การผลิตเอนไซม์เรนินจาก *Rhizopus microsporus* S.

นางสาว สุทธินี มิธรอยธรรม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาจุลชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2538

ISBN 974-632-136-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Production of rennin enzyme from *Rhizopus microsporus* S$_1$

Miss Suttinee Mechobtum

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Microbiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1995

ISBN 974-632-136-6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การผลิตเอนไซม์เรนินจาก *Rhizopus microsporus* S$_1$

โดย นางสาวสุทธินี มีชอบธรรม

ภาควิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิชญางกูร

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิชญางกูร)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปราณี อ่านเปรื่อง)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

สุทธินี มีย่อมธรรม : การผลิตเอนไซม์เรนนินจาก *Rhizopus microsporus* S_1
(PRODUCTION OF RENNIN ENZYME FROM *Rhizopus microsporus* S_1)
อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.สุมาลี พิชญางกูร, 95 หน้า. ISBN 974-632-136-6

การคัดแยกเชื้อรา 51 สายพันธุ์ จากลูกแป้งสุรา ลูกแป้งกระแช่และลูกแป้งข้าวหมาก จำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่ามีเพียง 9 สายพันธุ์ที่มีแอคติวิตีของเรนนินและได้จำแนกชนิดของเชื้อ พบว่า *Rhizopus microsporus* S_1 เป็นสายพันธุ์ที่มีแอคติวิตีของเรนนินสูงสุด เมื่อใช้สปอร์อายุ 2 วัน จำนวน 10^7 สปอร์/มล. เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีรำข้าวเข้มข้น 3% และค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 7.3 ในภาวะที่เหมาะสมของในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์เรนนินโดยบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน พบว่าราชนี้สามารถผลิตเอนไซม์เรนนินได้ 10 หน่วยต่อ มก.โปรตีน

เอนไซม์เรนนินจาก *R.microsporus* S_1 ได้ทำให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 30-75% แล้วแยกด้วยการผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-โทโยเพิร์ล 650 เอ็ม และคอลัมน์เจลฟิลเตรชั่น เซฟาเด็กซ์ จี - 75 พบว่าเอนไซม์นี้มีความบริสุทธิ์ขึ้น 23.86 เท่า และได้ปริมาณเอนไซม์ 10.95% จากเอนไซม์เริ่มต้น การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ พบว่าประกอบด้วย 2 โมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 18,000 และ 19,000 ตามลำดับ ภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสคืออุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ส่วนภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เรนนินคืออุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.8 โดยใช้นมผงร่องไขมันเข้มข้น 10% ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 25 มิลลิโมลาร์ เป็นสับสเตรทและเอนไซม์นี้มีความเสถียรที่ความเป็นกรดด่าง 2.5-7.5 อุณหภูมิไม่สูงกว่า 40 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต สุทธินี มีย่อมธรรม

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

C526197 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: : RENNIN / MILK CLOTTING ENZYME / Rhizopus sp.
SUTTINEE MECHOBTUM : PRODUCTION OF RENNIN ENZYME FROM *Rhizopus microsporus* S_1. THESIS ADVISOR : ASSO.PROF. SUMALEE PICHYANGKURA, Ph.D. 95 pp. ISBN 974-632-136-6

The isolated of 51 fungi strains from 20 samples of lookpangs (mold-bran), 9 strains were found to produce rennin activity. The best activity fungus was identified as *Rhizopus microsporus* S_1, then this fungus was cultured for production of rennin, when using about 10^7 2 days spores/ml inoculated in medium that contained 3% rice bran at pH 7.3. The optimal cultivation conditions for enzyme rennin production were shaking at 200 rpm and 30 °C. Under these conditions, 10 units/mg protein of rennin activity was obtained when cultivated for 4 days.

The results of the extraction and purification of rennin enzyme from *R.microsporus* S_1 showed that the fractional precipitation with 30-75% saturation of ammonium sulfate followed by column chromatography on DEAE-Toyopearl 650 M and Sephadex G-75 gel filtration found 23.86 fold increase in purity and 10.95% recovery from crude enzyme.

