สำนักหอสมุดกลาง_พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา

โดย นางสาวรุ่งรัตน์ แซ่หยาง รหัส 36054339
นางสาวศศิพร โกมลเกษรักษ์ รหัส 36054344
นางสาวอาริสา ตรีสัตยาเวทย์ รหัส 36054363

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2539

ปว.
5633ก
2539
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 28151
วัน, เดือน, ปี 17 ก.ค. 2540

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Production of protease by fungi

Name	Miss Rungrat	Sae-Yang	36054339
	Miss Sasiporn	Komongadluk	36054344
	Miss Arissa	Tresatayawed	36054363

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of

Bachelor of Science Department of Applied Biology Faculty of Science

King Mongkut ' s Institute of Technology Ladkrabang

Academic year 1996

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา		
โดย	นางสาวรุ่งรัตน์	แซ่หยาง	รหัส 36054339
	นางสาวศศิพร	โกมลเกษรักษ์	รหัส 36054344
	นางสาวอาริสา	ตรีสัตยาเวทย์	รหัส 36054363
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์		
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์อารี ฤทธิบูรณ์		

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... หัวหน้าภาค
(ผศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต)
คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

..... ประธานกรรมการ
(ผศ. อรไท สุขเจริญ)

..... กรรมการ
(อาจารย์อารี ฤทธิบูรณ์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ดวงใจ โอชัยกุล)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากเชื้อรา
โดย	นางสาวรุ่งรัตน์ แซ่หยาง รหัส 36054339
	นางสาวศศิพร โกมลเกษรักษ์ รหัส 36054344
	นางสาวอาริสา ตรีสัตยาเวทย์ รหัส 36054363
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์อารี ฤทธิบูรณ์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2539

บทคัดย่อ

การทดสอบการใช้แป้ง เป็นวัตถุดิบเพื่อการทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ทดสอบโดยการเลี้ยงเชื้อราทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus usamii* *Rhizopus oligosporus* และ *Actinomucor elegans* ซึ่งใช้วิธีเลี้ยงเชื้อแบบอาหารเหลวนำมาเลี้ยงที่สภาวะเริ่มต้นเดียวกัน คือ บ่มที่อุณหภูมิห้อง พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4 และปริมาณสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 10^7 สปอร์/มล. พบว่ามีเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.876 ยูนิตต่อมิลลิลิตร คือเชื้อ *Aspergillus usamii* .

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *Aspergillus usamii* ในอาหารเหลวเมื่อใช้แป้งความเข้มข้น 0,5,10และ20 พบว่าความเข้นข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด คือที่ความเข้นข้น 10 กรัม/ลิตร ซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่า 0.591 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการศึกษาที่เอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอช 4,5,6,และ7 พบว่า พีเอชเริ่ม ต้นที่เหมาะสมเท่ากับ 7 โดยในค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.648 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการศึกษาของแหล่งไนโตรเจนโดยให้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานใช้ยีสต์สกัด 3 กรัม/ลิตร ร่วมกับเปปโตน 10 กรัม/ลิตร สูตรของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ทดสอบคือ ยีสต์สกัด 10 กรัม/ลิตร เปปโตน 10 กรัม/ลิตร เคซีน 10 กรัม/ลิตร และใช้เคซีน 10 กรัม/ลิตร ร่วมกับเปปโตน 3 กรัม/ลิตร ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด คือ ยีสต์สกัดซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับ 1.066 ยูนิตต่อมิลลิลิตร.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Production of rotease by fungi
Name	Miss Rungrat Sae-Yang
	Miss Sasiporn Komolkadluk
	Miss Arissa Tresatayawed
Special Project Advisor	Mrs.Aree Rittiboon
Department	Applied Biology
Acadaemic	1996

Abstract

Processing as testing raw material in searching for C-Source by the method of inoculated 3 kinds of fungi such as *Aspergillus usamii* , *Rhizopus oligosporus*, *Actinomucor elegans* in submerge culture starting within the same circumstances such as room temperature , same pH value as 4 and spore formation is quantitatively as 10^7 spore/ml. . The result found that more growth activity fungi and produce enzyme protease with the level of enzyme activity process up to 0.876 U/ml. is *Aspergillus usamii.*

Another study of circomstances for the production of producing enzyme by protease *Aspergillus usamii* in submerged culture condeteons with a pH of 4 and 3 gm/l of yeast extrack as N_2 source, found that the concentration wf Carbon was 10 mg/l, giving a peak activity of 0.591 u/ml. the activity was are to 0.648 u/ml by increasing the pH to 7 , and was further increased to 10.066 u/ml by increasing the N_2 source yeast extract, to 10 g/l.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณอาจารย์อารี ฤทธิบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำแนะนำในการค้นคว้าวิจัยและการเขียนโครงงานพิเศษฉบับนี้ รวมทั้งการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณผศ. อรไท สุขเจริญและอาจารย์ดวงใจ โอชัยกุล คณะกรรมการโครงงานพิเศษที่ช่วยในการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพรักยิ่ง ขอขอบพระคุณทุก ๆ ท่าน ที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษามาตลอด รวมถึงมีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

รุ่งรัตน์ แซ่หยาง
ศศิพร โกมลเกษรักษ์
อาริสา ตรีสัตยเวทย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	
สารบัญรูป	
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	2
1. ลักษณะที่สำคัญของโปรติเอส	2
2. ประเภทของโปรติเอส	5
3. สมบัติทั่วไปของเปปซิน	14
4. การวิเคราะห์กิจกรรมของโปรติเอส	16
5. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิต เอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา	17
บทที่ 3 วัตถุประสงค์	21
บทที่ 4 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	22
วัสดุ	22
จุลินทรีย์	22
อุปกรณ์	22
1. การวิเคราะห์	23
2. วิธีการ	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 ผลการทดลองและวิจารณ์	27
1. การคัดเลือกชนิดของเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพื่อใช้แบ่งเป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับอาหารสูตรพื้นฐาน	27
2. ศึกษาสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *Aspergillus usamii*	28
บทที่ 6 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	45
เอกสารอ้างอิง	46
ภาคผนวก	48
ก. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์	49
ข. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน	50
ค. วิธีการวิเคราะห์	51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตัวอย่างเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อ R_1 และ R_2	3
2	ลำดับกรดอะมิโนรอบอนุมูลกรดอะมิโนจำเป็น (รอบซิสเตอีนและฮิสติดีน)	9
3	องค์ประกอบของรำข้าวเจ้า	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์	2
2	ลักษณะโครงสร้างของ L-amino acid และ D-amino acid	3
3	โครงสร้างของไคโมทริปซิโนเจน	8
4	กลไกการทำงานของแอลฟาไคโมทริปซิน	8
5	ปฏิกิริยาการทำ เคมิคัลโมดิฟิเคชั่นของปาเปนด้วยไดโบรโมอะซิโตน	11
6	สูตรโครงสร้างของสับสเตรทสังเคราะห์คาร์บอกซิเปปติเดส เอ	13
7	ปฏิกิริยาของเรนินกับแคปปาเคซีน	15
8	ความจำเพาะในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในอินซูลินด้วยเรนิน(R,r) และ เปปซิน (P,p) ตัวอักษรเล็กแสดงการย่อยสลายช้า ส่วนตัวอักษรใหญ่แสดงการย่อยสลายเร็ว	15
9	กลไกการทำงานของเปปซิน	16
10	ปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนอิสระทำปฏิกิริยากับนินไฮเดรต	17
11	ลักษณะเชื้อ *Aspergillus usamii* ในอาหารวุ้นเอียง	25
12	ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนการทดสอบ	26
13	แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสโดยจุลินทรีย์ต่างชนิดกันในอาหารสูตรพื้นฐาน	28
14	แสดงค่าพีเอชโดยจุลินทรีย์ต่างกันในอาหาร สูตร	29
15	ลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
16	แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสต่างกันในอาหารที่ใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน	31
17	แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน	33
18	แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในสภาวะที่ใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน	34
19	แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่พีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน	35
20	แสดงค่าพีเอชหลังการทดสอบที่พีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน	36
21	แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ใช้แหล่งไนโตรเจนสูตรแตกต่างกัน	37
22	แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชที่ใช้แหล่งไนโตรเจนสูตรแตกต่างกัน	39
รูปผนวกที่		หน้า
ค1	กราฟมาตรฐานแสดงความเข้มข้นของไทโรซีนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

โปรติเอสเป็นเอนไซม์ตัวหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างมากในอุตสาหกรรมที่ใช้จุลินทรีย์ในกระบวนการผลิต เอนไซม์กลุ่มนี้มีความสำคัญในการทำลายโมเลกุลของโปรตีนโดยการไฮโดรไลซิสพันธะเปปไทด์ การนำไปใช้ประโยชน์ไม่เพียงนำแต่ไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเท่านั้นยังสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนังและอุตสาหกรรมซักล้างอีกด้วย

โปรติเอสคือกลุ่มของเอนไซม์ซึ่งย่อยโปรตีน เช่น เปปซิน ทริปซิน อีริปซิน ไคโมทริปซิน คาร์บอกซีเปปทิเดส ไดเปปทีเดส คาทิปซิน และปาเปอีน ผลสุดท้ายของการย่อยจะได้กรดอะมิโน เอนไซม์โปรติเอสหรือโปรติเนสเป็นไฮโดรไลติกเอนไซม์ที่ทำลายพันธะอาจเรียกเอนไซม์พวกนี้ว่า เปปทีเดส ซึ่งได้แก่ เปปซินซึ่งได้มาจากกระเพาะ ทริปซิน และอีริปซินในน้ำย่อยอาหารภายในลำไส้เล็ก

ไฮโดรไลติคเอนไซม์ คือเอนไซม์ที่กระตุ้นให้สารตั้งต้นรวมกับน้ำแล้วทำให้อณูของสารตั้งต้นนั้นสลายออกไป เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสขึ้น

อุตสาหกรรมทั่วไปในประเทศไทยส่วนใหญ่จะมีการนำเข้าเอนไซม์และผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์เพื่อใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต เพราะฉะนั้นจึงเป็นสิ่งสำคัญในการพัฒนาเทคโนโลยีในการผลิตโปรติโอไลติคเอนไซม์เพื่อให้คุ้มค่าและเหมาะสมทางด้านเศรษฐกิจและเพื่อสำรวจคุณสมบัติและการนำไปใช้อีกด้วย (Singh,A.,Ghosh,P. 1994.)

ในการศึกษานี้นำไปสู่การพัฒนาและหาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมของขบวนการที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสโดยใช้เชื้อสายพันธุ์ต่างๆที่ต้องการคัดเลือก

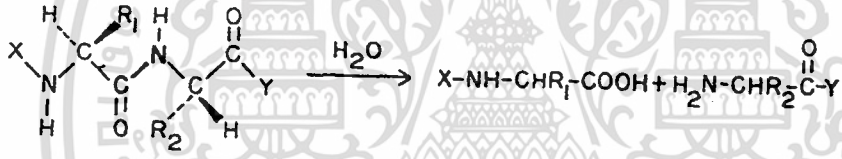
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

1.ลักษณะที่สำคัญของโปรติเอส

โปรตีเอสมีชื่อสามัญหลายชื่อ ได้แก่ เปปติเดส โปรติเอส โปรติเนส เปปไทด์ไฮโดรเลส และเอนไซม์โปรติโอไลติค มีลักษณะปฏิกิริยาดังนี้ คือ สลายพันธะเปปไทด์ - C - NH- ด้วยน้ำ ดังปฏิกิริยารวม



รูปที่ 1 ปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์

รายละเอียดของปฏิกิริยาอธิบายได้เป็นลำดับดังนี้

1. ความจำเพาะต่อสับสเตรท

1.1 ลักษณะธรรมชาติของ R_1 และ R_2

โดยให้ R_1 และ R_2 เป็นอนุมูลของกรดอะมิโน 2 ชนิดที่มาทำให้เกิดพันธะเปปไทด์ 12 พันธะ หรืออีกนัยหนึ่ง R_1 และ R_2 ก็คือ สายโซ่ (side chain) ของโปรตีน ดังนั้นถ้าโปรติเอสตัวใดมีความจำเพาะต่อ R_1 แสดงว่าเอนไซม์นั้นเข้าตัดพันธะเปปไทด์โดยเข้าทางปลายอะมิโน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(N-terminal) โดยที่ R_2 นั้นจะเป็นอะไรก็ได้ ดังแสดงตัวอย่างในตารางที่ 1 และในกรณีที่โปรติเอสมีความจำเพาะต่อ R_2 ก็แสดงว่าเอนไซม์นั้นเข้าตัดพันธะเปปไทด์ในโปรตีน โดยเข้าทางปลายคาร์บอกซิล (C-terminal)

ตารางที่ 1 ตัวอย่างเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อ R_1 และ R_2

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

1.2 ลักษณะด้านรูปพรรณสัณฐานภายนอก (configuration) ของอนุมูลกรดอะมิโน (R_1, R_2) เป็น D- หรือ L-

โปรติเอส จะมีความจำเพาะต่อชนิดของ R_1 และ R_2 และรูปพรรณสัณฐานภายนอกด้วยคือโครงรูปจะต้องเป็น L-amino acid เท่านั้นดังแสดงในรูปที่ 2 ทั้งนี้ปกติแล้วโปรตีนจะประกอบด้วย L- amino acid เท่านั้น

รูปที่ 2 ลักษณะโครงสร้างของL-amino acid และ D-amino acid

1.3 ขนาดของสารประกอบที่เป็นสับสเตรท

โปรติเอสโดยทั่วไปไม่มีความจำเพาะต่อดของสับสเตรท ยกเว้นโปรตีเอสที่เป็นกรด (acid protease) ที่มีความจำเพาะต่อขนาดของสับสเตรท ตามรูปที่ 1 แสดงสับสเตรทของแอลฟาไคโมทริปซินและทริปซิน ซึ่งจะเห็นว่าสับเสเตรททั้ง 2 ชนิดมีขนาดไม่เท่ากัน แต่มีอนุมูลของกรดอะมิโน (R_1) ที่สอดคล้องกับความเจาะจงของเอนไซม์ และอนุมูลของกรดอะมิโนนั้นเป็น L-form

1.4 ลักษณะธรรมชาติของหมู่ X และ Y (H^+ และ OH^-)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีนทั่วไปจะมีหมู่ X เป็น H^+ และหมู่ Y เป็น OH^- แต่เมื่อโปรตีนนั้น ๆ มีหมู่ X และ หมู่ Y เปลี่ยนไปจะมีผลทำให้ความจำเพาะของเอนไซม์เปลี่ยนไป กล่าวคือเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อหมู่ X และ Y จะบ่งชี้ลักษณะการตัดสายของโพลีเปปไทด์ คือ

1.4.1)เอนโดเปปติเดส

เป็นโปรตีนที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์อย่างอิสระ (randomly) ภายในสายโปรตีน ทั้งนี้ต้องให้จำเพาะโดยตรงต่อ R_1 และ R_2 ด้วย จึงจะตัดพันธะเปปไทด์ได้ ถ้า R_1 และ R_2 ไม่สอดคล้องกับความจำเพาะของเอนไซม์นั้น การตัดพันธะเปปไทด์จะไม่เกิดขึ้น และจะให้แอคติวิตีสูงสุด ถ้า X และ Y เป็นหมู่อนุพันธ์ไม่ใช่ H^+ , OH^- กล่าวคือ X อาจเป็นเอซิลกรุ๊ป (acyl group) เช่น อะเซติล , เบนโซล , เบนซิลออกซีคาร์บอนิล เป็นต้น และ Y เป็นเอไมด์ (amide) กลุ่มเ อสเทอร์ หรืออะมิโนแอซิดเรซิดิว (amino acid residues)

