การผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างและอุณหภูมิสูง

Production of Proteolytic Enzyme from a Thermostable Alkalophilic Bacterium

สุดเอื้อม พัฒนใหญ่ยิ่ง

Sud-aerm Pattanayaiying

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Sciences

Prince of Songkla University

2539

เลขหมู่ QP609.P28 ส93 2539 ก.1

Bib Key 118712

Order Key.....

BIB Key.....

ชื่อวิทยานิพนธ์	การผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างและอุณหภูมิสูง
ผู้เขียน	นางสาวสุดเอื้อม พัฒนใหญ่ยิ่ง
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ สันตินานาเลิศ)

.....กรรมการ
(อาจารย์ปรียานุช บวรเรืองโรจน์)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ สันตินานาเลิศ)

.....กรรมการ
(อาจารย์ปรียานุช บวรเรืองโรจน์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เยาวลักษณ์ ดิสระ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นงพร โตวัฒนะ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

.....
(ดร. ไพรัตน์ สงวนไทร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างและอุณหภูมิสูง
ผู้เขียน	นางสาวสุดเอื้อม พัฒนใหญ่ยิ่ง
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ
ปีการศึกษา	2539

บทคัดย่อ

Bacillus สายพันธุ์ PS719 ที่แยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณน้ำพุร้อน เป็นแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีที่พีเอช 9.0-11.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนออกสู่นอกเซลล์ได้ดีที่พีเอช 9.0-11.5 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมการย่อยโปรตีนที่พีเอชเหมาะสม 7.0 และ 10.5-12.0 อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส มีความจำเพาะต่อสับสเตรทเอโซเคซีนมากที่สุด รองลงมาคือ ฮีโมโกลบิน และเคซีน ตามลำดับ นอกจากนี้เอนไซม์ยังสามารถทนทานต่อสารลดแรงตึงผิว, สารปรุงแต่ง และสารคีเลต โดยพบว่าสารประกอบเหล่านี้ที่ระดับความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้ต่ำกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ดังกล่าวจัดเป็นซีรีนโปรติเนส เนื่องจากพีเอ็มเอสเอฟและดีซีไอ ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิลาร์ มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์

Bacillus สายพันธุ์ PS719 ที่เพาะเลี้ยงโดยวิธี batch culture ในฟลาสก์เขย่า มีเวลาเติบโตเป็นสองเท่า 82 นาที อัตราเติบโตจำเพาะ (μ) 0.51 ต่อชั่วโมง และกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 27 หน่วยต่อมิลลิลิตร ขณะที่การเพาะเลี้ยงโดยวิธี batch culture ในถังหมักจุลินทรีย์ที่ควบคุมพีเอช 9.0 มีเวลาเติบโตเป็นสองเท่า 57 นาที อัตราเติบโตจำเพาะ 0.73 ต่อชั่วโมง และกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 76 หน่วยต่อมิลลิลิตร การเพาะเลี้ยงโดยวิธี repeated batch culture ในถังหมักจุลินทรีย์ที่ควบคุมพีเอช 9.0 มีเวลาเติบโตเป็นสองเท่า 40 นาที อัตราเติบโตจำเพาะเท่ากับ 1.03 ต่อชั่วโมง และกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 49 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่ควบคุมพีเอช 9.0 พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้อย่างต่อเนื่อง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยไม่มีการกลายพันธุ์ และกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนโดยเฉลี่ยเท่ากับ 45 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Thesis Title	Production of Proteolytic Enzyme from a Thermostable Alkalophilic Bacterium
Author	Miss Sud-aerm Pattanayaiying
Major Program	Biological Science
Acadamic Year	1996

Abstract

A thermostable alkalophilic *Bacillus sp.* strain PS719 isolated from hot spring soil sample grew optimally between pH 9.0-11.0 and at the temperature of 50°C. The *Bacillus sp.* PS719 produced extracellularly proteolytic enzyme in the pH range of 9.0-11.5 at 55°C. The enzyme showed maximal activity at pH 7.0 and pH 10.5-12.0 and at the temperature between 70-75°C. It exhibited the highest activity on azocasein, haemoglobin and casein, respectively. The surfactants, additive (zeolite), and chelating agent (EDTA) at concentration of 0.15% could inhibit the enzyme activity less than 30%. The enzyme was identified to be a serine proteinase since it was completely inhibited by PMSF and 3,4-DCI at 10 mM.

The *Bacillus sp.* PS719 showed a doubling time of 82 minutes, a specific growth rate (μ) of 0.51 per hour and produced the enzyme at maximal activity of 27 units/ml under shaking flask condition. Under batch culture condition in a fermentor at constant pH of 9.0, the *Bacillus sp* PS719 showed a doubling time of 57 minutes, a specific growth rate (μ) of 0.73 per hour and produced the highest enzyme activity of 76 units/ml. Whereas, under repeated batch culture condition in a fermentor at constant pH of 9.0, the bacterium showed a doubling time of 40 minutes, a specific growth rate (μ) of 1.03 per hour and produced the enzyme at maximal activity of 49 units/ml. Additionally, when the *Bacillus sp.* PS719 was cultivated in a continuous fermentor, the bacterium continuously produced the proteolytic enzyme with the average enzyme activity of 45 units/ml throughout 120 hours without showing mutation any mutations of the strain.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ สันตินานาเลิศ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ปรียานุช บวรเรืองโรจน์ กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการศึกษาค้นคว้าวิจัย และเขียนวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เยาวลักษณ์ คิสระ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นงพร โตวัฒนะ กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้กรุณาแก้ไขปรับปรุงให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) สำหรับทุนสนับสนุนการศึกษา และการวิจัยเพื่อทำวิทยานิพนธ์ ตลอดระยะเวลาของการศึกษา และขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยเพื่อทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

สุดท้ายผู้เขียนขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพยิ่ง รวมทั้งน้องชาย และคุณวิเชษ พรมศิริ สำหรับการสนับสนุน และเป็นกำลังใจในการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบพระคุณ ดร. เมตตา องค์สกุล และอาจารย์ทุกท่าน ที่กรุณาให้คำแนะนำ และอบรมสั่งสอน ขอขอบคุณคุณนิศารัตน์ ดำเนียร และคุณสุกัญญา สุวรรณระ รวมทั้งเพื่อนๆ, พี่ๆ, น้องๆ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ ที่ให้กำลังใจ และมีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

สุดเอื้อม พัฒนใหญ่ยิ่ง

♡ Miss "A" So Much ♡

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบาญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการรูป	(8)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(11)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	38
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	39
วัสดุ	39
อุปกรณ์	39
วิธีการ	44
3. ผลการทดลอง	48
4. วิจารณ์	79
5. สรุป	85
เอกสารอ้างอิง	87
ภาคผนวก	96
ประวัติผู้เขียน	98

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	แบคทีเรียที่เป็นเทอร์โมไฟล์	6
2.	อาหารเลี้ยงเชื้อ, สารเคมี และบริษัทผู้ผลิต	41
3.	ผลการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ PS719	52
4.	จลนศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนโดย *Bacillus* PS719 ที่เพาะเลี้ยงโดยวิธีต่างๆ	77
5.	แบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน ที่มีกิจกรรมการทำงานในสภาวะที่เป็นด่างและอุณหภูมิสูง	80

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.	กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดยแบคทีเรียจำนวน 36 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดิน และน้ำบริเวณบ่อน้ำร้อน และน้ำจากโรงงานน้ำเต้าหู้ เมื่อเพาะเลี้ยงใน skim milk medium พีเอช 9.0 ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	49
2.	การผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงใน skim milk medium พีเอช 9.0 ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซี ยส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	50
3.	การเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆที่มีระดับกิจกรรมการย่อยโปรตีนสูง เมื่อเพาะเลี้ยงใน nutrient broth (NB) ที่พีเอชต่างๆกัน ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	51
4.	ผลของพีเอชต่อการเติบโตของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	54
5.	ผลของอุณหภูมิต่อการเติบโตของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth พีเอช 9.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	55
6.	ผลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk medium เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	57
7.	ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk medium พีเอช 9.0 เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	58
8.	ผลของ skim milk ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk medium พีเอช 9.0 เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ (%) โดยเทียบกับค่าสูงสุดของเอนไซม์	59

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
9.	ผลของพีเอช ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk medium พีเอช 9.0 เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	61
10.	ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk medium พีเอช 9.0 เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	62
11.	ความเสถียรของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ	64
12.	ความจำเพาะต่อสับสเตรทชนิดต่างๆ ของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk medium พีเอช 9.0 เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	65
13.	ผลของสารลดแรงตึงผิว, สารปรุงแต่ง และสารคีเลต ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719	67
14.	ผลของตัวยับยั้งของเอนไซม์ (enzyme inhibitor) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719	69
15.	จลนศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk medium พีเอช 9.0 โดยวิธี batch culture ในฟลาสก์เขย่า ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 55องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	71

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
16.	จลนศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ซึ่งเพาะเลี้ยงในถังหมักจุลินทรีย์ (fermentor) ที่มี skim milk medium พีเอช 9.0 โดยวิธี batch culture อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	73
17.	จลนศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ที่เพาะเลี้ยงในถังหมักจุลินทรีย์ (fermentor) โดยใช้วิธี repeated batch culture อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 55องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	74
18.	จลนศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ที่เพาะเลี้ยงในถังหมักจุลินทรีย์ (fermentor) โดยใช้วิธีการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง	76
19.	แสดงถังหมักจุลินทรีย์ พร้อมชุดควบคุม	97

ตัวย่อและสัญลักษณ์

α	=	alpha
&	=	and
β	=	beta
CMC	=	carboxy methyl cellulose
°C	=	องศาเซลเซียส
DCA	=	deoxycholic acid
3,4-DCI	=	3,4-dichloroisocoumarin
DDAB	=	dodecyltrimetylammonium chloride
DDAP	=	N-dodecyl-N-N-dimethyl-3-ammonio-1-propane-sulfonate
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
γ	=	gamma
κ	=	kappa
Glycine-NaOH	=	glycine-sodium hydroxide
h	=	hour
φ	=	omega
mg	=	miligram
ml	=	mililitre
μ	=	specific growth rate
O.D.	=	optical density
pH	=	-log hydrogen ion concentration
PMSF	=	phenylmethylsulphonyl fluoride
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
td	=	doubling time
Tris-HCl	=	Tris (hydoxymethyl aminomethane) hydrochloride

1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

เอนไซม์ย่อยโปรตีน จัดเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในทางอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่ กระบวนการผลิตเนย, ขนมปัง, เบียร์และน้ำคั้นผลไม้, อุตสาหกรรมฟอกหนัง และอุตสาหกรรมผงซักฟอก ปริมาณการซื้อขายเอนไซม์ย่อยโปรตีนในตลาดโลกมีประมาณ 2 ใน 3 ของเอนไซม์ทั้งหมดที่ใช้ในอุตสาหกรรม (Ng and Kenealy, 1986) เอนไซม์ย่อยโปรตีนสามารถผลิตได้จากแหล่งต่างๆ ได้แก่ พืช, สัตว์ และจุลินทรีย์ ปัจจุบันทั่วโลกหันมาให้ความสนใจกับการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนโดยใช้จุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากการใช้จุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์ สามารถลดต้นทุน และระยะเวลาการผลิตได้เป็นอย่างดี แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ แบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง (alkalophilic bacteria) โดยเฉพาะ *Bacillus* แบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างและอุณหภูมิสูงเป็นกลุ่มที่น่าสนใจ เนื่องจากมีแนวโน้มในการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีความเสถียรภายใต้สภาวะที่เป็นด่างและอุณหภูมิสูงได้ดีกว่าแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีความเสถียรภายใต้อุณหภูมิสูง มีข้อได้เปรียบกว่าเอนไซม์ย่อยโปรตีนกลุ่มอื่น คือ อุตสาหกรรมที่อาศัยเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาส่วนใหญ่ดำเนินภายใต้อุณหภูมิค่อนข้างสูง เพื่อให้อัตราการแพร่ และการละลายของสารประกอบต่างๆเพิ่มสูงขึ้น และทำให้ความหนืดและแรงตึงผิวของสารละลายลดลง มีผลให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้น และสามารถลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิต นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีความทนทานสูงต่อสารเคมีที่มีผลในการทำลายสภาพธรรมชาติของเอนไซม์อีกด้วย ดังนั้นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีความเสถียรภายใต้สภาวะที่เป็นด่างและอุณหภูมิสูง จึงมีคุณสมบัติที่เหมาะสมทั้งทางด้านกายภาพและเคมี ต่อการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาถึงการสืบหาแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างและอุณหภูมิสูง ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน ตลอดจนถึงปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ การศึกษาครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐาน สำหรับการค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างและอุณหภูมิสูง และใช้เป็นแนวทางในการศึกษาเชิงพันธุศาสตร์ของเชื้อดังกล่าวต่อไป

การตรวจเอกสาร

1.1 แบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง (Alkalophilic bacteria)

จุลินทรีย์สามารถเติบโตได้แทบทุกบริเวณบนพื้นโลก ตั้งแต่บริเวณขั้วโลก (Ikura and Horikoshi, 1987) จนถึงบริเวณน้ำพุร้อน (Brock *et al.*, 1984 ; Brock, 1986) บริเวณทะเลลึก และในน้ำที่มีปริมาณเกลือสูง (Brock *et al.*, 1984) จุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถเติบโตได้ดีในช่วงพีเอชที่เป็นกลาง (neutrophiles) อย่างไรก็ตามพบว่าจุลินทรีย์หลายกลุ่มสามารถเติบโตได้ในสภาวะที่เป็นด่าง ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ จุลินทรีย์ที่สามารถทนต่อสภาวะที่เป็นด่างได้ดี (alkaline-tolerant microorganisms) มีช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเติบโตอยู่ระหว่าง 7.0-9.0 แต่ไม่สามารถเติบโตได้ในสภาวะที่มีพีเอชสูงกว่า 9.5 และจุลินทรีย์ที่สามารถเติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง (extreme alkalophiles) มีช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเติบโตอยู่ระหว่าง 10.0-12.0 จุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถแบ่งย่อยออกเป็น 2 กลุ่ม คือ จุลินทรีย์ที่เติบโตในสภาวะที่เป็นด่างและสภาวะที่เป็นกลาง (facultative alkalophiles) ซึ่งมีช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเติบโตอยู่ที่ 10.0 หรือสูงกว่า และสามารถเติบโตในสภาวะที่เป็นกลางได้ด้วย อีกกลุ่มคือจุลินทรีย์ที่เติบโตในสภาวะที่เป็นด่างจัด (obligate alkalophiles) ในช่วงพีเอชที่สูงกว่า 10.0 และไม่สามารถเติบโตได้ในสภาวะที่พีเอชต่ำกว่า 8.5-9.0 (Krulwich and Guffanti, 1989)

จุลินทรีย์ที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง และสภาวะที่เป็นกลาง (facultative alkalophiles) เป็นกลุ่มที่น่าสนใจเป็นพิเศษ เนื่องจากสามารถใช้เป็นรูปแบบในการศึกษาโครงสร้าง และสรีรวิทยาที่ทำให้เซลล์สามารถเติบโตได้ภายใต้สภาวะที่มีความเป็นด่างค่อนข้างสูง รวมถึงการศึกษาส่วนประกอบของชั้นไขมันและอัตราส่วนของไขมันและโปรตีนภายในเซลล์เมมเบรน การศึกษาส่วนประกอบของเซลล์เมมเบรนที่มีลูกโซ่หายใจ(respiratory chain) ในปริมาณสูงมาก การศึกษาส่วนประกอบของโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดที่มีความเป็นกรด (acidic amino acid) ในปริมาณสูงกว่ากรดอะมิโนชนิดอื่น การศึกษากลไกการปั๊มโปรตอนออกนอกเซลล์ตลอดกระบวนการหายใจ เพื่อรักษาระดับพีเอชภายในเซลล์ให้ต่ำกว่าภายนอกเซลล์ และการศึกษาการแลกเปลี่ยนโปรตอนกับโซเดียมอิออนภายนอกเซลล์ เพื่อรักษาสมดุลของประจุภายในเซลล์ของแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างและมีออกซิเจน (Krulwich and Guffanti, 1989)

แบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง ได้แก่ แบคทีเรียกรัมลบที่ใช้แสงเป็นแหล่งพลังงาน (gram-negative photoautotrophs) เช่น *Synechococcus sp.* เติบโตได้ที่พีเอช 6.5-10.0 และพีเอชที่เหมาะสมต่อการเติบโตเท่ากับ 8.0 (Kallas and Castenholz, 1982) และ *Ectothiorhodospira sp.* เติบโตได้ที่พีเอช 8.0-10.0 (Grant *et al.*, 1979), แบคทีเรียกรัมลบที่ไม่สร้างสปอร์ (gram-negative non-endosporeformer) เช่น *Flavobacterium sp.* เติบโตได้ที่พีเอช 7.0-11.2 (Ikura and Horikoshi, 1987) และ *Vibrio alginolyticus* เติบโตได้ที่พีเอช 6.0-9.2 (Tokuda and Unemoto, 1983), แบคทีเรียกรัมบวกที่ไม่สร้างสปอร์ (gram-positive non-endosporeformers) เช่น *Streptococcus sp.* เติบโตได้ที่พีเอช 5.0-11.0 และเติบโตได้ดีที่พีเอช 8.0-9.0 (Graham and Laund, 1983) และ *Exiguobacterium sp.* เติบโตได้ที่พีเอช 7.0-11.5 และเติบโตได้ดีที่พีเอช 8.5-9.5 (Collins *et al.*, 1983) และแบคทีเรียกรัมบวกสร้างสปอร์ (gram-positive endosporeformers) เช่น *Clostridium sp.* เติบโตได้ที่พีเอช 8.0-11.3 และเติบโตได้ดีที่พีเอช 9.5 (Souza *et al.*, 1974), *Bacillus alcalophilus* เติบโตได้ที่พีเอช 8.5-11.5 และเติบโตได้ดีที่พีเอช 10.6 (Vedder, 1934 อ้างถึงโดย Krulwich and Guffanti, 1989), *Bacillus* สายพันธุ์ A007 เติบโตได้ที่พีเอช 9.0-11.0 (Ando *et al.*, 1981 อ้างถึงโดย Krulwich and Guffanti, 1989) และ *Bacillus* สายพันธุ์ WN13 เติบโตได้ที่พีเอช 8.0-11.5 และเติบโตได้ดีที่พีเอช 9.0-9.5 (Weisser and Truper, 1985) และ *Archaebacteria* ได้แก่ กลุ่มที่ต้องการออกซิเจนในการเติบโต (aerobes) เช่น *Natrobacterium sp.* เติบโตได้ดีที่พีเอช 9.0-10.0 (Tindall *et al.*, 1984) และกลุ่มที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเติบโต (anaerobes) เช่น *Methanobacterium thermoalcaphilum* เติบโตได้ที่พีเอช 6.5-10.0 (Blotevogel *et al.*, 1985 อ้างถึงโดย Krulwich and Guffanti, 1989)

สิ่งที่น่าสนใจเป็นพิเศษเกี่ยวกับแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง คือ การผลิตเอนไซม์ที่มีความเสถียรในสภาวะที่เป็นด่างออกสู่นอกเซลล์ (extracellular enzyme) เอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างและอุณหภูมิสูงนั้น น่าจะมีความเสถียรทั้งในสภาวะที่เป็นด่างและอุณหภูมิสูง ดังนั้นจึงใช้แบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างและอุณหภูมิสูงในการผลิตเอนไซม์ ในปีค.ศ. 1987 Kitada และคณะ ได้ศึกษาแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ IC ที่เติบโตได้ดีในช่วงพีเอช 8.0-10.0 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งผลิตเอนไซม์อีนอลเลส (enolase) อยู่ภายในเซลล์ (intracellular enzyme)

มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส และทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลาง แต่ยังไม่ได้มีการศึกษาเอนไซม์ที่ผลิตออกสู่ภายนอกเซลล์

เอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างได้แก่ เซลลูเลส (cellulase), ไซแลนเนส (xylanase), โปรติเนส (proteinase), อัลฟา-อะไมเลส (α-amylase), เบตา-อะไมเลส (β-amylase), พูลลูลาเนส (pullulanase), กลูโคอะไมเลส (glucoamylase), กลูโคส ไอโซเมอเรส (glucose isomerase) และไซโคลเด็กซ์ตรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (cyclodextrin glycosyl transferase ; CGTase) (Horikoshi, 1990)

1.2 แบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง (Thermophilic bacteria)

แบคทีเรียที่เติบโตได้ในสภาวะอุณหภูมิสูงแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ แบคทีเรียทนร้อน (thermotolerant หรือ thermoduric bacteria) และแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีภายใต้อุณหภูมิสูง หรือเทอร์โมไฟล์ (thermophilic bacteria) ซึ่งประกอบด้วย แฟคัลเทตีฟเทอร์โมไฟล์ (facultative thermophiles) และออบลิเกท หรือเอ็กทรีมเทอร์โมไฟล์ (obligate หรือ extreme thermophiles) หรือ คาลโดแอคตีฟ (caldoactive) (Brock, 1986)

แบคทีเรียในกลุ่มทนร้อน เป็นกลุ่มที่มีความสามารถในการอยู่รอดที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส แต่อัตราการเติบโตสูงสุดอยู่ภายใต้อุณหภูมิต่ำกว่า 50-60 องศาเซลเซียส แบคทีเรียเหล่านี้จะทนต่อขบวนการพาสเจอไรซ์ได้ เช่น *Micrococcus sp., Mycobacterium sp.* ส่วนแบคทีเรียในกลุ่มแฟคัลเทตีฟเทอร์โมไฟล์ มีอัตราการเติบโตสูงสุดที่อุณหภูมิสูงกว่า 50-60 องศาเซลเซียส ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของแบคทีเรียนั้นๆ และสามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50-60 องศาเซลเซียสอีกด้วย ในขณะที่แบคทีเรียในกลุ่มออบลิเกทเทอร์โมไฟล์ ไม่สามารถเติบโตภายใต้อุณหภูมิต่ำกว่า 50-60 องศาเซลเซียส (Brock, 1986 ; VanDermark and Barry, 1987) แบคทีเรียที่เติบโตได้ดีภายใต้อุณหภูมิสูงส่วนใหญ่พบในบริเวณที่มีการทับถมของถ่านหิน กองปุ๋ยหมัก น้ำพุร้อน และน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม (Brock, 1986)

น้ำพุร้อนส่วนใหญ่มีอุณหภูมิใกล้เคียงกับจุดเดือดของน้ำ เช่น น้ำพุร้อนจากวนอุทยานแห่งชาติเยลโลสโตน (Yellow Stone National Park) อุณหภูมิทั่วไปอยู่ในระดับ 92-93 องศาเซลเซียส เมื่อน้ำจากน้ำพุร้อนไหลสู่ธารน้ำไหลระดับอุณหภูมิของน้ำจะค่อยๆลดลง (thermal gradient) ตามระยะทางของธารน้ำไหล ดังนั้นจึงมีการเติบโตของจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆกัน

ตามช่วงอุณหภูมิ จากการศึกษาการแพร่กระจายของสิ่งมีชีวิตบริเวณน้ำพุร้อนและธารน้ำไหล และคุณสมบัติของน้ำพุร้อน และแหล่งน้ำร้อนอื่นๆที่มีอุณหภูมิแตกต่างกันทั่วโลก ทำให้สามารถตรวจหาอุณหภูมิสูงสุด สำหรับการเติบโตของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่มได้ดังนี้ คือ โปรโตซัว (45-50 องศาเซลเซียส), สาหร่าย (56 องศาเซลเซียส), เชื้อรา (60 องศาเซลเซียส), แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (70-73 องศาเซลเซียส) และแบคทีเรีย (>100 องศาเซลเซียส) จากข้อมูลดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่า (Brock, 1984)

1) สิ่งมีชีวิตพวกโปรคาริโอต สามารถเติบโตในสภาวะที่อุณหภูมิสูงกว่าสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต

2) สิ่งมีชีวิตที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ สามารถเติบโตในสภาวะที่อุณหภูมิสูงกว่าสิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถสังเคราะห์แสง

3) สิ่งมีชีวิตที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน สามารถเติบโตในสภาวะที่อุณหภูมิสูงกว่าสิ่งมีชีวิตที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน

เหตุผลที่เทอร์โมไฟล์สามารถมีชีวิตรอดและเติบโตในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงได้นั้น เนื่องจากโครงสร้างเซลล์เมมเบรนของเทอร์โมไฟล์ประกอบด้วยกรดไขมันประเภทอิ่มตัว,สาขาของกรดไขมัน และกรดไขมันสายยาว (longer chain fatty acid) ในสัดส่วนที่สูง กรดไขมันเหล่านี้จะมีจุดหลอมเหลวที่สูงกว่าปกติ นอกจากนี้เอนไซม์และโปรตีนอื่นๆ รวมทั้งโครงสร้างที่ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนของเทอร์โมไฟล์ซึ่งมีความเสถียรที่ระดับอุณหภูมิสูง ความแตกต่างของลำดับกรดอะมิโนเพียงเล็กน้อยในสายเปปไทด์จะมีผลต่อโครงสร้างตติยภูมิและจตุรภูมิ ทำให้โมเลกุลของโปรตีนมีความแข็ง และยืดหยุ่นต่ำภายใต้ระดับอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic temperature) แต่สามารถทำงานและเสถียรภายใต้อุณหภูมิสูง (Langworthy and Pond, 1986)

ความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียที่เป็นเทอร์โมไฟล์ จากรายละเอียดเกี่ยวกับการวิเคราะห์ 16 เอส อาร์เอ็นเอ (16 s RNA) Fox และคณะ (1980) ได้เสนอไฟโลจีนีติคสครีม (phylogenetic scheme) สำหรับสิ่งมีชีวิต โดยแบ่งสิ่งมีชีวิตออกเป็น 3 อาณาจักร (kingdom) คือ Archaebacteria, Eubacteria และ Eucaryote และให้นิยามของแบคทีเรียที่เป็นเทอร์โมไฟล์ว่า เป็นสิ่งมีชีวิตที่เติบโตภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า ซึ่งได้แก่ สิ่งมีชีวิตในอาณาจักร Archaebacteria และ Eubacteria ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แบคทีเรียที่เป็นเทอร์โมไฟล์ (Brock, 1986)

Genus	Number of species	Temperature range (°C)
Phototrophic bacteria		
Cyanobacteria	16	55-70
Purple bacteria	1	55-60
Green bacteria	1	70-73
Gram-positive bacteria		
Bacillus	15	50-70
Clostridium	11	50-75
Lactic acid bacteria	5	50-65
Actinomycetes	23	55-75
Eubacteria		
Thiobacillus	3	50-60
Spirochete	1	54
Desulfotomaculum	7	37-55
Gram-negative aerobe	7	50-75
Gram-negative anaerobe	4	50-75
Archaebacteria		
Methanogens	4	55-95
Sulfur-dependent	10	55-110
Thermonoplasma	1	37-55

ปัจจุบันมีการแยกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่เป็นเทอร์โมไฟล์ชนิดใหม่ๆ และน่าสนใจ แบคทีเรียเหล่านี้ส่วนใหญ่เก็บไว้ที่ German Collection of Microorganism (Brock, 1986) ซึ่งมีดังนี้

1. Archaebacteria

สมาชิกในกลุ่มนี้ได้แก่ *Sulfolobus acidocaldarius* (type species), *Sulfolobus brierleyi* และ *Sulfolobus solfataricus* เติบโตที่อุณหภูมิ 70-90 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตอยู่ในช่วง 75-85 องศาเซลเซียส); พีเอช 1-4 ; ใช้สารประกอบอินทรีย์และธาตุกำมะถัน (S°) เป็นแหล่งพลังงาน; ใช้ออกซิเจน (oxygen; O_2) และเฟอรัสอิออน (ferrus ion; Fe^{3+}) เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

2. Thermoproteales

สมาชิกในกลุ่มนี้ได้แก่ *Thermoproteus tenax*, *Desulfurococcus mobilis*, *Desulfurococcus mucosus*, *Thermophilum pendens* และ *Thermococcus celer* เติบโตที่อุณหภูมิ 70-85 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตอยู่ที่ 85 องศาเซลเซียส); ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobic); พีเอชเป็นกรด หรือเป็นกลาง; ใช้สารประกอบอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงาน; .ใช้ธาตุกำมะถันเป็นตัวรับอิเล็กตรอน

3. Methanothermaceae

สมาชิกในกลุ่มนี้ได้แก่ *Methanothermus fervidus* เติบโตที่อุณหภูมิ 70-95 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตอยู่ที่ 85 องศาเซลเซียส) ; ไม่ต้องการออกซิเจน ใช้ไฮโดรเจน (Hydrogen; H_2) และคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbondioxide; CO_2) เป็นแหล่งพลังงานและตัวรับอิเล็กตรอน

4. Methanococcales

สมาชิกในกลุ่มนี้ได้แก่ *Methanococcus jannaschii* เติบโตที่อุณหภูมิ 60-90 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตอยู่ที่ 85 องศาเซลเซียส) ไม่ต้องการออกซิเจน ใช้ไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งพลังงานและตัวรับอิเล็กตรอน

5. Pyrodictium

สมาชิกในกลุ่มนี้ได้แก่ *Pyrodictium brockii* และ *Pyrodictium occultum* เติบโตที่อุณหภูมิ 85-110 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตอยู่ที่ 105 องศาเซลเซียส) ไม่ต้องการออกซิเจน; ใช้ไฮโดรเจนและธาตุกำมะถัน