The purified enzyme was found to consist of 2 moleculars having molecular weight of 18,000 and 19,000 daltons respectively. The optimal conditions for the protease enzyme activity were 35 °C at pH 7.0, while optimal conditions for the rennin enzyme activity were 55 °C and pH 5.8 using 10% skim milk in $CaCl_2$ 25 mM as substrate. The enzyme was found to be stable in the pH range of 2.5-7.5 and temperature not oven 40 °C.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต สุทธินี มีเดชธรรม

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิชญางกูร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ รองศาสตราจารย์ ดร.ปราณี อ่านเปรื่อง และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะนยัคม์ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการในการสอบ ให้คำแนะนำต่างๆ รวมทั้งแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกๆ ท่าน ตลอดจนเนื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ รวมทั้งทุกคนที่มีส่วนในการช่วยเหลือ และให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนในการวิจัยนี้ ตลอดจนขอขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ให้ความสะดวกต่างๆ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ตลอดจนญาติพี่น้องทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือสนับสนุน และให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอดจนเสร็จสมบูรณ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญภาพ..... ฌ

คำย่อ..... ฎ

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการทดลอง..... 11

3. ผลการทดลอง..... 24

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 68

รายการอ้างอิง..... 77

ภาคผนวก ก..... 84

ภาคผนวก ข..... 89

ประวัติ..... 95

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สายพันธุ์ราที่มีการผลิตเอนไซม์เรนินในอาหารเหลววายเอ็มผสมนมพร่องไขมัน.....	25
2	อายุของกล้าเชื้อต่อแอคติวิตีของเรนิน และแอคติวิตีของโปรติเอสของ *Rhizopus* sp. และ *Chlamydomucor* sp.....	26
3	ผลของ pH เริ่มต้นในอาหารรำข้าว 3 เปอร์เซนต์ ต่อการผลิตเอนไซม์เรนินของ *R.microsporus* S_1.....	43
4	สรุปขั้นตอนต่างๆในการทำเอนไซม์เรนินจาก *R. microsporus* S_1 ให้บริสุทธิ์.....	48
5	เปรียบเทียบแอคติวิตีของเรนิน และแอคติวิตีของโปรติเอสของเอนไซม์เรนินจาก *R.microsporus* S_1 กับ เอนไซม์ที่ใช้ทางการค้า.....	65

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ตำแหน่งที่เรนินทำปฏิกิริยากับแคปปา - เคซีน.....	4
2	ลักษณะของสปอร์ ก้านชูสปอร์ และรากของ *R.microsporus* S_1 เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง YM.....	28
3	ผลของอาหารวายเอ็ม(YM) ต่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เรนินของ *R.microsporus* S_1.....	29
4	ผลของอาหารวายเอ็มผสมนมพร่องไขมัน(YM+SK) ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เรนินของ *R.microsporus* S_1.....	30
5	ผลของอาหารซูโครส(SU) ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เรนินของ *R.microsporus* S_1.....	32
6	ผลของอาหารซูโครสผสมนมพร่องไขมัน(SU+SK) ต่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เรนินของ *R.microsporus* S_1.....	33
7	ผลของอาหารนมพร่องไขมัน(SK)ต่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เรนินของ *R.microsporus* S_1.....	34
8	ผลของอาหารน้ำสกัดข้าวโพดผสมแลคโตส(CORN+LAC)ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เรนินของ *R.microsporus* S_1.....	35
9	ผลของอาหารแป้งสาลี(WF)ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์เรนินของ *R.microsporus* S_1.....	36
10	แอคติวิตีของเรนิน และแอคติวิตีของโปรติเอสของ *R. microsporus* S_1 เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM YM+SK CORN+LAC และ WF	38
11	แอคติวิตีของเรนินของ *R. microsporus* S_1 เมื่อเลี้ยงในอาหารแป้งสาลี แป้งข้าวจ้าว และรำข้าวเข้มข้น 2 เปอร์เซนต์.....	39

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
12	อัตราส่วนของแอคติวิตีของเรนินต่อแอคติวิตีของโปรติเอสเมื่อเลี้ยง *R. microsporus* S_1 ในอาหารแป้งสาลี แป้งข้าวจ้าวและรำข้าว เข้มข้น 2 เปอร์เซนต์.....	40
13	ผลของการแปรผันความเข้มข้นของรำข้าว 1-5 เปอร์เซนต์ ต่อการผลิตเอนไซม์เรนินจาก *R.microsporus* S_1.....	41
14	ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์เรนินของ *R.microsporus* S_1	44
15	ผลของความเร็วรอบในการเขย่าเมื่อเลี้ยง *R. microsporus* S_1 ต่อการผลิตเอนไซม์เรนิน.....	46
16	ความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างเอนไซม์เรนิน และการเจริญของ *R. microsporus* S_1.....	47
17	โครมาโตกราฟีของเอนไซม์เรนินจาก *R. microsporus* S_1 ในคอลัมน์ ดีอีเออี - โทโยเพิร์ล 650 เอ็ม.....	50
18	โครมาโตกราฟีของเอนไซม์เรนินจาก *R.microsporus* S_1 ในคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-75.....	51
19	โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส ของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆ ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์.....	52
20	โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส ของเอนไซม์เรนิน และโปรตีนมาตรฐาน.....	54
21	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน และลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล.....	55
22	ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์เรนินจาก *R. microsporus* S_1.....	56
23	ผลของความเป็นกรดด่าง ต่อการทำงานของเอนไซม์เรนิน จาก *R.microsporus* S_1.....	57