1.4.2)เอกโซเปปติเดส

เป็นโปรติเอสที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์จากปลายสายของโปรตีน จะเป็นปลายด้านไหนก็ต้องสอดคล้องต่อความจำเพาะของเอนไซม์ต่อ R_1 หรือ R_2 ดังอธิบายไว้ในข้อ 1.1 กล่าวคือ

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

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

1.4.2.1)คาร์บอกซีเปปติเดส (C-terminal splitting)

เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีชื่อเรียกตามระบบว่า เปปติดิลอะมิโนแอซิด-ไฮโดรเลส(Peptidyl-amino-acid hydrolase) ลักษณะที่สำคัญมีดังนี้มีความเจาะจงสับสเตรทที่มี R_2 และ Y = OH^- และ X = อะไรก็ได้คือH^+ หรือ อนุพันธ์ และจะตัดพันธะเปปไทด์โดยเข้าจากปลายคาร์บอกซิล (Y = OH^-) เพื่อให้แอคติวิตีสูงสุดพบว่า X ต้องเป็นอนุพันธ์ที่ไม่ใช่ H^+

1.4.2.2)อะมิโนเปปติเดส (N-terminal splitting)

เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีชื่อเรียกตามระบบว่าแอลฟาอะมิโนเอซิลเปป-ไทด์ไฮโดรเลส (∝-amino-acyl-peptide hydrolase) , EC 3.4.1.X ลักษณะที่สำคัญมีดังนี้ มีความเจาะจงสับสเตรทที่มี R_1 และ X = H^+ , และ Y = อะไรก็ได้ คือ OH^- หรืออนุพันธ์ และจะตัดพันธะเปปไทด์โดยเข้าสู่สายจากปลายอะมิโน (X = H^+) ไปเรื่อย ๆ ตามความเจาะจง R_1 เพื่อให้แอคติวิตีสูงสุดพบว่า Y ไม่ควรเป็น OH^- ควรจะเป็นปนุพันธ์อื่น ๆได้แก่ ลิวซีน อะมิโนเปปติเดส

1.4.2.3) ไดเปปติเดส (ไดเปปไทด์ไฮโดรเลส , EC 3.4.3.X)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีความเจาะจงสับสเตรทที่มีหมู่ X และ Y เป็น H^+ และ OH^- เหมือนไดเปปไทด์ทั่วไป และมีความเจาะจงแบบ N-terminal มากกว่า C-terminal สามารถตัดพันธะเปปไทด์ได้ทั้งในสับสเตรทที่เป็นไดเปปไทด์ (A-A) และ ไตรเปปไทด์ (A-A-A)

1.4.2.4) ไตรเปปติเดส

เหมือนไดเปปติเดส แต่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์เฉพาะในไตร-เปปไทด์เท่านั้น

1.5 ความต้องการพันธะเปปไทด์

โปรติเอสส่วนใหญ่จะย่อยสลายพันธะอื่น ๆ ที่มาแทนพันธะเปปไทด์ได้ดีกว่าพันธะเปปไทด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพันธะเปปไทด์ที่ถูกแทนที่ด้วยหมู่ต่าง ๆ เช่น หมู่เอไมด์ ($-NH_2$) เอสเทอร์ (-COOR) ไทโอเลสเทอร์ (-COSR) หรือ ไฮดรอกซาเมท (-CONHOH) แสดงว่าเอนไซม์เหล่านี้มีความจำเพาะต่ออนุมูล R_1 มากกว่า R_2 และกรณีของพวกเปปซินและแอซิดโปรติเอสที่มีความจำเพาะต่ออนุมูล R_2 นั้น พบว่าถ้าพันธะเปป-ไทด์ถูกแทนที่ด้วยพันธะอื่น ๆ ดังกล่าวมาแล้ว สับสเตรทนั้นก็จะไม่เป็นสับสเตรทของเปปซินและแอซิดโปรติเอส มีรายงายว่าไคโมทริปซินสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ได้เป็น 200-1000 เท่า ถ้าพันธะเอไมด์ในแอลฟาเอนอะเซติล-แอล-ไทโรซินาไมด์ (∝-N-Acetyl-L-tyrosinamide) เปลี่ยนเป็น พันธะจากหมู่เอสเทอร์(-COOR)

2. ประเภทของโปรติเอส

แบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม ตามกลไกการทำงาน

2.1 เซอรีนโปรติเอส (อัลคาไลน์โปรติเอส พีเอช 6.7-9)

เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่

1. ตระกูลไคโมทริปซิน (แอลฟา เบตา และแกมมาไคโมทริปซิน EC. 3.4.4.5)
2. ไคโมทริปซินบี (EC .3.4.4.6) และไคโมทริปซินซี
3. ทริปซิน (EC. 3.4.4.4)
4. อีลาสเตส (แพนครีเอโตเปปติเดส เอนไซม์ EC.3.4.4.7)
5. ทรอมบิน (EC.3.4.4.13)
6. ซับติลิซิน (ซับติโลเปปติเดส เอ . EC.3.4.4.16)
7. แอลฟาไลติคโปรติเอส จาก *Sorahgium* sp.

สมบัติที่สำคัญ

1. เอนไซม์เหล่านี้มีสมบัติเหมือนกัน คือถูกยับยั้งโดยไดไอโซโพรพิลฟอสโฟฟลูโอริเดท (DEP , diisopropylphosphofluoridate) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิล (OH^-)ของอนุมูลเซริล (seryl residue) ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ กล่าวอีกนัยหนึ่งคือ มีอนุมูลเซริลอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่บริเวณเร่ง เอนไซม์ที่มีหมู่เซริลอยู่ที่บริเวณเร่งที่ไม่ใช่โปรติเอสก็มี เช่น ฟอสโฟกลูโคไมเตส อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

2. มีหมู่อิมิดาโซล (imidazole) อยู่ที่บริเวณเร่ง

3. เอนไซม์ทั้งหมดเป็นพวกเอนโดเปปติเดส

4. เป็นพวกอัลคาไลน์เปปติเดส มี พีเอชที่เหมาะสมต่อแอคติวิตี ที่พีเอชมากกว่า 7 (pH 7-11)

5. โดยทั่วไปจะมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่อนุมูลกรดอะมิโนเป็น R_1 ดังนี้

เอนไซม์	ความจำเพาะ (R_1)
แอลฟาไคโมทริปซิน โบวิน	Tyr , Phe , Trp
ไคโมทริปซิน บี โบวิน	Tyr , Phe , Trp
ทริปซิน โบวิน	Lys , Arg
ทรอมบิน โบวิน	Lys , Arg
อีลาสเตส โบวิน	Ala
แอลฟาไลติกโปรติเอส *Sorangium* sp.	Tyr , Phe , Trp
ซับติลิซิน *B . subtilisin Carlsberg*	Tyr , Phe , Trp

เอนไซม์ที่มีต้นกำเนิดจากแหล่งเดียวกัน คือ จากตับอ่อน (pancreas) จะมีกลไกการทำงานคล้ายกัน ได้แก่ ไคโมทริปซิน ทริปซิน และ อีลาสเตส ส่วน ซับติลิซิน และแอลฟาไลติกโปรติเอสซึ่งพบในจุลินทรีย์จะมีสมบัติคล้ายกับแอลฟาไคโมทริปซินมีความจำเพาะต่อสับสเตรทเหมือนกันแต่แหล่งที่พบต่างกัน

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

6.1) ตับอ่อนของควาย (Bovine pancreas) ผลิตโปรตีน หรือไซโมเจน (zymogen) ซึ่งอยู่ในรูปของโปรตีนที่ไม่แสดงปฏิกิริยาจนกว่าจะมีการกระตุ้นด้วยการย่อยสลายแบบจำกัด (limited hydrolysis) ด้วยเอนไซม์ก่อนแล้วจะได้เอนไซม์ที่ไวต่อปฏิกิริยา ไซโมเจนทั้ง 2 ชนิด ที่ถูกสร้างโดยตับอ่อนควายนี้คือ ไคโมทริปซิโนเจน เอ และบี มีค่า ไอโซอิเลคตริกพอยน์ (isoelectric point) ต่างกันคือ เอ มีค่า 8.5 ส่วน บี มีค่า 4.5 ซึ่งเมื่อถูกไฮโดรไลซ์จะได้เอนไซม์ 2 ชนิด คือ ไคโมทริปซิน เอ และ บี

6.2) ตับอ่อนของหมู (Porcine pancreas) ผลิตไคโมทริปซิโนเจน เอ บี และ ซี แล้วถูกกระตุ้นด้วยทริปซินเกิดเป็นเอนไซม์ เหมือนกรณีที่กล่าวมาคือได้ไคโมทริปซินโนเจน เอ บี และ ซี ไคโมทริปซิน ซี มีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่ลิวซิลไซด์เชน (leusyl side chain) มากกว่าสับสเตรทพวกอะโรมาติกเรซิดิว (aromatic residue) เช่น ไทโรซิน ฟีนิลอะรานิน และทริปซิน

7. กระบวนการกระตุ้นของไคโมทริปซิโนเจน เอ เกิดเป็น แอลฟาไคโมทริปซินมีดังนี้

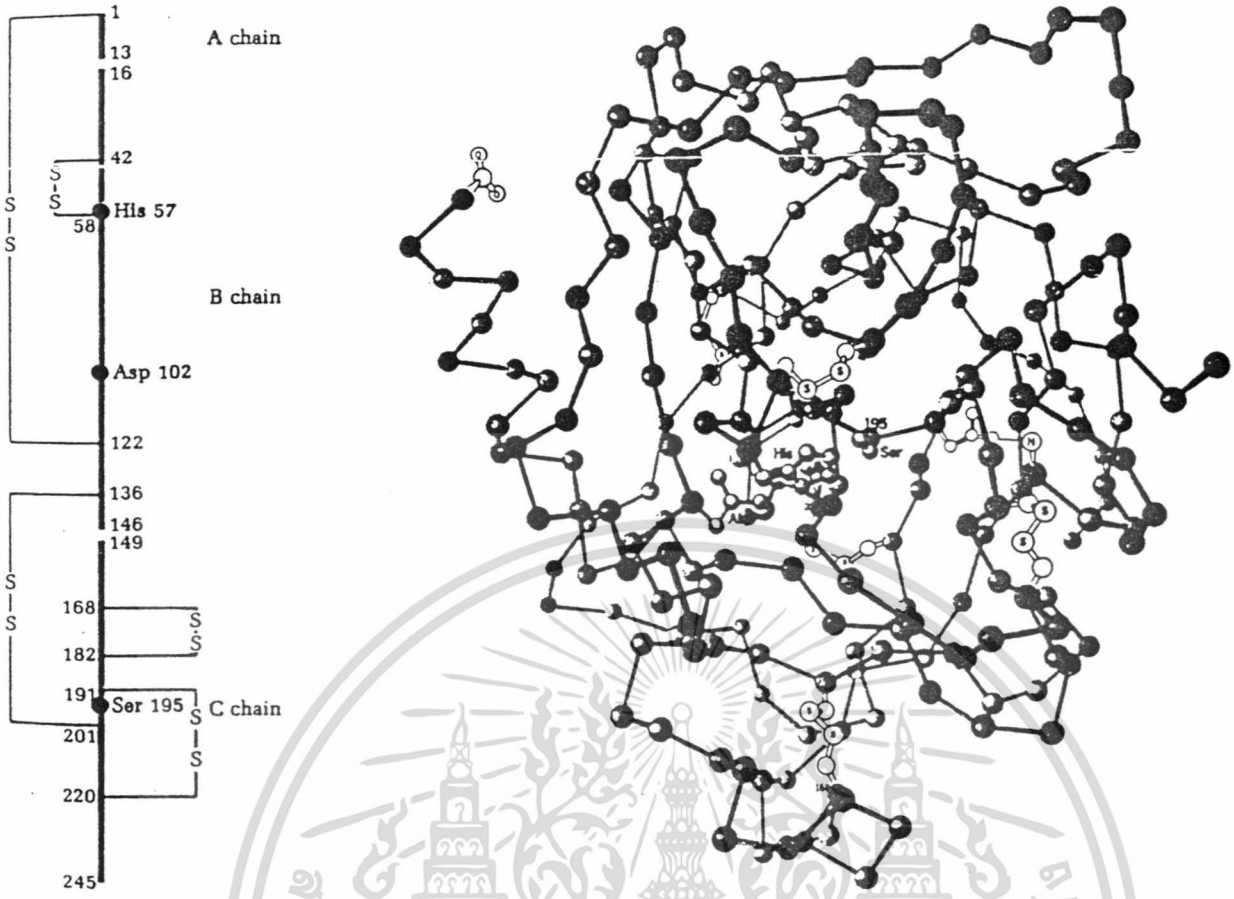
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไคโมทริปซิโนเจน เป็นโปรเอนไซม์หรือไซโมเจนที่ถูกสร้างขึ้นในตับอ่อนไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ แต่ต้องถูกกระตุ้นให้เป็นเอนไซม์ที่มีความว่องไวต่อปฏิกิริยาด้วยการย่อยสลายอย่างมีขีดจำกัด (limited hydrolysis) ด้วยทริปซิน ซึ่งในการกระตุ้นนี้ ทริปซินจะตัดพันธะเปปไทด์ที่ต่อระหว่างอนุมูลกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 13 - 16 และ ไคโมทริปซินอีกโมเลกุลหนึ่งจะไปตัดพันธะเปปไทด์ที่อนุมูลตำแหน่งที่ 146 - 149 จนกระทั่งได้เอนไซม์ที่เรียกว่าแอลฟาไคโมทริปซิน ซึ่งประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ 3 สาย (รูปที่ 3) การตัดที่จุดทั้ง 2 ดังกล่าวจะทำให้เกิดฮิสติดีน 57 แอสปาราจีน 102 และ เซอรีน 195 สามารถเคลื่อนเข้ามาอยู่ใกล้กัน และเกิดรวมเป็นบริเวณเร่ง (active site) ซึ่งจะจับกับสับสเตรทและเร่งการสลายพันธะเปปไทด์ ดังรายละเอียดในข้อ 8