6. เทอร์โมไฟล์ชนิดอื่นๆที่ไม่ต้องการออกซิเจน

สมาชิกในกลุ่มนี้ได้แก่ *Clostridium thermohydrosulfuricum* (อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตอยู่ที่ 65 องศาเซลเซียส; ผลิตเอธานอล), *Clostridium thermosulfurogenes* (อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตอยู่ที่ 60 องศาเซลเซียส; หมักเพคติน(pectin); เปลี่ยนธาตุกำมะถันเป็นไทโอซัลไฟต์ (thiosulfite ; S_2O_3)), *Thermoanaerobacter ethanolicus* (สามารถเติบโตได้ดีภายใต้อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส; ผลิตเอธานอล), *Thermoanaerobium brockii* (อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตอยู่ที่ 65 องศาเซลเซียส; ผลิตเอธานอล), *Thermobacteriodes acetoetylicus* (อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตอยู่ที่ 65 องศาเซลเซียส) และ *Thermodesulfobacterium commune* (อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตอยู่ที่ 70 องศาเซลเซียส)

1.3 เอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่เป็นเทอร์โมไฟล์

แบคทีเรียในกลุ่มเทอร์โมไฟล์ นับว่ามีประโยชน์ในทางเทคโนโลยีชีวภาพที่สำคัญมากที่น่าสนใจเป็นพิเศษ คือ การผลิตเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาทางชีวเคมีภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิสูงกว่าเอนไซม์ที่ผลิตโดยสิ่งมีชีวิตทั่วๆไป นอกจากนั้นเอนไซม์ที่ผลิตโดยเทอร์โมไฟล์ยังมีความเสถียรที่อุณหภูมิปกติอีกด้วย ทำให้สามารถยืดระยะเวลาการเก็บเอนไซม์ได้นานขึ้น

ปัจจุบันพบว่า โรงงานอุตสาหกรรมนิยมใช้เอนไซม์ที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงในกระบวนการผลิตต่างๆ เช่น เอนไซม์อัลฟาอะไมเลส (α-amylase), กลูโคอะไมเลส (glucoamylase), พูลลูลาเนส (pullulanase), ไซแลนเนส (xylanase), ไอโซเมอเรส (isomerase), เพคติเนส (pectinase), เซลลูเลส (cellulase), แลคเตส (lactase), ไลเปส (lipase) และโปรติเนส (proteinase) (Brock, 1986)

1.4 เอนไซม์ย่อยโปรตีน

เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจากจุลินทรีย์ จัดเป็นเอนไซม์ไฮโดรเลส กลุ่มที่ 3 กลุ่มย่อยที่ 4 เรียกว่า เปปไทด์ไฮโดรเลส (peptide hydrolase ; EC. 3.4) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม โดยอาศัยตำแหน่งของพันธะที่เอนไซม์เข้าไปตัด (Ward, 1983 ; Cantor *et. al.*, 1992) ดังนี้

1. เอนไซม์เปปทิเดส (peptidase ; EC. 3.4.11-19) เป็นเอนไซม์ที่มีกิจกรรมการตัดพันธะเปปไทด์ของกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณปลายสายเปปไทด์ (exocleaving peptidase) สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยตามการตัดพันธะตรงด้านปลายคาร์บอน (C-terminal) หรือด้านปลายไนโตรเจน (N-terminal) หรือไดเปปไทด์ที่จำเพาะชนิดลงไป ได้แก่ อะมิโนเปปทิเดส (aminopeptidase ; EC. 3.4.11), ไดเปปทิเดส (dipeptidase ; EC.3.4.13) และคาร์บอกซีเปปทิเดส (carboxypeptidase ; EC. 3.4.16-18)

2. เอนไซม์โปรติเนส (proteinase ; EC. 3.4.21-24) เป็นเอนไซม์ที่มีการตัดพันธะเปปไทด์ภายในสายเปปไทด์ (endocleaving peptidase) สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ตามกลไกการเร่งปฏิกิริยา ได้แก่ ซีรีนโปรติเนส (serine proteinase ; EC. 3.4.21), ซีสเตอีนโปรติเนส (cysteine proteinase ; EC 3.4.22), แอซิดโปรติเนส (acid proteinase ; EC. 3.4.23) และเมทาลโลโปรติเนส (metalloproteinase ; EC. 3.3.24)

เปปไทด์ไฮโดรเลสที่มีความสำคัญในทางการค้า จัดเป็นโปรติเนสมากกว่าเปปทิเดส ได้แก่ ซีรีนโปรติเนส (serine proteinase) ประกอบด้วย อัลคาไลน์โปรติเนส (alkaline proteinase) ซึ่งผลิตจาก *Aspergillus spp.* และ *Bacillus spp.* (เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเนสที่ผลิตจาก *Bacillus spp.* ที่มีความสำคัญในทางการค้าชื่อว่าสับติไลซิน (Subtilisin)) และไคโมทริปซิน (chymotrypsin) ซึ่งผลิตจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เอนไซม์ที่มีความสำคัญในทางการค้ามากที่สุดคือ ซีสเตอีนโปรติเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ผลิตจากพืช ได้แก่ ปาเปน (papain), ไฟซิน (ficin) และโบรมีลิน (bromelain) เอนไซม์โปรติเนสที่ทำให้น้ำนมจับตัวเป็นก้อน (milk-clotting proteinase) ประกอบด้วย แอซิดโปรติเนสที่ผลิตโดย *Mucor spp.*, *Endothia spp.* และ*Aspergillus spp.* รวมทั้งเรนเนต (rennet) และเปปซิน (pepsin) ที่ผลิตจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม สำหรับเมทาลโลโปรติเนสนั้น ได้แก่ นิวทรัลโปรติเนส (neutral proteinase) ที่ผลิตโดย *Bacillus subtilis* และ *Aspergillus oryzae*

สำหรับคุณสมบัติของเอนไซม์แต่ละกลุ่มย่อย มีรายละเอียด ดังนี้

1.4.1 อะมิโนเปปทิเดส (Aminopeptidase)

เอนไซม์ในกลุ่มนี้ มีกิจกรรมการไฮโดรไลส์โปรตีนทางด้านปลายไนโตรเจนของสายเปปไทด์ (Cantor *et al.*, 1992) ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์จะมีความแตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์

1.4.1.1 แบคทีเรียลลูซิลอะมิโนเปปทิเดส (Bacterial leucyl aminopeptidase)

เอนไซม์ชนิดนี้ มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโน ทางด้านปลายไนโตรเจนของสายเปปไทด์ โดยเฉพาะกรดอะมิโนลูซีน (leucine) แต่ไม่มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนกลูตามิค (glutamic) หรือแอสพาติค (aspartic) ต้องการอิออนของสังกะสี (Zn^{2+}) ในการเร่งปฏิกิริยา แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ ได้แก่ *Aeromonas proteolytica, Escherichia coli* และ *Staphylococcus thermophilus* (Cantor *et al.*, 1992)

1.4.1.2 เทอร์โมฟิลิคอะมิโนเปปทิเดส (Thermophilic aminopeptidase)

เอนไซม์ชนิดนี้ มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโน ทางด้านปลายไนโตรเจน ได้แก่ กรดอะมิโนไลซีน (lysine) และโปรลีน (proline) ต้องการอิออนของโลหะสำหรับความเสถียรภายใต้อุณหภูมิสูง จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ ได้แก่ *Bacillus stearothermophilus, Talaromyces duponti* และ *Mucor sp.* (Cantor *et al.*, 1992)

1.4.1.3 คลอสตริเดียลอะมิโนเปปทิเดส (Clostridial aminopeptidase)

มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนโปรลีน และไฮดรอกซีโปรลีน (hydroxy proline) ที่อยู่ทางด้านปลายไนโตรเจนของสายเปปไทด์ ต้องการอิออนของแมงกานีส (Mn^{2+}) หรือโคบอลต์ (Co^{2+}) สำหรับการทำงานของเอนไซม์ (Cantor *et al.*, 1992)

1.4.1.4 ไลซิลอะมิโนเปปทิเดส (Lysyl aminopeptidase)

มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนไลซีน ที่อยู่ทางด้านปลายไนโตรเจน ของสายเปปไทด์ ต้องการอิออนของโคบอลต์สำหรับการเร่งปฏิกิริยา ขณะที่อิออนของสังกะสีและแมงกานีสมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ เอนไซม์ชนิดนี้ที่ผลิตจาก *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งทำหน้าที่ไฮโดรไลส์แอล-ไลซิล-4-ไนโตรอะนิไลด์ (L-lysyl-4-nitroanilide) นั้น สามารถไฮโดรไลส์แอล-อาร์จินิล-4-ไนโตรอะนิไลด์ (L-arginyl-4-nitroanilide) ได้ช้ามาก (Cantor *et al.*, 1992)

1.4.1.5 ทริปโตเฟนิลอะมิโนเปปทิเดส (Tryptophanyl aminopeptidase)

โดยทั่วไปจะมีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนทริปโตเฟน (tryptophan) ที่อยู่ด้านปลายไนโตรเจนของสายเปปไทด์ สามารถไฮโดรไลส์แอล-ทริปโตเฟนาไมด์ (L-tryptophanamide) และต้องการอิออนของแมงกานีสสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ คือ *Trichosporon cutaneum* (Iwayama *et al.*, 1983)

1.4.2 คาร์บอกซีเปปทิเดส (Carboxypeptidase)

เอนไซม์คาร์บอกซีเปปทิเดส แบ่งตามบริเวณเร่งของเอนไซม์เป็น 2 กลุ่ม คือ ซีรีนคาร์บอกซีเปปทิเดส (serine carboxypeptidase) และเมทาลโลคาบอกซีเปปทิเดส (metallocarboxypeptidase)

1.4.2.1 ซีรีนคาร์บอกซีเปปทิเดส (Serine carboxypeptidase)

เอนไซม์ในกลุ่มนี้ จะถูกยับยั้งแบบแทนที่ โดยสารประกอบอินทรีย์ฟลูออโรฟอสเฟต (Cantor *et al.*, 1992) มีความจำเพาะต่อสับสเตรทอยู่ในช่วงกว้าง พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 4.5-6.0 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ ได้แก่ เชื้อราในจีนัส *Penicillium, Aspergillus* และยีสต์ (Ward, 1983 ; Cantor *et al.*, 1992) เอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. saitoi* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการทำงานอยู่ในช่วง 3.1-3.5 มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนที่มีหมู่วงแหวนหรือหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group) ทางด้านปลายคาร์บอนของเปปไทด์สายสั้นๆ (Ward, 1983)

1.4.2.2 เมทาลโลคาร์บอกซีเปปทิเดส (Metallo carboxypeptidase)

เป็นคาร์บอกซีเปปทิเดสที่ต้องการอิออนของโลหะ สำหรับกิจกรรมการเร่งปฏิกิริยา มีความจำเพาะต่อสับสเตรทแตกต่างกันไป ตามสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์นั้น ดังรายละเอียดต่อไปนี้

ก. ไกลซีนคาร์บอกซีเปปทิเดส (Glycine carboxypeptidase)

มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโน ที่อยู่ทางด้านปลายคาร์บอน ของสายเปปไทด์ และเชื่อมต่อกับกรดอะมิโนไกลซีน (glycine) เช่น Z-Gly-Leu เอนไซม์ชนิดนี้สามารถผลิตได้โดยยีสต์ (Ward, 1983 ; Cantor *et al.*, 1992)

ข. อะลานีนคาร์บอกซีเปปทิเดส (Alanine carboxypeptidase)

มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนอะลานีน (alanine) หรือหมู่เทอโรอิล (pteroyl) หรือเอซิล (acyl) ที่อยู่ทางด้านปลายคาร์บอนของสายเปปไทด์ ผลิตโดยแบคทีเรีย

ที่อาศัยในดิน เอนไซม์ชนิดนี้ที่ผลิตจาก *Corynebacterium equi* สามารถไฮโดรไลส์เอ็น-เบนโซอิลไกลซีน (N-benzoylglycine) และเอ็น-เบนโซอิล-แอล-อะมิโนบิวทิริคแอซิด (N-benzoyl-L-aminobutyric acid) ได้ (Levy and Goldman, 1969 ; Cantor *et al.*, 1992)

ค. ดี-อะลานีนคาร์บอกซีเปปทิเดส I (D-alanine carboxypeptidase I)

มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนอะลานีน ด้านปลายคาร์บอน โดยกรดอะมิโนอันดับรองสุดท้ายของสายเปปไทด์ จะต้องเป็นอะลานีนด้วย ได้แก่ UDP-N-acetylmuramoyl-L-alaminyl-D-γ-glutamyl-6-carboxy-L-lysyl-D-alanyl-D-alanine แต่ไม่สามารถไฮโดรไลส์ UDP-N-acetylmuramoyl-L alaminyl-D-γ-glutamyl-6-carboxy-L-lysyl-D-alanine ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยานี้ได้ เป็นเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย ต้องการอิออนของโลหะสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ และถูกยับยั้งแบบแข่งขันโดยเพนนิซิลิน (penicillins) และเซฟาโลสปอริน (cepharosporins) (Cantor *et al.*, 1992)

1.4.3 ซีรีนโปรติเนส (Serine proteinase)

บริเวณเร่งของเอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโนซีรีน (Ward, 1983 ; Cantor *et al.*, 1992) แบ่งเอนไซม์ซีรีนโปรติเนส ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ เป็น 4 กลุ่ม คือ ทริปซิน-ไลค์โปรติเนส (trypsin-like proteinase), อัลคาไลน์โปรติเนส, มิกโซแบคเตอร์แอลฟา-ไลติคโปรติเนส (Myxobacter α-lytic proteinase) และสเตปฟีโลคอคคอลโปรติเนส (Staphylococcal proteinase) เอนไซม์กลุ่มแรกมีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนที่เป็นเบส เอนไซม์กลุ่มที่ 2 มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนที่มีวงแหวน หรือมีกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ เอนไซม์กลุ่มที่ 3 มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนที่เป็นสายตรงสั้นๆ เช่น อะลานีน และกลุ่มที่ 4 มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนที่เป็นกรดตรงตำแหน่งทางด้านปลายคาร์บอนของสับสเตรทสังเคราะห์และสายเบตาของอินซูลินในรูปที่ถูกออกซิไดส์ (oxidised insulin β-chain)

1.4.3.1 ทริปซิน-ไลค์โปรติเนส (Trypsin-like proteinase)

เอนไซม์ทริปซินไลค์โปรติเนส ผลิตจากแบคทีเรีย *Streptomyces* บางสปีชีส์ เช่น *Streptomyces griseus* (Trop and Birk, 1968) และ *S. erytheus* (Yoshida *et al.*,1971 อ้างถึงโดย Ward, 1983) เอนไซม์เหล่านี้ส่วนใหญ่ทำงานที่พีเอช 8 และมีความไวต่อตัวยับยั้งไดไอโซโพรพิลฟลูออโรฟอสเฟต หรือ ดีเอฟพี (diisopropyl fluorophosphate; DFP), ตัวยับยั้งซอยบีนทริปซิน (soy bean trypsin inhibitors) และ โทซิล-แอล-ไลซีนคลอโรเมทิลคีโตน หรือ ทีเอลซีเค (tosyl-L-lysine chloromethyl ketone ; TLCK)

มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20,000 ดาลตัน จุดไอโซอิเล็กตริค (isoelectric point) อยู่ที่ 4.0 (Ward, 1983) โดยทั่วไปพบว่ามีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนอาร์จินีน (arginine) และไลซีน จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ คือ *Streptomyces griseus* (Cantor *et al.*, 1992)

1.4.3.2 อัลคาไลน์โปรติเนส(Alkaline proteinase)

แบคทีเรีย, รา และยีสต์หลายสปีชีส์ สามารถผลิตเอนไซม์ซีรีนอัลคาไลน์โปรติเนสได้ เอนไซม์ชนิดนี้สามารถทำงานได้ดีที่พีเอชสูง (ประมาณ 10) ไวต่อดีเอฟพี, และตัวยับยั้งที่ผลิตจากมันสำปะหลัง (potato inhibitors) แต่จะไม่ถูกยับยั้งโดยทีเอลซีเค และโทซิล-แอล-ฟีนิลอะลานีนคลอโรเมทิลคีโตน หรือ ทีพีซีเค (tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone ; TPCK) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งที่จำเพาะต่อทริปซิน (trypsin) เอนไซม์กลุ่มนี้มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนกลุ่มที่เป็นวงแหวน และกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ เช่น ไทโรซีน (tyrosine), ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) หรือ ลูซีน ตัวยับยั้งที่เป็นอนุพันธ์ของเปปไทด์คลอโรเมทิลคีโตน (peptide chloromethylketone derivative) มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้อย่างชัดเจน น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์อยู่ในช่วง 15,000-30,000 ดาลตัน จุดไอโซอิเล็กตริคอยู่ที่ 9.0 (Ward, 1983)

Taguchi และคณะ (1983) ทำการศึกษาเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *Thermus caldophilus* สายพันธุ์ GK24 โดยตรวจวัดกิจกรรมการย่อยโปรตีนของเชื้อจากสารละลายส่วนใส (supernate) ของอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นจึงนำสารละลายส่วนใสมาทำให้บริสุทธิ์ โดยผ่านขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate ; $(NH_4)_2SO_4$), เจลฟิวเตรชัน (gel filtration) และโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange chromatography) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อนำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ไปตรวจดูความบริสุทธิ์โดยดูจากการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้า (sodium dodocyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis ; SDS-PAGE) ตรวจพบแถบโปรตีนถึง 7 แถบ) พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการไฮโดรไลส์เคซีน (casein) และเอ็น-คาร์โบเบนโซซี-ลูซิล-แอล-ไทโรซินาไมด์ (N-carbobenzoxy-L-tyrosinamide ; Z-leu-tyr-NH_2) มีค่าประมาณ 7.8)และ 7.2 ตามลำดับ เอนไซม์มีความเสถียรในสภาวะที่มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 5-11 ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน และภายใต้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ที่ 90 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความทนทานต่อความร้อนและสารเคมีที่มี

ผลในการทำลายสภาพธรรมชาติ ดีเอฟพีมีผลในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ แต่ไม่ถูกยับยั้งโดยกรดเอธิลีนไดเอมีนเตตราอะซีติค หรืออีดีทีเอ (ethylenediaminetetraacetic acid ; EDTA) และกรดเอธิลีนไกลคอล-บีส-(เบตา-อะมิโนเอธิลอีเทอร์)-เอ็น-เอ็น-เตตราอะซีติค หรืออีจีทีเอ (ethylene glycol-bis-(β-aminoethyl ether)*N,N'*-tetraacetic acid ; EGTA) ดังนั้นจึงสามารถจำแนกชนิดของเอนไซม์ได้ว่า เป็นซีรีนโปรติเนส เอนไซม์สามารถไฮโดรไลส์เอ็น-เบนโซอิล-แอล-ไทโรซีนเอธิลเอสเทอร์ หรือบีทีอีอี (N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester ; BTEE) แต่ไม่สามารถไฮโดรไลส์เอ็น-เบนโซอิล-แอล-อาร์จินีนเอธิลเอสเทอร์ หรือบีเออีอี (N-benzoyl-L-arginine ethyl ester ; BAEE)

ค.ศ. 1987 Cowan และคณะ พบว่าแบคทีเรีย *Desulfurococcus* สายพันธุ์ $Tok_{12}S_1$ ที่แยกได้จากบริเวณภูเขาไฟ Tokaanu ประเทศนิวซีแลนด์ สามารถเติบโตและผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ภายใต้อุณหภูมิ 88 องศาเซลเซียส เมื่อนำเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์ และจำแนกคุณลักษณะพบว่าเป็นซีรีนโปรติเนส จากการตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีค่าเท่ากับ 52,000 ดาลตัน แต่มีค่าเพียง 10,000-13,000 ดาลตัน เมื่อตรวจหาโดยใช้วิธีเจลฟิวเตรชัน จุดไอโซอิเล็กตริคของเอนไซม์อยู่ที่ 8.7 กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งโดยดีเอฟพี, ฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ หรือพีเอ็มเอสเอฟ (phenylmethylsulphonyl fluride ; PMSF) และไคโมสเตติน (chymostatin) เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับสเตรททางด้านปลายคาร์บอนของจุดตัดตรงส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ค่าครึ่งชีวิต (half-life) ของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เท่ากับ 70-90 นาที และที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เท่ากับ 8-9 นาที อิออนของแคลเซียม (Ca^{2+}) ไม่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ พบว่าตัวรีดิวส์ เช่น ไดไทโอทริตอล (ditriothreitol), สารคาโอโทรปิค (chaotrophic agent) บางชนิด เช่น โซเดียมไซยาไนด์ (sodium cyanide ; NaSCN) และสารประกอบบางชนิดในผงซักฟอก มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย แต่เอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมการทำงานอย่างรวดเร็วในสภาวะที่มีโซเดียมบอเรต (sodiumborate ; $NaBO_3$) ภายใต้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส

Gusek และ Kinsella (1987) ทำเอนไซม์โปรติเนส ที่ผลิตจาก *Thermonospora fusca* YX ให้บริสุทธิ์ โดยผ่านขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุบวก เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์สามารถไฮโดรไลส์โปรตีนได้หลายชนิด และมีกิจกรรมการย่อยเคซีนภายใต้

อุณหภูมิ 35-95 องศาเซลเซียส (ที่พีเอช 8.0) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการย่อยเคซีนของเอนไซม์อยู่ที่ 80 องศาเซลเซียส พีเอชและความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride ; NaCl) ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่ 9.0 และ 20 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ เอนไซม์สามารถรักษากิจกรรมไว้ได้ในสภาวะที่มีโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต หรือ เอสดีเอส (sodium dodecyl sulfate ; SDS) เข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) หรือ ไดไทโอทริตอลเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ หรือเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 โมลาร์ พบว่าพีเอ็มเอสเอฟมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล 14,500 ดาลตัน และจุดไอโซอิเล็กตริคอยู่ที่ 9.21

(2) Takami และคณะ (1989) พบ *Bacillus sp.* no AH-101 จากตัวอย่างดิน ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง และผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีความเสถียรในสภาวะที่เป็นด่างและอุณหภูมิสูง กิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์หลังจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นด่าง (พีเอช 9.5) มีค่า 1,500 หน่วยต่อมิลลิลิตร (units/ml) เอนไซม์มีกิจกรรมการย่อยเคซีนได้ดีที่พีเอช 12-13 และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 5-13 เป็นเวลา 10 นาที อิออนของแคลเซียมมีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ภายใต้อุณหภูมิสูง พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรภายใต้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีอิออนของแคลเซียมเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งโดยพีเอ็มเอสเอฟ ขณะที่อีดีทีเอ , ยูเรีย, โซเดียมโดดีซิลเบนซีนซัลโฟเนต (sodium dodecylbenzenesulphonate) และเอสดีเอส มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล 30,000 ดาลตัน และสัมประสิทธิ์ของการตกตะกอนเท่ากับ 3.0s จุดไอโซอิเล็กตริคอยู่ที่ 9.2

ในปี ค.ศ. 1990 Takami และคณะ ได้ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์โปรติเนสที่ผลิตจาก *Bacillus sp.* no. AH-101 พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมการไฮโดรไลส์โปรตีนธรรมชาติที่มีลักษณะเป็นเส้นใยไม่ละลายน้ำ ได้แก่ อีลาสติน และ เคอราติน สูงกว่า สับติไลติน (subtilisins) และโปรติเนสเค (proteinae K) พีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยอีลาสตินและเคอราตินอยู่ที่ 10.5 และ 11.0-12.0 ตามลำดับ กิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์ต่ออีลาสติน (elastin) และเคอราติน (keratin) มีค่าเท่ากับ 10,600 และ 3,970 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน (units/mg protein) ตามลำดับ และจากการตรวจวัดส่วนประกอบของกรดอะมิโน และลำดับของกรดอะมิโนทางด้านปลายไนโตรเจน (amino

terminal sequence) พบว่ามีลักษณะคล้ายคลึงกับสับติไลซินบีพีเอ็น (Subtilisin BPN), สับติไลซินคาร์ลสเบิร์ก หมายเลข 221 (Subtilisin Carlberg No. 221) และ ยา-บี อัลคาไลน์ โปรติเนส (Ya-B alkaline proteinase)

Takii และคณะ(1990) ศึกษาเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเนสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* subsp. halodurans KP 1239 โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ประกอบด้วยกรดซิตริค (citric acid) เข้มข้นร้อยละ 1.0 พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ซึ่งอยู่ในรูปของผลึก พบว่าสามารถทำงานได้ดีเมื่ออยู่ภายใต้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และพีเอช 11.0 เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล 29,000 ดาลตัน จุดไอโซอิเล็กตริคอยู่ที่ 8.8 และค่าสัมประสิทธิ์ของการตกตะกอน เท่ากับ 3.3s

ในปีค.ศ. 1992 Takami และคณะ ได้ทำการโคลนยีนที่ควบคุมเอนไซม์ซีรีนโปรติเนสที่ผลิตจาก *Bacillus sp.* no. AH-101 ซึ่งมีความเสถียรภายใต้อุณหภูมิสูง, ทำงานได้ดีในสภาวะเป็นด่าง (พีเอช 12-13) และมีกิจกรรมการย่อยสลายเคอราติน โดยโคลนยีนดังกล่าวเข้าสู่ *Escherichia coli* พบว่ามีการผลิตเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเหมือนกับที่ผลิตจาก *Bacillus sp.* no. AH-101 ทุกประการ

Tachiya และคณะ (1992) นำเอนไซม์โปรติเนส ที่ผลิตจาก *Thermoactinomyces sp.* HS 682 ที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟี (chromagraphy) ที่ใช้ Butyl-Toyoperl 650 M และ SP-Toyoperl 650 S และวิธีการแยกสารด้วยกระแสไฟฟ้า (electrophorectically homogenous state) เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุล 25,000 ดาลตัน มีจุดไอโซอิเล็กตริคอยู่ที่ 11.0 กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งโดยดีเอฟพี, พีเอ็มเอสเอฟ และอิออนของทองแดง (Cu^{2+}) และปรอท (Hg^{2+}) เอนไซม์สามารถรักษากิจกรรมไว้ได้นาน 60 นาที ในสภาวะที่มีสารเคมีต่างๆที่ประกอบอยู่ในผงซักฟอก เช่น โซเดียมเปอร์บอเรต (sodium perborate), โซเดียมไตรฟอสเฟต (sodium triphosphate), โซเดียม-เอ็น-โดดีซิลเบนซีนซัลโฟเนต (sodium-N-dodecylbenzenesulfonate) และโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.1, พีเอช 11.5 ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Steele และคณะ (1992) ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเนส ที่มีความเสถียรภายใต้อุณหภูมิสูง และมีกิจกรรมการทำงานในสภาวะที่เป็นด่าง ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรีย

Kurthia spiroform ที่แยกได้จากน้ำพุร้อน แบคทีเรียชนิดนี้จะมีรูปร่างเป็นเกลียวเมื่ออยู่ในสภาวะที่พีเอชค่อนข้างเป็นกลาง สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 4-47 องศาเซลเซียส และพีเอช 7.0-11.5 สามารถเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพีเอช 10.0 เอนไซม์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเพียง 8 กิโลดาลตัน กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เกิดขึ้นได้ดีที่พีเอช 11.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่าครึ่งชีวิตของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (พีเอช 9.0) มีค่าเท่ากับ 41 ชั่วโมง

ในปีค.ศ. 1994 Rahman และคณะ แยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus stearothermophilus* F1 ได้จากกากน้ำมันปาล์มที่ถูกย่อยสลาย ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีความเสถียรในสภาวะที่เป็นด่างและอุณหภูมิสูง เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์พบว่ามีกิจกรรมจำเพาะ เพิ่มขึ้น 128 เท่า และได้เอนไซม์กลับคืนร้อยละ 75 ของเอนไซม์ทั้งหมด เอนไซม์ที่ได้จัดเป็นซีรีนโปรติเนสที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 33,500 และ 20,000 ดาลตัน เมื่อเทียบโดยใช้ SDS-PAGE และเจลฟิวเตรชัน ตามลำดับ สามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 9.0 และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และพีเอช 8.0-10.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เอนไซม์ชนิดนี้สามารถย่อยสลายสับสเตรทซึ่งเป็นโปรตีนที่ละลายและไม่ละลายน้ำได้หลายชนิด แต่ไม่พบกิจกรรมการย่อยเอสเทอร์ อิออนของโคบอลต์ และปรอทมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อย่างชัดเจน ขณะที่อิออนของแมกนีเซียม, ทองแดง, สังกะสี และสตรอนเชียม (Sr^{2+}) มีผลในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เพียงเล็กน้อยหรือไม่มีเลย ส่วนอิออนของแมงกานีสมีผลในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ความเสถียรของเอนไซม์ในสภาวะอุณหภูมิสูงจะอยู่ในระดับสูง (ค่าครึ่งชีวิตที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส = 4 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส = 25 นาที) สำหรับที่อุณหภูมิสูงกว่า 85 องศาเซลเซียสนั้น ความเสถียรของเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแคลเซียมอิออน

เอนไซม์ซีรีนอัลคาไลน์โปรติเนส สามารถแบ่งเป็นกลุ่มต่างๆได้ดังนี้

ก. สับติไลซิน (Subtisins)

เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีความสำคัญในทางการค้ามาก กิจกรรมการย่อยโปรตีนของเอนไซม์จะถูกยับยั้งโดยพีเอ็มเอสเอฟ และดีเอฟพี มีความเสถียรในช่วงพีเอชที่กว้าง คือ ตั้งแต่พีเอช 5 ถึง 12 (Outtrup and Boyce, 1990) ได้แก่ สับติไลซินคาร์ลสเบอร์ก (Subtilisin Carlsberg) และสับติไลซินบีพีเอ็น (Subtilisin BPN) ดังรายละเอียดต่อไปนี้