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
24	ความเสถียรของเอนไซม์เรนินจาก *R. microsporus* S_t ต่อความร้อน.....	59
25	ความเสถียรของเอนไซม์เรนินจาก *R. microsporus* S_t ต่อความเป็นกรดด่าง.....	60
26	ผลของความเข้มข้นของนมพร่องไขมันที่ใช้เป็นสับสเตรท ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เรนินจาก *R.microsporus* S_t.....	61
27	ผลของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เรนินจาก *R. microsporus* S_t.....	63
28	ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจาก *R. microsporus* S_t.....	64
29	แสดงลักษณะก้อนนม ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับนมพร่องไขมัน ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์.....	67

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

มล. = มิลลิลิตร

มก. = มิลลิกรัม

ซม. = เซ็นติเมตร

ชม. = ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

เรนนินเป็นเอนไซม์ที่ทำให้โปรตีนเคซีนในน้ำนมตกตะกอนจับตัวกันเป็นลิ่ม โดยในน้ำนมวัวมีโปรตีนทั้งหมดร้อยละ 3.5 เป็นเคซีนมากถึงร้อยละ 80 ของโปรตีนทั้งหมด หรือประมาณร้อยละ 2.5-3.2 ของน้ำนม เคซีนมีลักษณะเป็นเม็ดสีขาว ไม่มีกลิ่น ไม่มีรส เป็นตัวที่ทำให้น้ำนมมีลักษณะเป็นสีขาว และมักพบอยู่กับแคลเซียม เรียกว่าแคลเซียมเคซิเนต (Calcium casienate) เคซีนอยู่ในน้ำนมในรูปของสารแขวนลอย (Jenness และ Patton, 1976) เคซีน แบ่งออกได้เป็น 4 ชนิด ดังนี้

แอลฟา-เคซีน มีประมาณร้อยละ 50 - 55 ของเคซีนทั้งหมด

บีตา-เคซีน มีประมาณร้อยละ 30 - 35 ของเคซีนทั้งหมด มีความไวต่อแคลเซียมอิออน ตกตะกอนด้วยแคลเซียมได้ง่าย

แกมมา-เคซีน เป็นส่วนของ บีตา-เคซีน ที่สลายตัวโดยเอนไซม์โปรติเอสที่มีอยู่ในน้ำนมปะปนมากับเคซีน โดยเคซีนชนิดนี้มีอยู่ประมาณร้อยละ 5 ของโปรตีนทั้งหมด

แคปปา-เคซีน มีอยู่ประมาณร้อยละ 15 ของเคซีนทั้งหมด เป็นเคซีนที่ไม่มีความไวต่ออิออนของแคลเซียม โมเลกุลของแคปปา-เคซีนประกอบด้วยกรดอะมิโน 169 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุล 10,005 ดาลตัน ในโมเลกุลประกอบด้วยซิสเตอีน 2 ตัว ซึ่งทำให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างสายโพลีเพปไทด์ได้เป็นโพลิเมอร์ ทำให้มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 60,000-600,000 ดาลตัน เรนนินจะใช้แคปปา-เคซีน เป็นสับสเตรทซึ่งมีความจำเพาะที่พันธะระหว่างฟีนิลอะลานีนตำแหน่ง 105 และ เมไธโอนีนที่ตำแหน่ง 106 (ปราณี, 2534)

สารตั้งต้น (precusor) ของเรนนินเรียกว่าโพรเรนนิน (prorennin) ในสภาวะที่เป็นกรด pH ประมาณ 2-5 โพรเรนนินจะถูกตัดออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งเป็นสายเพบไทด์เดี่ยว ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 5300 ดาลตัน และอีกส่วนเป็นเรนนินซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 31,000 ดาลตัน ซึ่งมีปลายสายอะมิโน (N-terminal) เป็นไกลซีน และปลายคาร์บอกซิล (C-terminal) เป็นกรดอะมิโนลิวซีน (leucine) หรือไอโซลิวซีน (isoleucine) โดยมีลำดับกรดอะมิโนดังนี้ (Foltmann, 1971a)