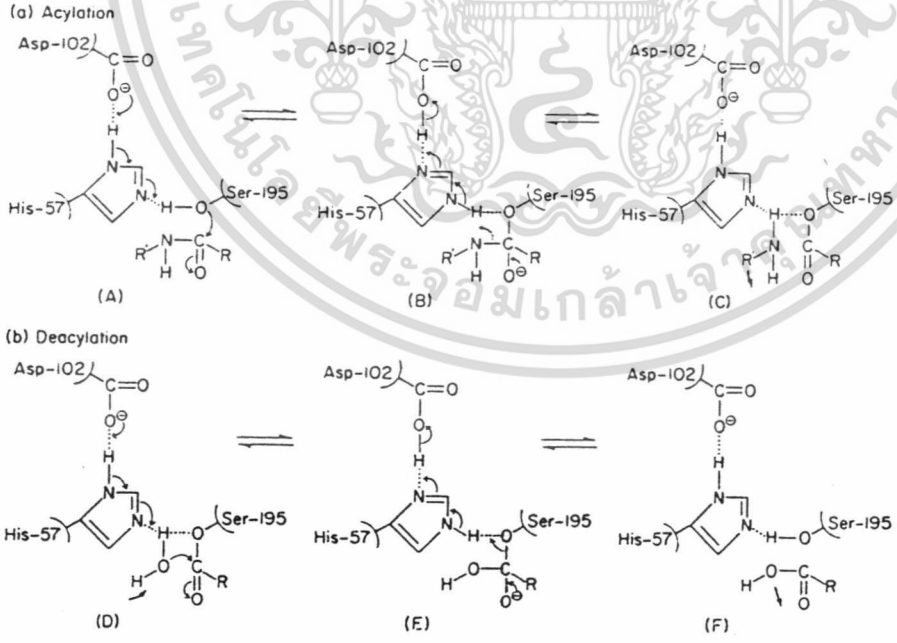
8. กลไกการทำงานของแอลฟาไคโมทริปซิน

ตามรูปที่ 4 จะเห็นว่า เซอรีน 195 จะทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเลกตรอนคู่ (nucleophile) และ ฮิสติดีน 57 หรือหมู่อิมิดาโซล จะทำหน้าที่เป็นโปรโตเนท (protonate) หรือ เบสทั่วไป จะสังเกตเห็นได้ว่า เรซิดิวที่บริเวณเร่งจะมีส่วนเกี่ยวข้องโดยตรงในระหว่างการเร่งการสลายตัวของสับสเตรท แต่เมื่อได้ผลผลิตของปฏิกิริยาแล้ว เรซิดิวเหล่านี้ก็จะกลับคืนสู่สภาพเดิมพร้อมที่จะจับกับสับสเตรทตัวใหม่ต่อไป ($E + S \leftrightarrow ES \rightarrow E + P$) กล่าวคือ เริ่มด้วย หมู่อิมิดาโซลของ His 57 จะทำหน้าที่เป็นตัวโปรโตเนท คือแยกโปรตรอนออกจากหมู่ไฮดรอกซิลของ Ser 195 และ Ser 195 จะทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไฟล์โดยออกซิเจนของเซอรีนจะไปปะทะกับหมู่คาร์บินิลของสับสเตรท (ที่พันธะเปปไทด์) ทำให้ได้ผลผลิตคือ R_1 หลุดออกไปก่อน และมีส่วนที่เหลือเป็นเอซิลเอนไซม์ (acyl-enzyme) คือการเติมหมู่เอซิลของสับสเตรทให้กับเอนไซม์ จากนั้นเอซิลเอนไซม์จะเข้าสู่ขั้นตอนดีเอซิลเรชัน (deacylation) เพื่อแยกหมู่เอซิลออกไปจากเอนไซม์ โดยเริ่มจากหมู่อิมิดาโซล ทำหน้าที่เป็นเบสทั่วไปที่จะแยกโปรตรอน (H^+) จากโมเลกุลน้ำ ทำให้เกิดการกระตุ้นให้อิออนของไฮดรอกซิล (OH^-) ไปปะทะกับหมู่คาร์บอนิลของเอซิลเอนไซม์ (รูป ดี) ผลที่ได้ทำให้เกิดการหลุดของผลผลิตตัวที่ 2 และอนุมูลของเอนไซม์กลับสู่สภาพเดิม (รูป อีและเอฟ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 โครงสร้างของไคโมทริปซิโนเจน



รูปที่ 4 กลไกการทำงานของแอลฟาไคโมทริปซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ซัลไฟดริลโปรติเอส (Sulfhydryl Protease , - SH group)

เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีน และจะถูกยับยั้งโดยสารที่เรียกว่าซัลไฟดริลรีเอเจนต์ (sulfhydryl reagents) หรือ ซัลไฟดริลกรุ๊ป (sulfhydryl group) หรือ กลุ่มไธออล (- SH) ทำให้หมู่อนุมูลซัลไฟดริลที่บริเวณเร่งได้รับความกระทบกระเทือนอาจสูญเสียแอคติวิตีไปในที่สุด จึงเรียกเอนไซม์กลุ่มนี้ว่า ซัลไฟดริลโปรติเอส เอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้เป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์บางชนิดดังนี้

ปาเปน (Papain , EC 3.4.4.10) จากมะละกอ (papaya)

ฟิซิน (Ficin , EC 3.4.4.12) จากมะเดื่อ (fig)

โบรมิเลน (Bromelain , EC 3.4.4.24) จากสับปะรด

Streptococcus protease (*Streptococcus* protease A , EC 3.4.4.18)

เอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด แตกต่างกันตามลำดับกระอะมิโนรอบอนุมูลกรดอะมิโนจำเป็นในบริเวณเร่ง คือ ซิสเตอีนและฮิสติดีน ตามตารางที่ 2

สมบัติของซัลไฟดริลโปรติเอส

1. เป็นนิวทรอลโปรติเอส (neutral protease) มีพีเอชที่เหมาะสมอยู่ที่พีเอช 6-7.5
2. ถูกยับยั้งด้วยซัลไฟดริลรีเอเจนต์หรืออีกนัยหนึ่งมี -SH ในบริเวณเร่ง
3. เป็นเอนโดเปปติเดส
4. ปาเปนและฟิซินจะไฮโดรไลซ์สับเสตรทที่มี แอล-อาร์จินิน (L-arginine) แอล-ไลซีน (L-lysine) ไกลซีน (glycine) และ แอล-ซิตรูลิน (L-citrulline) ด้วยประสิทธิภาพเท่ากัน แต่ประจุบวกในอนุมูลอาร์จินินและไลซีนไม่จำเป็นต้องเชื่อมที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ เพราะสับสเตรทที่มีอนุมูลไกลซีนและซิตรูลินสามารถเชื่อมกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ ได้อย่างแน่นพอดีอยู่แล้ว

ตารางที่ 2 ลำดับกรดอะมิโนรอบอนุมูลกรดอะมิโนจำเป็น (รอบ ซิสเตอีน และ ฮิสติดี) ในบริเวณเร่งของ ซัลไฟดริลโปรติเอส

Bromelain, stem	-Asn-Gln-Asp-Pro-Cys-Gly-Ala-Cys*-Trp-
Papain	-Pro-Val-Lys-Asn-Gln-Gly-Ser-Cys-Gly-Ser-Cys*-Trp-
Ficin	-Pro-Ile-Arg-Gln-Gln-Gly-Gln-Cys-Gly-Ser-Cys*-Trp-
Proteinase, streptococcal[b]	-Ser-Phe-Val-Gly-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His-Cys*-Val-
Bromelain, stem	-His*-Ala-Val-Thr-Ala-Ile-Gly-Tyr-
Papain	-Val-Gly-Pro-Cys-Gly-Asn-Lys-Val-Asp-His*-Ala-Val-Ala-Ala-Val-Gly-Tyr-
Ficin	-Thr-Gly-Pro-Cys-Gly-Thr-Ser-Leu-Asp-His*-Ala-Val-Ala-Leu-
Proteinase, streptococcal[b]	-Gln-Ala-Ala-Thr-Gly-His*-Cys-Val-Ala-Thr-Ala-Thr-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.ปาเปนเป็นซัลไฟดริลโปรติเอสที่ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว ประกอบด้วยกรดอะมิโน 212 กรดอะมิโน และมีมวลโมเลกุล 23,900 ที่บริเวณเร่งมีอนุมูลซิสเตอิน ฮิสติดีน หรือ แอสปาราจีน ลักษณะที่สำคัญของปาเปนคือ

5.1) กลุ่มซัลไฟดริลมีบทบาทสำคัญต่อบริเวณเร่งดังนี้

5.1.1 เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีเมื่อหมู่ซัลไฟดริลเปลี่ยนแปลง

5.1.2 ผลจากสเปกโตรโฟโตเมทรี พบว่าเอซิลเอนไซม์อินเตอร์มิเดียท (acyl-enzyme intermediate) เป็น ไธโอเลสเตอร์ (Thiolester , E-S-C-R) หรืออีกนัยหนึ่งคือมี -SH ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์

5.1.3 จากค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์มีค่า pK = 8.3 , ΔH_{ion} = 5.1 กิโลแคลอรี/โมล ดังนั้นอนุมูลกรดอะมิโนควรเป็น -SH (ซิสเตอีน)

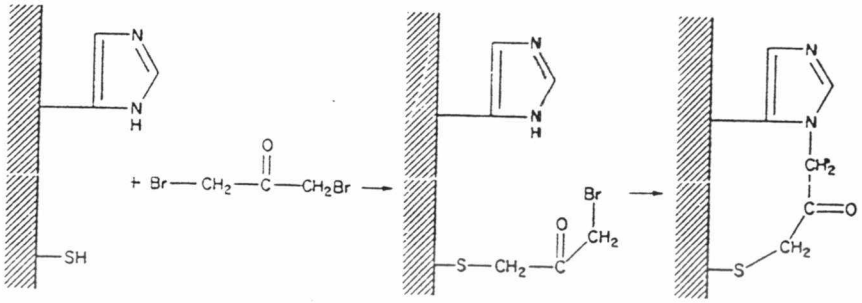
5.2) มีกลุ่มอื่นมีบทบาทสำคัญร่วมต่อบริเวณเร่งดังนี้ อาจเป็นหมู่คาร์บอกซิล (แอสปาราจีน) และหมู่อิมิดาโซล (ฮิสติดีน) อย่างใดอย่างหนึ่ง หรือทั้ง 2 อย่าง ขึ้นกับการเปลี่ยนโครงร่าง 3 มิติในระหว่างการเชื่อมจับกับโมเลกุลของสับสเตรท ซึ่งก็ได้ผลการวิเคราะห์ดังนี้

5.2.1 วิเคราะห์ค่า pK = 4 และ ΔH_{ion} = 0 กิโลแคลอรี/โมล แสดงว่าควรจะเป็นหมู่คาร์บอกซิล

5.2.2 พิจารณาจากผลการทดลองด้านเอกซ์เรย์ดิฟแฟรคชัน (X-ray diffraction) พบว่าหมู่คาร์บอกซิลที่ใกล้ที่สุด (แอสปาราจีน 158) จะห่างจากหมู่ซัลไฟดริล (ซิสเตอีน) ประมาณ 7.5 อังสตรอม ระยะห่างดังกล่าวอาจจะยาวเกินไปที่จะทำหน้าที่ร่วมกับซิสเตอีน ส่วนหมู่อิมิดาโซล (ฮิสติดีน 159) ห่างจากหมู่ซัลไฟดริลประมาณ 4.5 อังสตรอม ดังนั้นฮิสติดีน 159 ควรเป็นกลุ่มที่มีบทบาทร่วมกับซิสเตอีนได้มากกว่า แอสปาราจีน 158 เพราะระยะต่างกันถึง 3 อังสตรอม (7.5-4.5 = 3 ^{o}A) เว้นไว้แต่ว่ามีการเปลี่ยนบริเวณเร่งที่เกาะกับสับสเตรท

5.2.3 พิจารณาผลการทำเคมิคัลโมดิฟิเคชัน (chemical modification) ของเอนไซม์ใช้ไบฟังก์ชันนอลเอเจนต์ (bifunctional agent) ซึ่งมีอยู่ 2 หมู่ทำหน้าที่เดียวกัน ได้แก่ ไดโบรโมอะซิโตน (dibromoacetone) ตามรูปที่ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 ปฏิกิริยาการทำ เคมิคัลโมดิฟิเคชันของปาเปนด้วยไดโบรโมอะซิโตน

2.3 เมทัลคอนเทนนิ่งโปรติเอส (metal-containing protease)

หมายถึง โปรติเอสที่มีอิออนของโลหะรวมในโมเลกุลเอนไซม์ หรือร่วมใน ปฏิกิริยาการย่อยสลาย กล่าวคือ อยู่ในลักษณะของโคแฟคเตอร์ ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้คือ

1. คาร์บอกซิเปปติเดส เอ (เปปติดิลแอลอะมิโนแอซิดไฮโดรเลส (peptidyl-L-amino acid hydrolase , EC 3.4.2.1)) คาร์บอกซิเปปติเดส บี (เปปติดิลแอลไลซีนไฮโดรเลส (peptidyl-L-lysine hydrolase , EC 3.4.2.2)) เป็นเอกโซเปปติเดสตัดสายด้านปลายหมู่คาร์บอกซิล ต้องการอิออนของโลหะ คือ Zn^{+2}

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

3. คาร์โนซิเนส (amino-acyl-L-histidine hydrolase , EC 3.4.3.3)ย่อยสลายสับสเตรทพวก เบต้าอะลานิลแอลฮิสติดีน (β-alanyl-L-histidine) เป็นพวกไดเปปติเดส ต้องการ Zn^{+2}

4. ลิวซีนอะมิโนเปปติเดส (L-leucyl-peptide hydrolase , EC 3.4.1.1) ต้องการ Zn^{+2} เป็นพวกอะมิโนเอซิลเปปไทด์ไฮโดรเลส (N-terminal) ได้ผลผลิตเป็นแอลลิวซีน

5. โปรลิเดส (amino-acyl-L-proline hydrolase , EC 3.4.3.7) เป็นไดเปปติเดสซึ่งไฮโดรไลซ์ไดเปปไทด์ซึ่งมีโปรลีน (proline) หรือไฮดรอกซีโปรลีน (hydroxyproline) ต้องการ Mn^{+2} ได้ผลผลิตที่มีอนุมูลของปลายคาร์บอกซิล

6. อิมิโนไดเปปติเดส (L-prolyl-amino acid hydrolase , EC 3.4.3.6) เป็นไดเปปติเดสซึ่งไฮโดรไลซ์ไดเปปไทด์ซึ่งมีโปรลีนหรือไฮดรอกซีโปรลีน ต้องการ Mn^{+2} เหมือนโปรลิเดสแต่มีความจำเพาะต่างกัน ผลผลิตที่ได้เป็นอนุมูลของปลายอะมิโน

สมบัติทั่วไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. เป็นเอกโซเปปติเดสเกือบทั้งหมด

2. เป็นเอนไซม์ ที่มีช่วงปฏิกิริยาของ พีเอช เป็นกลาง (พีเอช 6.5 - 7.5) เรียก นิวทรัลโปรติเอส

3. เนื่องจากมีอิออนของโลหะร่วมในปฏิกิริยา ถูกยับยั้งด้วยสารจับอิออนของโลหะ (metal-chelating agents) เช่น 1,10-phenanthroline , EDTA

ตัวอย่างเอนไซม์

คาร์บอกซิเปปติเดส เอ , บี

- แหล่งที่พบ

ตับอ่อน (pancreas) จะผลิตโปรคาร์บอกซิเปปติเดสซึ่งมีมวลโมเลกุล 80,000 ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ 3 สาย ซึ่งสารโปรเอนไซม์นี้จะถูกกระตุ้นด้วยทริปซินให้เกิดเป็น คาร์บอกซิเปปติเดส เอ มีมวลโมเลกุลเหลือเพียง 34,500 นอกจากนั้นแล้วในตับอ่อนยังสามารถผลิตโปรเอนไซม์อื่นที่เปลี่ยนเป็นคาร์บอกซิเปปติเดส บี โดยทั้ง เอ และบี มีกลไกปฏิกิริยาคล้ายกัน

สมบัติของคาร์บอกซิเปปติเดส เอ และ บี

1. มีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่มีหมู่คาร์บอกซิลอิสระตรงปลาย หรืออีกนัยหนึ่ง Y = OH^- ส่วน X อาจเป็น H^+ หรือหมู่อื่น ๆ ในกรณีของคาร์บอกซิเปปติเดส เอ และบี จะมีความจำเพาะต่างกัน คือ :