(1) สับติไลซินคาร์ลสเบิร์ก (Subtilisin Carlsberg)

สับติไลซินคาร์ลเบิร์ก เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในอุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอกสูงมาก เอนไซม์ชนิดนี้ประกอบด้วยสายเปปไทด์เดี่ยว ที่มีกรดอะมิโน 274 ตัว แต่ไม่มีส่วนที่เป็นซิสเตอีน (cysteine) ทำให้ไม่มีพันธะไดซัลไฟด์อยู่เลย มีรูปร่างเป็นทรงกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.2 นาโนเมตร บริเวณแร่งประกอบด้วย Ser 221, His 64 และ Asp 32 ถูกยับยั้งโดยสารเคมีที่ทำปฏิกิริยากับซีรีน เช่น ดีเอฟพี และพีเอ็มเอสเอฟ ซึ่งเป็นตัวยับยั้งของซีรีนโปรติเนสทั่วๆไป น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ชนิดนี้มีค่าประมาณ 27,277 ดาลตัน และมีจุดไอโซอิเล็กตริคอยู่ที่ 9.4 มีความจำเพาะต่อสับสเตรทหลายชนิดมาก โดยสามารถไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์ได้เกือบทุกชนิด และไฮโดรไลส์พันธะเอสเทอร์บางชนิดได้ นอกจากนั้นยังสามารถไฮโดรไลส์กลีเซอไรด์ (glyceride) บางชนิด เช่น ไตรโปพิโอนิน (tripopionin) และไตรบิวทิริน (tributyrin) ได้อีกด้วย สามารถย่อยพันธะเปปไทด์ในเคซีนได้ร้อยละ 30-40 เอนไซม์ชนิดนี้มีลักษณะเหมือนกับซีรีนโปรติเนสชนิดอื่นๆ คือ ไม่ต้องการอิออนของแคลเซียมในการทำงาน และสารคีเลต (chelating reagent) ไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อยู่ระหว่างพีเอช 8-9 มีความเสถียรในช่วงพีเอชที่กว้าง และถูกยับยั้งการทำงานเมื่อพีเอชต่ำกว่า 5.0 และสูงกว่า 11.0 (Ottensen and Svendsen, 1970 ; Markland and Smith, 1971 ; Ward, 1983) แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้คือ *Bacillus licheniformis* (Ward, 1983) และ *Bacillus pumitus* (Markland and Smith, 1971)

(2) สับติไลซินบีพีเอ็น (Subtilisin BPN)

เอนไซม์ชนิดนี้ถูกทำให้บริสุทธิ์ และทำให้เป็นผลึกในครั้งแรกจากการเตรียมเอนไซม์แบคทีเรียลโปรติเนสนากาเรส (Bacterial Proteinase Nagarase) เพื่อใช้ในทางการค้า (จึงได้ชื่อว่า สับติไลซินบีพีเอ็น (Subtilisin BPN)) สับติไลซินบีพีเอ็นมีความสำคัญในทางการค้าค่อนข้างน้อย เมื่อเทียบกับสับติไลซินคาร์ลสเบิร์ก แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens, B. subtilis* และ *B. stearothermophilus* (Ottensen and Svendsen, 1970 ; Ward, 1983) เอนไซม์ชนิดนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 275 ชนิด มีจุดไอโซอิเล็กตริคเท่ากับ 9.1 และมีส่วนของกรดอะมิโนที่แตกต่างจากสับติไลซินคาร์ลสเบิร์กเพียง 58 ชนิด เท่านั้น เอนไซม์ชนิดนี้ไม่มี

ส่วนที่เป็นกรดอะมิโนซิสเตอีน เช่นเดียวกับสับติไลซินคาร์ลเบิร์ก บริเวณเร่งของเอนไซม์ประกอบด้วย Ser 221, His 54 และ Asp 32 มีความจำเพาะต่อสับสเตรทหลายชนิด (Markland and Smith, 1971 ; Ward, 1983)

จากการศึกษาถึงความแตกต่าง ระหว่างสับติไลซินคาร์ลสเบิร์กและ สับติไลซินบีพีเอ็น พบว่าอิออนของแคลเซียมจะมีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดในสภาวะที่อุณหภูมิสูงหรือความเป็นกรด-ด่างรุนแรง สับติไลซินบีพีเอ็นจะมีความต้องการแคลเซียมมากกว่าสับติไลซินคาร์ลสเบิร์ก ความจำเพาะของเอนไซม์ต่อเอสเทอร์จะมีความแตกต่างกัน คือ สับติไลซินคาร์ลสเบิร์กมีกิจกรรมการย่อยบีทีอีอี สูงกว่าสับติไลซินบีพีเอ็นประมาณ 3-4 เท่า กิจกรรมของเอนไซม์สับติไลซินบีพีเอ็นที่พีเอช 7.0 มีค่าเพียงร้อยละ 20 ของกิจกรรมสูงสุด ขณะที่สับติไลซินคาร์ลสเบิร์กมีค่าร้อยละ 40-70 ของกิจกรรมสูงสุด

ข. เอนไซม์โปรติเนสจาก *Bacillus spp.*ที่เติบโตในสภาวะที่เป็นด่าง

เอนไซม์ชนิดนี้เป็นซีรีนอัลคาไลน์โปรติเนส ที่มีสายเปปไทด์เดี่ยวๆ ซึ่งไม่มีพันธะไดซัลไฟด์อยู่ด้วย น้ำหนักโมเลกุลจะอยู่ในช่วง 20,000-30,000 ดาลตัน มีจุดไอโซอิเล็กตริคประมาณ 11 เอนไซม์ชนิดนี้มีความเสถียรในช่วงพีเอช 6.0-12.0 และทำงานได้ดีในพีเอชช่วงกว้าง คือที่พีเอชระหว่าง 7.0-12.0 (Ward, 1983)

ค. เอนไซม์ซีรีนอัลคาไลน์โปรติเนสที่ผลิตจากเชื้อรา

North (1982) รายงานว่า เอนไซม์ซีรีนอัลคาไลน์โปรติเนส ที่ผลิตโดย *Aspergillus niger, A. nidulans, Phycomyces blakesleeanus, Blastocladiella emersonii* และ *Blaseslea trispora* เป็นเอนไซม์ที่มีขนาดใหญ่ มีน้ำหนักโมเลกุลสูงถึง 126,000 ดาลตัน ส่วนใหญ่มีจุดไอโซอิเล็กตริคค่อนข้างต่ำ คืออยู่ระหว่าง 4.4-6.2 ขณะที่เอนไซม์ซีรีนอัลคาไลน์โปรติเนสที่ผลิตจาก *Alternaria tenuissima, Fusarium sp.* และ *Tritirachium album* (โปรติเนสเค) มีจุดไอโซอิเล็กตริคตั้งแต่ 8.9 ขึ้นไป

เอนไซม์โปรติเนสที่ผลิตในทางการค้าโดยใช้ *Aspergillus* ประกอบด้วยสารผสมของเอนไซม์โปรติเนส ที่ผลิตจาก *Aspergillus flavus, A. oryzae* และ *A. sojae* นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *A. sydowi* สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ด้วย (Nakagawa, 1970) ตัวยับยั้งที่ประกอบด้วยหมู่ซัลฟิดริล (sulphydryl group ; -SH), พารา-คลอโรเมอคิวรีเบนโซเอท (*p*-chloromercuri benzoate ; *p*-CMB), ซิสเตอีน และ

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

โปแตสเซียมไซยาไนด์ (potasium cyanide; KCN) ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ เอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. oryzae* ไม่มีกิจกรรมต่อกรดอะมิโนที่อยู่ทางด้านปลายของสายเปปไทด์ แต่จะมีมีความเสถียรในสภาวะที่เป็นด่างมากกว่าเอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. sojae* เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อรา 2 สปีชีส์นี้มีความจำเพาะต่อสับสเตรทต่างกัน

มีการนำอัลคาไลน์โปรติเนส ที่มีความเสถียรภายใต้อุณหภูมิสูงที่ผลิตจากเชื้อรามาใช้ในผงซักฟอก ได้แก่ เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Tritirachium album* , *Malbranchea pulchella* , *Acremonium kiliense, Fusarium* และ *Gibberella spp.* เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Tritirachium* และ *Malbranchea* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการทำงานที่ 65-70 องศาเซลเซียส และพีเอชที่เหมาะสมอยู่ที่ 7-12 และ 8.5 ตามลำดับ เอนไซม์ที่ผลิตโดย *Malbranchea* ต้องการแคลเซียมเป็นตัวรักษาความเสถียรเพื่อป้องกันการย่อยตัวเอง (Ward, 1983)

Phadatare และคณะ (1993) รายงานว่า *Conidiobolus coronatus* สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเนสที่มีกิจกรรมการย่อยโปรตีนสูงถึง 30 หน่วยต่อมิลลิลิตร และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในผงซักฟอกได้ การผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ให้ได้ปริมาณสูงพอสำหรับใช้ในทางการค้านั้น อาหารที่ใช้ในกระบวนการหมักต้องเหมาะสมสำหรับการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ สภาวะในการหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Conidiobolus coronatus* คือที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในอาหารที่ประกอบด้วยซูโครส (3 เปอร์เซ็นต์), แอมโมเนียมไนเตรท (0.38 เปอร์เซ็นต์), ทริปโตน (2 เปอร์เซ็นต์), โปแทสเซียมคลอไรด์ (0.2 เปอร์เซ็นต์), โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (0.1 เปอร์เซ็นต์), เคซีน (2 เปอร์เซ็นต์), ซิงค์ซัลเฟต (0.001 เปอร์เซ็นต์) และแคลเซียมคลอไรด์ (0.001 เปอร์เซ็นต์) โดยปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้อยู่ในช่วง 7.0-7.5 เอนไซม์มีความเสถียรที่พีเอชระหว่าง 6.0-8.5 และอุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส สามารถรักษากิจกรรมของเอนไซม์ไว้ได้เมื่ออยู่ในสารละลายผงซักฟอกชนิดต่างๆ

ง. สเตปโตไมซีสโปรติเนส (Streptomyces proteinase)

Streptomyces rectus จะผลิตเอนไซม์เซรีนอัลคาไลน์โปรติเนส ที่มีความเสถียรภายใต้อุณหภูมิสูง เอนไซม์ชนิดนี้มีหมู่ซัลฟีดริลอยู่ใกล้กับบริเวณเร่ง ตัวยับยั้งพารา-คลอโรเมอคิวโรเบนโซเอท สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ และมีผลให้

ความเสถียรภายใต้อุณหภูมิสูงลดลง เอนไซม์ชนิดนี้สามารถไฮโดรไลส์โปรตีนทั่วๆไป รวมทั้งคอลลาเจน (collagen) มีพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการทำงานอยู่ในช่วง 4.0-4.5 และถูกยับยั้งการทำงานโดยดีเอฟพีและพีเอ็มเอสเอฟ แต่ทีเอลซีเคไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ (Mizusawa and Yoshida, 1972 ; Ward, 1983 ; Cantor *et al.*, 1992)

1.4.3.3 มิกโซแบคเตอร์แอลฟา-ไลติคโปรติเนส (Myxobacter α-lytic proteinase)

โดยทั่วไปมีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนอะลานีน และวาลีน (valine) ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย อีลาสติน และโปรตีนอื่นๆ มีผลในการทำลายแบคทีเรียชนิดอื่นที่เติบโตในดิน จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้คือ *Lysobacter enzymogenes* (Epstein and Wensink, 1988 ; Bone *et al.*, 1989 ; Cantor *et al.*, 1992)

1.4.3.4 สเตปฟิโลคอคคอลโปรติเนส (Staphylococcal proteinase)

เอนไซม์ชนิดนี้ผลิตโดย *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ V8 มีความไวต่อดีเอฟพี มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเพียง 12,000 ดาลตัน กิจกรรมการย่อยสับสเตรทฮีโมโกลบิน (haemoglobin) สูงสุดอยู่ในช่วงพีเอช 4.0-7.8 มีการตัดพันธะเปปไทด์อย่างจำเพาะตรงบริเวณกรดอะมิโนแอสพาร์ติค หรือกลูตามิค (Ward, 1983; Cantor *et al.*, 1992)

1.4.4 ซีสเตอีนโปรติเนส (Cysteine proteinase)

บริเวณเร่งของเอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโนซีสเตอีน พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วงที่เป็นกลาง ถูกกระตุ้นโดยตัวรีดิวส์ (reducing reagents) เช่น ไฮโดรเจนไซยาไนด์ (hydrogencyanide; HCN) หรือซีสเตอีน มีความไวต่อสารที่ประกอบด้วยหมู่ซัลฟิดริล เช่น พารา-คลอโรเมอคิวริเบนโซเอท สำหรับดีเอฟพีและสารคีเลตจะมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย (Ward, 1983 ; Cantor *et al.*, 1992) สามารถจำแนกเอนไซม์ชนิดนี้ออกเป็น 2 กลุ่ม ตามความจำเพาะต่อสับสเตรท ได้แก่ คลอสตริเพน (clostripain) ซึ่งผลิตโดย *Clostridium histolyticum* มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนที่เป็นด่างตรงบริเวณหมู่คาร์บอกซิลที่เป็นจุดตัด ขณะที่สเตปโตคอคคอลโปรติเนส (Streptococcal proteinase) จะมีความจำเพาะต่อสายเบตาของอินซูลินในรูปที่ถูกออกซิไดส์และสับสเตรทสังเคราะห์หลายชนิด (Ward, 1983)

1.4.4.1 คลอสตริเพน (Clostripain)

เอนไซม์ชนิดนี้ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50,000 ดาลตัน มีจุดไอโซอิเล็กตริคอยู่ที่ 4.8-4.9 (Michell and Harrington, 1971 มีความไวต่อทีเอลซีเค ขณะที่ทีพีซีเคมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย จุดตัดบนสายเบตาของอินซูลินในรูปที่ถูกออกซิไดส์ โดยเอนไซม์ชนิดนี้ เป็นจุดตัดเดียวกับที่ตัดโดยทริปซินจากวัว (Cole *et al.*, 1971) มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนอาร์จินีน (arginine) ได้แก่ อาร์จินีนที่เชื่อมต่อกับโปรลีน (Arg-Pro) (Cantor *et al.*, 1992)

1.4.4.2 สเตปโตคอคคอลโปรติเนส

ผลิตโดย *Streptococcus spp.* group A มีลักษณะเป็นไซโมเจน (zymogen) จะเปลี่ยนไปเป็นซีสเตอีนโปรติเนสเมื่อมีการทำงานของเอนไซม์เกิดขึ้น มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 32,000 ดาลตัน จุดไอโซอิเล็กตริคอยู่ที่พีเอช 8.4 อัตราการไฮโดรไลส์ทริปซินหลายชนิดค่อนข้างต่ำ มีการทำงานคล้ายเอสเทอเรส (esterase) คือตัดพารา-ไนโตรฟีนิลเอสเทอร์ของสับสเตรทไทป์ (type) Z-X-Y (X=Lys, Nle หรือ Glu และ Y=ฟีนิล หรือพารา-ไนโตรฟีนิล) เอนไซม์ชนิดนี้สามารถไฮโดรไลส์สายเบตาของอินซูลินในรูปที่ถูกออกซิไดส์ได้เช่นเดียวกับปาเปน (papain) (Elliott and Liu, 1970 ; Liu and Elliott , 1971 ; Ward, 1983 ; Cantor *et al.*, 1992)

1.4.5 แอซิดโปรติเนส (Acid proteinase)

เอนไซม์ชนิดนี้ ผลิตโดยรา และยีสต์ และในบางครั้งอาจพบในแบคทีเรีย ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อยู่ระหว่าง 3-4 ไม่มีความไวต่อดีเอฟพี, พารา-คลอโรเมอคิวรีเบนโซเอท และอีดีทีเอ แต่จะไวต่อสารประกอบไดเอโซคีโตน (diazoketone) บริเวณเร่งประกอบด้วยกรดอะมิโนแอสพาติคเช่นเดียวกับเปปซิน น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 30,000-45,000 ดาลตัน ยกเว้นเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Podospora aserina* และเอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. oryzae* ที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 29,000-34,000 ดาลตัน จุดไอโซอิเล็กตริคอยู่ในช่วง 3-5 (North, 1982)

เอนไซม์แอซิดโปรติเนส ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ มีความจำเพาะต่อกรดอะโนที่เป็นวงแหวน และกรดอะมิโนที่มีขนาดใหญ่ตรงบริเวณที่เป็นจุดตัดเช่นเดียวกับเปปซิน แม้ว่าความจำเพาะของเอนไซม์แอซิดโปรติเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์จะต่ำกว่าเปปซิน ในปีค.ศ.

1971 Matsubara และ Feder จัดจำแนกเอนไซม์แอซิดโปรติเนสออกเป็น 2 กลุ่ม คือ เปปซิน-ไลค์เอนไซม์ (pepsin like-enzyme) ที่ผลิตโดย *Aspergillus* สีดำ, *Penicillium* และ *Rhizopus spp.* และ เรนนิน-ไลค์เอนไซม์ (rennin like-enzyme) ที่ผลิตโดย *Mucor* และ *Endothia* บางสปีชีส์

1.4.5.1 เปปซิน-ไลค์ แอซิดโปรติเนส

การนำเอนไซม์ชนิดนี้ มาใช้ในทางอุตสาหกรรม ส่วนใหญ่จะเป็นการไฮโดรไลส์โปรตีนถั่วเหลือง ในกรรมวิธีการผลิตเต้าเจี้ยว, การปรับปรุงคุณสมบัติของขนมปัง, และใช้เป็นตัวช่วยย่อยอาหาร จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ที่สำคัญในทางการค้า คือ *Aspergillus saitoi (A. phonicus)* ในปีค.ศ. 1956 Yoshida (อ้างถึงโดย Ward, 1983) ทำการแยกเอนไซม์เพื่อใช้ประโยชน์เกี่ยวกับการช่วยย่อยอาหาร เรียกว่า แอสเพอจิลโล เปปทิเดส เอ (aspergillopeptidase A) ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วง 2.5-3.0 มีกิจกรรมของเปปทิเดส, อะมิเดส และเอสเทอเรสเพียงเล็กน้อย น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 34,000-35,000 ดาลตัน และประกอบด้วยเปปไทด์สายเดี่ยวที่มีกรดอะมิโนประมาณ 283-289 ตัว ซึ่งมีกรดอะมิโนซีสเตอีน 2 ตัว ที่จับกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ และไม่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ

เอนไซม์แอซิดโปรติเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus oryzae* มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 4.0-4.5 การเก็บเอนไซม์ชนิดนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จะมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลือประมาณร้อยละ 50 ของกิจกรรมทั้งหมด เอนไซม์ชนิดนี้ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ซึ่งประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตประมาณร้อยละ 50 ที่เหลือเป็นส่วนที่ไม่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ (carbohydrate free) เอนไซม์ทุกตัวที่แยกจากการเพาะเลี้ยงแบบซับเมิร์ก (Submerg culture) จะมีส่วนประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรต มีผลทำให้เอนไซม์มีความเสถียรภายใต้อุณหภูมิสูงได้ดีขึ้น (Tsujita and Endo, 1977)

เอนไซม์ชนิดอื่นในกลุ่มนี้ที่มีความสำคัญในทางชีวเคมี ได้แก่ เปปซินที่ผลิตจาก *Rhizopus chinesis* และเพนนิซิโลเปปซิน (penicillopepsin) ที่ผลิตจาก *Penicilium janthinellum* โดยพบว่าเปปซินและเพนนิซิโลซิน จะมีลำดับของกรดอะมิโนเหมือนกัน เชื้อรา *Penicillium duponte* ผลิตเอนไซม์แอซิดโปรติเนสที่มีความเสถียรภายใต้อุณหภูมิสูง โดยพบว่าการให้ความร้อนที่ระดับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 3.5-5.5

เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เอนไซม์สามารถรักษากิจกรรมการทำงานไว้ได้ทั้งหมด (Hashimoto *et al.*, 1973)

1.4.5.2 เรนนิน-ไลค์แอซิดโปรติเนส (Rennin-like acid proteinase)

เรนนิน-ไลค์แอซิดโปรติเนสที่มีความสำคัญในทางการค้า ส่วนใหญ่ผลิตจาก *Endothia parasitica*, *Mucor pusillus* และ *M. miehei* มีประโยชน์ในอุตสาหกรรมการผลิตเนย (Ward, 1983)

1.4.5.3 มิวเคอร์โปรติเนส (Mucor proteinase)

มิวเคอร์โปรติเนสที่ผลิตจาก *Mucor pusillus* ประกอบด้วยสายเปปไทด์เดี่ยวๆ และแม้ว่าจะมีส่วนที่เป็นกรดอะมิโนซีสเตอีน 2 ตัว แต่ไม่ได้อยู่ในรูปของพันธะไดซัลไฟด์ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 30,000 ดาลตัน พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการย่อยฮีโมโกลบินและเคซีนอยู่ที่ 4.0 และ 4.5 ตามลำดับ เอนไซม์ชนิดนี้มีความอยู่ตัวในช่วงพีเอช 3-6 สำหรับแอซิดโปรติเนสที่ผลิตจาก *M. miechei* จะมีโมเลกุลขนาดใหญ่กว่าโดยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 38,000 ดาลตัน ซึ่งประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 6 พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการย่อยฮีโมโกลบินอยู่ที่ 4.5 แคลเซียม (100 กรัมต่อนม 1 ลิตร) มีผลต่อเอนไซม์ที่ผลิตจาก *M. miehei* และเรนเนตที่ผลิตจากลูกวัวในการเพิ่มความสามารถในการจับตัวเป็นก้อนของนมถึง 400 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เอนไซม์ที่ผลิตจาก *M. pusillus* จะมีการจับตัวเป็นก้อนของนมเพิ่มขึ้นถึง 600 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้นของแคลเซียมเท่ากัน (Arima *et al.*, 1970 ; Ottensen and Rickert, 1970)

1.4.5.4 เอนโดเทียพาราซิติคาโปรติเนส (Endothia parasitica proteinase)

เอนไซม์ชนิดนี้ที่ผลิตโดย *Endothia parasitica* สายพันธุ์ ATCC 14729 มีจุดไอโซอิเล็กตริคประมาณ 4.6 ประกอบด้วยสายโซ่เปปไทด์เดี่ยวๆ ที่ไม่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 34,000-39,000 ดาลตัน ช่วงพีเอชที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ต่อการย่อยฮีโมโกลบิน และเคซีนอยู่ที่ 2.0 และ 2.5 ตามลำดับ สามารถเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลส์เคซีนได้ดีกว่าเปปซิน หรือเรนนิน โดยสามารถไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์ได้ร้อยละ 29 ของสายเปปไทด์ทั้งหมด ขณะที่เปปซินสามารถไฮโดรไลส์ได้เพียงร้อยละ 8.0 และเรนนินสามารถไฮโดรไลส์ได้เพียงร้อยละ 10.2 ของเปปไทด์ทั้งหมด เอนไซม์โปรติเนสที่ผลิตจาก *Endothia parasitica* และเรนนินสามารถย่อยแคบปาเคซีน (kappa casein) ที่พีเอช 3.4 ได้ผลผลิตเป็นสายเปปไทด์จำนวน 10

และ 6 สาย ตามลำดับ นอกจากนั้นยังสามารถไฮโดรไลส์สายเบตาของอินซูลินในรูปที่ถูกออกซิไดส์ได้ดีกว่าเรนนินอีกด้วย กิจกรรมการทำให้น้ำนมจับตัวเป็นก้อนโดย *Endothia* แทบจะไม่ขึ้นกับอุณหภูมิ และอิออนของแคลเซียม ต่างจากเรนนินและโปรตินเนสที่ผลิตจาก *Mucor* (Whitaker, 1970 ; Ward, 1983)

1.4.6 เมทาลโลโปรติเนส (Metallo-proteinase)

เมทาลโลโปรติเนสเป็นเอนโดเปปทิเดส ที่ต้องการอิออนของโลหะ (ส่วนใหญ่เป็นอิออนของสังกะสี) สำหรับกลไกการเร่งปฏิกิริยา (Cantor *et al.*, 1992) เอนไซม์ชนิดนี้แบ่งเป็น 4 กลุ่ม คือ นิวทรัลโปรติเนส (neutral proteinase), อัลคาไลน์โปรติเนส และมิกโซโปรติเนส I และ II (Myxobacter proteinase I & II) นิวทรัลโปรติเนสมีความจำเพาะต่อส่วนของกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ หรือกรดอะมิโนที่มีขนาดใหญ่ อัลคาไลน์โปรติเนสมีความจำเพาะต่อสับสเตรทหลายชนิดมาก มิกโซแบคเตอร์โปรติเนส I มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนที่มีขนาดเล็ก สำหรับมิกโซแบคเตอร์โปรติเนส II มีความจำเพาะต่อไลซีน เอนไซม์ทั้ง 4 กลุ่มนี้มีความไวต่อสารประกอบเชิงซ้อนของโลหะ เช่นอีดีทีเอ แต่ไม่มีความไวต่อสารที่ประกอบด้วยหมู่ซัลฟีดริล เช่น พารา-คลอโรเมอคิวโรเบนโซเอทและดีเอฟพี

1.4.6.1 นิวทรัล-โปรติเนส (Neutral-proteinase)

จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ เอนไซม์ประกอบด้วยอะตอมของโลหะที่จำเป็น โดยส่วนใหญ่จะเป็นสังกะสี ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่ 7.0 มีความจำเพาะต่อการตัดของพันธะเปปไทด์ตรงตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์อะมิเดสและกิจกรรมการย่อยเอสเทอร์ จึงไม่สามารถย่อยพารา-ไนโตรฟีนิลเอสเทอร์ (*p*-nitrophenyl ester) และสับสเตรทที่เป็นเอสเทอร์อื่นๆได้ มีกิจกรรมการย่อยฟิวรีลาโครลิลไกลซิลลูซีนาไมด์ หรือ เอฟเอจีเอลเอ (furylacrolylglycylleucin-amide ; FAGLA) สูงมาก ขณะที่ซีรีนโปรติเนสส่วนใหญ่ไม่สามารถย่อยได้ (Ward, 1983)

ความแตกต่างบางประการ เกี่ยวกับความจำเพาะของนิวทรัลโปรติเนส ได้ทำการศึกษาโดยใช้สับสเตรทเปปไทด์สังเคราะห์ เช่น Z-Phe-X-Ala โดยให้ X เป็นกรดอะมิโนชนิดต่างๆ และศึกษาถึงการไฮโดรไลส์พันธะระหว่าง Phe-X ความจำเพาะต่อ X จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งการผลิตเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis*

มีความจำเพาะต่อลูซีน>ฟีนิลอะลานีน≥ไทโรซีน ขณะที่เทอร์โมไลซินซึ่งผลิตจาก *B. proteolyticus* มีความจำเพาะต่อลูซีน≥ฟีนิลอะลานีน>ไทโรซีน และเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa, Streptomyces griseus* และ *Aspergillus oryzae* มีความจำเพาะต่อฟีนิลอะลานีน>ลูซีนหรือไทโรซีน แสดงว่าเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus* มีความจำเพาะต่อส่วนที่เป็นสายตรงมากกว่าส่วนที่เป็นวงแหวน ขณะที่เอนไซม์จากแหล่งอื่นๆจะมีลักษณะตรงกันข้าม แบคทีเรีย *Bacillus* หลายสปีชีส์สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้เพื่อใช้ในทางการค้า ได้แก่ *B. subtilis, B. cereus, B. pumilus, B. megaterium, B. stearothermophilus* (de Boer *et al.*, 1994) , *B. thuringiensis* (Li and Yousten, 1975) และ *B. polymyxa* (Griffin and Fogarty,. 1973) เอนไซม์ที่ผลิตโดย *B. amyloliquefaciens* และ *B. thermoproteolyticus* มักใช้ในทางอุตสาหกรรมเป็นส่วนใหญ่ การเตรียมเอนไซม์โปรติเนสที่ผลิตจาก *A. oryzae* ในทางการค้า ประกอบด้วยนิวทรัลเมทาลโลโปรติเนส, แอซิดโปรติเนส และ อัลคาไลน์โปรติเนส จุลินทรีย์ชนิดอื่นที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ ได้แก่ *Streptomyces naraensi, S. griseus* และ *P. aeruginosa* เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Clostridium* ส่วนใหญ่จะเป็นคอลลาจีเนส (collagenase) ส่วน *P. aeruginosa* จะผลิตเอนไซม์อีลาสเตส (elastase) ที่มีกิจกรรมการย่อยอีลาสติน

ก. นิวทรัลโปรติเนสที่ผลิตจาก *Bacillus*

Yoneda และ Maruno (1975) รายงานว่าเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* ประกอบด้วยนิวทรัลโปรติเนสและสับติไลซิน ในอัตราส่วนเท่ากับ 1 ต่อ 1 Dancer และ Madelstam (1975) รายงานว่านิวทรัลโปรติเนสจะถูกย่อยสลายโดยสับติไลซิน และสังเกตพบว่า กิจกรรมของนิวทรัลโปรติเนสในอาหารที่มีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จะมีค่าเพิ่มขึ้น 4.5 เท่า เมื่อมีพีเอ็มเอสเอฟอยู่ในอาหาร และอิออนของแคลเซียมจะมีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์

เทอร์โมไลซิน (thermolysin) ที่ผลิตโดย *B. thermoproteolyticus* มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 34,000 ดาลตัน และประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 316 ตัว ในสายเปปไทด์เดี่ยวๆที่ไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ โมเลกุลที่ม้วนเข้าหากันเพื่อให้อยู่ในรูปพู (lobe) จะแยกออกจากกันตรงรอยแตกที่ลึกมาก ซึ่งเป็นส่วนก้นที่มีอะตอมของสังกะสีที่จำเป็นตั้งอยู่ โดยล้อมรอบส่วนที่เป็นฮีสติดีน (histidine) 2 ตัว และกลูตาเมท และจากการศึกษาพบว่าอิออนของสังกะสีไม่มีความจำเป็นต่อความอยู่ตัวของโมเลกุล (Weaver *et al.*, 1976 อ้างถึง