ลำดับกรดอะมิโนแสดงปลายหมู่อะมิโน :

N-gly-glu-val-ala-ser-val-pro-leu-thr-asn—┐
-tyr-ile-lys-gly-phe-tyr-gln-ser-asp-leu-tyr—┘

ลำดับกรดอะมิโนแสดงปลายหมู่คาร์บอกซิล :

-ile-leu-gly-asp-val-phe

ala-arg-asp-phe-val-ser-tyr-tyr-glu-arg-ile

asn-asn-leu-val-gly-leu-ala-lys-ala-ile-COOH

เมื่อโปรเรนินถูกแยกออกจากกันด้วย pH เป็นกรด โมเลกุลของเรนินยังมีพันธะ-ไดซัลไฟด์เชื่อมอยู่ทั้ง 3 ตำแหน่ง ลำดับของกรดอะมิโนในแต่ละตำแหน่งของพันธะไดซัลไฟด์ทั้ง 3 ตำแหน่งมีดังนี้ (Fryer, 1969)

ตำแหน่งที่ 1 : อยู่ในสายของกรดอะมิโน 270 ตัว

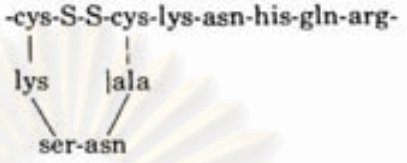
-asp-ile-asp-cys-asp-asn-leu-glu-gly-ser-
|
S
|
S
|
-tyr-thr-ser-gln-asp-gln-gly-phe-cys-thr-ser-gly-phe-

ตำแหน่งที่ 2 : อยู่ในวงแหวนของกรดอะมิโน 6 ตัว

-ala-cys-S-S-cys-gln-
| |
glu-gly-gly

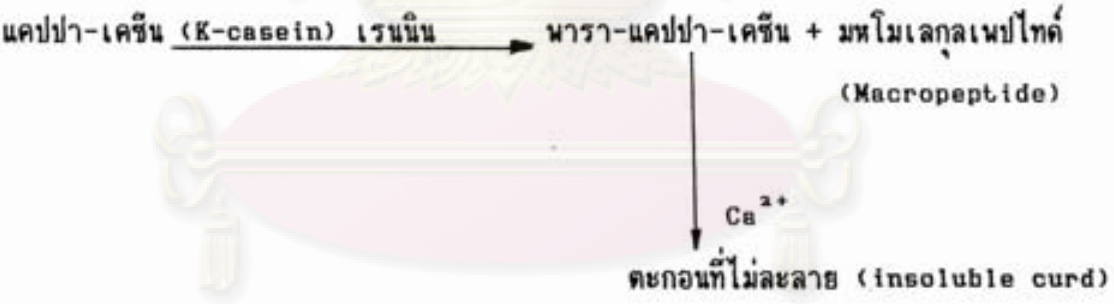
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตำแหน่งที่ 3 : อยู่ในวงแหวนของกรดอะมิโน 6 ตัว



เนื่องจากองค์ประกอบของกรดอะมิโนดังกล่าวมานั้น เป็นลักษณะเฉพาะของเรนินดังนั้นลำดับกรดอะมิโนทั้ง 2 ปลาย และพันธะไดซัลไฟด์ ทั้ง 3 ตำแหน่ง ของเรนินจึงเป็นองค์ประกอบหลักของเรนินจากทุกแหล่ง (Foltmann, 1971b)