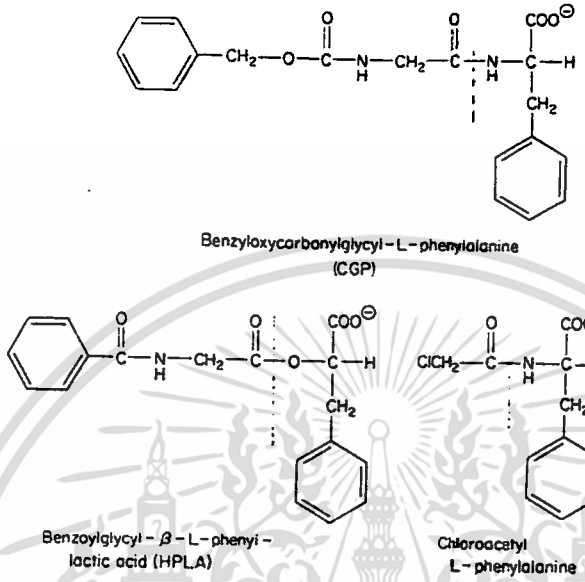
คาร์บอกซิเปปติเดส บี จำเพาะต่อสับสเตรทที่มีพันธะเปปไทด์ที่มีหมู่อนุมูลคาร์บอกซิลที่ปลายเป็นอาร์จินินหรือไลซีน ส่วนคาร์บอกซิเปปติเดส เอ นั้น จะต่างออกไป คือเป็นอนุมูลฟีนิลอลานีน และอนุพันธ์ดังรายชื่อตัวอย่างของสับสเตรทในรูปที่ 6

2. มี Zn^{+2} ที่บริเวณเร่ง และสามารถแทนได้ด้วยไดวาเลนท์เมทัลอิออน (divalent metal ions) อื่น ๆ เช่น Co^{+2} , Ni^{+2} , Pb^{+2} แต่อย่างไรก็ตามระดับแอคติวิตีที่ปรากฏของเอนไซม์จะแตกต่างกัน เมื่ออิออนของโลหะในบริเวณเร่งนี้ ถูกแยกออกไปด้วยสารจับโลหะ เช่น 1,100 phenanthroline จะได้เมทัลฟรีโปรตีน (metal-free protein) ซึ่งไม่มีคุณสมบัติของเอนไซม์ แต่ก็ยังสามารถเชื่อมพันธะเปปไทด์ของสับสเตรทได้

2.4 แอซิดโปรติเอส (Acid protease)

หมายถึง โปรติเอสที่มีช่วงพีเอชของการทำปฏิกิริยาการย่อยสลายอยู่ในช่วงพีเอชของกรด (พีเอช น้อยกว่า 7) โดยทั่วไปเอนไซม์ในกลุ่มนี้มีช่วงพีเอชเหมาะสมระหว่างพีเอช 2-4 และไม่แสดงซัดเจนถึงอนุมูลกรดอะมิโนที่มีบทบาทในบริเวณเร่ง อย่างไรก็ตามแต่จากการพิจารณาของ pH activity profile ของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ ชี้ให้เห็นว่ามีหมู่คาร์บอกซิลมากกว่า 1 หมู่ อยู่ในบริเวณเร่ง ตัวอย่างเอนไซม์ได้แก่ เรนนิน และ เปปซิน เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 6 สูตรโครงสร้างของสับสเตรทสังเคราะห์คาร์บอกซิเปปติเดส เอ

2.4.1) เรนนิน (Rennin)

ชื่อสามัญ คือ ไคโมซิน (chymosin) และเรนนิน (EC 3.4.4.23) เคยมีผู้เสนอให้เรียกไคโมซินเพื่อป้องกันการสับสนกับเรนิน (renin) ซึ่งเป็นเอนไซม์จากไตแต่ไม่ใช่โปรติเอส เรนนินมีชื่อทางการค้าซึ่งเรียกกันทั่วไปจนหลายคนมักจะนำมาใช้เป็นชื่อสามัญ คือ เรนเนต (Rennet) เรนนินเป็นเอนไซม์ที่มีต้นกำเนิดมาจากกระเพาะส่วนที่ 4 ของลูกวัวระยะไม่หย่านม (suckling calf) โดยจะปล่อยออกมาในรูปของไซโมเจน เรียกว่า โปรเรนนิน (prorennin) ที่พีเอช 2.47 มีมวลโมเลกุล 5,300 แต่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยทริปซินเป็นเรนนิน จะมีมวลโมเลกุลเพิ่มขึ้นเป็น 31,000 ประกอบด้วยสารโพลีเปปไทด์หลายสายมาต่อกันด้วยพันธะเชื่อมขวางของพันธะไดซัลไฟด์ (-S-S-) การพัฒนาเอนไซม์จะเปลี่ยนไปตามธรรมชาติของการย่อยอาหารของสิ่งมีชีวิต เมื่อลูกวัวโตขึ้นอาหารจะค่อย ๆ เปลี่ยนจากนมเป็นหญ้า เมล็ดข้าว กล่าวอีกนัยหนึ่งคือ เปลี่ยนแหล่งโปรตีนจากนมเป็นพืช ดังนั้นเรนนินจะหมดความจำเป็นในการใช้ย่อยอาหาร เรนนินจะค่อย ๆ ลดลง และมีเปปซินเพิ่มขึ้นมาแทนให้สอดคล้องกับชนิดของอาหารใหม่ที่มาแทน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมบัติทั่วไปของเรนนิน

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

2. มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ระหว่าง Phe_{105} - $Meth_{106}$ ของโปรตีนนม (เคซีน) ซึ่งเดิมแขวนลอยอย่างคงตัวในนมในลักษณะคอลลอยด์ที่คงตัว เมื่อโปรตีนนมถูกตัดสายพันธะเปปไทด์ทำให้คอลลอยด์ไม่เสถียร โปรตีนจะแยกตัวออกมาเป็นตะกอน ผลผลิตที่เกิดจากการย่อยสลายคือ พารา-แคปปา-เคซีน (para-kappa-casein) หรือเคซีนสายสั้น (ดังรูปที่ 7) ไม่มีสมบัติของคอลลอยด์ พร้อมที่จะจับกับอิออนของแคลเซียม (Ca^{+2}) ที่มีอยู่ในน้ำนม เกิดเป็นตะกอนลิ่มนมที่ไม่ละลายน้ำ ในอุตสาหกรรมเนยแข็งมีการนำส่วนของตะกอนลิ่มนมไปสู่กระบวนการผลิตเนยแข็งด้วยกรรมวิธีเฉพาะของผลิตภัณฑ์

2.4.2) เปปซิน (Pepsin)

เปปซิน พบทั่วไปในน้ำย่อย (gastric juice) ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง และประกอบด้วยสารโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว ซึ่งมีกรดอะมิโนจำนวน 321 กรดอะมิโน และมีมวลโมเลกุล 35,500

สมบัติทั่วไปของเปปซิน

1. มีความเสถียรที่พีเอช 2.5 ถ้าต่างกว่านี้กิจกรรมจะลดลงเนื่องจากเกิดการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน และมีพีเอลที่เหมาะสมสำหรับโปรตีนทั่วไปเท่ากับ 2 และสำหรับสับสเตรทสังเคราะห์มีพีเอชที่เหมาะสมที่พีเอช 4

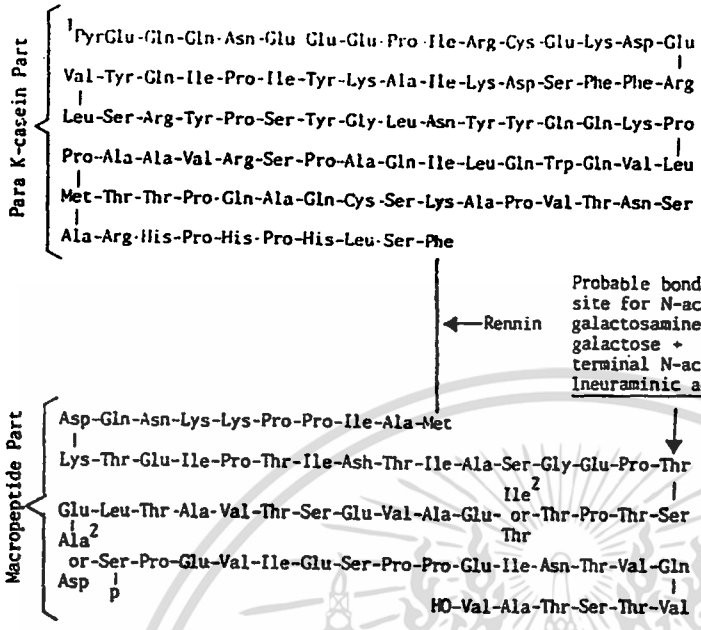
2. มีความจำเพาะต่ออนุมูลกรดอะมิโนเป็น ฟีนิลอลานีน ไทโรซีน และ ทริปโตเฟน (R_2) และพบว่ามีความชอบต่อการไฮโดรไลซ์อนุมูลกรดอะมิโนประเภทอะโรมาติกของสับสเตรท

เมื่อเปรียบเทียบการย่อยสลายโดยพันธะเปปไทด์ในอินซูลินด้วยเรนนินและเปปซิน ตามรูปที่ 7 สรุปว่าคล้ายกันมาก แต่เรนนินมีความจำเพาะค่อนข้างกว้างกว่าเปปซิน

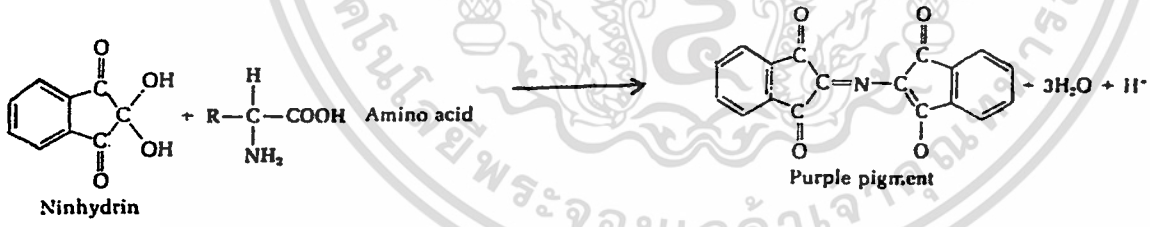
3. กลไกการทำปฏิกิริยาของเปปซิน

อธิบายประกอบรูปที่ 9 ซึ่งเอนไซม์ประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิล 2 หมู่ ทำหน้าที่เป็นโปรโตเนทฟอร์ม (protonated form) และ อิออไนซ์ฟอร์ม (ionized) ในบริเวณเร่ง หลังจากเกิดสารประกอบระหว่างเอนไซม์และสับสเตรท (ES complex) แล้ว ตามด้วยการปะทะของหมู่คาร์บอกซิลของเอนไซม์กับหมู่คาร์บอนิล (-C-) ของสารประกอบระหว่างเอนไซม์และสับสเตนทแบบนิวคลีโอฟิลิกแอทแทรค (nucleophelic attack) คือ ให้อิเลกตรอนคู่เกิด covalent tetrahedral intermediate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 7 ปฏิกิริยาของเรนนินกับแคปปาเคซีน



รูปที่ 8 ความจำเพาะในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในอินซูลิน ด้วยเรนนิน (R , r) และเปปซิน (P , p) ตัวอักษรเล็กแสดงการย่อยสลายช้า ส่วนตัวอักษณใหญ่แสดงการย่อยสลายเร็ว

คาร์บอนิลออกซิเจนของโปรโตคาร์บอกซิลกรุ๊ป จะเป็นตัวแยก H^+ (proton) จากการปะทะแบบอิเลกโตรฟิลิก (electrophilic) ของคาร์บอนิลคาร์บอนบนหมู่อะมิโน (-NH-) ของพันธะเปปไทด์ เกิด อะมิโน-เอซิล-เอนไซม์ อินเตอร์มิเดียท หรือ อะมิโน-เอนไซม์ อินเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิเดียท และ เอซิล-เอนไซม์ อินเตอร์มิเดียท โดยที่อินเตอร์มิเดียททั้งคู่นี้จะทำปฏิกิริยากับน้ำ ได้ผลผลิต 2 หมู่ คือ $R_1 - NH_2$ และ RCOOH

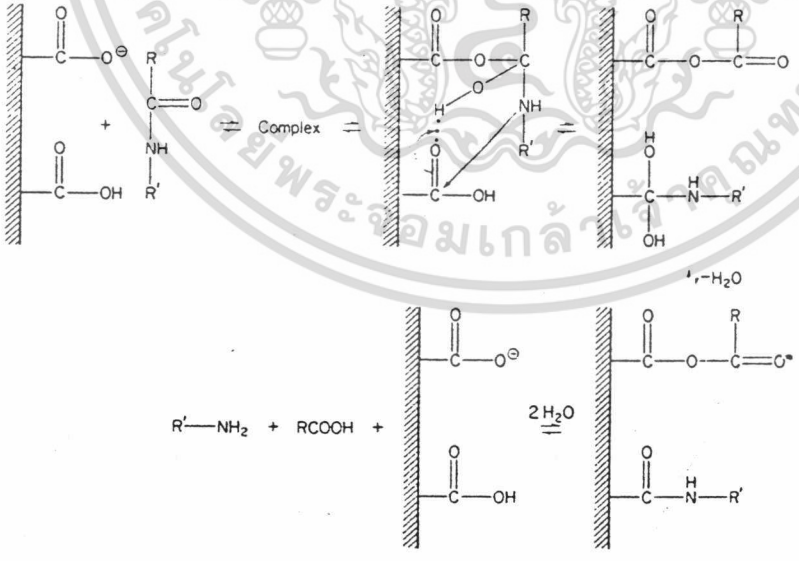
ปรากฏการณ์นี้แสดงให้เห็นการเกิดอะมิโน-เอนไซม์ อินเตอร์มิเดียท มากกว่าการเกิด เอซิล-เอนไซม์ อินเตอร์มิเดียท ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะการมีความจำเพาะของเปปซินต่อ R_2 กล่าวคือ มีต่อปลายด้านอะมิโน

3. การวิเคราะห์กิจกรรมของโปรติเอส

แบ่งวิธีวิเคราะห์ตามชนิดของสับสเตรทดังนี้

3.1 โปรตีนเป็นสับสเตรท มีวิธีการแตกต่างกัน 2 วิธี คือ

3.1.1) ประเมินจากผลผลิตของการทำปฏิกิริยา เช่น ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในตัวทำละลายต่าง ๆ เช่น ไตรคลอโรอะซิติกแอซิด (Trichloroacetic acid , TCA) , เปอร์คลอริกแอซิด (Perchloric acid) เป็นต้น ส่วนโปรตีนที่ใช้ได้แก่ เคซีน , ฮีโมโกลบินที่ผ่านการบำบัดด้วยกรดหรือยูเรีย (acid-หรือ urea- denatured hemoglobin) วัดปริมาณ TCA-soluble peptides คือส่วนของสารประกอบอะโรมาติกที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 (OD_{280}) แล้วประเมินค่าด้วยไทโรซีน (tyrosine) ในสารละลายปฏิกิริยา ปริมาณของไทโรซีนจะผันตามแอคติวิตีของเอนไซม์ ค่าที่วิเคราะห์นี้ไม่สามารถบอกจำนวนพันธะเปปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลซ์



รูปที่ 9กลไกการทำงานของเปปซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

3.1.2) ประเมินจำนวนพันธะเปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลซ์