โดย Ward, 1983) โมเลกุลของเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วยแคลเซียม 4 อะตอม จึงมีความสำคัญต่อการทนความร้อนของเอนไซม์ เทอร์โมไลซินเป็นเอนไซม์ในทางการค้าที่มีความเสถียรสูง โดยสามารถรักษากิจกรรมหลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ได้ถึงร้อยละ 50 ของกิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ (Endo, 1962 อ้างถึงโดย Ward, 1983)

นิวทรัลโปรติเนสที่ผลิตโดย *B. amyloliquefaciens* มีคุณสมบัติหลายประการที่คล้ายคลึงกับเทอร์โมไลซิน เอนไซม์ชนิดนี้ประกอบด้วยสายเปปไทด์เดี่ยวๆที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 37,000 ดาลตัน และประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 326 ตัว แต่มีความทนทานต่อความร้อนต่ำกว่าเทอร์โมไลซิน คือ จะสูญเสียกิจกรรมถึงร้อยละ 50 ของกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมด เมื่ออยู่ภายใต้อุณหภูมิ 59 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ประกอบด้วยแคลเซียมเพียง 2 อะตอม และมีจำนวนร้อยละของกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำต่ำกว่าเทอร์โมไลซิน ความแตกต่างเหล่านี้น่าจะเป็นสาเหตุให้เอนไซม์มีความเสถียรต่ำกว่าเทอร์โมไลซิน (Ward, 1983)

Feder และ Shuck (1970) ได้ศึกษาถึงความแตกต่างเกี่ยวกับความจำเพาะของนิวทรัลโปรติเนสที่ผลิตจาก *B. thermoproteolyticus, B. subtilis* และ *B. megaterium* ต่อสับสเตรทเปปไทด์สังเคราะห์ พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตจาก *B. thermoproteolyticus* และ *B. megaterium* มีความคล้ายคลึงกันมาก เมื่อพิจารณาในแง่ของความจำเพาะของเอนไซม์ต่อลูซีน และฟีนิลอะลานีนในสับสเตรทสังเคราะห์

ข. นิวทรัลโปรติเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus*

เอนไซม์นิวทรัลเมทาลโลโปรติเนส ที่ผลิตจาก *A. oryze* แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกมีกิจกรรมการทำงานได้ดีที่พีเอช 7.0 มีความเสถียรเมื่ออยู่ในช่วง พีเอช 5.5-12.0 และถูกยับยั้งการทำงานอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส กลุ่มที่ 2 มีกิจกรรมการทำงานได้ดีที่พีเอช 5.5-6.0 และมีความเสถียรภายใต้อุณหภูมิสูง สามารถรักษากิจกรรมของเอนไซม์หลังจากการให้ความร้อนที่ระดับอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ได้มากกว่าร้อยละ 50 ของกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมด (Nakadai *et al.*, 1973 อ้างถึงโดย Ward, 1983) และในปี ค.ศ. 1963 Bergkvist (อ้างถึงโดย Ward, 1983) ทำการแยกนิวทรัลโปรติเนสได้ 2 ส่วน จาก *A. sojae* และแสดงคุณลักษณะว่าเป็นซิงค์เมทาลโลโปรติเนสที่มีอะตอมของสังกะสี 1 กรัมต่อโมเลกุล ซึ่งจำเป็นต่อกิจกรรมการทำงานของ

เอนไซม์ เอนไซม์แต่ละส่วนมีความเสถียรภายใต้อุณหภูมิและพีเอช รวมทั้งโครงสร้างของเอนไซม์ต่างกัน เอนไซม์ทั้ง 2 ส่วนนี้ไม่มีกิจกรรมของเอสเทอเรส, และเอ็กโซเปปทิเดส ส่วนที่ 1 มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำตรงจุดตัดทางด้านอะมิโน ส่วนที่ 2 มีความจำเพาะต่อเปปไทด์สังเคราะห์และสายเบตาของอินซูลินในรูปที่ถูกออกซิไดส์

นอกจากนั้นมีรายงานถึงนิวทรัลโปรติเนสที่ไวต่ออีดีทีเอ ซึ่งแยกได้จาก *Aspergillus ochraceus, A.flavus* และ *A. paraditicus* อย่างไรก็ตามเอนไซม์ที่มีความสำคัญในทางการค้าเป็นเอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. oryzae* เท่านั้น ซึ่งใช้เตรียมทั้งแอซิดและอัลคาไลน์โปรติเนส และส่วนใหญ่จะมีกิจกรรมการย่อยเปปไทด์ (Ward, 1983)

ในปี ค.ศ. 1980 Gripon และคณะ รายงานว่านิวทรัลโปรติเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus oryzae* และ *A. sojae* สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มีค่าพีเอชต่ำ คือประมาณ 5-6 และมีน้ำหนักโมเลกุลเพียง 19,000-20,000 ดาลตัน

ค. อัลคาไลน์โปรติเนส (Alkaline proteinase)

แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa, Serratia spp., Escherichia freundii* และ *Erwinia chryxanthemi* เอนไซม์กลุ่มนี้ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง คือในช่วงพีเอช 9-10 (Cantor *et al.*, 1992) มีขนาดใหญ่กว่านิวทรัลโปรติเนส น้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 48,000-60,000 ดาลตัน มีความไวต่อสารคีเลตน้อยกว่านิวทรัลเมทาลโลโปรติเนส คือ นิวทรัลเมทาลโลโปรติเนสจะมีความไวต่ออีดีทีเอ ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 10^{-3} โมลาร์ ขณะที่อัลคาไลน์โปรติเนสถูกยับยั้งการทำงานเมื่อมีความเข้มข้นของอีดีทีเอสูงกว่า 10^{-2} โมลาร์ มีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่เป็นเปปไทด์โมเลกุลใหญ่หลายชนิดและสับสเตรทที่เป็นโปรตีน (Ward, 1983)

ง. มิกโซแบคเตอร์ โปรติเนส I (Myxobacter proteinase I)

เอนไซม์ชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 14,000 ดาลตัน พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ที่ 9.0 และมีความสามารถในการย่อยผนังเซลล์ของ *Arthrobacter crystellopoites* (Ward, 1983)

จ. มิกโซแบคเตอร์ โปรติเนส II (Myxobacter proteinaseII)

เอนไซม์ชนิดนี้มีความจำเพาะเป็นพิเศษต่อกรดอะมิโนไลซีน ในการไฮโดรไลส์เปปไทด์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ แต่จะไม่สามารถย่อยเซลล์ของแบคทีเรียได้

(Wingara *et al.*, 1972) มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 17,000 ดาลตัน และพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วง 8.5-9.0 (Ward, 1983)

1.5 การประยุกต์ใช้เอนไซม์โปรติเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์

การนำเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ มาใช้ประโยชน์ในทางการค้า สามารถใช้ได้จำกัดเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น ได้แก่ สับติไลซินอัลคาไลน์โปรติเนสที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis,* เรนเนตที่ผลิตจาก *Mucor spp.,* นิวทรัลโปรติเนสที่ผลิตจาก *B. amyloliquefaciens,* แอซิดโปรติเนส, นิวทรัลโปรติเนสและอัลคาไลน์โปรติเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus oryzae* ทั้งนี้เนื่องจากต้องพิจารณาเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ผลิตจากพืชและสัตว์ โดยเฉพาะเรนเนตที่ผลิตจากตับอ่อนลูกวัว เอนไซม์โปรติเนสที่ผลิตจากข้าวมอลต์และมะละกอ ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายในการผลิตเนย, การกำจัดขนสัตว์, การทำเบียร์, การทำให้โปรตีนตกตะกอน, การไฮโดรไลส์โปรตีนและการทำให้เนื้อมีความอ่อนนุ่ม

1.5.1 การใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอก

Ng และ Kenealy (1986) กล่าวว่า ในการเตรียมเอนไซม์สำหรับใช้ในผงซักฟอกควรคำนึงถึง

1. เอนไซม์ต้องมีความเสถียร เมื่ออยู่ในรูปของผงซักฟอก ที่มีลักษณะเป็นผง ในระหว่างการเก็บรักษา

2. เอนไซม์ต้องมีความเสถียร และทำงานได้ในสารละลายผงซักฟอก ขณะการซักล้าง และมีความเสถียรภายใต้อุณหภูมิสูงพอที่จะซักด้วยเครื่องซักผ้าได้

3. เอนไซม์ต้องสามารถไฮโดรไลส์โปรตีนได้หลายชนิด

4. เอนไซม์ที่อยู่ในผงซักฟอกชนิดผง ควรอยู่ในรูปที่ปราศจากฝุ่นละออง (dust-free form)

ค่าพีเอชของสารละลายผงซักฟอก ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงพีเอช 9.0-9.5 อุณหภูมิที่ต้องการซักในยุโรปกับสหรัฐอเมริกาจะแตกต่างกัน อุณหภูมิที่ใช้ซักในยุโรปมีตั้งแต่อุณหภูมิห้อง จนถึง 100 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราประมาณ 2 องศาเซลเซียสต่อนาที มีผลให้เอนไซม์สามารถทำงานจนอุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 15-20 นาที หลังจากนั้นเอนไซม์โปรติเนสส่วนใหญ่จะถูกยับยั้งการทำงาน สภาวะการซักภายใต้อุณหภูมิที่ใช้ในสหรัฐอเมริกาอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 นาที

สำหรับการซักที่ต้องการการรักษาคุณภาพเนื้อผ้า จะใช้อุณหภูมิต่ำกว่า และใช้น้ำเย็น ซึ่งเอนไซม์ในผงซักฟอกจะมีกิจกรรมการทำงานต่อโปรตีนที่เปื้อนอยู่ในเนื้อผ้า แต่จะใช้ระยะเวลาการทำงานเพิ่มขึ้น

เอนไซม์ย่อยโปรตีนหลายชนิดมีโครงสร้างง่ายๆ ไม่สามารถรวมตัวกับสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในผงซักฟอกส่วนใหญ่ได้ ผงซักฟอกที่เติมเอนไซม์มักจะประกอบด้วยตัวออกซิไดส์ พบว่าตัวออกซิไดส์ในหมู่ไทออลของซีสเตอีน (cysteine thiol group) มีผลยับยั้งกิจกรรมของปาเปน (papain) ตรงบริเวณเร่งของเอนไซม์, การออกซิไดส์โดยเปอร์บอเรตมีผลในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างตติยภูมิของโมเลกุลของเอนไซม์ นอกจากนั้นผงซักฟอกมักจะประกอบด้วยสารคีเลต เช่น ฟอสเฟต และอีดีทีเอ มีผลให้ไม่สามารถนำเอนไซม์เมทาลโลโปรติเนสมาใช้ในผงซักฟอกได้ ผงซักฟอกที่เติมเอนไซม์ในอุดมคติควรมีความเสถียรในช่วงพีเอช 9.0-10.5, ภายใต้อุณหภูมิในช่วงกว้าง, สามารถอยู่รวมกับตัวออกซิไดส์และสารคีเลตได้ และมีความจำเพาะต่อสับสเตรทหลายชนิด (Ward, 1983 ; Ng and Kenealy, 1986)

กลไกการกำจัดรอยเปื้อนของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ขึ้นอยู่กับชนิดของรอยเปื้อน คือ รอยเปื้อนที่เป็นโปรตีน เช่น เลือด ซึ่งเอนไซม์จะทำหน้าที่ไฮโดรไลส์ฮีโมโกลบิน ทำให้คราบรอยเปื้อนหลุดออกไป รอยเปื้อนอีกประเภทเป็นรอยเปื้อนที่มีโปรตีนเป็นตัวเชื่อมสิ่งสกปรก ได้แก่ เขม่า และฝุ่นละออง เมื่อเอนไซม์ทำหน้าที่ย่อยโปรตีน จะมีผลให้สิ่งสกปรกเหล่านี้หลุดออกไปด้วย (Outtrup and Boyce, 1990)

การผลิตผงซักฟอกที่เติมเอนไซม์ จะใช้วิธีการหมักมาตรฐาน (standard fermentation) ร่วมกับกระบวนการนำกลับมาใช้ใหม่ (recovery process) ต่อมาในปี ค.ศ. 1971 มีปัญหาการแพ้ผงซักฟอกที่เติมเอนไซม์เกิดขึ้น จึงต้องมีการพัฒนากระบวนการผลิตเอนไซม์ในผงซักฟอกในรูปของฝุ่นละอองให้ลดต่ำลง โดยการใช้แคปซูลหุ้มเอนไซม์ (encapsulated enzyme particle) ซึ่งประกอบด้วยสารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ (non-ionic surfactants) หรือสารผสมของโซเดียมคลอไรด์ และเอทิลีนไกลคอล (ethylene glycol) ในกระบวนการผลิต จะผสมเอนไซม์เข้ากับสารละลายผงซักฟอกที่ไม่มีประจุ (non-ionic detergent) แล้วจึงพ่นในอากาศที่มีความเย็น จนกระทั่งกลายเป็นเกล็ด เพื่อให้อยู่ในลักษณะเป็นเม็ดได้ สำหรับวิธีการผลิตที่จดสิทธิบัตรแล้วในปัจจุบัน ปฏิบัติโดยนำผงซักฟอกที่เติมเอนไซม์มาจับกับเส้นใยเซลลูโลส และสารที่มีลักษณะเป็นขี้ผึ้ง ทำให้อยู่เป็นเม็ดโดยใช้

เครื่องจักร กระบวนการทำให้เป็นเม็ดโดยอาศัยเซลลูโลสจะช่วยให้เอนไซม์มีความทนทานต่อแรงจากเครื่องจักรในกระบวนการผลิตผงซักฟอกได้ดี กระบวนการทำให้เป็นเม็ดครั้งที่ 2 เป็นการปรับปรุงความเสถียรของเอนไซม์ในผงซักฟอก (Ward, 1983)

การนำเอนไซม์โปรติเนสมาใช้ในผงซักฟอก ประสบความสำเร็จในทางการค้าสูงมาก สับติไลซินคาร์ลสเบิร์กที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* เป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดแรกที่นำมาใช้ในผงซักฟอก เนื่องจากมีความทนทานต่อสภาวะที่เป็นด่าง และมีฟอสเฟตในระดับความเข้มข้นสูง (Outtrup and Boyce, 1990) ต่อมามีการวิจัยพบ *Bacillus* ที่เติบโตในสภาวะเป็นด่างซึ่งผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่สามารถนำมาใช้ในผงซักฟอกได้ ได้แก่ *Bacillus* สายพันธุ์ Ya, Yb, GX6644, GX6638 I-III, LA 1-1, ES 2-5 และ NF-1 และจากแหล่งอื่นๆ ได้แก่ *Bacillus thermoruber, Bacillus APG501, Flavobacterium arborescens, Fusarium sp., Conidibolus sp., Thermomonospora fusca,* และ *Streptomyces sp.* การวิจัยในระยะหลังเป็นการปรับปรุงเอนไซม์ให้มีคุณสมบัติในการลบรอยเปื้อน และมีความเสถียรเพิ่มสูงขึ้น มีผลให้ค้นพบการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนโดย *Bacillus* ที่เติบโตได้ดีในสภาวะเป็นด่างสายพันธุ์ใหม่ๆเพิ่มมากขึ้น

1.5.2 อุตสาหกรรมการฟอกหนัง

1.5.2.1 กระบวนการกำจัดขน (Unhairing)

ในต้นศตวรรษได้มีการพิจารณาถึงประโยชน์ของเอนไซม์โปรติเนส ในการกำจัดขนสัตว์ พบว่า เอนไซม์ชนิดนี้มีข้อจำกัดสำหรับการใช้ประโยชน์เพื่อจุดประสงค์นี้ เนื่องจากการใช้วิธีการทางเคมีจะมีความซับซ้อนต่ำ และราคาถูกกว่า กระบวนการกำจัดขนสัตว์ในวิธีทางเคมีปฏิบัติโดยใช้ปูนขาวที่มีโซเดียมซัลไฟด์ (sodium sulphide) เป็นองค์ประกอบ มีผลให้ขนสัตว์เกิดการโป่งพองและหลุดออก รวมทั้งสามารถทำลายขนได้อีกด้วย หากต้องการเก็บขนสัตว์ในสภาพที่ไม่ถูกทำลาย สามารถปฏิบัติได้โดยใช้สารเคมีกับด้านที่เป็นเนื้อสัตว์ (flesh side) อย่างไรก็ตาม การใช้สารเคมีในกระบวนการกำจัดขนสัตว์มีผลเสียคือ มีผลต่อสุขภาพคนงาน ซึ่งเกิดจากไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulphide) และปัญหาในการกำจัดของเสีย (waste treatment) ทำให้หันมาใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีนเพิ่มขึ้น ในวิธีการทางเอนไซม์นั้น จะใช้เอนไซม์โปรติเนสที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* ผสมกับซัลไฟต์ (sulphite) ที่พีเอชค่อนข้างเป็นกลาง และอุณหภูมิในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส (Ward, 1983 ; Outtrup and Boyce, 1990)

ในส่วนของการใช้เอนไซม์โปรติเนสจาก *Bacillus spp.* ที่มีการทำงานในสภาวะที่เป็นด่างสูงนั้น กำลังมีการพัฒนา ปฏิบัติโดยใช้สารละลายที่ประกอบด้วยปูนขาว 8 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์สำหรับกำจัดขน 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ภายใต้อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส พีเอชของสารละลายอยู่ระหว่าง 12.0-12.5 ในระหว่างที่เอนไซม์มีการทำงาน สีผิวที่ไม่พึงปรารถนาจะถูกทำลายไปด้วย และมีการขยายตัวของพื้นที่ผิวเพิ่มขึ้น

1.5.2.2 แบทติง (Bating)

จุดประสงค์ของแบทติงคือ ทำให้เครื่องหนังมีความอ่อนนุ่ม และยืดหยุ่นได้ตามความต้องการ เดิมแหล่งของเอนไซม์ที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์จากตับอ่อน การใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์นั้น เพิ่งจะเป็นที่แพร่หลายเมื่อเร็วๆนี้ โดยใช้เอนไซม์โปรติเนสที่ผลิตจาก *Aspergillus oryzae*, *Bacillus amyloliquefaciens* หรือ *B. licheniformis* หรือสารผสมของเอนไซม์เหล่านี้ (Ward, 1983 ; Outtrup and Boyce, 1990)

1.5.3 การใช้เอนไซม์โปรติเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมการผลิตเนย

เมื่อประมาณ 10 ปี ที่ผ่านมา ได้มีการพัฒนาและยอมรับการใช้เรนเนตที่ผลิตจากจุลินทรีย์ ได้แก่ *Mucor miehei, M. pusillus* และ *Endothia parasitica* ซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้แก่ Emparase ที่ผลิตจาก *M. pusillus* โดยบริษัท Dairy Food Laboratories , Fromase ที่ผลิตจาก *M. miehei* โดยบริษัท G.B. Fermentation Industries , Hannilase ที่ผลิตจาก *M. miehei* โดยบริษัท Chr. Laboratories , Marzyme ที่ผลิตจาก *M. miehei* และ *Aspergillus oryzae* โดยบริษัท Miles Laboratories เป็นต้น เรนเนตจาก *Mucor* ที่ซื้อขายในท้องตลาดมักอยู่ในรูปของเหลว และมีความเสถียรเมื่อมีเกลือและวัตถุกันเสียอยู่ด้วย เอนไซม์ที่ผลิตจาก *E. parasitica* มีความเสถียรต่ำมาก และมักซื้อขายในรูปของแข็ง ความต้องการเรนเนตที่ผลิตจากจุลินทรีย์ มีความสัมพันธ์กับความขาดแคลนเรนเนตที่ผลิตจากตับอ่อนของลูกวัว โดยเฉพาะในสหรัฐอเมริกา รวมทั้งความเชื่อในลัทธิศาสนา และหลักธรรม ต่อการใช้เอนไซม์ที่ได้จากสัตว์ ในช่วงปี ค.ศ. 1960-1970 พบว่าปริมาณลูกวัวที่ถูกฆ่าในสหรัฐอเมริกา มีปริมาณลดลงร้อยละ 50 คือ จาก 8,000,000 เหลือ 4,000,000 ตัวต่อปี และเป็นช่วงเวลาเดียวกับที่การผลิตเนยในประเทศนี้เพิ่มขึ้น 50 เปอร์เซ็นต์ คือ จาก 1.5 พันล้าน เป็น 2.2 พันล้านปอนด์ต่อปี (USDA, 1972 อ้างถึงโดย Ward, 1983) ขณะที่

ประเทศในยุโรปแทบจะไม่มีการขาดแคลนเรนเนตที่ผลิตจากลูกวัวเลย และในกระบวนการผลิตมักผสมเรนเนตที่ผลิตจากลูกวัว และเปปซินจากวัวและหมู ในอัตราส่วน 50 ต่อ 50

กระบวนการผลิตเนยประเภทเชดดาร์ (cheddar cheese) โดยทั่วๆไปมักเติมเรนเนตลงในนม ภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเติมเอนไซม์เพื่อให้นมเกิดการจับตัวเป็นก้อน ปริมาณมาตรฐานทั่วๆไปมีค่าประมาณ 150-200 มิลลิลิตรต่อน้ำนม 1,000 กิโลกรัม และเกิดการจับตัวเป็นก้อนภายใน 10-15 นาที ในประเทศสวิสเซอร์แลนด์ กระบวนการผลิตเนยส่วนใหญ่ดำเนินภายใต้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (Ward, 1983)

กระบวนการจับตัวเป็นก้อนของนม โดยใช้เอนไซม์แบ่งเป็น 3 ระยะ คือ ระยะเริ่มต้น หรือเอนไซมิคเฟส (enzymic phase), ระยะที่ 2 หรือคล็อทติงเฟส (clotting phase) และระยะที่ 3 หรือโปรติโอไลติคเฟส (proteolytic phase) หากสามารถเพิ่มอุณหภูมิของระยะที่ 1 และ 2 ให้สูงถึง 45 องศาเซลเซียส จะทำให้เกิดการจับตัวเป็นก้อนของนมเกิดได้เร็วขึ้น ภายใต้อุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส ปฏิกิริยาของเอนไซม์สามารถเกิดขึ้นได้ แต่ส่วนที่ข้นแข็งไม่สามารถตกลงมาอยู่ข้างล่างได้ จนกว่าจะมีการให้ความร้อน ในกระบวนการผลิตเนยแบบต่อเนื่อง ปฏิบัติโดยใช้เรนเนตในการตกตะกอนนมภายใต้อุณหภูมิต่ำ และมีการจับตัวเป็นก้อน ระยะที่ 3 เป็นระยะที่มีความซับซ้อนและเกี่ยวข้องกับแรงจับของนมกับเอนไซม์

มีการทดลองเปรียบเทียบถึงปริมาณ และความแน่นอนของนมที่ตกตะกอน ในกระบวนการผลิตเนย โดยใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์กับที่ผลิตจากตับอ่อนลูกวัว เนยหลายชนิดที่ผลิตโดยใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์จะถูกนำมาทดสอบทางประสาทสัมผัส (organoleptic test) (Arima *et al.*, 1970) การจับตัวเป็นก้อนของนมโดยใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์มีผลให้เนยมีรสขมมากกว่าการใช้เอนไซม์จากตับอ่อน โดยเฉพาะเนยที่ผลิตใหม่ๆ (young cheese) บางครั้งนมที่จับตัวเป็นก้อนโดยใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์จะมีการปนเปื้อนของเอนไซม์ไลเปส (lipase) และโปรติเนส หากจะเตรียมเพื่อใช้ในทางการค้าควรผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์เพื่อกำจัดสารปนเปื้อนเหล่านั้นก่อน สามารถพบเอนไซม์ไลเปสได้ในแป้งที่อับชื้น และกำจัดเอนไซม์ชนิดนี้ได้โดยการให้ความร้อน, ใช้ตัวทำละลาย หรือเกลือ หรือกระตุ้นโดยใช้ความเป็นกรด-ด่าง

การจับตัวเป็นก้อนของนมโดยเรนเนตที่ผลิตจากจุลินทรีย์ มีความคล้ายคลึงกับเรนเนตที่ผลิตจากตับอ่อน คือ จะมีกิจกรรมต่อเคซีนในหลายๆส่วน ซึ่งสามารถเปรียบเทียบ

ได้โดยใช้วิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซีส (polyacrylamide gel electrophoresis) เรนเนตที่ผลิตจาก *M. miehei* และ *M. pusillus* จะมีรูปแบบการใช้โปรตีนที่ใกล้เคียงกันกับเรนเนตที่ผลิตจากตับอ่อน เรนเนตที่ผลิตจาก *Endothia parasitica* มีคุณสมบัติในการย่อยโปรตีนสูง พบว่าสามารถย่อยเคซีนได้เป็นไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนอยู่ในปริมาณสูงมาก (Ward, 1983)

การศึกษาเกี่ยวกับปฏิกิริยาของเรนเนตบริสุทธิ์ แสดงให้เห็นว่าเรนเนตสามารถย่อยสลายโปรตีนในเนยให้เป็นสายโพลีเปปไทด์ (polypeptide) ซึ่งจะถูกย่อยสลายต่อไปเป็นเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำๆ โดยแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) และจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆ จากการศึกษาผลของการเติมสารละลายเอนไซม์จากแหล่งต่างๆลงในนมข้นที่ปราศจากเชื้อ (sterile curd) พบว่าปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเนสที่ผลิตจากแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค มีความแตกต่างจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นอย่างชัดเจน เอนไซม์นิวทรัลโปรติเนสที่ผลิตจาก *Penicillium caseicolum* และแอซิดโปรติเนสที่ผลิตจาก *Penicillium roqueforti* สามารถย่อยโปรตีนได้เป็นไนโตรเจนที่ละลายน้ำได้เพิ่มขึ้น และมีอยู่ในรูปกรดอะมิโนเพียงเล็กน้อย การเติมเอนไซม์โปรติเนสจากภายนอกลงไป น่าจะเป็นการช่วยปรับปรุงคุณภาพของเนย และช่วยเร่งเวลาสุกให้เร็วขึ้น ระหว่างที่เนยจะสุก พบว่าเรนเนต และอะมิโนเปปทิเดสที่ผลิตจากแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค มีบทบาทสำคัญในการช่วยให้รสชาดของเนยดีขึ้น สารสกัดจากเซลล์ของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติคจะมีกิจกรรมต่อกรดอะมิโนทางด้านปลายของสายเปปไทด์ และจากการจำแนกคุณลักษณะ พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวคือ *Streptococcus ceremoris* และ *S. lactis* (Hwang *et al.*, 1981)

1.5.4 การไฮโดรไลส์โปรตีน (Protein hydrolysis)

สันนิษฐานว่า การพัฒนาเอนไซม์สำหรับอุตสาหกรรมโปรตีน เกิดขึ้นครั้งแรกใน ค.ศ. 1980 และบริษัทที่ผลิตเอนไซม์หลายแห่ง ได้ร่วมกันพัฒนากระบวนการผลิตเอนไซม์สำหรับการไฮโดรไลส์โปรตีน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการไฮโดรไลส์โปรตีนจากถั่วเหลือง และโปรตีนจากผักอื่นๆ รวมทั้งการไฮโดรไลส์โปรตีนเนื้อปลา, เนื้อ และโปรตีนจากจุลินทรีย์

ปัจจัยซึ่งมีผลต่อการย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ ความจำเพาะของเอนไซม์, ขอบเขตในการทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีน, ความเข้มข้นของสับสเตรทและเอนไซม์, พีเอช, อุณหภูมิ, ปริมาณของประจุ (ionic strength) และการมีสารยับยั้งอยู่ด้วย โปรตีนในธรรมชาติโดยทั่วไปไม่มีความไวต่อการย่อยสลายโดยเอนไซม์โปรติเนส เนื่องจาก

มีโครงสร้างที่แข็งแรง การทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีนเป็นผลจากการคลายตัวของโมเลกุลโปรตีนออกมา ทำให้พันธะเปปไทด์สัมผัสกับภายนอก และมีความไวที่จะสัมผัสกับการย่อยสลายโดยเอนไซม์ได้เพิ่มขึ้น

1.5.4.1 การไฮโดรไลส์โปรตีนจากถั่วเหลือง

ปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์จากการไฮโดรไลส์โปรตีนจากถั่วเหลือง อย่างแพร่หลายมาก โดยใช้เป็นส่วนผสมในอาหารที่มีพีเอชต่ำ การใช้ประโยชน์ขึ้นอยู่กับการละลายน้ำของผลิตภัณฑ์ ซึ่งไม่ได้เป็นสาเหตุของปัญหาการเกิดเจลาติน, ความขุ่น และการเปลี่ยนแป้งเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร

ปัญหาหลักที่ประสบเกี่ยวกับการไฮโดรไลส์โปรตีนในน้ำซีอิ้ว คือ ทำให้เกิดรสขมจากเปปไทด์ ซึ่งเกิดจากการไฮโดรไลส์โปรตีนที่มากเกินพอ และในปี ค.ศ. 1971 Ney (อ้างถึงโดย Ward, 1983) อธิบายว่า รสขมจากการไฮโดรไลส์เกิดจากส่วนของกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำมีปริมาณมากเกินไป ในกรณีของโปรตีนจากถั่วเหลืองที่ไฮโดรไลส์แล้ว จะสังเกตพบว่า ระดับความขมจะเพิ่มขึ้นตามระดับการไฮโดรไลส์