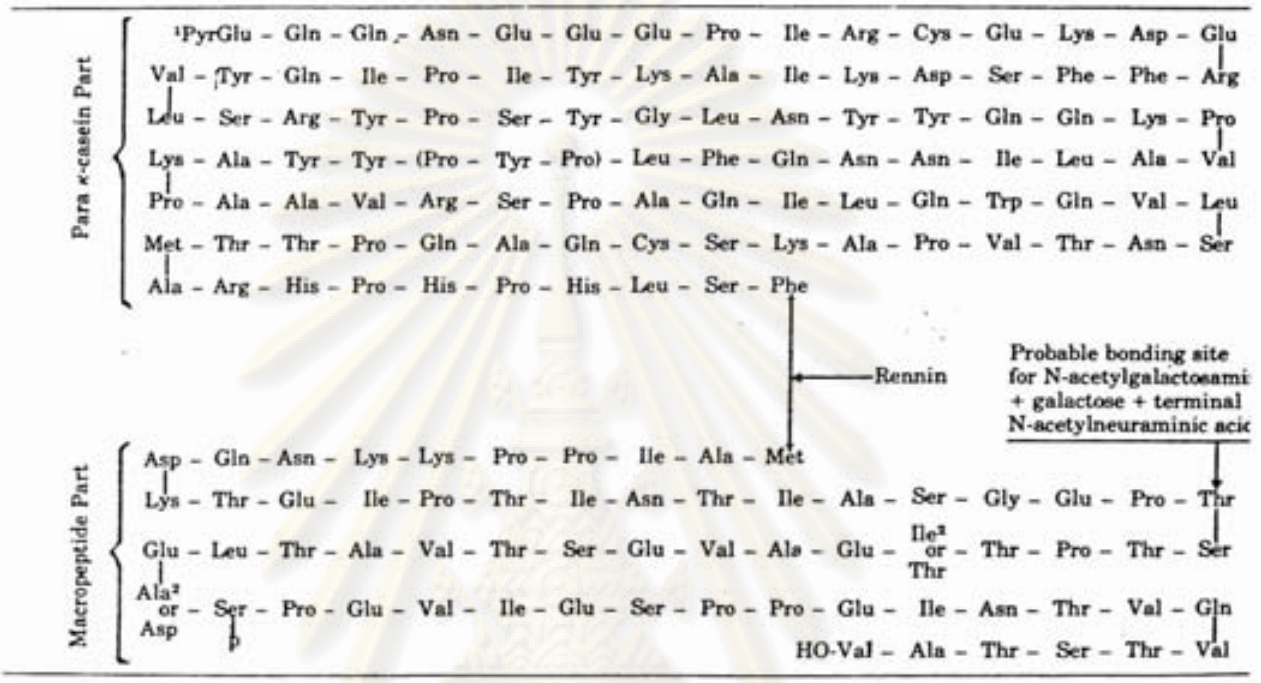
ในน้ำนมแคปปา-เคซีน ทำหน้าที่สำคัญ คือเป็นสารที่ทำให้เกิดการกระจายตัว(emulsifying agent)จึงทำให้เคซีนสามารถรักษาสภาพการกระจายตัวในน้ำนมได้ ถ้าแคปปา-เคซีนถูกทำลายโดยเรนิน น้ำนมจะเสียสภาพการกระจายตัวไป Mackinlay และ Wake (1971) ได้อธิบายขั้นตอนดังนี้



อาจสรุปได้เป็น 2 ขั้นตอน ของการตกตะกอนเคซีน จากแผนผังนี้ คือ

ขั้นตอนที่1 ระยะต้นที่มีปฏิกิริยาของเอนไซม์เรนิน(Primary enzymatic phase) (Jolles และคณะ, 1968)

เรนินจะทำปฏิกิริยากับแคปปา-เคซีน ทำให้เคซีนเสียสมดุลโดยพันธะเพปไทด์ที่ไวต่อเรนิน คือพันธะระหว่างฟีนิลอะลานีน ตำแหน่ง 105 กับเมทไทโอนีน ตำแหน่ง 106 ทำให้แคปปา-เคซีนแยกเป็น 2 ส่วน คือ พารา-แคปปา-เคซีน และมหโมเลกุลเพปไทด์ ดังรูป



[1]Pyrrolidonecarboxylic acid.
[2]Genetic variant κA-casein contains Thr and Asp in residues 136 and 148, κB-casein contains Ile and Ala.
Sources: Jolles *et. al*,[336a] Jolles *et. al*,[337a] Jolles *et. al*,[337b] and Mercier *et. al*.[362a]

รูปที่ 1 ตำแหน่งที่เรนนินทำปฏิกิริยากับแคปปา-เคซีน

Wheelock และ Sinkinson, 1969) ได้อธิบายว่า ส่วนของมหโมเลกุลเฟปไทด์นี้ ได้แก่ ส่วนของไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (non-protein-nitrogen, NPN) เช่น glyco-macropeptideซึ่งมีสมบัติในการละลายได้ดีในกรดไตรคลอโรอะซิติกซึ่งglycomacropeptide ประกอบด้วย N-acetylgalactosamine, กาแลคโตส และ N-acetylneuraminic acid

ขั้นตอนที่ 2 ระยะที่เอนไซม์ไม่ได้เข้าร่วมปฏิกิริยา (secondary non-enzymatic phase) เกิดการตกตะกอนของพารา-แคปปา-เคซีน ซึ่งเป็นผลจากอิออนของแคลเซียม จับกับ พารา-แคปปา-เคซีน โดยสร้างสะพานแคลเซียม ทำให้โมเลกุลของพารา-แคปปา-เคซีน จับกัน ในลักษณะร่างแห หรือตาข่าย (cross-link net work) ในที่สุดจะตกตะกอนแยกจากน้ำนม