ปริมาณของประอะมิโนอิสระ (free amino acid) ที่เป็นผลผลิต จะแปรผันโดยตรงกับจำนวนพันธะเปปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลซ์ โดยให้กรดอะมิโนอิสระทำปฏิกิริยากับนิน-ไฮดรินรีเอเจนต์ (ninhydrin reagent) ให้สีที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 (OD_{570}) เทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐานของลิวซีน ดังปฏิกิริยาในรูปที่ 10

3.2 สับสเตรทสังเคราะห์

ได้แก่สับสเตรทที่มีพันธะเอสเทอร์ เอไมด์ เปปไทด์ ในตำแหน่งพันธะเปปไทด์เดิม ใช้เพื่อพิจารณาความจำเพาะและกลไกทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

รูปที่ 10 ปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนอิสระทำปฏิกิริยากับนินไฮเดรต

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์จากเชื้อรา

1. แหล่งคาร์บอน

Sato (1982) พบว่าการผลิตเอนไซม์ โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae* และ *Aspergillus sojae* มักใช้ในอุตสาหกรรมเบียร์และปกติมักผลิตด้วยวิธีเพาะเลี้ยงแบบแห้งหรือแบบเปียก (Irie 1954) อย่างไรก็ตามทั้ง 2 ระบบก็ยังเกิดปัญหาบางประการ ยกตัวอย่างเช่น การเพาะเลี้ยงแบบแห้งจะเกิดการปนเปื้อนแบคทีเรียและแบบเปียกจะได้ผลของการผลิตต่ำมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

28151

การเพาะเลี้ยงแบบ Chemostat ที่รู้จักเป็นประโยชน์มากในการผลิตเอนไซม์ซึ่งได้มาจากการยับยั้งคาตาโบลิซึม (Catabolite) เพราะสารตั้งต้นที่เหลืออยู่ เช่น กลูโคส และ กรดอะมิโน ยังคงเหลืออยู่จากการรวมตัวกันที่ต่ำมาก อย่างไรก็ตาม กรปนเปื้อนแบคทีเรียเกิดขึ้นได้บ่อยตรุ้งในการปฏิบัติการที่ใช้เวลานาน ดังนั้น การเพาะเลี้ยงแบบ Chemostat จึงไม่ใช่ในอุตสาหกรรม ยิ่งไปกว่านั้นมีรายงาน 2-3 ชิ้นเร่งการผลิตเอนไซม์ต่อเนื่องใช้ ฟิลาเมนตัส (filamentous) ของเชื้อรา ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน เนื่องมาจากความยากในการเพาะเลี้ยง ยกตัวอย่าง เช่น หลอดที่ติดอยู่กับ reactors (เครื่องต้านไฟฟ้ากระแสสลับ) บ่อยครั้งที่ถูกอุดตันด้วยเส้นใยของรา

Yaichi Fukushima และ คณะ (1989) ได้รายงานการผลิตเอนไซม์ต่อเนื่อง โดยใช้สายพันธุ์ *Aspergillus oryzae* ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ Chemostat จำกัดคาร์บอนใน NaCl 10 % เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของ แบคทีเรีย

Drucker (1972) รายงานว่า การผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *Neurospora crassa* จะขึ้นอยู่กับการชักนำและยับยั้งกลูโคสในอาหาร

Heineken and O' Conor, 1972 และ Ferreo และคณะ (1996) พบว่า เคซีนเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในขณะที่กลูโคส กลีเซอรอล ซูโครส มอลโตสและไซโลส จะยับยั้งการสร้างเอนไซม์ถึงแม้ว่าจะมีการเจริญของเชื้ออยู่ก็ตาม และพบว่าการสร้างเอนไซม์โปรติเอสจะเกิดขึ้นในระยะการเจริญเฮกโปเนนเชียล (exponential phase) ช่วงท้ายและช่วงที่มีการเจริญคงที่ (stationary phase)

Farley และ Ikasari (1992) เลี้ยงเชื้อ *Rhizopus oligosporus* ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส (carboxyl proteinase) พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน เมื่อเติมกลูโคส 275 มิลลิโมลาร์ และแมกนีเซียมซัลเฟต 10.5 มิลลิโมลาร์ กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่า

ตารางที่ 3 องค์ประกอบของรำข้าวเจ้า

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. แหล่งไนโตรเจน

Bernerd L. Cohen และคณะ (1975) ศึกษารายละเอียดของลักษณะสำคัญที่เป็นกุญแจของความสัมพันธ์ของโปรติเอสหลักที่ผลิตออกนอกเซลล์ของ *Neurospora crassa* การ เตรียมรากฐานสำหรับการสังเคราะห์ทางชีวเคมี พันธุ์ศาสตร์ของโปรติเอสหลักที่ผลิตออกนอกเซลล์ ความสัมพันธ์ของทั้ง 2 ชนิดใน *N. crassa* นี้ สิ่งนี้แสดงให้เห็นว่า การทำงานร่วมกันของ เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด ต้องการการชักนำโดยโปรตีนที่เกิดจากภายนอกอวัยวะหรือร่างกาย จะถูกทำให้สมดุลย์ด้วยความว่องไวต่อการระงับสารเมตาโบไลซ์ที่เป็นอิสระต่อสภาวะของแหล่ง คาร์บอน ไนโตรเจนและซัลเฟอร์

3. พีเอช

พีเอชมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน การหมักในระยะแรกพีเอชของการเลี้ยงเชื้อเหมาะต่อการเจริญของเชื้อ แต่ระหว่างการหมักค่าพีเอชเปลี่ยนแปลง อาจเกิดการย่อยสลายโปรตีนและสารประกอบไนโตรเจน ทำให้มีการปลดปล่อยแอมโมเนียหรือสารที่เป็นด่างอื่นๆ ออกมา หรือมีการย่อยสลายสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเกิดกรดอินทรีย์ขึ้น เป็นผลให้ค่าพีเอชไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ จึงต้องมีการเติมสารที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อควบคุมให้ค่าพีเอชในอาหารเปลี่ยนแปลงอย่างช้าๆ บัฟเฟอร์จะไปรวมตัวกับกรดหรือด่างป้องกันไม่ให้ปล่อย H^+ หรือ OH^- ออกมา Wang และ Hesseltine (1965) อิทธิพลของพีเอชต่อการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์โปรติเอสมีจุดสูงสุดที่พีเอช 3 และสูงรองลงมาที่พีเอช 5.5 และกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำลงที่พีเอช 4-5 เนื่องจากข้อจำกัดในการละลายได้ของเคซีน.

Shinmyo และคณะ (1968) รายงานว่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในสภาพที่เป็นกรดเป็น 4.6 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ นอกจากนี้ Morimura และคณะ(1994) เลี้ยงเชื้อในน้ำทิ้ง พบว่าค่าพีเอชระหว่าง 3.5-5.0 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้นเมื่อค่าพีเอชสูงขึ้น และที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะเป็นร้อยละ 15 และร้อยละ 50 ตามลำดับของที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส .

Battaglino R.A. และคณะ (1991) การให้ความชื้นของสารตั้งต้นด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์และเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 4 เปอร์เซนต์ (ความเข้มข้นสุดท้าย) เมื่อพีเอชเริ่มต้นเพิ่มขึ้นถึง 6.9-7.2 พบว่าผลผลิตของเอนไซม์โปรติเอสจากรำข้าวสาลี: เปลือกข้าว เปลือกข้าว:รำข้าวและเปลือกข้าวสาลี: รำข้าวโพดจะเพิ่มขึ้นถึง 4000,7000 และ 4000 โปรติเอสยูนิต/กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. จำนวนสปอร์เริ่มต้น

Battaglino และคณะ (1991) ทดสอบจำนวนสปอร์เริ่มต้นของเชื้อในการผลิตเอนไซม์โปรติ-เอส(10^4,10^5 และ 10^6 สปอร์/ กรัมสับสเตรท) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปติเอสสูงสุดที่ 10^6 สปอร์/กรัมสับสเตรท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วัตถุประสงค์

<u>วัตถุประสงค์</u>

1. ศึกษาถึงศักยภาพของพันธุ์เชื้อราที่เก็บจากสถาบันวิจัยและเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ ต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากสายพันธุ์เชื้อราที่คัดเลือกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุ

วัตถุดิบ

- รำข้าวเจ้า
- รำข้าวสาลี

จุลินทรีย์

1. *Aspergillus usamii*
2. *Rhizipus oligosporus*
3. *Actinomucor elegans*

ซึ่งเชื้อราทั้ง 3 ชนิดนี้ได้มาจากสถาบันวิจัยและเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ เก็บรักษาเชื้อในหลอดอาหารวุ้นเอียง Potato Dextrose Agar (PDA) (ภาคผนวก ก) โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6-7 วัน เพื่อให้เกิดสปอร์เต็มที่(รูปที่ 11) แล้วเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถ่ายเชื้อทุก ๆ เดือน และนำสปอร์มาใช้ในการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแบบอาหารเหลว ประกอบไปด้วย

- กลูโคลิน 20 กรัมต่อลิตร
- เปปโตน 10 กรัมต่อลิตร
- KH_2PO_4 1 กรัมต่อลิตร
- ยีสต์สกัด 3 กรัมต่อลิตร

ปรับให้ได้ปริมาตร 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นและปรับค่าพีเอชให้เป็น 4 ด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง
2. เครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter)
3. เครื่องเขย่า (Shaker)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. เครื่องสเปรกโตโฟโตมิเตอร์

6. ฮีมาไซโตมิเตอร์และกล้องจุลทรรศน์

7. เครื่องเขย่าหลอด (Vortex)

8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

การวิเคราะห์

1. การนับจำนวนสปอร์ของเชื้อรา เจือจางตัวอย่างของเชื้อเริ่มต้นด้วยน้ำกลั่นที่ผสม Tween 80 เข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหยดตัวอย่างลงในฮีมาไซโตมิเตอร์ และนับจำนวนสปอร์จากกล้องจุลทรรศน์ ปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้ได้ 10^7 สปอร์/มิลลิลิตร

2. ค่าพีเอชเริ่มต้น นำอาหารเลี้ยงเชื้อ 75 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ปรับค่าพีเอชด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์

3. กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (ตามวิธีของ Battaglino R.A., et.al.1991)

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมลงใน 5 มิลลิลิตรของสารละลายแขวนลอยเคซีนและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติม 3 มิลิลิตรของ 30% ไตรคลอโรอซิติกแอซิด (TCA) เพื่อหยุดปฏิกิริยาและนำไปบ่มต่อที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนของแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร บันทึกผล

วิธีการ

1. การคัดเลือกชนิดของเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยการใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน

1.1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ(รูปที่ 12) คือ อาหารบาซาล-มิเดียม รำข้าวเจ้า รำข้าวสาลี และสารละลายแป้งตามลำดับ บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรและปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^7 โคนิดิโอสปอร์/มิลลิลิตร

1.2) เลี้ยงเชื้อราชนิดต่างๆในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ โดยปิเปตสารละลายของเชื้อเริ่มต้นที่มีความเข้มข้น 10^7 โคนิดิโอสปอร์/มิลลิลิตร ลงไป 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเขย่าที่ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 4 วัน โดยสุ่มสารละลายตัวอย่างทุกวัน ตัวอย่างละ 6 มิลลิลิตร และนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

2 . ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ปัจจัยต่างๆที่ศึกษามีดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1) ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

ศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนซึ่งคัดเลือกจากข้อ 1 แล้วโดยปรับค่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 0,5,10,15 และ20 ก/ล ตามลำดับ

2.2) ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ศึกษาผลของพีเอชโดยทำการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลือกแหล่งคาร์บอนแล้วจากข้อ1 ให้เป็น 4,5,6 และ7 ตามลำดับ

2.3) ชนิดของแหล่งไนโตรเจน

เปรียบเทียบชนิดของแหล่งไนโตรเจนสูตรต่างๆกับชุดควบคุมซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนอยู่ 2 ชนิด คือ ยีสต์สกัดปริมาณ 3 ก/ลและเปปโตนปริมาณ 10 ก/ล ส่วนสูตรอาหารที่ใช้เปรียบเทียบมีดังนี้

- สูตรอาหารที่ 1 ใช้ยีสต์สกัด 10 ก/ล
- สูตรอาหารที่ 2 ใช้เปปโตน 10 ก/ล
- สูตรอาหารที่ 3 ใช้เคซีน 10 ก/ล
- สูตรอาหารที่ 4 ใช้เคซีน 10 ก/ล และเปปโตน 3ก/ล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 11 ลักษณะของเชื้อ *Aspergillus usamii* ในอาหารวุ้นเอียง (PDA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 12 แสดงลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อก่อนการทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดลอง

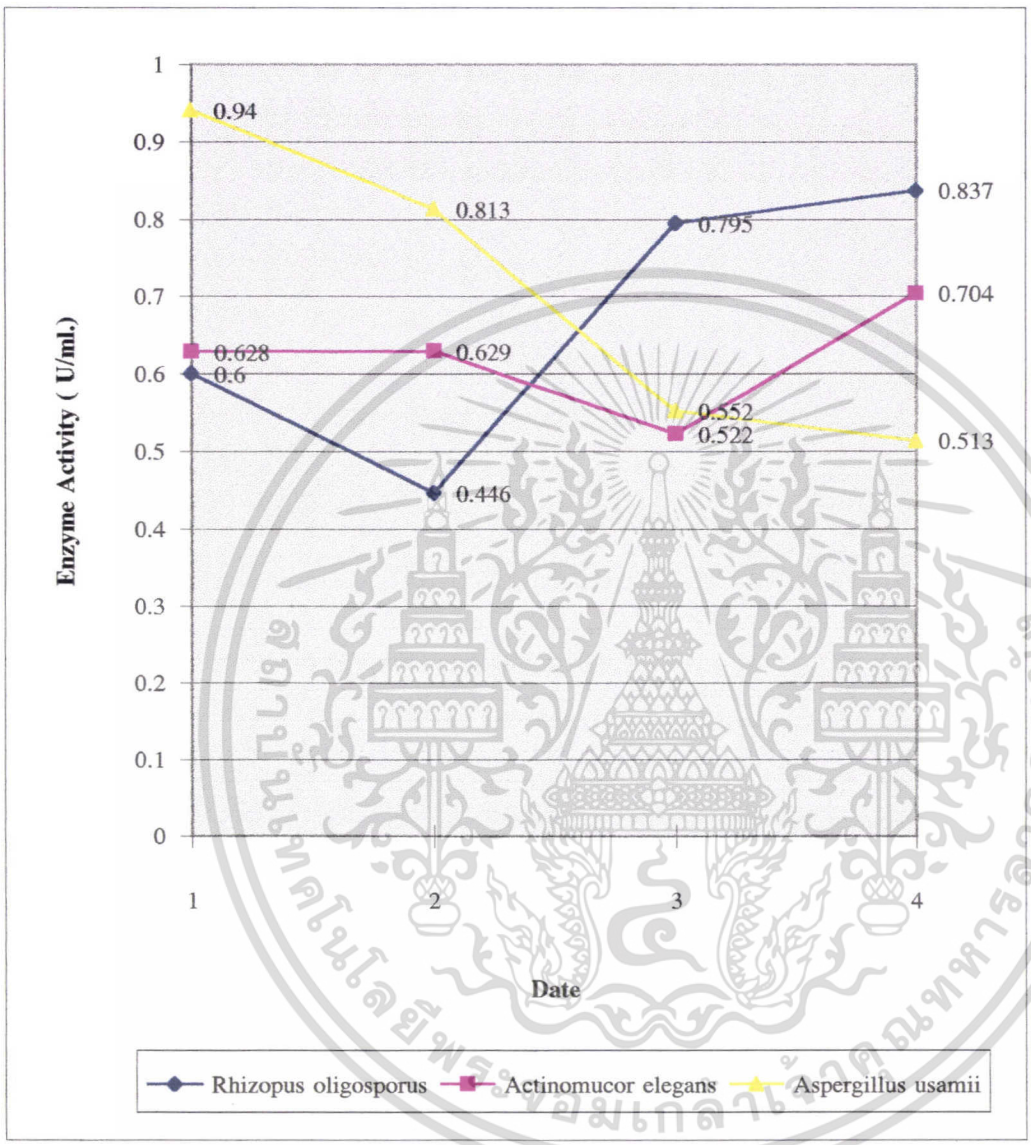
1.การคัดเลือกชนิดของเชื้อที่มีความสามารถเมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับอาหารสูตรพื้นฐานในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ผลของการเลี้ยงเชื้อรา 3 ชนิดได้แก่ *Aspergillus usamii* *Actinomucor elegans* และ *Rhizopus oligosporus* ในสภาพอาหารเหลวสูตรพื้นฐาน โดยใช้รำข้าวเจ้า รำข้าวสาลีและแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนแทนการใช้กลูโคลิน ทำการเพาะเลี้ยงและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 วัน และนำมาทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ พบว่าจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตรพื้นฐาน *Rhizopus oligosporus* *Actinomucor elegans* จะมีการผลิตเอนไซม์เอนไซม์สูงสุดในวันที่ 4 โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เป็น 0.873 และ 0.704 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ *Aspergillus usamii* จะมีการผลิตเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 1 โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.940 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รูปที่ 13 โดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าพีเอชค่อนข้างเป็นกรดอยู่ในช่วงประมาณ 4-5 (รูปที่ 14)