1.5.4.2 การไฮโดรไลส์เจลาติน

เจลาตินที่ไฮโดรไลส์แล้ว จะมีคุณค่าทางโภชนาการต่ำกว่าถั่วเหลืองที่ถูกไฮโดรไลส์ อย่างไรก็ตามสามารถใช้ประโยชน์จากการไฮโดรไลส์ได้ เช่น ใช้เป็นสารให้ฟองในแชมพู, ใช้เป็นเครื่องดื่มที่ให้พลังงานต่ำ สำหรับบุคคลที่ต้องการลดความอ้วน กระบวนการไฮโดรไลส์ประกอบด้วยการใช้สารละลายเจลาติน 30 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับอัลคาไลน์และนิวทรัลโปรติเนส ภายใต้อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำสารผสมดังกล่าว ไปผ่านกระบวนการพาสเจอไรส์ ภายใต้อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จะได้ผลิตภัณฑ์ประมาณ 3-6 เปอร์เซ็นต์

1.5.4.3 การใช้เอนไซม์โปรติเนสในการผลิตเบียร์และน้ำคั้นผลไม้

ในขบวนการผลิตเบียร์จะใช้เอนไซม์โปรติเนส 2 ขั้นตอน คือ ระหว่างการบด (mashing) ซึ่งมีปริมาณของน้ำคั้น และระดับของอัลฟา-อะมิโนไนโตรเจน (α-amino nitrogen) ในน้ำเบียร์ที่ต้มแล้ว แต่ยังไม่ผ่านการหมัก (wort) เพิ่มขึ้น และระหว่างการผลิตเบียร์เสร็จ ซึ่งต้องมีการกำจัดส่วนขุ่น (chill haze) ออกจากเบียร์ เนื่องจากส่วนใหญ่จะใช้ปาเปน (papain) ซึ่งเป็นเอนไซม์จากพืช จึงไม่ขอกล่าวถึงกระบวนการในที่นี้

ระดับของอัลฟา-อะมิโนไนโตรเจนในน้ำเบียร์ที่ต้มแล้ว แต่ยังไม่ผ่านการหมัก ที่ยอมรับได้โดยทั่วไปมีค่าประมาณ 140-150 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเพียงพอต่อการหมักธรรมดา และมักพบในน้ำเบียร์ที่ใช้ข้าวมอลต์ในการผลิต ยีสต์ที่เติบโตในน้ำต้มเบียร์จะใช้กรดอะมิโนในน้ำต้มเบียร์ ส่วนใหญ่เป็นกรดอะมิโนกลูตาเมท, แอสพาร์เตท, แอสพาราจีน (asparagine), กลูตามีน (glutamine), ซีรีน, ทรีโอนีน (threonine), ไลซีน และอาร์จินีน ซึ่งจะถูกดูดซึมเข้าไปได้อย่างรวดเร็วมาก และกรดอะมิโนโปรลีนเป็นชนิดที่ไม่ถูกใช้เลย และยังเป็นส่วนประกอบหลักอยู่ในน้ำต้มเบียร์ กรดอะมิโนอิสระที่อยู่ในน้ำต้มเบียร์จะเกิดขึ้นระหว่างที่เกิดกระบวนการมอลติง (malting process) และเกิดขึ้นโดยกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสต่อข้าวมอลต์ในระหว่างที่เกิดมอลต์แมชชิงไซเคิล (malt mashing cycle) ระหว่างการเกิดมอลติงพบว่า ปริมาณของฮอร์ดีน (hordein) และกลูเตลิน (glutaelin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญในข้าวบาร์เลย์จะลดลง 60 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีปริมาณของเปปไทด์และกรดอะมิโนเพิ่มขึ้น ความแตกต่างในด้านราคาระหว่างข้าวบาร์เลย์กับธัญพืชชนิดอื่น ทำให้มีแนวโน้มที่จะใช้สัดส่วนของธัญพืชชนิดอื่นในกระบวนการผลิตเบียร์เพิ่มขึ้น การเติมเอนไซม์นิวทรัลโปรติเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ *Bacillus* และ *Aspergillus spp.* ซึ่งมีผลในการส่งเสริมให้มีปริมาณน้ำคั้น (extract) และระดับของอัลฟา-อะมิโนไนโตรเจนเพิ่มขึ้น ขณะที่เอนไซม์โปรติเนสที่ผลิตจาก *Bacillus* ไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้เนื่องจากถูกยับยั้งโดยส่วนประกอบในข้าวบาร์เลย์ การผลิตอัลฟา-อะมิโนไนโตรเจนเกิดจากการกระทำของมอลต์ หรือการเติมเอนไซม์โปรติเนส ในช่วงอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส และมีแมชชิงไซเคิลมากมายที่มีการผลิตอัลฟา-อะมิโนไนโตรเจนสูงสุด (Ward, 1983)

อัตราการรวมกันระหว่างข้าวมอลต์กับ adjunct ที่เป็นธัญพืชชนิดอื่น ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช และภูมิประเทศ ตามความสามารถในการหาวัตถุดิบในแต่ละท้องถิ่น, ธรรมชาติของพืช, ระยะเวลาในวงจรของการผลิตเบียร์ และคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อการสนับสนุนอัตราการเติมและการเลือกชนิดของเอนไซม์โปรติเนส เอนไซม์ชนิดอื่นๆที่มีความสำคัญในการผลิตเบียร์และน้ำคั้นจากธัญพืช ได้แก่ อัลฟา-อะไมเลส และเบตา-กลูคาเนส (β-glucanase) ในการผลิตน้ำต้มเบียร์ที่ยังไม่ผ่านกระบวนการหมักจำเป็นต้องไม่ให้ธัญพืชบดซึ่งเติมโปรติเนสแล้วในอัตราที่สูงเกินไป เพราะจะทำให้มีการผลิตอัลฟา-อะมิโนไนโตรเจนในน้ำต้มเบียร์เพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลในการลดความอยู่ตัวของเบียร์ (Ward, 1983)

1.5.4.4 การใช้เอนไซม์โปรติเนสในโรงงานทำแป้งและขนมปัง

คุณสมบัติที่พิเศษ และเปลี่ยนแปลงได้ของแป้งทำขนมปัง ส่วนใหญ่เกิดจากกลูเต็น (gluten) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ และทำให้แป้งทำขนมปังมีความเหนียวนุ่มเป็นพิเศษ ความเหนียวของแป้ง มีความสัมพันธ์กับปริมาณ และคุณภาพของกลูเต็น แป้งที่มีความเหนียวจะทำให้แป้งต้มขนมปัง (dough) มีความทนทานต่อการผสมที่รุนแรง นอกจากนี้ ยังมีการเติมเอนไซม์โปรติเนส และอัลฟา-อะไมเลสลงไปในก้อนขนมปัง ทำให้คุณภาพของขนมปังดีขึ้น (El-dash and Johnson, 1967)

วัตถุประสงค์

1. แยกเชื้อแบคทีเรีย ที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง และอุณหภูมิสูง
2. คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง และอุณหภูมิสูง
3. บ่งชี้ชนิดของแบคทีเรีย
4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน
5. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมการย่อยโปรตีนของเอนไซม์
6. บ่งชี้ชนิดของเอนไซม์ย่อยโปรตีน
7. เปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ โดยวิธี batch culture ระหว่างการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่า (shaking flask) ที่ไม่มีการควบคุมพีเอช กับการเพาะเลี้ยงในถังหมักจุลินทรีย์ (fermentor)ที่ควบคุมพีเอชให้คงที่
8. เปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ที่เพาะเลี้ยงโดยวิธี repeated batch culture กับวิธี continuous culture

Stirring hot plate : Thermolyne Barnstead, Thermolyne Corporation, Dubuque, Lowa, USA

Vortex mixer : Scientific Industries Inc., Bohemia, New York, USA

Waterbath : Eyela Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Muromachi Nihonbashi, Chuo-ku, Tokyo, Japan.

Centrifuge

Bench-top centrifuge : Kokusan Enshinki Co. Ltd., Taito-ku, Tokyo, Japan.

Eppendorf centrifuge : Brinkmann Instruments Inc., Wesbury, N.Y., USA.

Sorvall superspeed centrifuge : Du Pont Company, Wilmington Delaware,USA.

Spectrophotometer

Shimadzu spectrophotometer : Shimadzu Corporation, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan.

Fermentor

Fermentor M-100 : Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Tokyo, Japan.

Microtube pump : Eyela Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Muromachi Nihonbashi, Chuo-ku, Tokyo, Japan.

Stirring hot plate : Thermolyne Barnstead, Thermolyne Corporation, Dubuque, Lowa, USA

Vortex mixer : Scientific Industries Inc., Bohemia, New York, USA

Waterbath : Eyela Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Muromachi Nihonbashi, Chuo-ku, Tokyo, Japan.

Centrifuge

Bench-top centrifuge : Kokusan Enshinki Co. Ltd., Taito-ku, Tokyo, Japan.

Eppendorf centrifuge : Brinkmann Instruments Inc., Wesbury, N.Y., USA.

Sorvall superspeed centrifuge : Du Pont Company, Wilmington Delaware,USA.

Spectrophotometer

Shimadzu spectrophotometer : Shimadzu Corporation, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan.

Fermentor

Fermentor M-100 : Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Tokyo, Japan.

Microtube pump : Eyela Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Muromachi Nihonbashi, Chuo-ku, Tokyo, Japan.

ตารางที่ 2 อาหารเลี้ยงเชื้อ, สารเคมี และบริษัทผู้ผลิต

อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต*
1. อาหารเลี้ยงเชื้อ	
Motility-test medium	Difco
MR-VP medium	Difco
Nitrate broth	Difco
Nutreint agar	Oxoid
Nutrient broth	Oxoid
Simmon's cittrate agar	Difco
2. สารเคมี	
Albumin	Sigma
Arabinose	Sigma
Azocasein	Sigma
Azocoll	Fluka
Carboxymethyl cellulose	Sigma
Casein	Sigma
Deoxycholic acid (DCA)	Sigma
3,4-Dichloroisocoumarin (3,4-DCI)	Sigma
Dimethylsulfoxide	Sigma
Dodecyltrimethylammonium bromide (DDAB)	Sigma
N-dodecyl-N-N-dimethyl-3-ammonio-1-propane-sulfonate (DDAP)	Sigma
Elastin orecin	Sigma
Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)	Fluka
Fructose	Reidel-de Haen
Galactose	Sigma

ตารางที่ 2 (ต่อ) อาหารเลี้ยงเชื้อ, สารเคมี และบริษัทผู้ผลิต

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต*
Gelatin	Difco
Glucose	Reidel-de Haen
Haemoglobin	Sigma
Hydrogenperoxide	Sigma
Iodoacetic acid	Sigma
Keratin azure	Sigma
Lactose	Sigma
Maltose	Sigma
Mannitol	Sigma
α-Napthol	Sigma
Mercaptoethanol	Sigma
Phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF)	Sigma
Potassium hydroxide	Reidel-de Haen
Raffinose	Sigma
Skim milk	Difco
Sodium carbonate	Reidel-de Haen
Sodium chloride	Fluka
Sodium dihydrogen phosphate	Fluka
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	Sigma
di-Sodium hydrogen phosphate	Fluka
Sorbitol	Sigma
Sucrose	Sigma
Tributyrin	Merck
Trichloroacetic acid	Reidel-de Haen
Tryptone	Difco

ตารางที่ 2 (ต่อ) อาหารเลี้ยงเชื้อ, สารเคมี และบริษัทผู้ผลิต

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต*
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Fluka
Triton X-100	Merck
L-tyrosine	Difco
Yeast extract	Difco
3. สีย้อม	
Bromocresol green	Reidel-de Haen
Congo red	Sigma
Crystal violet	Reidel-de Haen
Fushsin	Fluka
Methyl orange	Reidel-de Haen

*ที่อยู่ของบริษัทผู้ผลิต

Difco : Difco Laboratories, Detroit Michigan, USA.

Fluka : Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland.

Merck : E. Merck, Darmstadt, Postfach, Germany.

Reidel-de Haen : Reidel-de Haen AG, Seelze, Germany.

Sigma : Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA.

วิธีการ

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง เป็นอาหาร skim milk medium ซึ่งในปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย nutreint broth จำนวน 13 กรัม และ skim milk จำนวน 10 กรัม ปรับพีเอช ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 9.0 โดยแยกฆ่าเชื้อระหว่าง nutrient broth และ skim milk เพื่อป้องกัน skim milk ตกตะกอน (ในกรณีที่เป็นอาหารแข็ง ใช้ nutrient agar จำนวน 28 กรัม แทน nutrient broth)

2.2 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว ใช้เชื้อเริ่มต้น (inoculum) ที่เพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรอาหารเหลวทั้งหมด ใส่เชื้อเริ่มต้นลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร และ skim milk ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มในเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3 การแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน

เก็บตัวอย่างดินและน้ำจากบ่อน้ำร้อน และตัวอย่างน้ำจากโรงงานน้ำเต้าหู้ รวม 18 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างดินและน้ำจากบ่อน้ำร้อน อำเภอควนกาหลง จังหวัดสตูล จำนวน 6 ตัวอย่าง และ 4 ตัวอย่าง ตามลำดับ ตัวอย่างน้ำจากบ่อน้ำร้อน อำเภอเบตง จังหวัดยะลา จำนวน 5 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำจากโรงงานน้ำเต้าหู้ จำนวน 3 ตัวอย่าง นำตัวอย่างดินหรือน้ำ จำนวน 10 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) ที่มีพีเอช 9.0 เขย่าให้เข้ากันด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เจือจางสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นเหมาะสมประมาณ 10^{-3}-10^{-4} เท่า ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ พีเอช 9.0 นำสารละลายตัวอย่างไปแยกเชื้อโดยวิธี spread plate technichs บนอาหารแข็ง skim milk agar ที่มี skim milk ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 9.0 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยโปรตีน จะมีวงใสเกิดขึ้นรอบโคโลนี ซึ่งเห็นได้อย่างชัดเจนบนอาหารแข็งดังกล่าว ทำซ้ำ

โดยแยกเชื้อที่ย่อยโปรตีนเขี่ยลงบนอาหารแข็ง skim milk agar และอาหารแข็ง gelatin agar ที่มีเจลาติน (gelatin) ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูวงใสรอบโคโลนีบนอาหารแข็ง skim milk agar สำหรับบนอาหารแข็ง gelatin agar จะเห็นวงใสรอบโคโลนี หลังจากราดด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติค (trichloroacetic acid) เข้มข้น 1 โมลาร์

2.4 การนับจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิต

ดูดเชื้อตัวอย่างที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงบนอาหารแข็ง skim milk agar ที่มีพีเอช 9.0 โดยหยดเป็นจุด ตามวิธี Drop plate method ของ Supanwong (1972) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อนำไปคำนวนหาจำนวนเชื้อทั้งหมดต่อมิลลิลิตร (CFU/ml) เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตกับระยะเวลาที่ทำการทดลอง เพื่อคำนวนหาค่าเวลาเติบโตเป็นสองเท่าของเชื้อตัวอย่าง ช่วงเวลาทำการทดลอง เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง

2.5 การตรวจหาปริมาณสับสเตรทในอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำตัวอย่างซึ่งเป็นอาหารที่เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ซึ่งปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียออกแล้ว มาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 580 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นแบล็งค์ (blank) เปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของสารละลาย skim milk

2.6 การเตรียมเอนไซม์ย่อยโปรตีน

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร ซึ่งมีอาหารเหลว skim milk medium ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นแยกอนุภาคของแบคทีเรียด้วยอัตราเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะได้สารละลายเอนไซม์ย่อยโปรตีนในสารละลายส่วนใส (supernate) สำหรับการทดลองต่อไป

2.7 การตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน

ตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ตามวิธีของ Sarath และคณะ (1990) โดยบ่มสารละลายสับสเตรทเคซีนเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 9.0 ในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10 นาที จากนั้นนำตัวอย่างเอนไซม์ย่อยโปรตีน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมรวมกับสารละลายสับสเตรท ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มสารผสมที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติค เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที (สำหรับการทดลองชุดควบคุมจะเติมกรดไตรคลอโรอะซีติค ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในสารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันจากนั้นจึงเติมสารละลายสับสเตรท ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไป) และนำไปกรองตะกอนออกโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายส่วนใสที่ช่วงความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นแบล็งค์ นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายไทโรซีน (L-tyrosine) ที่มีความเข้มข้นต่อไปนี้คือ 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร คำนวนหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากกราฟมาตรฐานดังกล่าว โดยที่ 1 หน่วยของเอนไซม์ย่อยโปรตีน หมายถึง กิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนได้เป็นกรดอะมิโนไทโรซีน ปริมาณ 1 ไมโครกรัมต่อนาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด ค่าเปอร์เซ็นต์กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ (% relative activity) หมายถึง ค่าเปรียบเทียบที่ได้จากกิจกรรมของเอนไซม์หารด้วยค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นสูงสุดของการทดลอง คูณด้วย 100

2.8 การตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตภายในเซลล์

นำตัวอย่างอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในช่วงเวลาต่างๆ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อปั่นแยกเอาส่วนใสออก โดยใช้ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) พีเอช 9.0 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 9.0 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในเซลล์ที่ปั่นแยกได้ที่มีปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เซลล์กระจาย และนำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้ sonicator (Branson sonifer 450) โดยใช้ duty cycle เท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ และ out-put control เท่ากับ 4 เป็นเวลา 3 นาที หยุดทุก 1 นาที โดยแช่สารละลายเซลล์ใน

น้ำแข็ง เมื่อสารละลายเซลล์เปลี่ยนจากขุ่นเป็นใส แสดงว่าเซลล์แตกอย่างสมบูรณ์ นำสารละลายที่ได้ไปตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ตามวิธีการในข้อ 2.7

2.9 การผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากเชื้อแบคทีเรียในถังหมักจุลินทรีย์ (fermentor)

ถังหมักจุลินทรีย์ขนาด 2 ลิตร ประกอบด้วยชุดควบคุมอัตโนมัติของค่าพีเอช และออกซิเจนที่ละลายน้ำ (dissolved oxygen) และเครื่องปั๊มอากาศ โดยใส่เชื้อเริ่มต้น (inoculum) ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณอาหารทั้งหมด ลงในถังหมักที่มีอาหารเหลว skim milk medium ปริมาตร 1.2 ลิตร ผสมเชื้อเริ่มต้นให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยปรับความเร็วของใบพัดที่ 200 รอบต่อนาที เปิดเครื่องปั๊มอากาศ ให้ออกซิเจนละลายน้ำ 1 vvm หรือ 15 เปอร์เซ็นต์ ตั้งการควบคุมพีเอชให้คงที่ โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) เข้มข้น 2 โมลาร์ ตลอดระยะเวลาหมัก ที่พีเอช 9.0 เก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อครั้งละ 10 มิลลิลิตร ทุก 2 ชั่วโมง เพื่อศึกษาจลนศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน

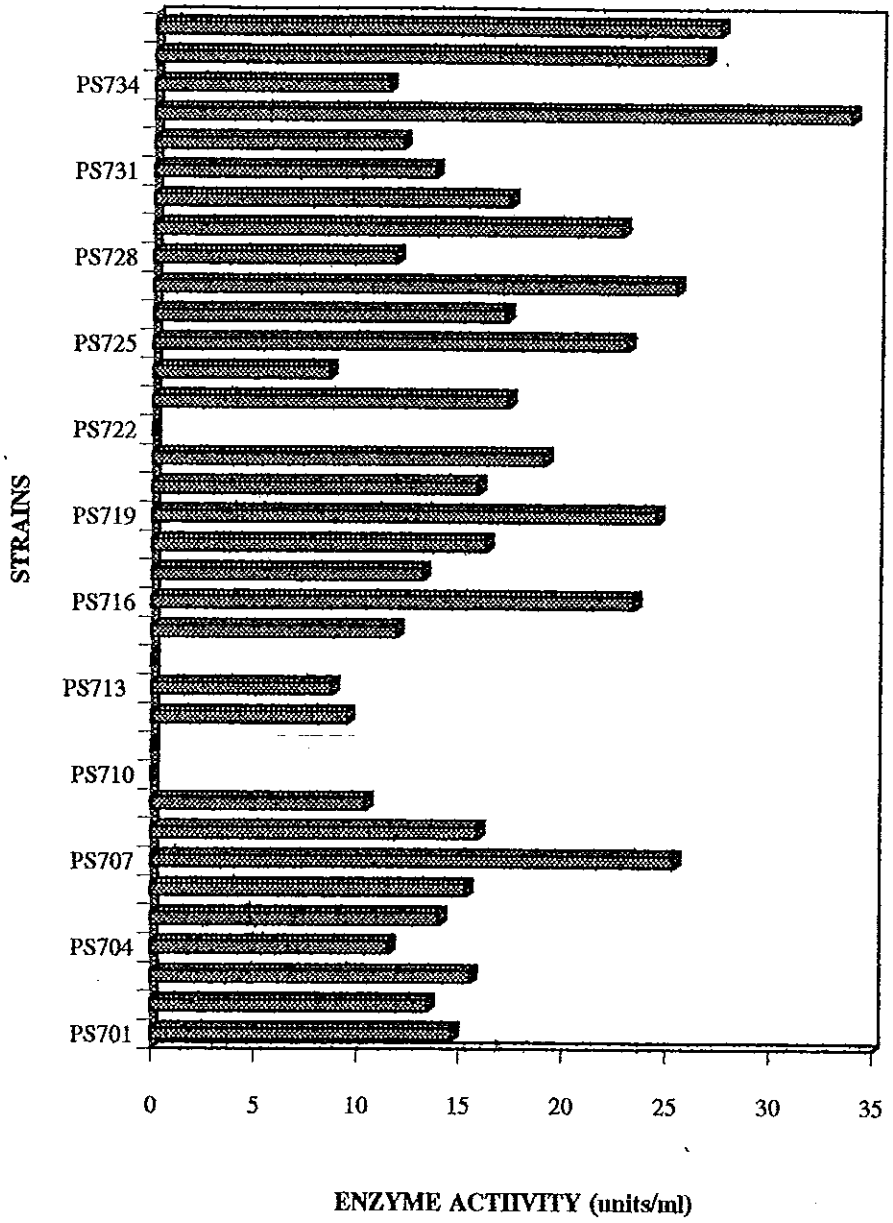
3. ผลการทดลอง

3.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนในสภาวะที่เป็นด่างและอุณหภูมิสูง

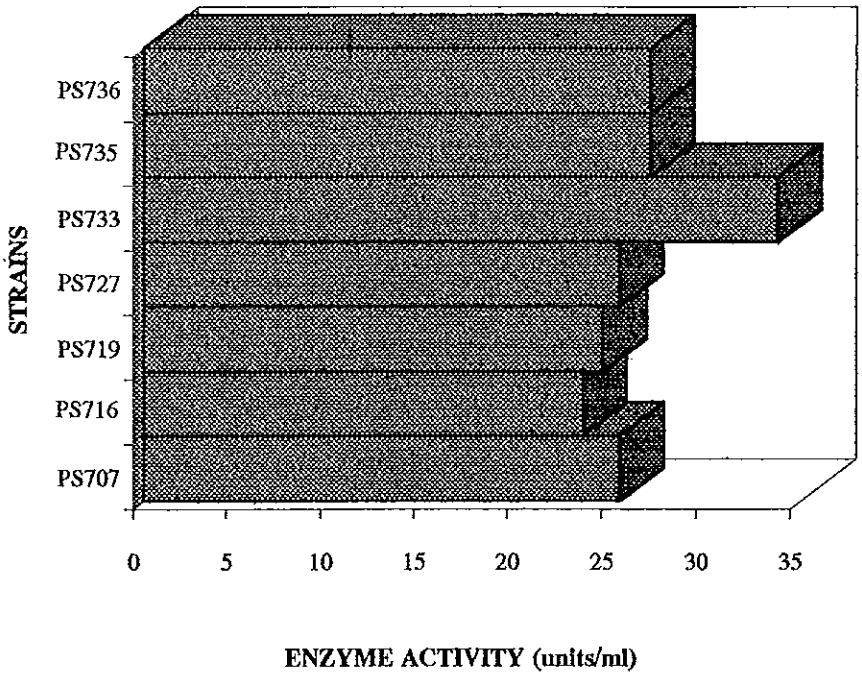
แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน ที่แยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำบริเวณบ่อน้ำร้อน และตัวอย่างน้ำจากโรงงานน้ำเต้าหู้ ทั้งหมด 18 ตัวอย่าง มีทั้งหมด 36 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้โดยอาศัยลักษณะ สี และขนาดของโคโลนี รวมทั้งความสามารถในการย่อยโปรตีนบนอาหารแข็ง skim milk medium วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี เพื่อเปรียบเทียบขนาดของวงใส แต่วิธีนี้บอกได้เพียงคร่าวๆเท่านั้น ดังนั้นจึงเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในอาหารเหลว skim milk medium พีเอช 9.0 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ดังแสดงในรูปที่ 1 พบว่า แบคทีเรียที่แยกได้ไม่สามารถย่อยโปรตีนในอาหารเหลวดังกล่าวได้ มีจำนวน 4 สายพันธุ์ ส่วนที่เหลืออีก 32 สายพันธุ์ มีความสามารถในการย่อยโปรตีนได้มากน้อยแตกต่างกันไป ปรากฏว่าแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนอยู่ในปริมาณสูง มีทั้งหมด 7 สายพันธุ์ (รูปที่ 2) คือ สายพันธุ์ PS707, PS716, PS719, PS727, PS733, PS735 และ PS736 ซึ่งมีกิจกรรมการย่อยโปรตีนเท่ากับ 25, 23, 24, 25, 34, 27 และ 27 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อนำแบคทีเรียสายพันธุ์เหล่านี้ มาตรวจสอบการเติบโตในอาหารเหลวที่มีพีเอชต่างๆกัน ตั้งแต่ 5-12 (รูปที่ 3) ปรากฏว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PS716 และ PS719 เป็นสายพันธุ์ที่มีการเติบโตในสภาวะที่เป็นด่างได้ดีที่สุด แต่สายพันธุ์ PS719 ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้มากกว่า PS716 ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ PS719 สำหรับการศึกษาต่อไป ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์ PS719 เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน จากบ่อน้ำร้อน อำเภอควนกาหลง จังหวัดสตูล

3.2 การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ PS719

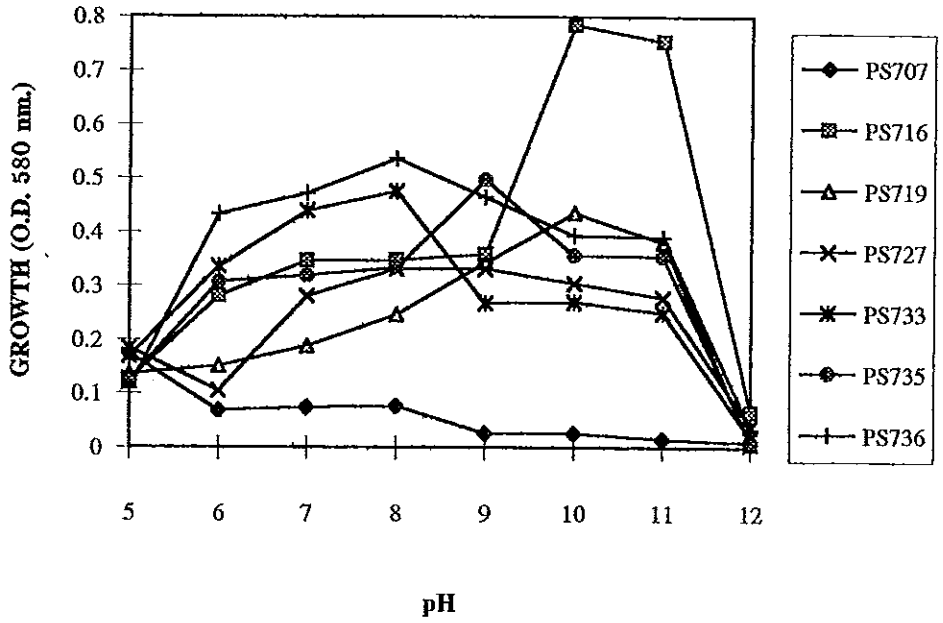
การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ PS719 โดยวิธีทางกายภาพและชีวภาพ ตามที่ปรากฏใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, volume 2 (Peter *et al.*, 1986) และ Biochemical of Identification of Medical Bacteria (Jean and Faddin, 1980) (ตารางที่ 3) ปรากฏว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ PS719 เป็นแบคทีเรียกรัมบวก, รูปแท่ง, มีสปอร์รูปร่างกลมอยู่ตรงปลาย, เคลื่อนที่ได้, สามารถผลิตเอนไซม์คาทาเลส (catalase) แต่ไม่



รูปที่ 1 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดยแบคทีเรียจำนวน 36 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดินและน้ำบริเวณบ่อน้ำร้อน และน้ำจากโรงงานน้ำต้าหู้ เมื่อเพาะเลี้ยงใน skim milk medium พีเอช 9.0 ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 2 การผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ เมื่อเพาะเลี้ยงใน skim milk medium พีเอช 9.0 ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 3 การเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆที่มีระดับกิจกรรมการย่อยโปรตีนสูง เมื่อเพาะเลี้ยงใน nutrient broth (NB) ที่พีเอชต่างๆกัน ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบทางชีวเคมีเพื่อบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ PS719