ในรูปลิ่มนม นอกจากนี้โมเลกุลร่างแหตาข่ายนี้จะจับกับโมเลกุลของไขมันและแคลโตสที่อยู่ในน้ำนมให้อยู่ในลิ่มนมนี้ด้วย (ปราณี, 2534)

เรนนินเป็นเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน ซึ่งจัดอยู่ในประเภท endopeptidases (E.C.3.4.23.4) ในปี ค.ศ.1970 Foltmann มีการเสนอให้ใช้ชื่อสามัญ เรียกเรนนินว่า ไคโมซิน (chymosin) แทนคำว่าเรนนินเพื่อหลีกเลี่ยงความสับสนกับการออกเสียงคำว่า เรนิน (renin)จากไต แต่ในทางการค้านิยมใช้คำว่า เรนเนต (rennet) ดังนั้นคำว่าเรนนิน เรนเนต และไคโมซิน จึงหมายถึงเอนไซม์ตัวเดียวกัน

แหล่งดั้งเดิมของเรนนินพบในกระเพาะอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องที่มีอายุน้อยเช่น ลูกวัว ลูกแพะ และลูกแกะ หรือในช่วงที่มีการให้ดูดนมจากแม่ (period of lactation)จะมีเรนนินมาก แต่เมื่อสัตว์โตขึ้นแล้วกระเพาะที่ 4 ของสัตว์เหล่านี้จะสร้างเพปซิน(pepsin) ขึ้นทดแทนเรนนิน (leitch, 1937)

การผลิตเรนนินจากกระเพาะวัวในระดับอุตสาหกรรมนั้นได้มีการทำมานานแล้ว ทั้งในสภาพเอนไซม์ชนิดเหลวและแข็ง มีหลักการผลิตโดยทั่วไป คือ นำเยื่อบุผนังด้านในของกระเพาะวัวมาล้างน้ำให้สะอาด แล้วนำมาตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 วัน เพื่อลดเมือกที่ติดผิวกระเพาะวัว จากนั้นทำให้เป็นชิ้นเล็ก ๆแช่ในสารละลายกรดบอริกร้อยละ 4 หรือสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 3-6 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 4-5 วัน เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งจะย่อยสลายโปรตีนเรนนิน แยกส่วนของเอนไซม์ที่ไม่ใช่เรนนิน โดยเติมกรดไฮโดรคลอริกตกตะกอนโปรตีน แล้วกรองแยกออกไปจากนั้นปรับ pH ของสารละลายเรนนิน เป็น 5.3-6.3 (ปราณี, 2534)

เนื่องจากเรนนินจากเยื่อบุกระเพาะวัวมีราคาสูง และไม่เพียงพอ เมื่ออุตสาหกรรมการทำเนยแข็งและการบริโภคเนยแข็งเป็นที่นิยมและแพร่หลายมากขึ้น ผู้ผลิตเอนไซม์จึงพยายามหาแหล่งเรนนินอื่นมาทดแทนทั้งจากสัตว์ชนิดอื่น เช่น porcine pepsin จากเยื่อบุกระเพาะหมู (Foltmann และคณะ , 1981) bovine pepsin จากเยื่อบุกระเพาะวัวที่โตเต็มที่แล้ว (Olson, 1971) pepsin A จากเยื่อบุกระเพาะของแมวน้ำ(Shamsuzzaman และHaard, 1985) และ Zymogen จากเยื่อบุกระเพาะแมว (Jensen และคณะ, 1982)

ส่วนพืชที่ศึกษาพบเอนไซม์ เช่น *Carica papaya* สกัดเอนไซม์ได้จากยาง เรียกเอนไซม์นี้ว่า Papain (Arnon, 1970),*Ficus carica* สกัดเอนไซม์ได้จากยาง เรียกเอนไซม์นี้ว่า Ficin (Liener และ Friedenson, 1970), เอนไซม์ Bromelain จาก

สัปปะรด (Murachi, 1970), *Cynara cardunculus* (Campos และคณะ, 1990), *Albizia julibrissin* พบเอนไซม์ในส่วนของใบ,เปลือกของต้น และเมล็ด (Otani และคณะ, 1991) และ *Onopordum turcicum* พบเอนไซม์ในส่วนของใบ,ดอก และเมล็ด (Tamer, 1993)