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อโดยการใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนลักษณะการเจริญของเชื้อแสดงให้เห็นดังรูปที่ 15 พบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้เป็น 1.007, 1.195และ 0.961 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากเชื้อ *Rhizopus oligosporus* *Actinomucor elegans* และ *Aspergillus usamii* ตามลำดับ (รูปที่ 16)

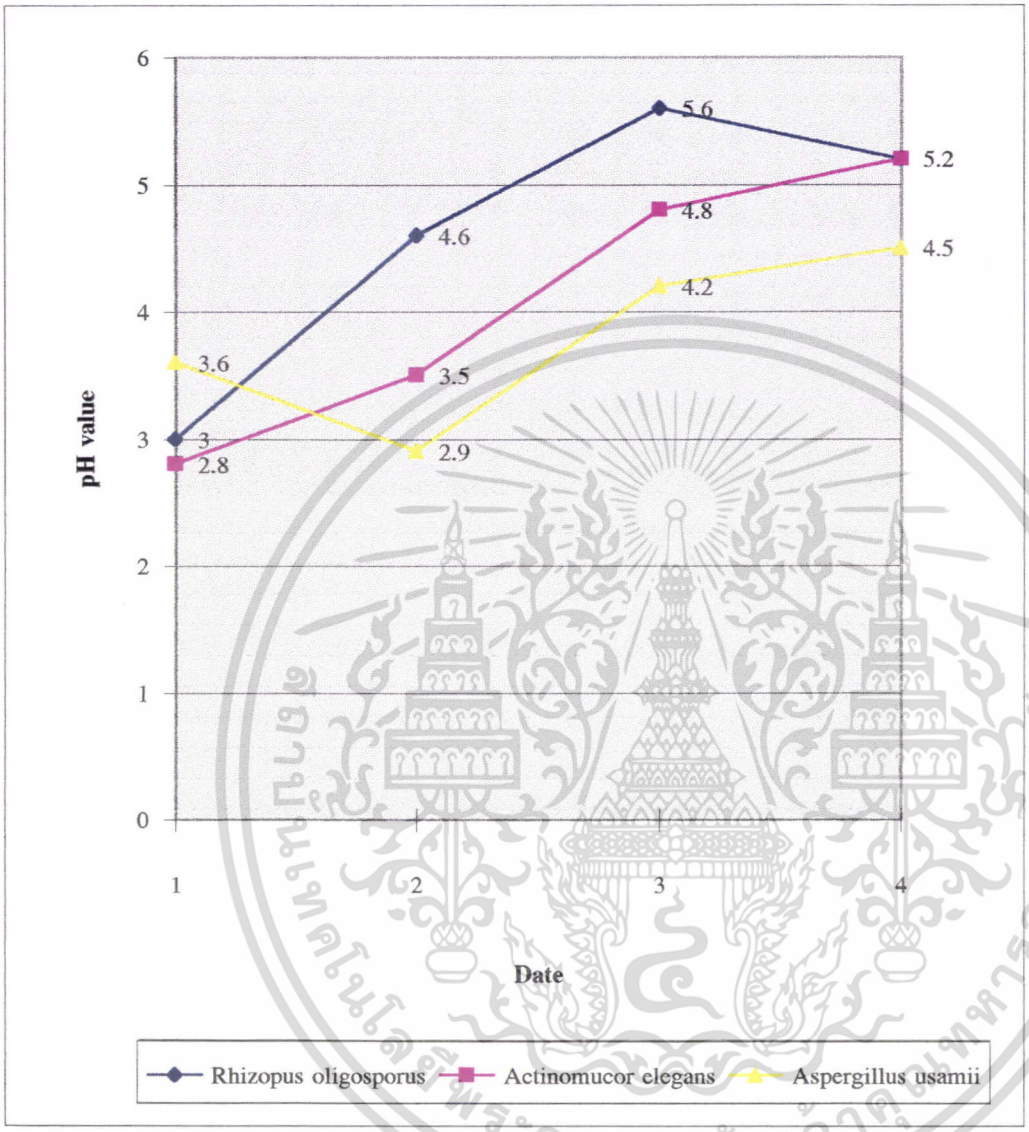
จากผลการทดลองที่ได้จึงเลือกใช้เชื้อ *Aspergillus usamii* แม้ว่าเชื้อ *Aspergillus usamii* นี้จะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์จากการใช้รำข้าวสาลีน้อยกว่าเชื้อ *Rhizopus oligosporus* แต่พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้มีค่าไม่แตกต่างกันมากนักและการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดในระยะเวลา 1 วัน ซึ่งใช้ระยะเวลาในการผลิตน้อยกว่าเชื้อชนิดอื่น ซึ่งจะผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ 4 วันนอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีลักษณะเป็นเพลเล็ต (pellet) สามารถเก็บสารละลายไปทดสอบได้ง่าย ในขณะที่เชื้อที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้รำข้าวเจ้าและรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น จะมีลักษณะเป็นก้อน เหนียว ขุ่น ข้นและหนืด ทำให้เป็นอุปสรรคในการเก็บสารละลายมาทดสอบ ผลการวิเคราะห์ที่ได้จึงไม่แน่นอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 13 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสโดยจุลินทรีย์ต่างกัน ในอาหารสูตรพื้นฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

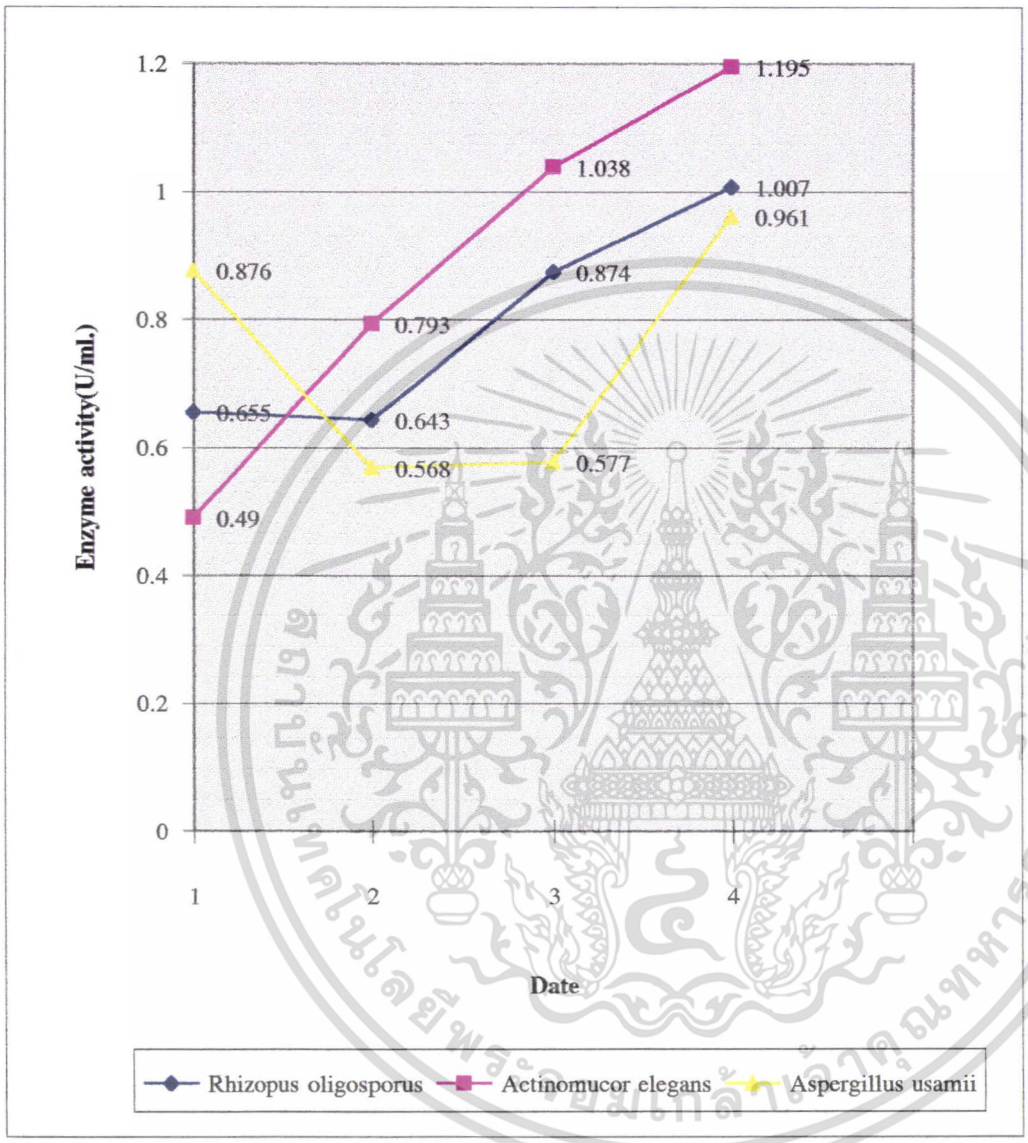


รูปที่ 14 แสดงค่าพีเอชโดยจุลินทรีย์ต่างกันในอาหารสูตรพื้นฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 15 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ปที่ 16 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสโดยจุลินทรีย์ต่างกันในอาหารที่ใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ศึกษาสภาวะและปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *Aspergillus usamii*

2.1 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (กรัม/ลิตร)

ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (ในที่นี้คือแป้งซึ่งคัดเลือกได้จากข้อ1) พบว่าในวันที่ 1 ของการทดสอบ จะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดและความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือ ความเข้มข้นที่ 10 กรัม/ลิตร ซึ่งให้ค่าเป็น 0.591 ยูนิต/มล. ในขณะที่ที่ความเข้มข้น 0 , 5 , 15 และ 20 กรัม/ลิตร จะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.053 , 0.055, 0.055 , 0.059 ยูนิต/มล. ตามลำดับ (แสดงดังรูปที่ 17) และจากการศึกษาค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการทดสอบควบคู่ไปด้วยนั้น พบว่าค่าพีเอชที่ได้จะลดลงหรือเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยและการเปลี่ยนแปลงพีเอชจะอยู่ในช่วง 5-6 (รูปที่ 18)

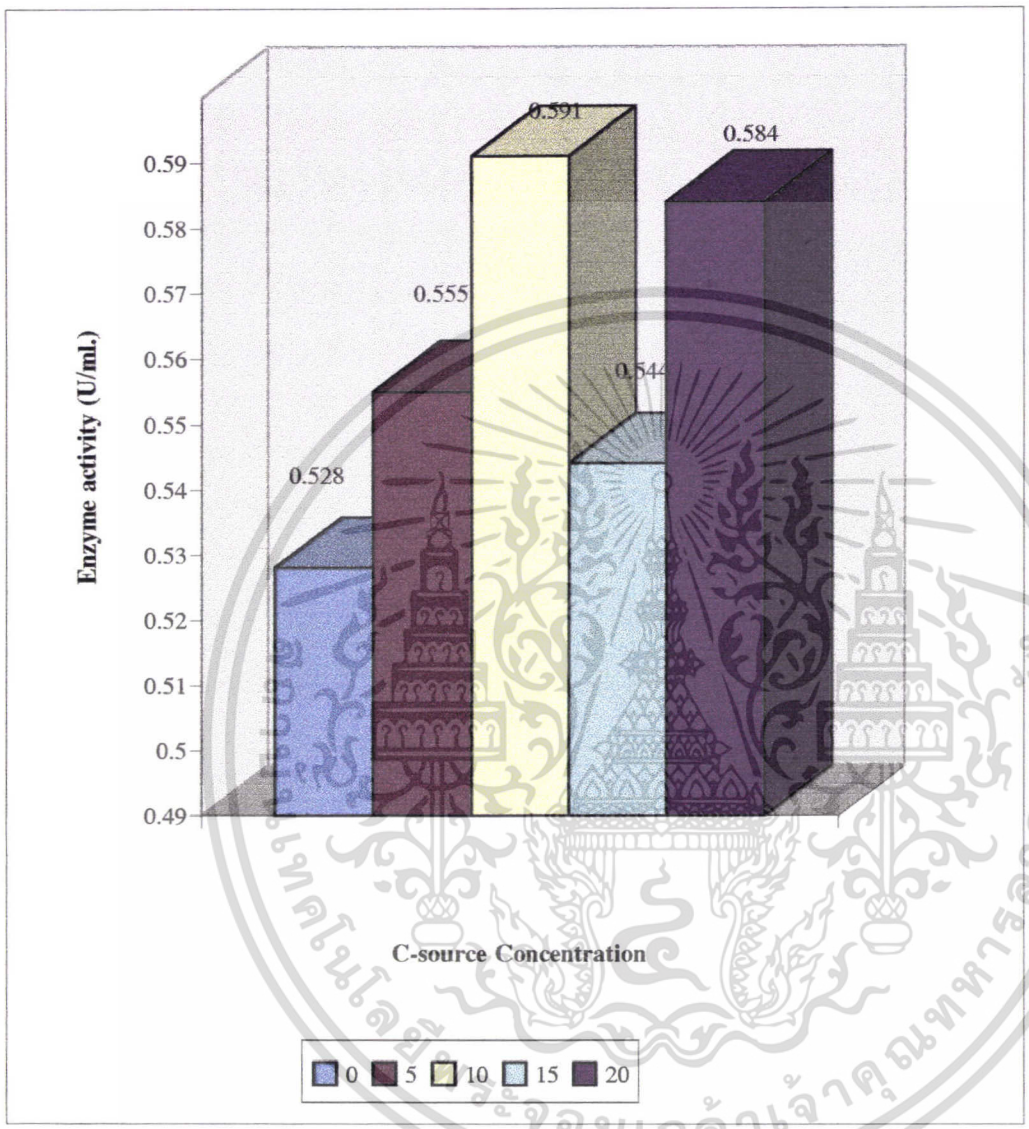
2.2 ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ผลของค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตเอนไซม์นั้น พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จะมีค่าใกล้เคียงกันในทุกค่าพีเอชเริ่มต้น โดยที่ค่าพีเอชเริ่มต้นที่ 7 จะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือ 0.648 ยูนิต/มล. ส่วนค่าพีเอชเริ่มต้นค่าอื่น ๆ คือ 4 , 5 และ 6 จะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือ 0.597 , 0.628 และ 0.643 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลที่ได้นี้ชี้ให้เห็นว่า กิจกรรมเอนไซม์จะมีค่าสูงขึ้นเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าพีเอชสูงขึ้น (รูปที่ 19)นอกจากนี้ยังพบว่าค่าพีเอชของอาหารระหว่างการทดสอบ เมื่อใช้พีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ กัน ซึ่งทำการทดสอบควบคู่ไปด้วยนั้น พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อไปได้ 1 วัน ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 7 จะมีค่าพีเอชของอาหารระหว่างการทดสอบเป็น 7.55 และที่พีเอชเริ่มต้นที่ 4 , 5 และ 6 จะมีค่าพีเอชของอาหารระหว่างการทดสอบเป็น 4.9 , 6.7 และ 7.1 ตามลำดับ(รูปที่ 20)ซึ่งจะเห็นว่าเมื่อค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารมีค่าสูงขึ้น ค่าพีเอชของอาหารระหว่างการทดสอบก็มีค่าสูงขึ้นด้วย จึงเป็นผลให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้มีค่าสูงขึ้นเช่นเดียวกัน