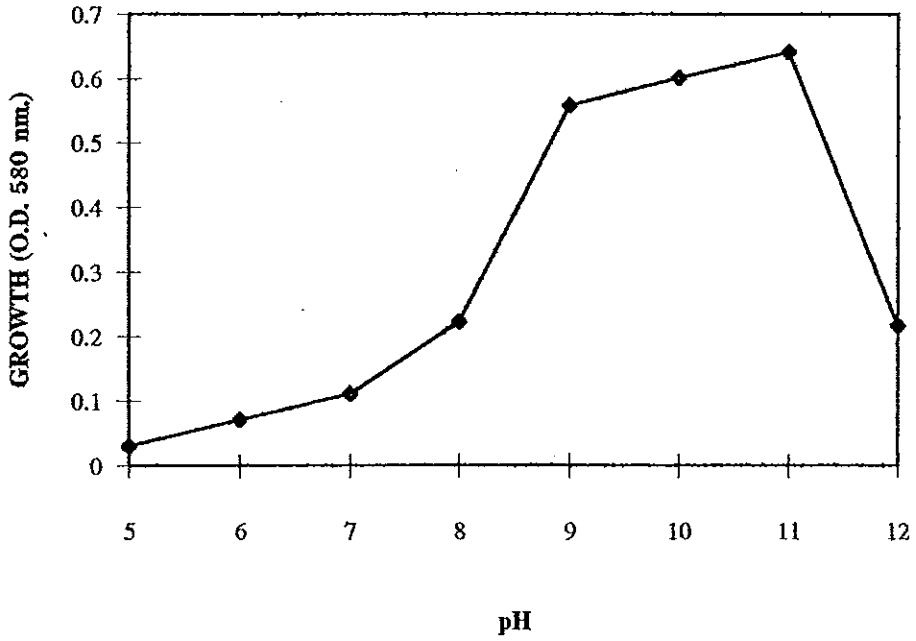
การทดสอบ	ลักษณะ	การทดสอบ	ลักษณะ
Gram stain	gram positive, rod	Degradation of	
Spore	spherical, subterminal	CMC	-
Motility	+	Xylan	-
Catalase	+	Tributyrin	+
Oxidase	-	Tween 80	-
Anaerobic growth	-	Hydrolysis of	
Voges-Proskeur	-	Casein	+
Methyl red	-	Gelatin	+
Indole	-	Starch	+
Citrate	+	Nitrate reduce	
Urea	-	to nitrite	+
Glucose	+	Growth in NaCl	
Fructose	+	1%	+
Maltose	+	2%	+
Mannitol	+	5%	+
Lactose	+	Growth at	
Galactose	+	35°C	+
Sucrose	+	40°C	+
Raffinose	-	45°C	+
Sorbitol	-	50°C	+
Xylose	+	55°C	+
Arabinose	+	60°C	+

สามารถผลิตเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase), ไม่เติบโตในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน, ไม่สามารถสร้างสารอะซีติลเมทธิลคาร์บินอล (acetylmethyl carbinol) และกรดฟอร์มิค (formic acid) จากกลูโคส, ไม่สามารถเปลี่ยนทริปโตเฟน (tryptophan) เป็นอินโดล (indole), สามารถใช้กรดซิตริคเป็นแหล่งคาร์บอน, ไม่สามารถย่อยสลายยูเรียให้เป็นแอมโมเนีย, สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส, ฟรุคโตส, มอลโตส, แมนนิทอล, แลคโตส, กาแลคโตส, ซูโครส, ไซโลส และอะราบิโนสได้ แต่ไม่ให้ก๊าซ, ไม่สามารถใช้น้ำตาลราฟีโนส และซอร์บิทอล, สามารถย่อยสลายไตรบิวทิริน, เคซีน, เจลาติน และแป้งได้, สามารถรีดิวส์ไนเตรทให้เป็นไนไตรท์, สามารถเติบโตในอาหารที่มีความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride; NaCl) สูงถึง 5 เปอร์เซ็นต์, สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส แบคทีเรียที่แยกได้นี้จัดเป็น *Bacillus* แต่เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ปรากฏใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology , volume 2 , (1986) ดังนั้นจึงจัดแบคทีเรียที่แยกได้นี้ เป็น *Bacillus* สายพันธุ์ PS719

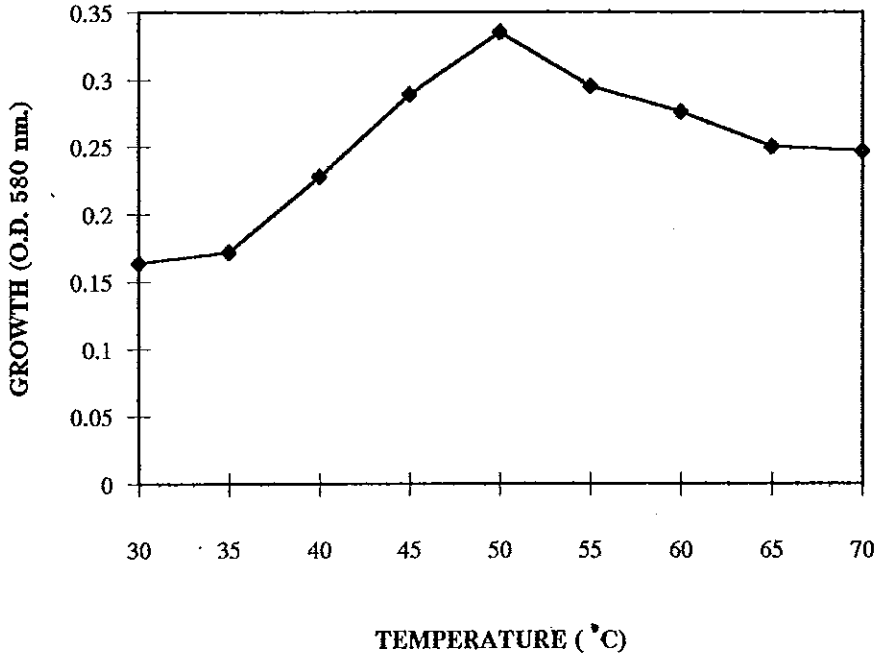
3.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719

การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียลงใน nutrient broth ที่มีพีเอชต่างๆกัน ตั้งแต่ 5.0-12.0 โดยใส่เชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลปรากฏว่า แบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 สามารถเติบโตได้ตั้งแต่พีเอช 8-12 แต่เติบโตได้ดีที่พีเอชระหว่าง 9-11 (รูปที่ 4)

การเพาะเลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ใน nutrient broth พีเอช 9.0 ที่อุณหภูมิต่างๆกัน ตั้งแต่ 30-70 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรากฏว่า แบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 เติบโตได้ที่อุณหภูมิ 40-70 องศาเซลเซียส แต่เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (รูปที่ 5)



รูปที่ 4 ผลของพีเอชต่อการเติบโตของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 5 ผลของอุณหภูมิต่อการเติบโตของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth พีเอช 9.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

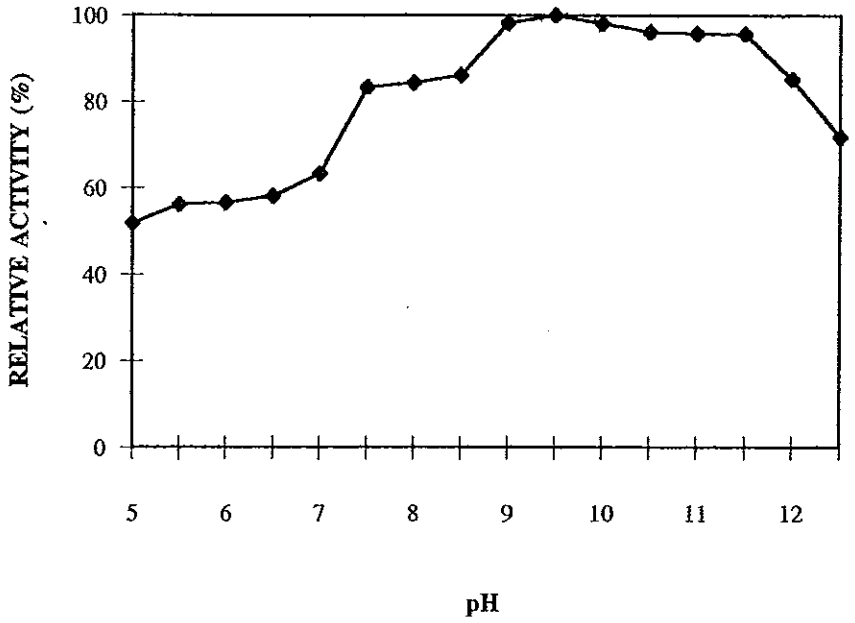
3.4 การศึกษาสภาวะเหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719

การศึกษาสภาวะพีเอชที่เหมาะสม สำหรับการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียลงใน nutrient broth ที่ผสม skim milk ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด ที่พีเอชต่างๆกัน ตั้งแต่ 5.0-12.5 โดยใส่เชื้อเริ่มต้นปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรากฏว่า *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ตั้งแต่พีเอช 7.5-12.5 แต่ผลิตเอนไซม์ได้ดีที่พีเอชระหว่าง 9.0-11.5 (รูปที่ 6)

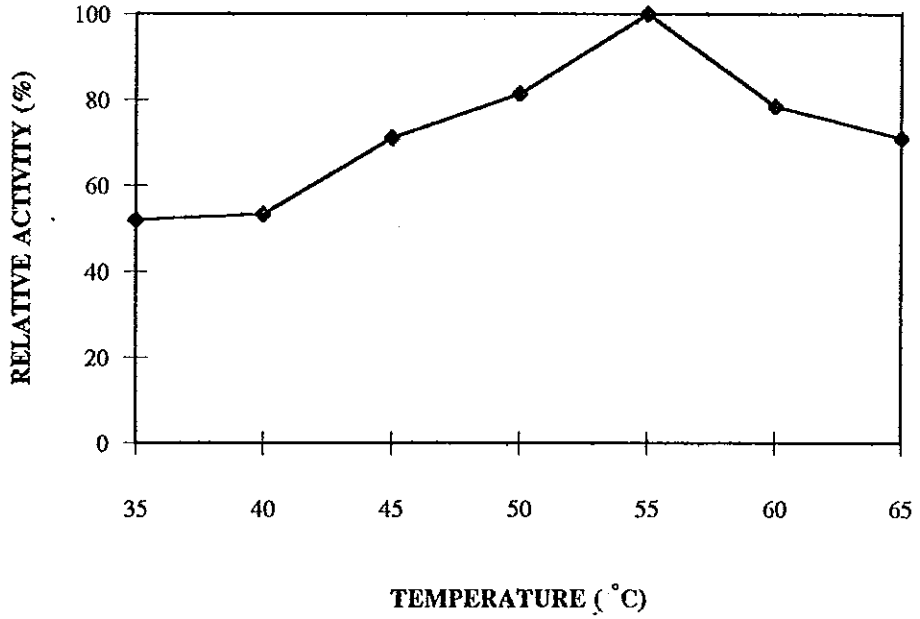
เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ใน nutrient broth พีเอช 9.0 ที่ผสม skim milk ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด ที่อุณหภูมิต่างๆกัน ตั้งแต่ 35-65 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรากฏว่าแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 45-65 องศาเซลเซียส แต่ผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (รูปที่ 7)

การศึกษาความเข้มข้นของ skim milk ที่เหมาะสม สำหรับการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียลงใน nutrient broth พีเอช 9.0 ที่ผสม skim milk ในระดับความเข้มข้นต่างๆกันคือ 1, 2, 3, 4, และ 5 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรากฏว่า แบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ตั้งแต่ที่ระดับความเข้มข้นของ skim milk เท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ การผลิตเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และมีปริมาณคงที่เมื่อระดับความเข้มข้นของ skim milk เท่ากับ 4 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณการผลิตเอนไซม์สูงสุดกับต่ำสุด มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก ดังนั้นเพื่อประหยัดอาหาร skim millk จึงเลือกใช้ skim milk ที่ระดับความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการทดลอง (รูปที่ 8)

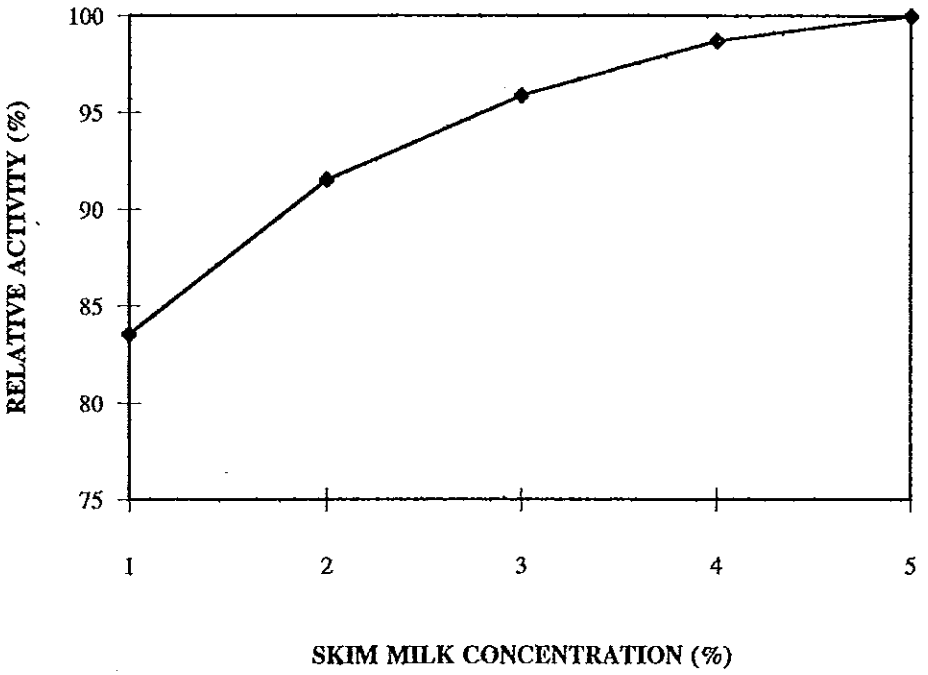
ดังนั้นสภาวะที่ได้เลือกใช้ในการผลิตเอนไซม์ของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 สำหรับการทดลองต่อไป คือ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth พีเอช 9.0 ที่เติม skim milk ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส



รูปที่ 6 ผลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk medium เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 7 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk medium พีเอช 9.0 เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 8 ผลของ skim milk ต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk medium พีเอช 9.0 เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

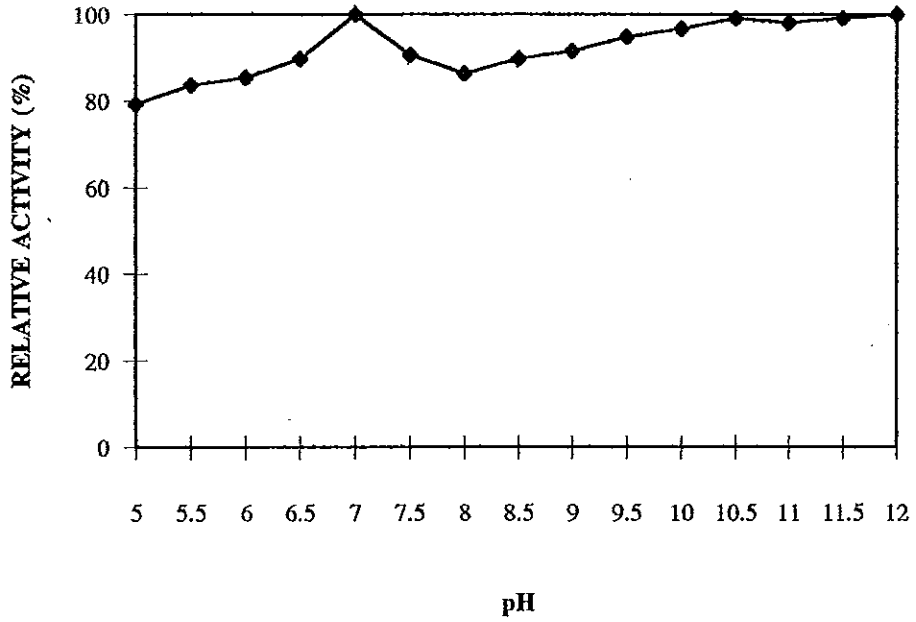
3.5 การศึกษาสภาวะเหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719

การศึกษาผลของสับสเตรทที่มีพีเอชต่างๆกัน ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียใน nutrient broth พีเอช 9.0 ที่ผสม skim milk ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ (crude enzyme) ซึ่งปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียแล้ว ไปทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อสับสเตรทที่เตรียมจากสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชต่างๆกันดังนี้ คือ ซิเตรทบัฟเฟอร์(citrate buffer) เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5.0-6.0, ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.5-8.0, ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer) เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.5-9.0 และ ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ (glycine-NaOH buffer) เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9.5-12.0 ปรากฏว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่พีเอช 6.5-12.0 และทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 7.0 และ 10.5-12.0 (รูปที่ 9)

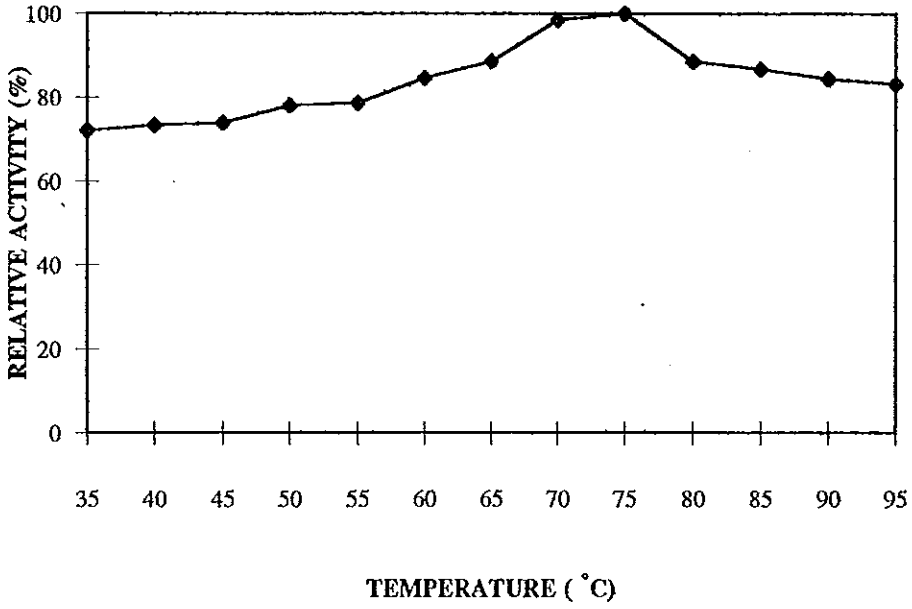
ดังนั้นจึงทดสอบผลของอุณหภูมิ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ที่พีเอช 9.0 ปรากฏว่า กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนทำงานได้ดีตั้งแต่อุณหภูมิ 35-95 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เอนไซม์มีกิจกรรมทำงานได้ดีที่สุดอยู่ระหว่าง 70-75 องศาเซลเซียส (รูปที่ 10) จะเห็นได้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเติบโต (รูปที่ 5) และการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 (รูปที่ 7) ต่างกัน กล่าวคือ เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส แต่เชื้อแบคทีเรียเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และมีการผลิตเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

3.6 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ที่อุณหภูมิต่างๆกัน

การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ที่อุณหภูมิต่างๆกัน โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth พีเอช 9.0 ที่เติม skim milk ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารทั้งหมด โดยใส่เชื้อเริ่มต้นปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 55



รูปที่ 9 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk medium พีเอช 9.0 เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

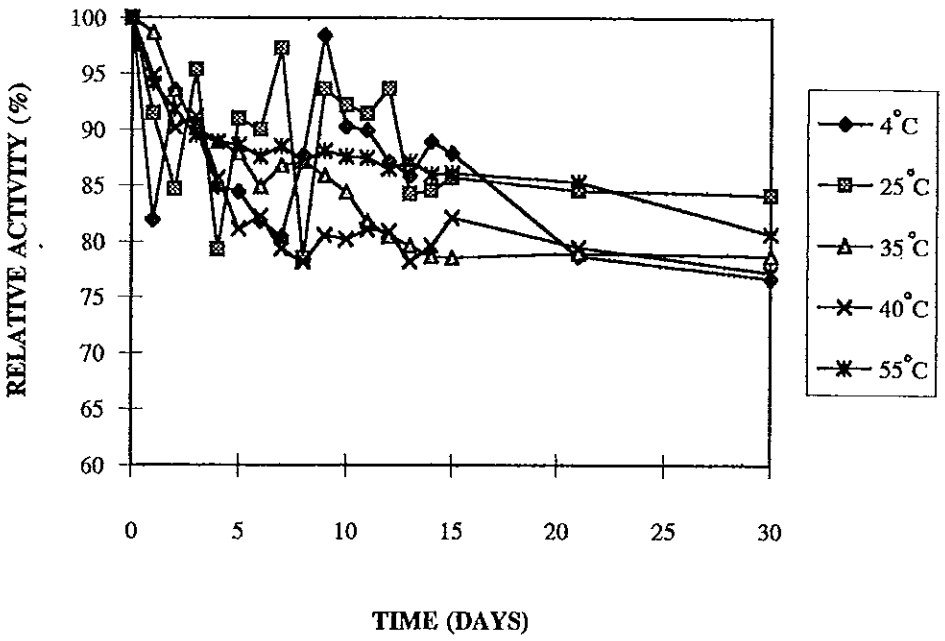


รูปที่ 10 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk medium พีเอช 9.0 เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

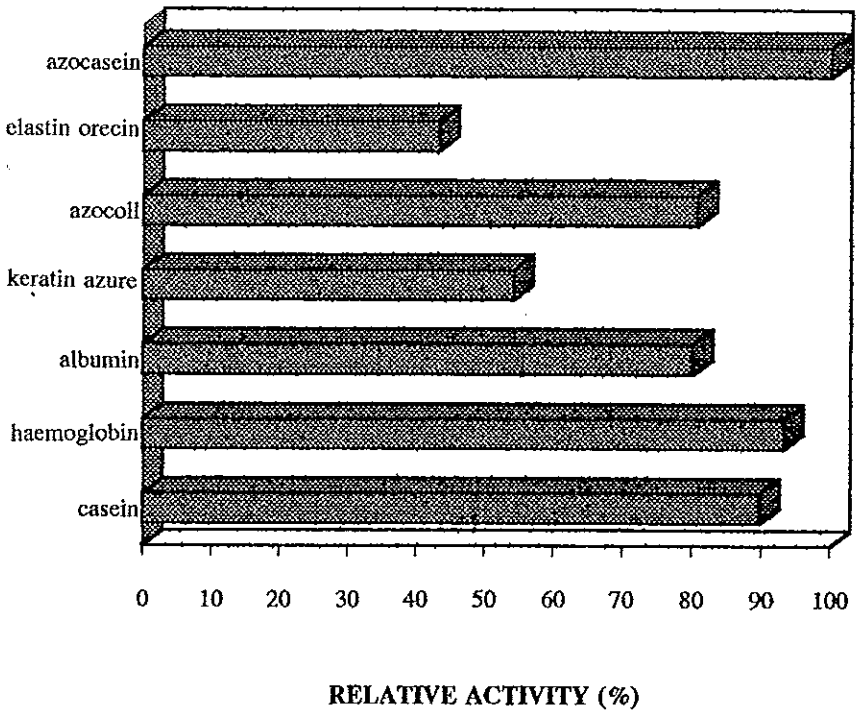
องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างสารละลายที่ปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียแล้วไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆกันดังนี้ คือ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส), อุณหภูมิ 35, 40 และ 55 องศาเซลเซียส โดยทำการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ตั้งแต่วันที่ 1 ถึง 15 ของการเก็บเอนไซม์ 1 ครั้งต่อวัน และหลังจากวันที่ 15 ถึงวันที่ 30 ของการเก็บเอนไซม์ ทำการตรวจวัด 1 ครั้งต่อสัปดาห์ ปรากฏว่าตัวอย่างเอนไซม์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆนั้น สามารถรักษากิจกรรมการย่อยโปรตีนได้ดีตลอดระยะเวลา 30 วัน (รูปที่ 11)

3.7 การศึกษาการย่อยโปรตีนชนิดต่างๆ ของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719

การศึกษาการย่อยโปรตีนชนิดต่างๆ ของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียใน nutrient broth พีเอช 9.0 ที่เติม skim milk ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรอาหารทั้งหมด โดยใส่เชื้อเริ่มต้นปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างของสารละลายเอนไซม์ ที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ (crude enzyme) ซึ่งปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียแล้ว ไปทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน เมื่อใช้สับสเตรทโปรตีนชนิดต่างๆ ได้แก่ เคซีน (casein), ฮีโมโกลบิน (haemoglobin), อัลบูมิน (albumin), เคอราตินเอซูร์ (keratin azure), เอโซคอล (azocoll), อีลาสตินออรีซิน (elastin orecin) และเอโซเคซีน (azocasein) ที่มีความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 12) ปรากฏว่ากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดต่างๆ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์โดยเทียบจากค่าสูงสุดของเอนไซม์ได้ดังนี้ เคซีน 90 เปอร์เซ็นต์, ฮีโมโกลบิน 93 เปอร์เซ็นต์, อัลบูมิน 80 เปอร์เซ็นต์, เคอราตินเอซูร์ 54 เปอร์เซ็นต์, เอโซคอล 80 เปอร์เซ็นต์, อีลาสตินออรีซิน 43 เปอร์เซ็นต์ และเอโซเคซีน 100 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 12) แสดงว่า เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับสเตรท เอโซเคซีนมากที่สุด รองลงมาคือ ฮีโมโกลบินและเคซีนตามลำดับ ขณะที่เคอราตินเอซูร์ และอีลาสตินออรีซิน เป็นสับสเตรทที่เอนไซม์ย่อยได้น้อย



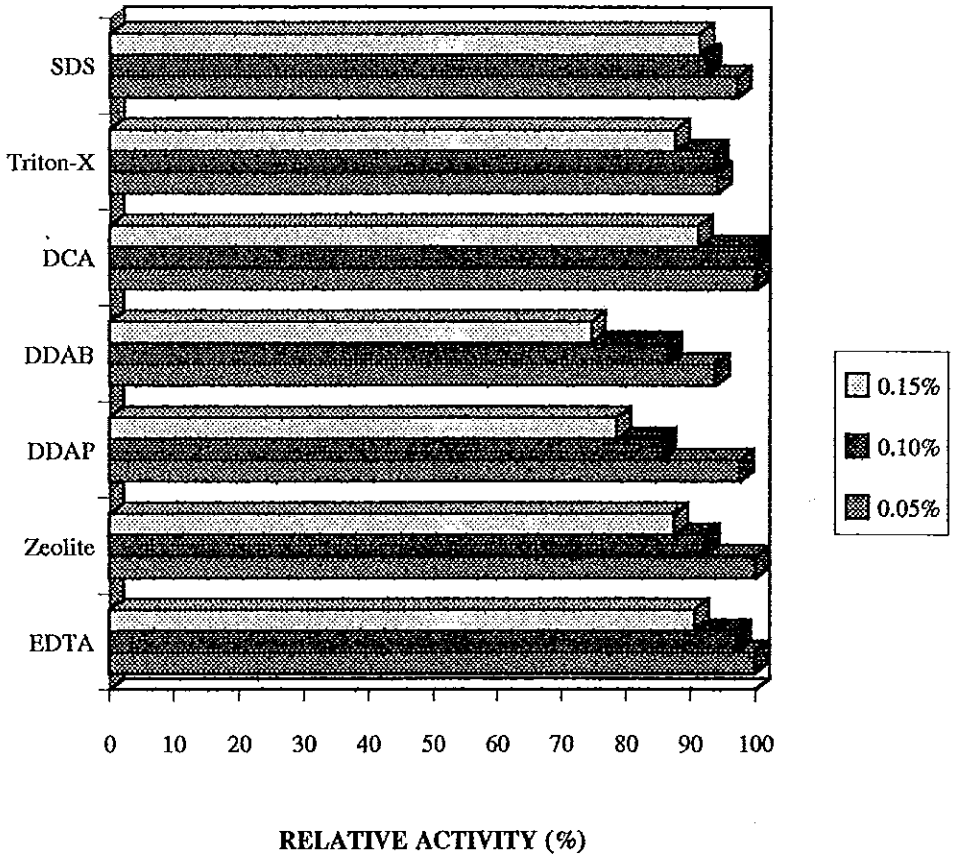
รูปที่ 11 ความเสถียรของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ



รูปที่ 12 ความจำเพาะต่อสับสเตรทชนิดต่างๆของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk medium พีเอช 9.0 เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.8 การศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิว (surfactants), สารปรุงแต่ง (additive) และสารคีเลต (chelating agent) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719

การศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิว, สารปรุงแต่ง และสารคีเลต ซึ่งเป็นองค์ประกอบในผงซักฟอก ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ที่เพาะเลี้ยงใน nutrient broth พีเอช 9.0 ที่เติม skim milk ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรอาหารทั้งหมด โดยใส่เชื้อเริ่มต้นปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างของสารละลายเอนไซม์ที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ (crude enzyme) ซึ่งปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียแล้ว ไปทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน โดยผสมสับสเตรทกับสารลดแรงตึงผิวที่ให้ประจุลบ (anionic surfactants) ได้แก่ โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต หรือเอสดีเอส (sodium dodecyl sulphate ; SDS) และกรดดีออกซีโคลิค หรือ ดีซีเอ (deoxycholic acid ;DCA), สารลดแรงตึงผิวที่ให้ประจุบวก (cationic surfactant) ได้แก่ โดดีซิลไตรเมทิลแอมโมเนียมโบรไมด์ หรือดีดีเอบี (dodecyltrimethylammonium bromide ; DDAB), สารลดแรงตึงผิวที่ให้ประจุบวกและลบ (zwitterionic surfactant) ได้แก่ ดีดีเอพี (N-dodecyl-N-N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate ; DDAP), สารลดแรงตึงผิวที่ไม่ให้ประจุ (non-ionic surfactant) ได้แก่ ไตรตอนเอ็กซ์-100 (triton X-100), สารปรุงแต่ง (additive) ได้แก่ ซีโอไลท์ (zeolite) และสารคีเลต (chelating agent) ได้แก่ กรดเอทิลีนไดเอมีนเตตราอะซีติค หรืออีดีทีเอ (ethylenediaminetetraacetic acid ; EDTA) (รูปที่ 13) ปรากฏว่าที่ความเข้มข้นของสารเคมีดังกล่าว 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนดังนี้ อีดีทีเอมีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 1 เปอร์เซ็นต์ , ซีโอไลท์ไม่มีผลต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ , ดีดีเอพีมีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 3 เปอร์เซ็นต์ , ดีดีเอบีมีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 6 เปอร์เซ็นต์, ดีซีเอไม่มีผลต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ , ไตรตอนเอ็กซ์-100 มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ 6 เปอร์เซ็นต์ และเอสดีเอสมีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 3 เปอร์เซ็นต์, เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารเคมีดังกล่าวเป็น 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ดังนี้ อีดีทีเอมีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 3 เปอร์เซ็นต์ , ซีโอไลท์มีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของ เอนไซม์ 8 เปอร์เซ็นต์ , ดีดีเอพีมีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 14 เปอร์เซ็นต์ , ดีดีเอบี