นอกจากนี้ยังศึกษาพบเรนินในจุลินทรีย์โดยในแบคทีเรีย กลุ่มที่มีการศึกษาพบเรนินมากที่สุด คือ *Bacillus sp.* เช่น *B. polymyxa*, *B. Coagulans* และ *B. subtilis* ส่วนในราได้มีการศึกษาหาเรนินกันอย่างกว้างขวาง และในปัจจุบันพบว่า มีรา 3 ชนิดที่มีสมบัติคล้ายคลึงเรนินจากสัตว์ และนำมาใช้ผลิตเนยแข็งในระดับอุตสาหกรรมได้ คือ *Endothia parasitica* , *Mucor pusilles* var. Lindt. และ *M. miehei* (Tewari และ Singh, 1988)

เอนไซม์ที่นิยมและเหมาะสมสำหรับอุตสาหกรรมเนยแข็ง ควรมีสมบัติที่สามารถทำให้นมตกตะกอนจับตัวกันเป็นลิ่มได้ไว คือมีแอคติวิตีของเรนินสูง และมีการย่อยสลายโปรตีนโดยแอคติวิตีของโปรติเอสต่ำ รวมทั้งมีอัตราส่วนระหว่างแอคติวิตีของเรนินต่อแอคติวิตีของโปรติเอสสูงด้วย (Ernstrom, 1988)

ได้มีผู้ศึกษาเกี่ยวกับ ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์เรนินจากราชนิดต่าง ๆ โดย Wang และคณะ (1968) ศึกษา *Rhizopus oligosporus* NRRL 3271 พบว่าอาหารที่มีผลให้แอคติวิตีของเรนินสูงคือ รำข้าว 2 % แป้งสาลี 1 % และนมพร่องไขมัน 5 % โดยได้แอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากัน 0.38 ,0.33 และ 1.0 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และมีอัตราส่วนของแอคติวิตีของเรนิน ต่อแอคติวิตีของโปรติเอสเท่ากับ 4.1 , 7.2 และ 4.8 ตามลำดับ ส่วนเมื่อเลี้ยงราในกากถั่วเหลือง (soybean meal) 2 % พบว่าได้แอคติวิตีต่ำลง ในขณะที่เมื่อเลี้ยงในหางนมราจะเจริญเติบโตเป็นเส้นใยได้ดี แต่ไม่มีแอคติวิตีของเรนิน และพบว่า น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) 2 % ไม่เหมาะสมทำให้ราไม่สร้างเรนิน นอกจากนี้ยังพบว่าการเลี้ยงในอาหารเหลวราจะผลิตเรนินได้ดีกว่าการเลี้ยงในอาหารแข็ง

Osman และคณะ (1969) ศึกษาผลของอาหารต่อการผลิตเอนไซม์เรนินของ *Aspergillus niger* พบว่าอาหารที่มีน้ำแช่ข้าวโพด 2 % ผสมกับแลคโตส 1 % และหางนม เอนไซม์ที่ผลิตได้สามารถทำให้นมตกตะกอนเป็นลิ่มนมได้ภายใน 10 นาที ในขณะที่เมื่อเลี้ยงราในอาหาร หางนม ผสมแลคโตส 2 % หรือ กากน้ำตาล 12 % แอคติวิตีของเรนินต่ำลง

Kawai และMukai (1970) ศึกษา *Irpex lacteus* พบว่า ราจะผลิตเอนไซม์เรนินได้สูงในอาหารซุโครสผสมโพลีเปปโตน รองลงมาคือ อาหารซุโครสผสมน้ำแช่ข้าวโพด

Abdel-Fattah และคณะ (1972) ศึกษา ผลของอาหารต่อการผลิตเอนไซม์เรนินของ *Penicillium citrinum* พบว่าน้ำแช่ข้าวโพด 2 % เป็นอาหารที่ให้แอคติวิตีของเรนินสูงที่สุด ในขณะที่การเติมกลูโคส 2 % หรือแลคโตส 2 %และ KH_2PO_4 0.1 %หรือ inositol 0.1 % ทำให้แอคติวิตีของเรนินต่ำลง นอกจากนี้เมื่อเลี้ยงราในอาหารนมพร่องไขมัน 10 % พบว่าไม่สร้างเอนไซม์เรนินและเมื่อเติมกลูโคส 1 %แคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.005 โมลาร์ลงไปด้วย พบว่ามีแอคติวิตีของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย และจากการศึกษาพบว่าการผลิตเอนไซม์เรนินมีความสัมพันธ์กับการสร้างสปอร์และในปี 1974 Abdel-FattahและHawwaryได้ทดลองเลี้ยง *Penicillium expensum* ในอาหารน้ำแช่ข้าวโพด 2 % ผสมแลคโตส 2 % พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนไปในระหว่างการเลี้ยงไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์