2.3 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

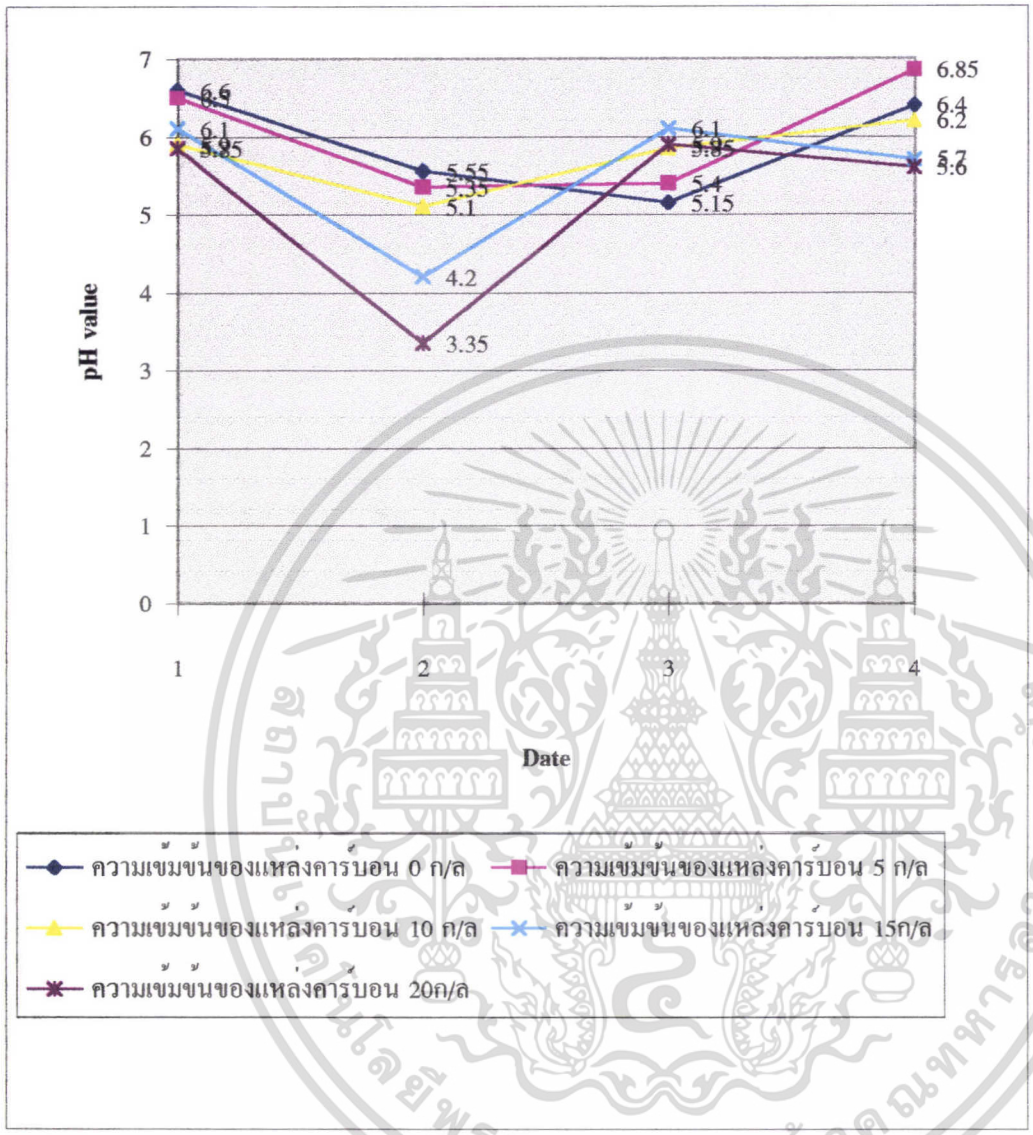
ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยใช้สูตรอาหาร 4 สูตรต่าง ๆ กัน และเปรียบเทียบผลที่ได้กับการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชุดสูตรควบคุมที่ใช้ ยีสต์สกัด 3 กรัม/ลิตร และ ใช้ เปปโตน 10 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน (รูปที่ 21) พบว่า วันที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดยังคงเป็นวันที่ 1 โดยที่การใช้สูตรอาหารที่ 1 ซึ่งใช้ยีสต์สกัดที่มีความเข้มข้น 10 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น จะให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ดีที่สุดซึ่งมีค่าเป็น 1.066 ยูนิต / มล. ส่วนการใช้สูตรอาหารที่ 2 , 3 และ 4 จะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เป็น 0.397 , 0.536 และ 0.65

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



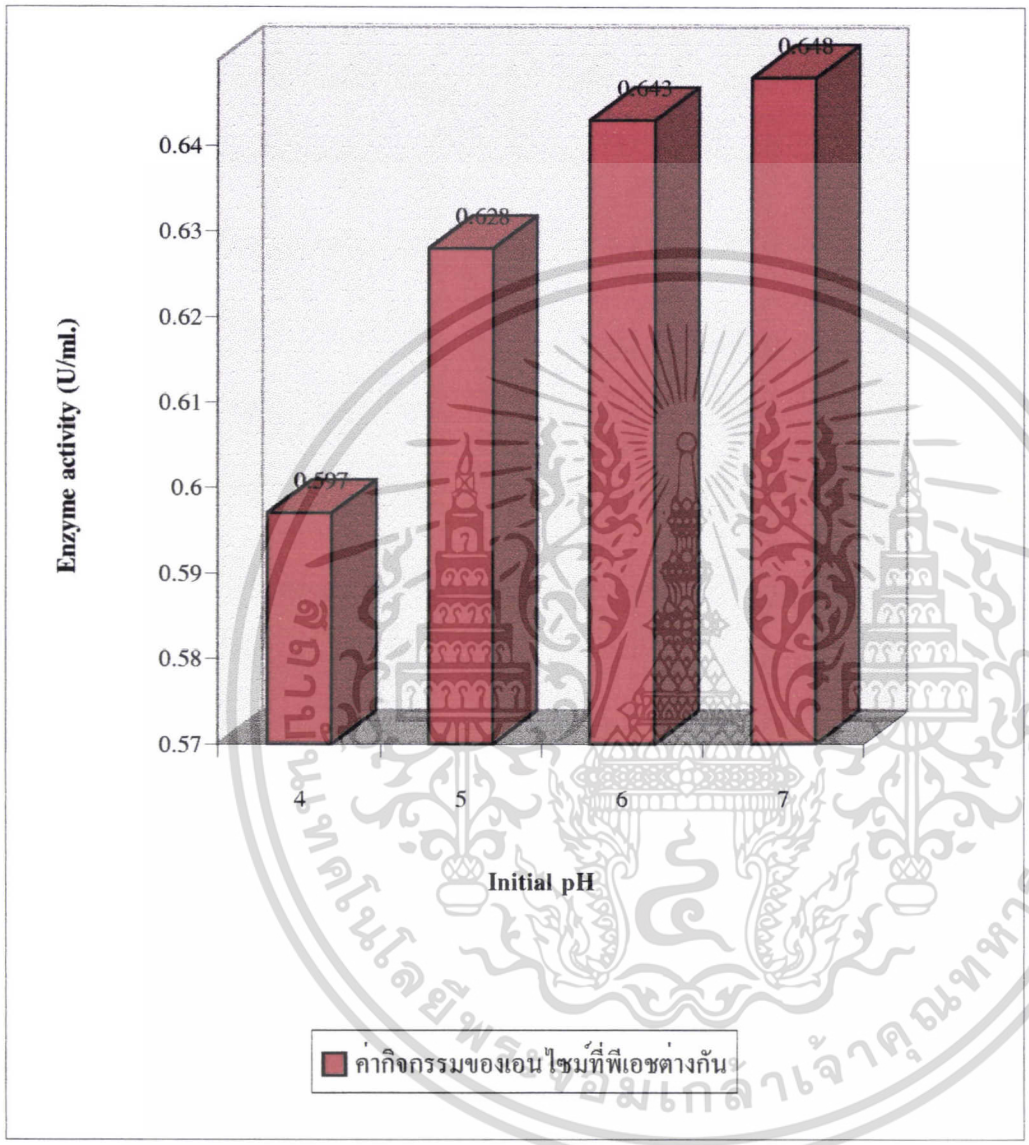
รูปที่ 17 แสดงถึงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่ใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



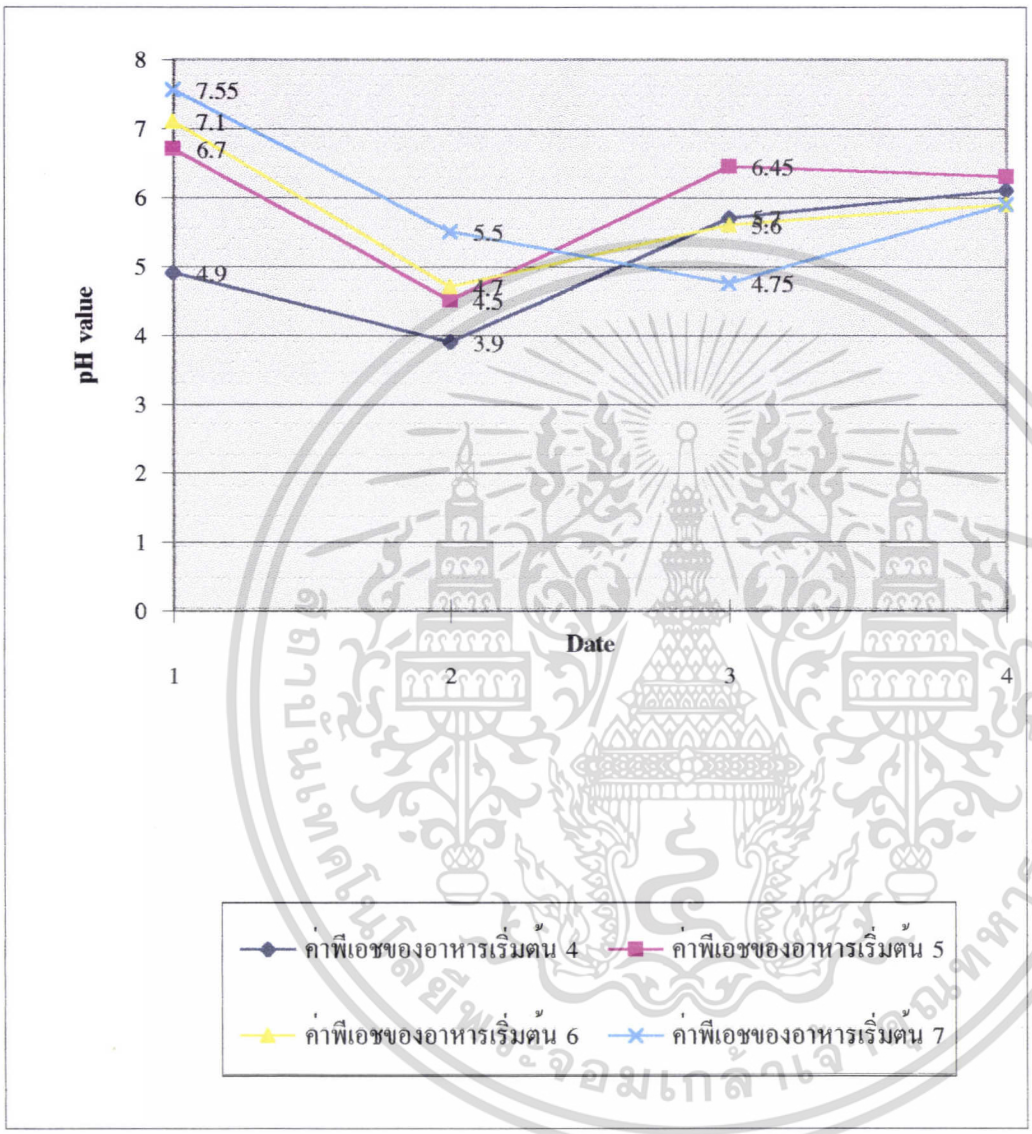
รูปที่ 18 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในสภาวะที่ใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