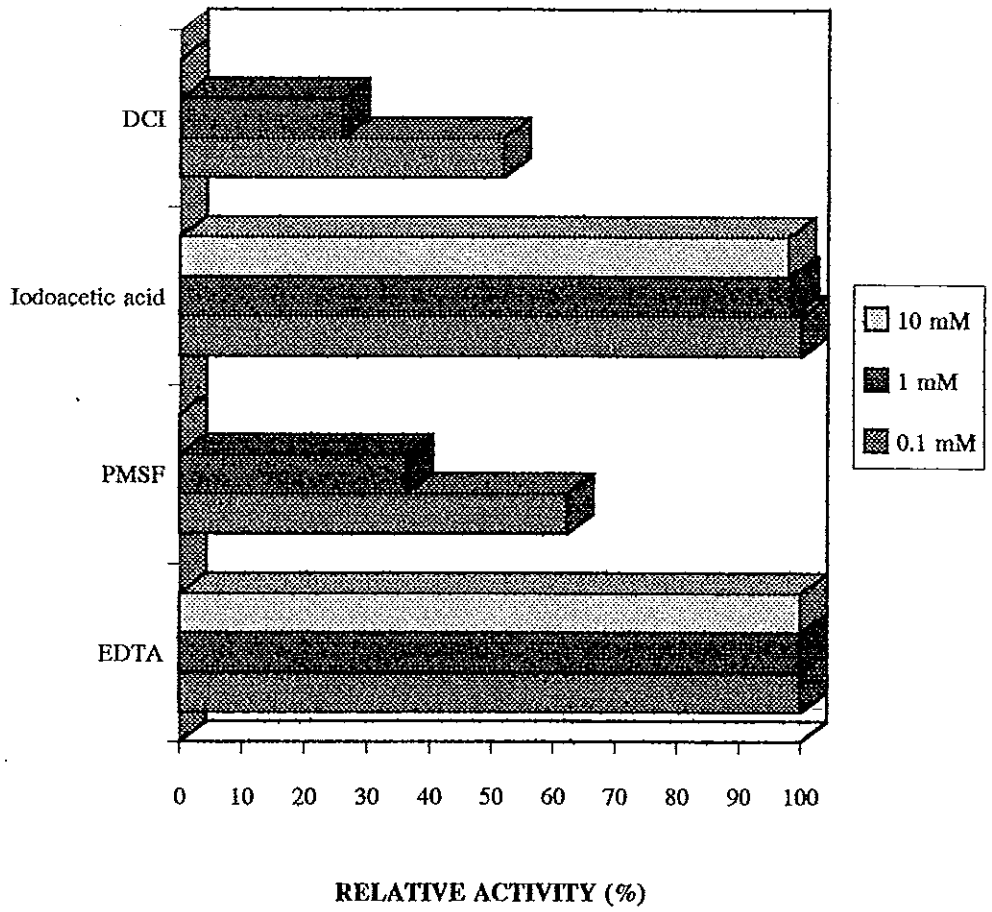


รูปที่ 13 ผลของสารลดแรงตึงผิว, สารปรุงแต่ง และสารคีเลต ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719

มีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 14 เปอร์เซ็นต์ , ดีซีเอมีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 1 เปอร์เซ็นต์, ไตรตอนเอ็กซ์-100 มีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 7 เปอร์เซ็นต์ และเอสดีเอสยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 8 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารเคมีดังกล่าวเป็น 0.15 เปอร์เซ็นต์ มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ดังนี้ อีดีทีเอมีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 9 เปอร์เซ็นต์ , ซีโอไลท์มีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 13 เปอร์เซ็นต์ ดีดีเอพีมีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 21 เปอร์เซ็นต์, ดีดีเอบีมีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 25 เปอร์เซ็นต์ , ดีซีเอมีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 9 เปอร์เซ็นต์ , ไตรตอนเอ็กซ์-100 มีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 12 เปอร์เซ็นต์ และเอสดีเอสมีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 8 เปอร์เซ็นต์

3.9 การบ่งชี้ชนิดของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719

การบ่งชี้ชนิดของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ปฏิบัติโดยศึกษาผลของตัวยับยั้งชนิดต่างๆ ได้แก่ อีดีทีเอ, พีเอ็มเอสเอฟ, กรดไอโอโดอะซีติค (Iodoacetic acid) และ 3,4-ไดไอโซคิวมารีน หรือ 3,4-ดีซีไอ (3,4-dichloroisocoumarin ; 3,4-DCI) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ใน nutrient broth พีเอช 9.0 ที่เติม skim milk ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรอาหารทั้งหมด โดยใส่เชื้อเริ่มต้นปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างของสารละลายเอนไซม์ที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ ซึ่งปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียแล้ว ไปบ่มกับสารละลายตัวยับยั้งชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 10, 1.0 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน (รูปที่ 14) ปรากฏว่า ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ดังนี้ อีดีทีเอไม่มีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์, พีเอ็มเอสเอฟมีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 38 เปอร์เซ็นต์, กรดไอโอโดอะซีติคไม่มีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์, และ 3,4-ดีซีไอมีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 48 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 มิลลิโมลาร์ มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ดังนี้ อีดีทีเอไม่มีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์, พีเอ็มเอสเอฟมีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 64 เปอร์เซ็นต์, กรดไอโอโดอะซีติคมีผลยับยั้งกิจกรรมการ

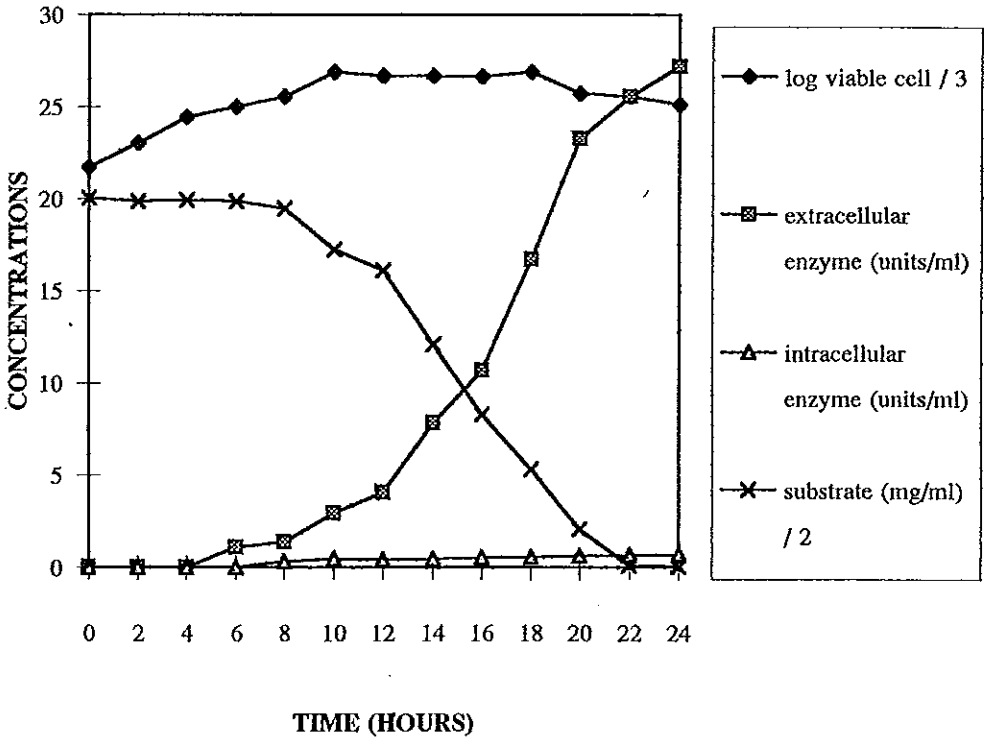


รูปที่ 14 ผลของตัวยับยั้งของเอนไซม์ (enzyme inhibitor) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719

ทำงานของเอนไซม์ 2เปอร์เซ็นต์ และ 3,4-ดีซีไอมีผลยับยั้ง กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 74 เปอร์เซ็นต์ และที่ระดับความเข้มข้น 10.0 มิลลิโมลาร์ มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ดังนี้ อีดีทีเอไม่มีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์, พีเอ็มเอสเอฟมีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 100 เปอร์เซ็นต์, กรดไอโอโดอะซีติคมีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 2 เปอร์เซ็นต์ และ 3,4-ดีซีไอมีผลยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ 100 เปอร์เซ็นต์

3.10 การศึกษาจลนศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 โดยวิธี batch culture (shaking flask)

ผลการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน ของแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ที่เพาะเลี้ยงแบบ batch culture ในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร ที่มีอาหารเหลวปริมาตร 500 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย nutrient broth พีเอช 9.0 และ skim milk ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารทั้งหมด โดยใส่เชื้อเริ่มต้นปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (รูปที่ 15) พบว่า *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 เริ่มผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนออกสู่นอกเซลล์ หลังจาก 6 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง และมีปริมาณเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 27 หน่วยต่อมิลลิลิตร เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าว มีการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ในปริมาณต่ำมาก โดยจะมีการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์หลังจาก 8 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง และมีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 เช่นกัน โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.71 หน่วยต่อมิลลิลิตร สำหรับปริมาณสับสเตรท (skim milk) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเริ่มมีปริมาณลดลงในชั่วโมงที่ 8 ของการเพาะเลี้ยง และลดลงเรื่อยๆจนถึง 0 เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 22 ชั่วโมง ส่วนการเติบโตของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว พบว่ามีอัตราการเติบโตจำเพาะ (specific growth rate ; μ) เท่ากับ 0.51 ต่อชั่วโมง และมีเวลาเติบโตเป็น 2 เท่า (doubling time ; td) 82 นาที การเติบโตของเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 10 ของการเพาะเลี้ยง และหลังจากชั่วโมงที่ 18 พบว่าการเติบโตของเชื้อเริ่มลดลง



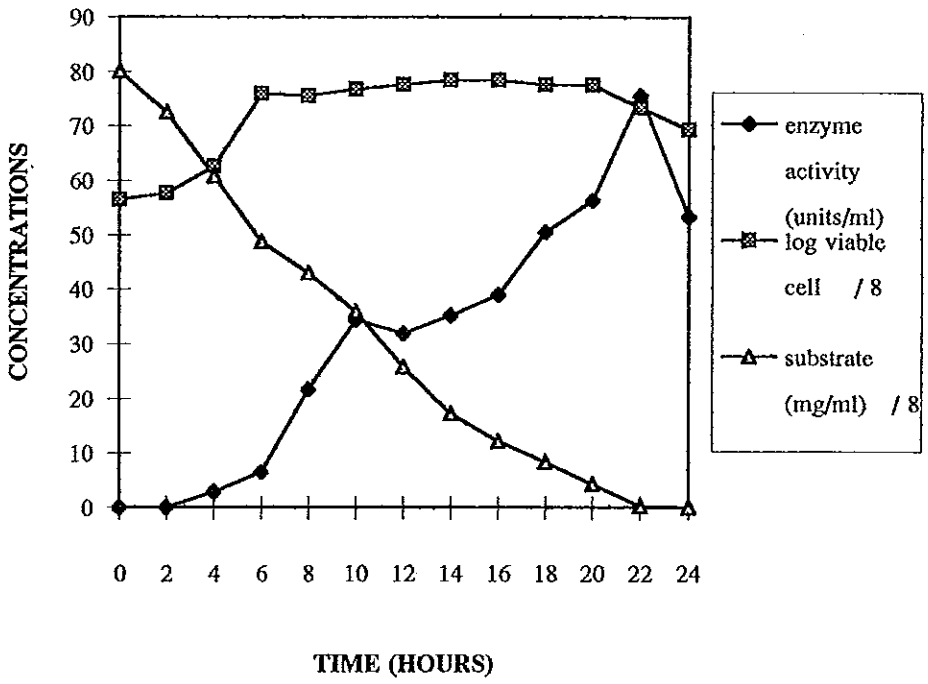
รูปที่ 15 จลนศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ skim milk medium พีเอช 9.0 โดยวิธี batch culture ในฟลาสก์เขย่า ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.11 การศึกษาจลนศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 โดยวิธี batch culture ในถังหมักจุลินทรีย์ (fermentor)

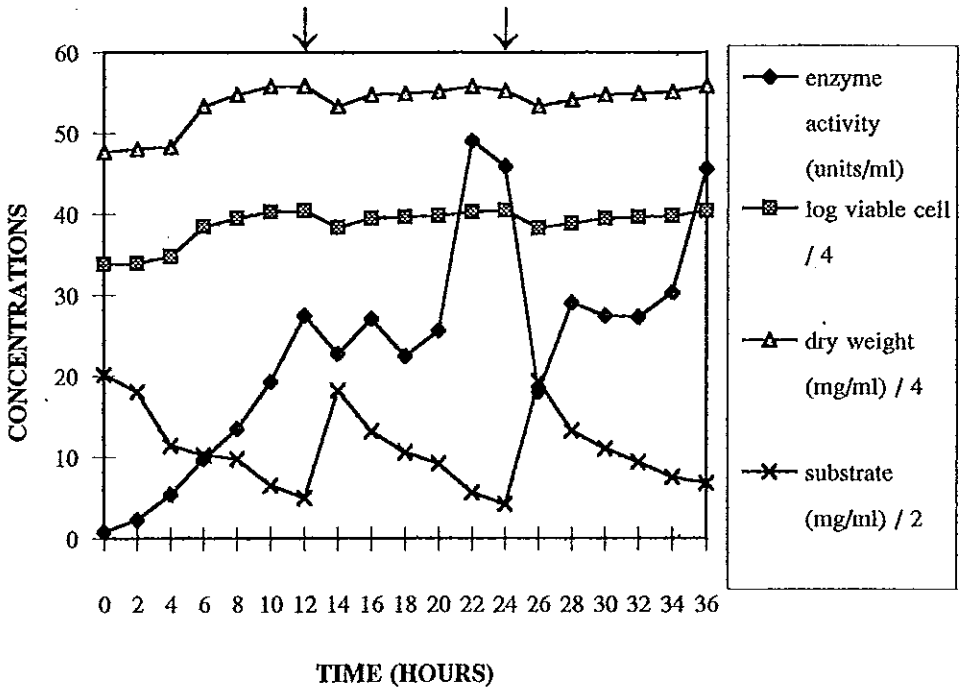
จากการติดตามผลการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ที่เพาะเลี้ยงโดยวิธี batch culture ในถังหมักจุลินทรีย์ขนาด 2 ลิตร ที่มีอาหารเหลวปริมาตร 1.2 ลิตร ซึ่งประกอบด้วย nutrient broth และ skim milk ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารทั้งหมด โดยใส่เชื้อเริ่มต้นปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ อัตราการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และควบคุมพีเอชให้คงที่ ที่พีเอช 9.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว ทุก 2 ชั่วโมง (รูปที่ 16) พบว่า *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 เริ่มผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนออกสู่นอกเซลล์หลังจาก 6 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง และมีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 76 หน่วยต่อมิลลิลิตร หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 ชั่วโมง และลดลงในชั่วโมงที่ 24 ส่วนปริมาณ skim milk ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าค่อยๆลดลงจนถึงศูนย์ เมื่อเพาะเลี้ยงไปได้ 22 ชั่วโมง การเติบโตของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว พบว่า มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.73 ต่อชั่วโมง โดยมีเวลาเติบโตเป็น 2 เท่า เท่ากับ 57 นาที (ตารางที่ 4) และเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง หลังจากชั่วโมงที่ 20 พบว่าการเติบโตของเชื้อเริ่มลดต่ำลง

3.12 การศึกษาจลนศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 โดยวิธี repeated batch culture ในถังหมักจุลินทรีย์

จากการติดตามผลการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ที่เพาะเลี้ยงโดยวิธี repeated batch culture ในถังหมักจุลินทรีย์ขนาด 2 ลิตร ที่มีอาหารเหลวปริมาตร 1.2 ลิตร ซึ่งประกอบด้วย nutrient broth และ skim milk ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรอาหารทั้งหมด โดยใส่เชื้อเริ่มต้นปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ควบคุมพีเอชให้คงที่ ที่พีเอช 9.0 อัตราการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ระยะเวลาในการเติมอาหารเข้าและนำของเสียออกเท่ากับ 12 ชั่วโมงต่อครั้ง โดยถ่ายอาหารที่ผ่านการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปริมาตร 1/2 ของปริมาตรอาหารทั้งหมดออกจากถังหมักจุลินทรีย์ และนำอาหารที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อเข้าสู่ถังหมักจุลินทรีย์ ให้มีปริมาตรรวมและความเข้มข้นของอาหารเท่าเดิม เก็บตัวอย่าง



รูปที่ 16 จลนศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ซึ่งเพาะเลี้ยงในถังหมักจุลินทรีย์ (fermentor) ที่มี skim milk medium พีเอช 9.0 โดยวิธี batch culture อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

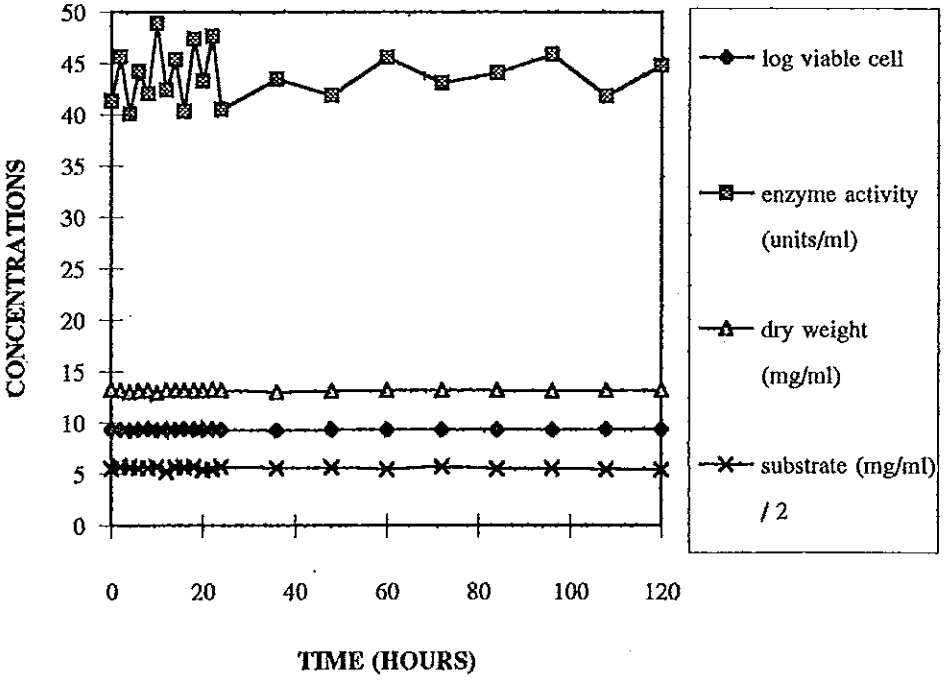


รูปที่ 17 จลนศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ที่เพาะเลี้ยงในถังหมักจุลินทรีย์ (fermentor) โดยใช้วิธี repeated batch culture อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ลูกศรแสดงการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ ครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2

อาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวทุก 2 ชั่วโมง (รูปที่ 17) พบว่า *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 เริ่มผลิตเอนไซม์ออกสู่นอกเซลล์หลังจาก 4 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง และมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึงชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อครั้งที่ 1 (การเพาะเลี้ยงเชื้อผ่านไป 12 ชั่วโมง) พบว่ามีการผลิตเอนไซม์ลดลง และมีแนวโน้มจะเพิ่มขึ้น ปริมาณเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 22 เท่ากับ 49 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเริ่มลดลงเล็กน้อยในชั่วโมงที่ 24 หลังจากการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อครั้งที่ 2 (การเพาะเลี้ยงเชื้อผ่านไป 24 ชั่วโมง) พบว่าปริมาณเอนไซม์ลดต่ำลง และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นเวลาที่เชื้อมีการผลิตเอนไซม์สูงสุดอีกครั้ง สำหรับปริมาณสับสเตรทในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าค่อยๆลดลง จนถึงชั่วโมงที่ 12 เป็นเช่นนี้สลับกันทุกครั้งที่มีการเติมอาหารเข้าและนำของเสียออก การเติบโตของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว พบว่ามีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 1.03 ต่อชั่วโมง และเวลาเติบโตเป็นสองเท่า เท่ากับ 40 นาที

3.13 การศึกษาจลนศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 โดยวิธี continous culture ในถังหมักจุลินทรีย์

จากการติดตามผลการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ที่เพาะเลี้ยงโดยวิธี continuous culture ในถังหมักจุลินทรีย์ขนาด 2 ลิตร ที่มีอาหารเหลวปริมาตร 1.2 ลิตร ซึ่งประกอบด้วย nutrient broth และ skim milk ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารทั้งหมด ควบคุมพีเอชให้คงที่ที่พีเอช 9.0 ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส อัตราการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 168 ชั่วโมง โดยมีอัตราการนำอาหารเข้า-ออก (flow rate) เท่ากับ 0.1 ลิตรต่อชั่วโมง อัตราการเจือจาง (dilution rate) ของอาหารเท่ากับ 0.08 ต่อชั่วโมง และมีระยะพัก (residence time ; tr) ของเชื้อเท่ากับ 12 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างอาหารชั่วโมงที่ 0 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากชั่วโมงที่ 48 ซึ่งเป็นเวลา 4 เท่าของระยะพัก เชื้อจะเข้าสู่ระยะคงที่ (steady state) เก็บตัวอย่างอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 86 ชั่วโมง (4 วัน) (รูปที่ 18) พบว่า *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 เริ่มผลิตเอนไซม์ออกสู่นอกเซลล์หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และการผลิตเอนไซม์มีปริมาณคงที่ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 จนถึงชั่วโมงที่ 168 มีปริมาณ 45 หน่วยต่อ



รูปที่ 18 จลนศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ที่เพาะเลี้ยงในถังหมักจุลินทรีย์ (fermentor) โดยใช้วิธีการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) โดยมีอัตราการเติมอาหารเข้า และนำอาหารออก (flow rate) เท่ากับ 0.1 ลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง

ตารางที่ 4 จลนศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Bacillus* PS719 ที่เพาะลี้ยงโดยวิธีต่างๆ

culture	batch culture (shake flask)	batch culture (fermentor)	repeated batch culture	continuous culture
specific growth rate : μ (h^{-1})	0.51	0.73	1.03	0.08
doubling time td (minute)	82	57	40	520
enzyme activity (units/ml)	27	76	49	45

มิลลิลิตร (ตารางที่ 4) สำหรับปริมาณสับสเตรทในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีปริมาณลดลงเรื่อยๆ และมีปริมาณคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 จนถึงชั่วโมงที่ 168 โดยมีปริมาณสับสเตรทเหลือประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสับสเตรทเริ่มต้น ส่วนการเติบโตของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว พบว่าเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง ของการเพาะเลี้ยง

4. วิจารณ์

แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณบ่อน้ำร้อน อำเภอควนกาหลง จังหวัดสตูล เป็นแบคทีเรียสกุล *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 และสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ 24 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่าปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus sp.* no AH-101 ที่ผลิตได้ 1,500 หน่วยต่อมิลลิลิตร แต่เป็นการทดสอบต่างสภาวะกัน (Takami *et al.*, 1989) *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 เป็นแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง พีเอช 9.0-11.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แต่ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ดีที่พีเอช 9.0-12.0 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนทำงานได้ดีที่พีเอช 7.0 และ 10.5-12.0 และอุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส แบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 จัดเป็น แบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะเป็นด่าง (alkalophile) ในกลุ่มที่สามารถเติบโตได้ในสภาวะเป็นด่างและเป็นกลาง (facultative alkalophile) และเติบโตได้ดีภายใต้อุณหภูมิสูง (thermophile) ในกลุ่มแฟคัลเทตีฟเทอร์โมไฟล์ (facultative thermophile) ขณะที่ *Bacillus sp.* no AH-101 สามารถเติบโตได้ที่พีเอชระหว่าง 7.0-11.0 และอุณหภูมิ 20-50 องศาเซลเซลเซียส ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะเป็นด่าง (alkalophile) ในกลุ่มที่สามารถเติบโตได้ในสภาวะเป็นด่างและเป็นกลางเช่นกัน แต่เป็นแบคทีเรียในกลุ่มทนร้อน (thermotolerant) โดยแบคทีเรีย *Bacillus sp.* no AH-101 จะผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ดีในสภาวะที่มีพีเอช 9.5 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีกิจกรรมการย่อยโปรตีนได้ดีที่พีเอชระหว่าง 12.0-13.0 และอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (Takami *et al.*, 1989) สำหรับแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างและอุณหภูมิสูง ได้แก่ *Bacillus sp.* B18 ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ดีที่พีเอช 10.5 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมการย่อยโปรตีนได้ดีที่พีเอชระหว่าง 12.0-13.0 และอุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส (Fujiwara *et al.*, 1993) และ *Bacillus stearothermophilus* F1 ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ดีที่พีเอช 10.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และมีกิจกรรมการย่อยโปรตีนได้ดีที่พีเอช 9.0 และอุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส (Rahman *et al.*, 1994) ดังแสดงในตารางที่ 5

จากผลการทดลองในรูปที่ 6 ซึ่งแสดงว่า *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 มีการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ดีที่พีเอช 7.5 และ 9.0-11.5 และในรูปที่ 9 การที่ตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าว ซึ่งยังไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ มีกิจกรรมการย่อยโปรตีนได้ดีทั้งที่พีเอช 7.0 และ 10.5-12.0 นั้น แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียนี้อาจจะผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดเดียว แต่มีคุณสมบัติการทำงานได้ดีทั้งที่พีเอชเป็นกลางและด่าง หรือผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน 2 ชนิด คือ นิวทรัลโปรติเนส และอัลคาไลน์โปรติเนส ซึ่งทำงานได้ดีในสภาวะที่มีพีเอชเป็นกลาง และเป็นด่าง ตามลำดับ ซึ่งจะต้องทำการศึกษาต่อไป

การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ปรากฏว่าเอนไซม์มีความเสถียรสูง ตั้งแต่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนถึง 55 องศาเซลเซียส (รูปที่ 11) แสดงว่าเอนไซม์สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรม เพื่อลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆ, ลดต้นทุนการผลิต และทำให้ทนต่อสภาวะแวดล้อมได้ดี สามารถเก็บไว้ได้เป็นเวลานาน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าความเสถียรของเอนไซม์ย่อยโปรตีนบางชนิดอาจต้องการอิออนของแคลเซียม (Takami *et al.*, 1989 ; Fujiwara *et al.*, 1993 ; Macfarlane and Gibson, 1993 ; Rahman *et al.*, 1994; Rattray *et al.*, 1995)

เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 มีความสามารถในการย่อยสลายสับสเตรทเอโซเคซีน, เคซีน, เอโซคอล และอัลบูมินได้ดี แต่ย่อยสลายสับสเตรทเคอราตินเอซูร์ และอีลาสตินออรีซิน ซึ่งเป็นโปรตีนที่ย่อยสลายได้ยากในธรรมชาติได้ต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างของโปรตีนของเคอราตินและอีลาสติน มีความแตกต่างจากโปรตีนปกติกล่าวคือจะประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่ละลายน้ำ (hydrophobic amino acid) โดยเคอราตินเป็นโปรตีนที่อยู่ในเส้นผม, ขนสัตว์, เขาสัตว์, เล็บ, เกล็ดปลา และเยื่อหุ้มที่เปลือกไข่ ส่วนอีลาสตินเป็นโปรตีนที่อยู่ในเนื้อเยื่อเชื่อมต่อ (connective tissue) และเอ็น (ligament) ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง และผนังของหลอดเลือด แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเคอราติน ได้แก่ *Bacillus sp.* no. AH-101 (Takami *et al.*, 1990) และ *Streptomyces pactum* DSM 40530 (Bockle *et al.*, 1995) แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายอีลาสติน ได้แก่ *Bacillus sp.* no. AH-101 (Takami *et al.*, 1990) นอกจากนี้ในขั้นตอนการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 มีความสามารถในการย่อยสลายเจลาติน

ซึ่งก็คือ คอลลาเจนที่ถูกแปรสภาพ (denature collagen) โดยจะสังเกตเห็นวงใสรอบโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง gelatin agar หลังจากราดด้วยกรดไตรคลอโรอะซีติค เข้มข้น 1 โมลาร์ แสดงว่า เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 มีคุณสมบัติในการย่อยคอลลาเจน (collagenase) ด้วย

เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 มีความทนทานต่อสารลดแรงตึงผิว, สารปรุงแต่ง และสารคีเลต ซึ่งเป็นสารเคมีที่ประกอบอยู่ในผงซักฟอก เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ยังคงมีมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 13) ดังนั้นเอนไซม์ย่อยโปรตีนดังกล่าว จึงเหมาะสมสำหรับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก ซึ่งนอกจากจะต้องมีกิจกรรมการย่อยโปรตีนสูงแล้ว ต้องสามารถรักษากิจกรรมของเอนไซม์ไว้ได้ภายใต้สภาวะที่รุนแรงในการขณะการซัก เช่น อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และมีความต้านทานต่อสารปรุงแต่งอื่นๆ เช่น สารลดแรงตึงผิว และสารฟอกขาว (Ng and Kenealy, 1986) อย่างไรก็ตาม Barfoed (1983) (อ้างถึงโดย Brock, 1986) กล่าวไว้ว่า ปัจจุบันเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus spp.* ที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างเท่านั้นที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอกได้ โดยส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดย *Bacillus licheniformis* ซึ่งมีกิจกรรมการย่อยโปรตีนได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และพีเอช 10.0

สารยับยั้งที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 คือ พีเอ็มเอสเอฟ (PMSF) และ 3,4-ดีซีไอ (3,4-DCI) แสดงว่าเอนไซม์นี้จัดอยู่ในกลุ่มซีรีนโปรติเนส (Salvesen and Nagase, 1990) ไม่ใช่ซีสเตอีนโปรติเนสเนื่องจากไม่ถูกยับยั้งการทำงานด้วยกรดไอโอโดอะซีติค (iodoacetic acid) และเอนไซม์นี้ไม่ใช่เมทาลโลโปรติเนส เนื่องจากไม่ถูกยับยั้งการทำงานด้วยอีดีทีเอ (EDTA) แต่การทำงานของเอนไซม์ดีขึ้นเมื่อมีเมอร์แคพโตเอธานอล (mercaptoethanol) (ไม่ได้แสดงข้อมูล) เนื่องจากสารเมอร์แคพโตเอธานอล เป็นสารรีดิวส์ (reducing agent) ซึ่งสามารถกำจัดสารบางชนิดได้ดี และทำให้เอนไซม์มีความเสถียรยิ่งขึ้น (stabilzing agent) ส่วนสารอื่นที่นิยมใส่ร่วมกับเอนไซม์เพื่อป้องกันการย่อยสลายของเอนไซม์ ได้แก่ ไกลคอล (glycol) หรือไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulphoxide ; DMSO) เอนไซม์ที่มีรายงานว่าเป็นซีรีนโปรติเนส ได้แก่ เอนไซม์ที่ผลิต

จาก *Bacillus sp.* no. AH-101 (Takami *et al.*, 1989) , *Bacillus stearothermophilus* F1 (Rahman, *et al.*, 1994) , *Thermococcus stetteri* (Klingeberge *et al.*, 1995)

การเพาะเลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 โดยวิธี batch culture ในฟลาสก์เขย่า (shaking flask) ที่ไม่มีการควบคุมพีเอช กับการเพาะเลี้ยงในถังหมักจุลินทรีย์ (fermentor) ที่ควบคุมพีเอชไว้ที่ 9.0 ตลอดการทดลอง (รูปที่ 15 และ 16) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักจุลินทรีย์ เชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 มีการเติบโตเร็วกว่า โดยมีเวลาเติบโตเป็น 2 เท่า (doubling time ; td) ลดลง และมีอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) เพิ่มมากขึ้น และยังสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนออกสู่นอกเซลล์มากกว่าเดิมถึง 3 เท่า ซึ่งเนื่องจากการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ เป็นการเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการควบคุมพีเอช ค่าพีเอชลดต่ำลงไปตามระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง โดยมีพีเอชสุดท้ายของอาหารเท่ากับ 7.49 ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว

ส่วนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ในถังหมักจุลินทรีย์ เปรียบเทียบกับวิธี repeated batch culture นั้น ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน คือ ใน repeated batch culture เชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 มีการเติบโตเร็วกว่า โดยเวลาเติบโตเป็นสองเท่าลดลง และอัตราการเติบโตจำเพาะเพิ่มขึ้น ขณะที่ความสามารถในการผลิตเอนไซม์นั้น พบว่าผลิตได้น้อยกว่าวิธี batch fermentation โดยใช้ถังหมักจุลินทรีย์ถึง 1.5 เท่า ทั้งนี้อาจเนื่องจากระยะเวลาการผลิตเอนไซม์ในวิธี repeated batch culture ยังไม่ถึงจุดสูงสุด ผลการทดลองนี้ต่างจากงานวิจัยของ Giesecke และคณะ (1991) ซึ่งรายงานว่าได้เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* โดยวิธี fed batch culture มีการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเนสในปริมาณที่สูงกว่าการเพาะเลี้ยงโดยวิธี Batch culture ถึง 4.6 เท่า

ส่วนการเพาะเลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ในถังหมักจุลินทรีย์ชนิดต่อเนื่อง (continuous culture) นั้น พบว่าที่ระยะคงที่ (steady state) เชื้อแบคทีเรียมีการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนโดยเฉลี่ยประมาณ 45 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ได้ต่อเนื่องเป็นเวลา 120 ชั่วโมง (3 วัน) โดยไม่มีการกลายพันธุ์ของเชื้อ ต่างจากงานวิจัยของ Heineken และ Comnor (1972) ซึ่งรายงานว่า ได้เพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* NRRL-B3411 ใน chemostat เพื่อผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเนส, นิวทรัลโปรติเนส และอัลฟาอะไมเลส ผลปรากฏว่าการ

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียอย่างต่อเนื่องนี้ไม่เหมาะสมสำหรับผลิตเอนไซม์ดังกล่าว เนื่องจากในขณะเพาะเลี้ยงมักมีการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) เกิดขึ้น ได้เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์กลายที่ไม่ผลิตเอนไซม์ดังกล่าว

5. สรุป

1. สามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย ที่ย่อยโปรตีนได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง และอุณหภูมิสูง จากตัวอย่างดินและน้ำบริเวณบ่อน้ำร้อน และตัวอย่างน้ำจากโรงงานน้ำเต้าหู้ รวม 18 ตัวอย่าง โดยอาศัยความสามารถในการย่อยโปรตีนเป็นวงใสรอบโคโลนี บนอาหารแข็งที่มีโปรตีน และตรวจหากิจกรรมการย่อยโปรตีนในอาหารเหลว พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้มี 36 สายพันธุ์ สายพันธุ์ที่ย่อยโปรตีนได้ดีที่สุด และเป็นแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างคือ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719

2. *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 เติบโตได้ดีที่พีเอชระหว่าง 9.0-11.0 ภายใต้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

3. *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนออกสู่นอกเซลล์ได้ดีที่สุดที่พีเอช 9.0-11.5 ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

4. เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 7.0 และ 10.5-12.0 ภายใต้อุณหภูมิ 70-75 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรที่พีเอช 9.0 ตั้งแต่อุณหภูมิ 4-55 องศาเซลเซียส

5. เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 มีความจำเพาะต่อสับสเตรทเอโซเคซีนมากที่สุด รองลงมาคือ ฮีโมโกลบิน และเคซีน ตามลำดับ

6. เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 มีความทนทานต่อสารลดแรงตึงผิว, สารปรุงแต่ง และสารดีเลต โดยพบว่าดีดีเอบี (DDAB) ที่ระดับความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดลอง มีผลในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงสุด 25 เปอร์เซ็นต์

7. เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 จัดเป็นซีรีนโปรติเนส โดยพบว่าพีเอ็มเอสเอฟ (PMSF) และ 3,4-ดีซีไอ (3,4-DCI) มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์

8. จลนศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 โดยวิธี batch culture ในฟลาสก์ พบว่า *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 มีเวลาเติบโตเป็นสองเท่า เท่ากับ 82

เอกสารอ้างอิง

Ando, A., Yabuki, M. and Fujii, T. 1981. General characteristics of an alkalophilic bacterium, *Bacillus* A-007. Tech. Bull. Fac. Hortic Chiba. 27 : 17-28.

Arima, K., Yu, J. and Iwasaki, S. 1970. Milk clotting enzyme from *Mucor pusillus* var.Lindt. In Method in enzymology (Perlman, G. and Lorand, L. eds.), Vol 19, pp. 446-458, Acadamic Press Inc., USA.

Blotevogel, K. H., Fisher, U., Mocha, M. and Jannsen, S. 1985. *Methanobacterium thermoalcaliphilum* spec. nov., a new moderately alkaliphilic and thermophilic autophic methanogen. Arch. Microbiol. 142 : 211-217.

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

Bone, R., Flank, D., Kettner, C. A. and Agard, D. A. 1989. Structural analysis of specificity : α-lytic protease with analogues reaction intermediates. Biochem. 28 : 7600-7609.

Brock, T. D. 1986. Introduction : An overview of thermophiles. Thermophiles : General, molecular, and applied microbiology (Brock, T.D. ed.), pp. 1-16, A Wiley-Interscience Publication, USA.

Brock, T. D., Smith, D. W. and Madigan, T. M. 1984. The microbe in its environment. In Biology of microorganism, pp. 239-270, Prentice Hall International, USA.

Cantor, C. R., Liebecq, C., Moss, G. P., Saenger, W., Sharon, N., Tipton, K. F., Vanetianer, P. 1992. Hydrolase. In Enzyme nomenclature, pp 306-345, Academic Press Inc., USA.

Cole, P. W., Murakami, K. and Inagami, T. 1971. Specificity and mechanism of clostripain catalysis. Biochem. 10 : 4246-4250.

นาที อัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.51 ต่อชั่วโมง และกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 27 หน่วยต่อมิลลิลิตร

9. จลนศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 โดยวิธี batch culture ในถังหมักจุลินทรีย์ที่ควบคุมพีเอชไว้ที่ 9.0 พบว่า *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 มีเวลาเติบโตเป็นสองเท่า เท่ากับ 57 นาที อัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.73 ต่อชั่วโมง และกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 76 หน่วยต่อมิลลิลิตร

10. จลนศาสตร์ของการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 โดยวิธี repeated batch culture ในถังหมักจุลินทรีย์ที่ควบคุมพีเอชไว้ที่ 9.0 พบว่า *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 มีเวลาเติบโตเป็นสองเท่า เท่ากับ 40 นาที อัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) เท่ากับ 1.03 ต่อชั่วโมง และกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 49 หน่วยต่อมิลลิลิตร

11. การเพาะเลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ในถังหมักจุลินทรีย์ชนิดต่อเนื่อง (continuous culture) ที่ควบคุมพีเอชไว้ที่ 9.0 พบว่าเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวมีการผลิตเอนไซม์ได้อย่างต่อเนื่อง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยไม่มีการกลายพันธุ์ของเชื้อ และมีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนโดยเฉลี่ย เท่ากับ 45 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Collins, M. D., Laund, B.M., Farrow, J. A. E. and Schleifer, K. H. 1983. Chemotaxonomic study of an alkalophilic bacterium, *Exiguobacterium aurantiacum* gen. nov., sp. nov. J. Gen. Microbiol. 129 : 2037-2042.

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

Dancer, B. N. and Mandelstam, J. J. 1975. Production and possible function of serine protease during sporulation of *B. subtilis.* J. Bacteriol. 121 : 406-410.

de Boer, A. S., Priest, F. and Diderichsen, B. 1994. On the industrial use of *Bacillus licheniformis* : A review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40 : 595-598.

Desmond, E. P., Stanes, W. L. and Behal, F. S. 1975. Aminopeptidase of *B. subtilis.* J. Bacteriol. 124 : 353-363.

El-dash, A. A. and Johnson, J. A. 1967. Protease enzyme : Effect on bread flavour. Cereal Science Today. 12 : 282-288.

Elliott, S. D. and Liu, T. Y. 1970. Streptococcal proteinase. In Method in enzymology (Perlman, G. and Lorand, L. eds.), Vol 19, pp. 252-261, Acadamic Press Inc., USA.

Epstein, D. M. and Wensink, F. C. 1988. The α-lytic protease gene of *Lysobacter enzymogenas.* J. Biol. Chem. 263 : 16586-16590.

Feder, J. and Shuck, J. M. 1970. Studies on the *Bacillus subtilis* neutral protease and *Bacillus thermoproteolyticus* thermolysin-catalyzed hydrolysis of dipeptide substrates. Biochem. 9 : 2784-2791.

Fox, G. E., Stackebrandt, E., Hespell, R. B., Gibson, J., Manlioff, J., Dyer, T. A., Wolfe, R. S., Balch, W. E., Tanner, R.S., Magrum, L. J., Zablen, L. B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B. J., Stahl., Luehrsen, K. R., Chen, K. N. and Woese, C. R.. 1980. The phylogeny of prokaryotes. Science. 209 : 457-463.

Fujiwara, N., Masui, A. and Imanaka, T. 1993. Purification and properties of the highly thermostable alkaline protease from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus sp.* J. Biotechnol. 30 : 245-256.

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

Graham, A. F. and Lund, B. M. 1983. The effect of alkaline pH on growth and metabolic products of a motile, yellow-pigmented *Streptococcus sp.* J. Gen. Microbiol. 129 : 2429-2435

Grant, W. D., Mills, A. A., Schofield, A. K. 1979. An alkalophilic species of *Ectothiorhodospira* from a Kenyan Soda lake. J. Gen. Microbiol. 129 : 2429-2435.

Griffin, P. J. and Fogarty, W. M. 1973. Physicochemical properties of the native, Zinc - and manganese- prepared metalloprotease of *Bacillus polymyxa.* Appl. Microbiol. 26 : 191-195.

Gripon, J. C., Auberger, B., and Lenoir, J. 1980. Metalloprotease from *Penicillium caseicolum* and *P. roqueforti* : comparison of specificity and chemical characterization. Int. J. Biochem. 12 : 451-455.

Gusek, T. W. and Kinsella, J. E. 1987. Purification and characterization of the heat-stable serine proteinase from *Thermomonospora fusca* YX. Biochem. J. 246 : 511-517.

Hashimoto, H., Iwaasa, T. and Yokotsuka, T. 1973. Some properties of acid protease from thermophilic fungus, *Penicillium duponti* K 1014. Appl. Microbiol. 25: 578-583

Heineken, F. G. and O' Connor, R. J. 1992. Continuous culture studies on the biosynthesis of alkaline protease, neutral protease and α-amylase by *Bacillus subtilis* NRRI-B 3411. J. Gen. Microbiol. 73 : 35-44.

Horikoshi, K. 1990. Enzyme of alkalophiles In Microbial enzyme and biotechnology (Fogarty, W. M. and Kelly, C. T., eds.), 2nd edn., pp. 275-291. Elsevier Applied Science, England.

Hwang, I. K., Kaminogawa, S. and Yamauchi, K. 1981. Purification and properties of a dipeptidase from *Streptococcus cremoris*. Agric. Biol. Chem. 45 : 159-165.

Ikura, Y. and Horishi, K. 1987. Stimulatory effect of certain amino acids on xylanase production by alkalophilic *Bacillus sp.* Agric. Biol. Chem. 51 : 3143-3145.

Ikura, Y., Horikoshi, K. 1987. Effect of amino compounds on alkalophilic *Bacillus sp.* J. Ferment. Technol. 65 : 707-709.

Iwayama, A., Kimura, T., Adachi, O. and Ameyama, M. 1983. Crytallization and characterization of a novel aminopeptidase from *Trichosporon cutaneum*. Agric. Biol. Chem. 47 : 2483-2493.

Jean, F. and Faddin, M. 1980. Biochemical test for identification for medical bacterial, 2 nd edn, pp. 360, Willium and Wilking, England.

Kallas, T. and Castenholz, R. W. 1982. Internal pH and ATP-ADP pools in the cyanobacterium *Synechococcus sp.* during exposure to growth-inhibiting low pH. J. Bacteriol. 149 : 229-236.

Klingeberge, M., Galunsky, B., Kasche, V. and Antranikian, G. 1995. Purification and Properties of a highly thermostable, sodium dodecyl sulfate-resistant and stereo-specific proteinase from the extremely thermophilic archaeon *Thermococcus*. Appl. Environ. Microbiol. 61 : 3098-3104.

Kitada, M., Guffanti, A. A. and Krulwich, T. A. 1982. Bioenergetic properties and viability of the alkalophilic *Bacillus firmus* RAB as a function of pH and Na^+ content of the medium. J. Bacteriol. 152 : 1096-1104.

Krulwich, T. A. and Guffanti, A. A., 1989. Alkalophilic bacteria. Annu. rev. Microbiol. 43 : 435-463.

Kumagai, H., Matsue, M., Majima, E., Tomoda, K. and Ichishima, E. 1981. Carboxyl proteinase from the wood deteriorating Basidiomycetes *Pycnoporus coccineus* : substrate specificity with oxidized insulin peptide B1 - B6 - B24, Angiotensin and proangiotensin. Agric. Biol. Chem. 45 : 981-985.

Langworthy, T. A. and Pond, J. L. 1986. Membranes and lipids of thermophiles. In Thermophiles : General, molecular, and applied microbiology (Brock, T. D., ed.) pp. 107-135. A Wiley-Interscience Publication, USA.

Levy, C. C. and Goldman, P. 1969. Bacterial peptidase. J. Biol. Chem. 244 : 4467-4472.

Li, E. and Yousten, A. A. 1975. Metalloprotease from *Bacillus thuringiensis*. Appl. Microbiol. 30 :354-361.

Liu, T. Y. and Elliott, S. D. 1971. Streptococcal proteinase. In The enzyme (Boyer, P. D. ed.), Vol. 3, 3rd edn., pp. 609-647, Acadamic Press Inc., USA.

Lu, A. Y. H., Junk, K. W. and Coon, M. J. 1969. Resolution of the cytochrome P-450 containing φ-Hydroxylation system of liver microsomes into three components. J. Biol. Chem. 244 : 3714-3721.

Macfarlane, G. T. and Gibson, G. R. 1993. Characteristics of protease synthesis in *Bacteroides splanchnicus* NCTC 10825. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39 : 506-511.

Markland, E. S. and Smith, E. L. 1971. Subtilisin : Primary structure, chemical and physical properties. In The enzymes, (Boyer, P.D. ed.) Vol. 3, 3rd edn., pp. 561-608, Acadamic Press Inc., USA.

Matsubara, H. and Feder, J. 1971. Other bacterial, mold, and yeast proteinase. In The enzyme (Boyer, P. D. ed.), Vol. 3, 3rd edn., pp. 721-795. Acadamic Press Inc., USA.

Mitchell, W. M. and Harrington, W. F. 1971. Clostripain In The enzymes (Boyer, P. D. ed.), Vol. 3, 3rd edn., pp. 699-719. Acadamic Press Inc., USA.

Nakadai, T. and Nasuno, S. 1977. Hyperproduction of peptidase and proteinase by mutants of *Aspergillus oryzae*. J. Ferment. Technol. 55 : 273-276.

Nakagawa, Y. 1970. Alkaline proteases from *Aspergillus*. In Method in enzymology (Perlman, G. and Lorand, L. eds.), Vol 19, pp. 581-591, Acadamic Press Inc., USA.

Ng, T. K. and Kenealy, W.R. 1986. Industrial application of thermostable enzymes. In Thermophiles : General, molecular, and applied microbiology (Brock, T. D., ed.), pp. 197-215. A Wiley-Interscience Publication, USA.

North, M. J. 1982. Comparative biochemistry of the proteinase of eucaryotic microorganisms. Microbiol. Rev. 46 : 308-340.

Ottensen, M. and Rickert, W. 1970. The acid protease of *Mucor miehei*. In Method in enzymology (Perlman, G. and Lorand, L. eds.), Vol 19, pp. 459-460, Acadamic Press Inc., USA.

Ottensen, M. and Swendsen, I. 1970. The subtilisin. In Method in enzymology (Perlman, G. and Lorand, L. eds.), Vol 19, pp. 199-215, Acadamic Press Inc., USA.

Outtrup, H. and Boyce, C. O. L. 1990. Microbial proteinases and biotechnology. In Microbial enzyme and biotechnology (Fogarty, W. M. and Kelly, C. T., eds.), 2 nd. ed. pp. 227-253, Information Press Ltd., England.

Peter, H. A., Mair, S. N., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. 1986. Bergey's Manual of systematic bacteriology, Vol 2, pp. 1104-1137, Willium and Wilking, USA.

Phadatare, S. U., Desppande, V. V. and Srinivasan, M. C. 1993 High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20) : Enzyme production and compatibility with commercial detergent. Enzyme Microb. Technol. 15 : 72-76.

Rahman, R. N. Z. A., Ampon, C. N. R. K., Basri, M., Yunus, W. Md. Z. W. Y. and Salleh, A. B. 1994. Purification and characterization of a heat-stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40 : 822-827.

Rattray, F. P., Bockelmann, W. and Fox, P. F. 1995. Purification and characterization of an extracellular proteinase from *Brevibacterium linen* ATCC 9174. Appl. Environ. Microbiol. 61 : 3454-3456.

Salvesen, G. and Nagase, H. 1990. Inhibition of proteolytic enzyme. In Proteolytic enzyme : A practical approach. (Beynon, R. J. and Bond, J. S., eds.), pp. 83-104, Information Press Ltd., England.

Sarath, G., de la Motte, R. S. and Wagner, F. W. 1990. Protease assay methods. In Proteolytic enzyme : a practical approach. (Beynon, R. J. and Bond, J. S., eds.), pp. 25-55, Information Press Ltd., England.

Souza, K. A., Deal, P. H., Mack, H. M. and Turnbill, C. E. 1974. Growth and reproduction of microorganisms under extremely alkaline conditions. Appl. Microbiol. 28 : 1066-1068.

Steel, D. B., Fiske, M. J., Steele, B. P. and Kelley, V. C. 1992. Production of a low-molecular-weight, alkaline-active, thermostable protease by a novel, spiral-shaped bacterium, *Kurthia spiroforme*, sp. nov. Enzyme Microb. Technol. 14 : 358-360.

Supanwong, K. 1972. Method for the determination of accurate number of viable cells. Faculty of Science, Chieng Mai University, Thailand.

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.

Takami, H., Akiba, T. and Horikoshi, K. 1990. Characterization of alkaline protease from *Bacillus sp.* no. AH-101. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33 : 519-523

Takami, H, Kibayashi, T. Aono, R. and Horikoshi, K. 1992. Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of the structural gene for a thermostable alkaline protease from *Bacillus sp.* no. AH-101. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38 : 101-108.

Takami, H., Teruhiko, A. and Horikoshi, K. 1989. Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus sp.* no. AH-101. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30 : 120-124.

Takii, Y., Kuriyama, N. and Suzuki, Y. 1990. Alkaline serine protease produced from citric acid by *Bacillus alcalophilus* subsp. halodurans KP 1239. App. Microbiol. Biotechnol. 34 : 57-62.

Tindall, B. J., Ross, H. N. M. and Grant, W. D. 1984. *Natronobacterium* gen. nov., and *Natronococcus* gen. nov., two genera of haloalkalophilic archaebacterium. Syst. Appl. Microbiol. 5 : 41-57.

Tokuda, H. and Unemoto, T. 1983. Growth of a marine *Vibrio alginolyticus* and moderately halophilic *V. costicola* becomes uncoupler resistant when the respiration-dependent Na^+ pump functions. J. Bacteriol. 156 : 636-643.

Trop, M. and Birk, Y. 1968. The trypsin-like enzyme from *Streptomyces griseus* (Pronase). Biochem. J. 109 : 475-476

Tsuchiya, K., Nakamura, Y., Sakashita, H. and Kimura, T. 1992. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Thermoactinomyces sp.* HS 682. Biosci. Biotechnol. Biochem. 56 : 246-250.

Tsujita, Y. and Endo, A. 1971. Extracellular acid protease of *Aspergillus oryzae* grown on liquid medium multiple forms due to association with heterogeneous polysaccharides. J. Bacteriol. 130 : 48-56.

VanDermark, P. J. and Barry, L. B., 1987. The microbe : An introduction to their nature and importance, pp. 131-173, A Wiley-Interscience Publication, USA.

Vedder, A. 1934. *Bacillus alcalophilus* n. sp., benevens enkele ervaringen metsterk alcaliche voeding sbodems Antonie Vanleeuwenhoek. J. Microbiol. Serol. 1 :141-147.

Ward, O. P. 1983. Proteinase. In Microbial enzymes and biotechnology (Fogarty, W. M., ed,), pp. 251-317, Applied Science Publishers, England.

Weisser, J. and Truper, H. G. 1985. Osmoregulation in a new haloalkalophilic *Bacillus* from the Wadi Natrum. Syst. Appl. Microiol. 6 : 7-11.

Whitaker, J. R. 1970. Protease of *Endothia parasitica*. In Method in enzymology (Perlman, G. and Lorand, L. eds.), Vol 19, pp. 436-445, Acadamic Press Inc., USA.

Wingard, M., Matsueda, G, and Wolfe, R. S. 1972. Myxobacter AL-1 protease II : Specific peptide bond clevage on the amino side of lysine. J. Bacteriol. 112 : 940-949.

Yoneda, Y. and Maruo, B. 1975. Mutation of *Bacillus subtilis* causing hyperproduction of α-amylase and protease and its symergistic effect. J. Bacteriol. 124 : 48-54.

ภาคผนวก

ก. การคำนวณเวลาเติบโตเป็นสองเท่า (doubling time)

จากสูตร $td = t \log 2 / \log b - \log B$

โดย td = เวลาเติบโตเป็นสองเท่า หน่วยเป็นนาทีหรือชั่วโมง

B = จำนวนแบคทีเรียที่เวลา t_1

b = จำนวนแบคทีเรียที่เวลา t_2

t = ระยะเวลาระหว่าง B กับ b

ดังนั้นในกรณีของ *Bacillus* PS719 ที่เพาะเลี้ยงโดยวิธี batch culture ในฟลาสก์เขย่า โดย

$\log B = 7.24$

$\log b = 7.68$

$t = 120$ นาที

แทนค่าสูตรดังกล่าว จะได้ $td = 120 \log 2 / 7.68-7.24$

$= 82.09$ นาที

ข. การคำนวณอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ)

จากสูตร $td = 0.693 / \mu$

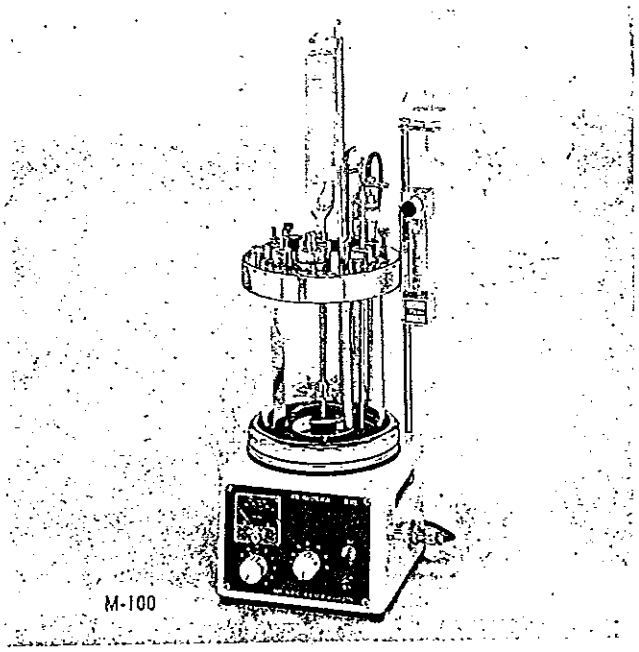
จาก ข้อ ก. td = 1.37 ชั่วโมง

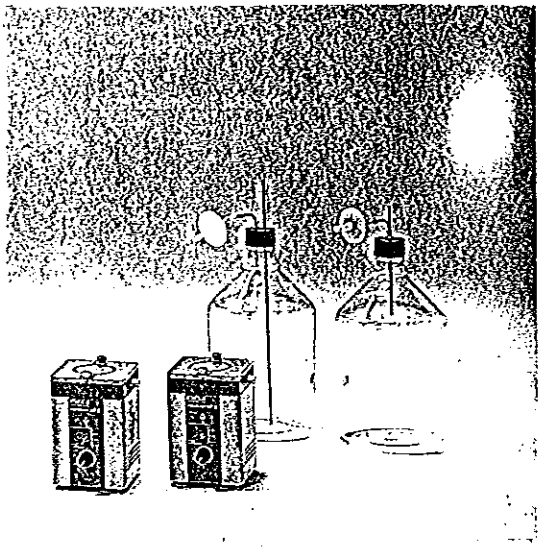
แทนค่า td ในสูตร

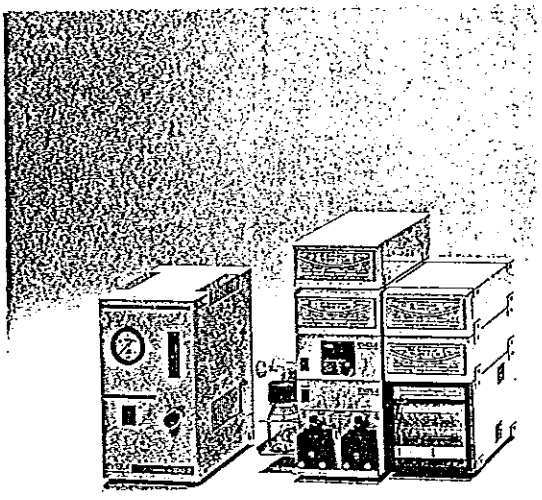
$1.37 = 0.693 / \mu$

จะได้ $\mu = 0.51$ ต่อชั่วโมง

ค. ภาพแสดงถังหมักจุลินทรีย์ พร้อมชุดควบคุม







ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวสุดเอื้อม พัฒนใหญ่ยิ่ง
วัน เดือน ปี เกิด	18 ตุลาคม 2513

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วท.บ. (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ภาคใต้	2536