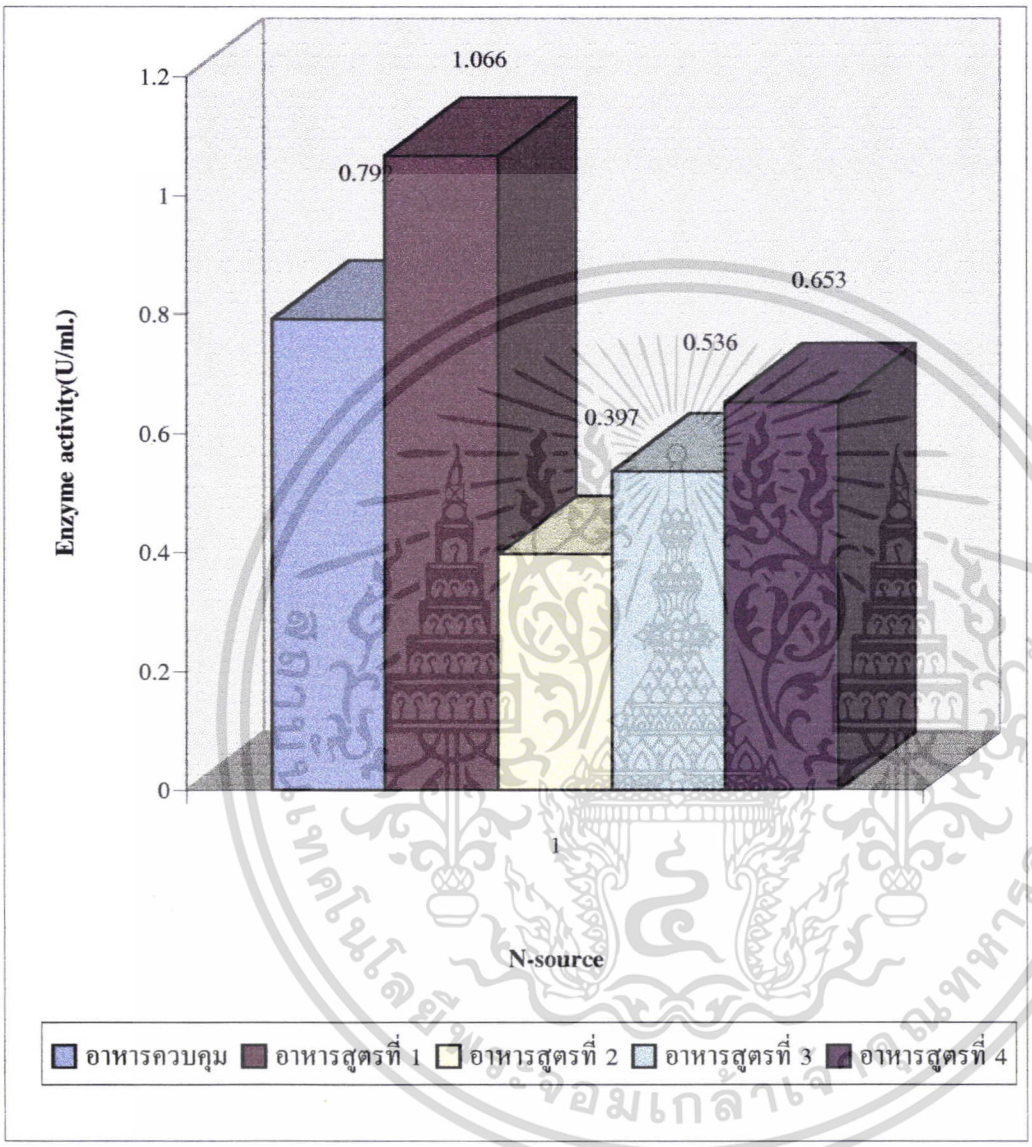
รูปที่ 19 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่พีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 20 แสดงค่าการเปลี่ยนแปลงพีเอชเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

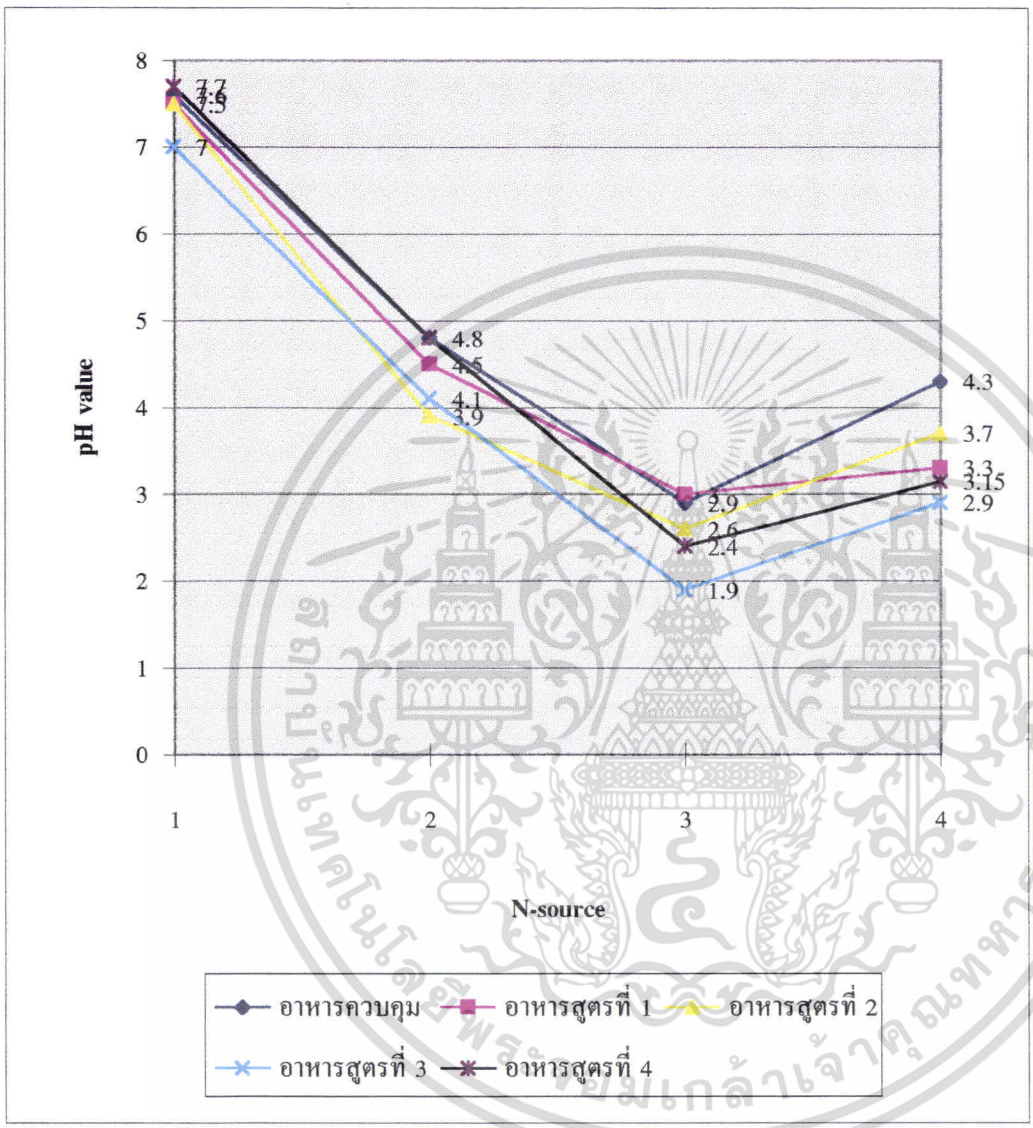


รูปที่ 21 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้แหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นิต/มล. ตามลำดับ นอกจากนี้จากการศึกษาพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการทดสอบนั้น ยังพบว่ามีค่าพีเอชของอาหารใกล้เคียงกันจากอาหารทั้ง 4 สูตร และมีแนวโน้มลดลงเรื่อย ๆ เมื่อใช้เวลานานขึ้น (รูปที่ 22)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 22 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชที่ใช้แหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองที่ได้โดยทำการทดสอบหาชนิดของเชื้อควบคู่ไปกับการทดสอบหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ พบว่า เชื้อ *Aspergillus usamii* เป็นเชื้อที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ได้รวดเร็วที่สุด และแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือ แป้ง เนื่องจาก เชื้อ *Aspergillus usamii* สามารถให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ใกล้เคียงกับอีก 2 ชนิดจากการใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กันและการเจริญของเชื้อในอาหารที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น พบว่ามีเพียงเชื้อ *Aspergillus usamii* เท่านั้นที่สามารถเจริญเป็นเพลเล็ต (pellet) แต่เชื้ออีก 2 ชนิดนั้นจะเจริญจับกันเป็นก้อนและอมน้ำ

จากผลการทดลองข้างต้น จึงนำเชื้อ *Aspergillus usamii* มาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ โดยการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (ในที่นี้คือแป้ง) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ผลปรากฏว่า ค่าความเข้มข้นของแป้งที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือ ที่ความเข้มข้น 10 กรัม/ลิตร ในการทดสอบวันที่ 1 จากการทดสอบทั้ง 4 วัน ส่วนค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์นั้น พบว่าวันที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือวันที่ 1 เช่นเดียวกัน โดยที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือที่พีเอช 7 นอกจากนั้นยังพบว่า การใช้ยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 10 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนจะมีความเหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ เนื่องจากให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ และพบว่าวันที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดก็ยังคงเป็นวันที่ 1 เช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ประพาส วีระแพทย์. 2531. ความรู้เรื่องข้าว. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Escobar,J. and Barnett,S. 1995. Synthesis of acid protease from *Mucor meihei* : intregation of product and recovery. Process Biochemistry. 30:695-700.

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

Drucker,H. 1972. Regulation of exocellular protease in *Neurospora crassa*: induction and repression of enzyme synthesis. J. Bacteriol 110:1041-1049.

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

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

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

Yaichi Fukashima,Itoh,H.,Fukase,T. and Motai,H.1991. Stimulation of protease production by *Aspergillus oryzae* with oil in continusous culture.Appl.Microbiol.Biotechnol.34: 586-590.

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

Irie,T.Z.,1954. Studies on the soy brewing by enzymes obtained by submersed culture of molds. Nippon Nogei kagaku Kaishi 28 : 550-555.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Shigeru Morimura, Kenjikida, and Yorikazu Sonoda.1994. Production of Protease using wastewater from the Manufacture of Shochu. J. of Fermentation and Bioengineering. 77 : 183-187.

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

อาหารวุ้นเอียง PDA (potato dextrose agar)

ประกอบด้วย

มันฝรั่ง	200 กรัม
น้ำตาลเดกซ์โทรส	20 กรัม
ผงวุ้น	15 กรัม

วิธีการ

ต้มมันฝรั่งในน้ำจนเดือด กรองด้วยผ้าขาวบาง นำส่วนของเหลวที่ได้มาเติมน้ำตาลเดกซ์โทรส และผงวุ้น ต้มจนวุ้นละลาย ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร บรรจุในหลอดฝาเกลียว ขนาด 16 * 150 มม. หลอดละ 5 มม. ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที (ขณะที่วุ้นยังไม่แข็งตัวให้นำหลอดมาวางเอียงไว้จนกระทั่งวุ้นแข็งตัวดี) หรือใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สำเร็จรูป โดยนำมาละลายในน้ำกลั่นตามอัตราส่วนที่ได้ระบุไว้ที่ข้างภาชนะ คนให้ละลาย แล้วบรรจุในหลอดฝาเกลียว ทำเช่นเดียวกับที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน

ประกอบด้วย

กลูโคลิน	20 กรัมต่อลิตร
เปปโตน	10 กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	1 กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด	3 กรัมต่อลิตร

วิธีการ

นำสารทั้ง 4 ตัว ข้างต้นมาผสมให้เข้ากันปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ปรับค่าพีเอช ให้เท่ากับ 4.0 โดยใช้สารละลาย NaOH หรือ HCl เข้มข้น 1.0 นอร์มัล.. บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มม. ขวดละ 75 มม. ปิดจุกสำลี ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที .

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
วิธีการวิเคราะห์

การเตรียมกราฟมาตรฐานของไทโรซีนสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมโปรติเอส

สารเคมี

ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

A: 0.2 นอร์มัล. ของสารละลายของโมโนเบสิค โซเดียมฟอสเฟต (monobasic sodium phosphate) โดยนำมา27.8 กรัม ละลายในน้ำ 1000 มล.

B: 0.2 นอร์มัล. สารละลายของไดเบสิค โซเดียมฟอสเฟต (dibasic sodium phosphate)

โดยนำ $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ ปริมาณ 53.65 กรัม หรือ $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$ ปริมาณ 71.1 กรัม ละลายในน้ำ 1000 มิลลิลิตร

X มล. ของ A + Y มล. ของ B , ละลายจนได้ 200 มล.

X	Y	pH
45	55	6.9
39	61	7.0
33	67	7.1
28	72	7.2
23	77	7.3
19	81	7.4
16	84	7.5

การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์

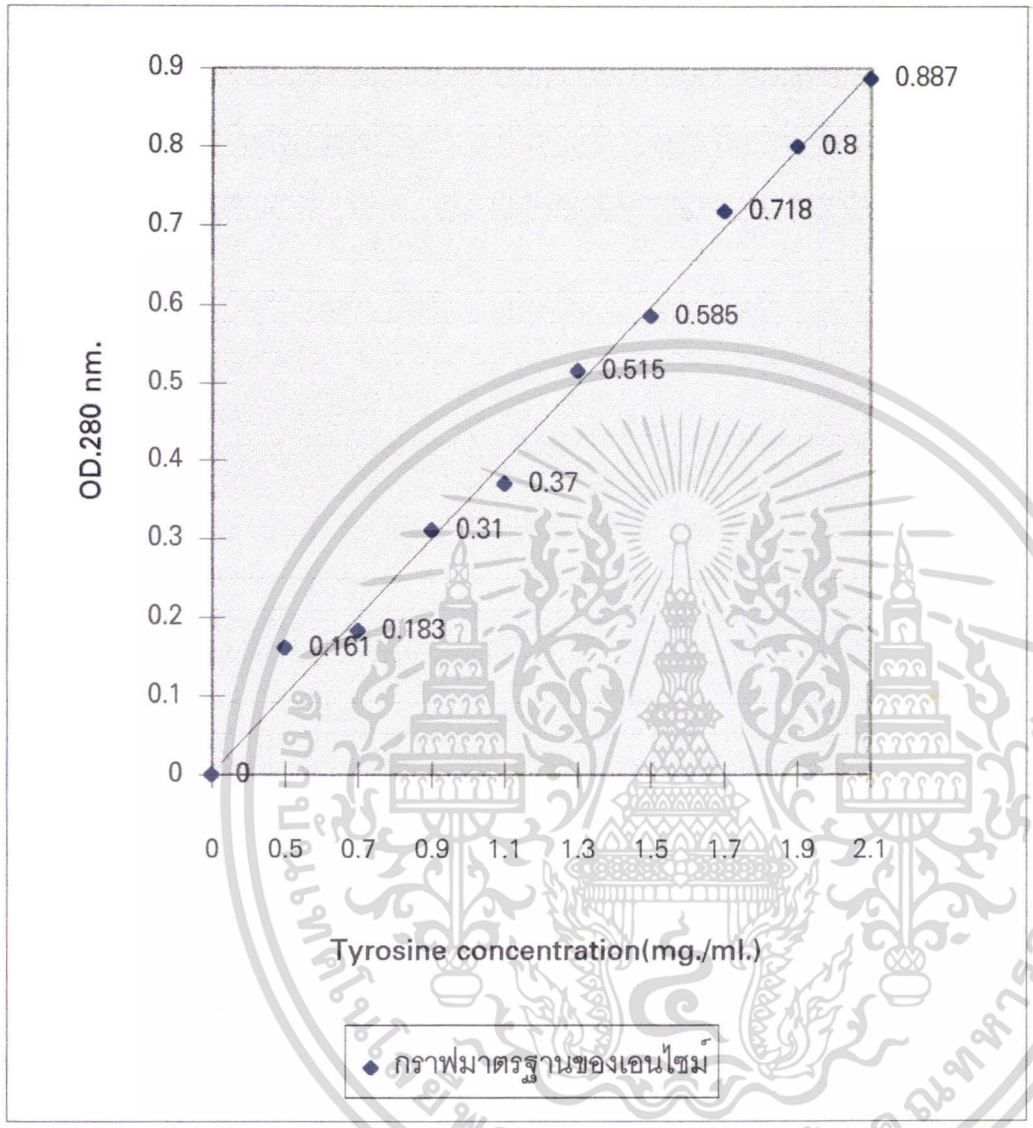
ก. เตรียมสารละลายไทโรซีนที่ความเข้มข้น 0.5, 0.7, 0.9, 1.1, 1.3, 1.5, 1.7, 1.9 และ 2.1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร

ข. นำสารละลายไทโรซีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 2 มล. เติมลงใน 5 มล. ของสารแขวนลอยเคซีนในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และนำไปบ่มที่ 50° ซ เป็นเวลา 20 นาที

ค. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

ง. นำไปวัดค่าความดูดกลืนของแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปผนวกที่ ค1 กราฟมาตรฐานแสดงความเข้มข้นของไทโรซีนกับค่าการดูดกลืนแสง
ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้