Ismail และคณะ (1984) พบว่าการเลี้ยงราบนผิวหน้าของอาหาร (surface culture) จะผลิตเอนไซม์เรนินได้ดีกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลวแบบเขย่า (shaken culture) และแอคติวิตีของเอนไซม์จะแตกต่างกันไปแล้วแต่อายุและชนิดของรา

Abdel-Fattah และ Ismail (1984) พบว่าน้ำแช่ข้าวโพดเสริมการผลิตเอนไซม์เรนินของ *Absidia cylinddrospore* มากกว่าโปรติเอสเอนไซม์ และให้อัตราส่วนของแอคติวิตีของเรนิน ต่อแอคติวิตีของโปรติเอส เท่ากับ 39.3 เมื่อใช้น้ำแช่ข้าวโพดเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร และอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 21 ต่อ 1 และพบว่าการเติม KH_2PO_4 1 กรัมต่อลิตร ให้ผลดีต่อการผลิตเรนิน แต่ถ้าความเข้มข้นของ KH_2PO_4 มากหรือน้อยกว่านี้ จะทำให้แอคติวิตีลดลงในขณะที่การเติม $MgSO_4$ ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเรนิน

Kolaczkowska และคณะ (1988) ศึกษา *Fusarium moniliforme* พบว่าแอคติวิตีของเรนินจะต่ำลง เมื่อใช้อาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นสารอนินทรีย์ (inorganic nitrogen source) รวมทั้งการขาดแคลน KH_2PO_4,$MgSO_4$ และ $CaCl_2$ ก็ทำให้แอคติวิตีของเรนินต่ำลง และจากการทดลองพบว่าแป้งและเคซีนกระตุ้นการผลิตเอนไซม์เรนินได้ดีที่สุด เมื่อใช้อัตราส่วนของแป้งต่อเคซีนเท่ากับ 5 ต่อ 1

Thakur และคณะ (1990) เลี้ยง *Mucor Miehei* บนอาหารแข็ง (solid state) โดยใช้รำข้าวและแป้งสาลีในอัตราส่วน 90:10 และผสมนมผงพร่องไขมันเข้มข้น 1 % เป็นตัวเหนี่ยวนำให้จุลินทรีย์สร้างเอนไซม์ ได้อัตราส่วนของแอคติวิตีของเรนินต่อแอคติวิตีของโปรติเอสเท่ากับ 6.6

Jiao และคณะ (1992) เลี้ยง *Mucor pusillus* ในอาหารสภาพกึ่งเหลวกึ่งแข็ง (semisolid culture) โดยใช้อาหารรำข้าว 50 - 56 % พบว่าการเติมกลูโคส, แอมโมเนียซัลเฟต หรือ หางนมผง(whey powder) ไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เรนนิน

ส่วนงานวิจัยเกี่ยวกับการทำให้เอนไซม์เรนนินบริสุทธิ์ Wang และคณะ (1968) ได้ศึกษา *Rhizopus oligosporus* NRRL 3271 โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 30-70 % แล้วนำไปทำโครมาโตกราฟี บนดีอีเอดี-เซลลูโลส (DEAE-Cellulose)โดยใช้-โซเดียมคลอไรด์เกรเดียนท์ เข้มข้น 0.1-1 โมลาร์ พบว่า ได้ส่วนที่มีแอคติวิตีของเรนนินออกมา 4 ส่วน และจากการศึกษาสมบัติของเอนไซม์พบว่าเรนนินจะเสถียรในช่วงความเป็นกรดด่าง 3.0-6.0 ทนความร้อนได้ถึงอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และถ้า pH ของสับสเตรทลดลง หรือเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์จะทำให้ใช้เวลาน้อยลงในการทำให้นมตกตะกอนกลายเป็นลิ่มนมโดยแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.05 โมลาร์เหมาะสมที่สุด Osman และคณะ (1969) ศึกษาการสกัดเอนไซม์และการทำให้บริสุทธิ์จากรา *Aspergillus niger* โดยการตกตะกอนพบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตไม่เหมาะสม แต่ถ้าใช้เอธานอล หรืออะซิโดนเข้มข้น 50 % หรือแทนนิน (tannin) 0.9 % ตะกอนโปรตีนที่ได้จะมีแอคติวิตีของเรนนินสูง และจากการศึกษาพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์คือ 50 องศาเซลเซียส ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ ขึ้นอยู่กับ pH โดยพบว่าเอนไซม์ที่อยู่ในสภาวะ pH 3.4 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เอนไซม์ก็ยังคงมีแอคติวิตีสัมพัทธ์ (relative activity) 100 % แต่ที่ pH 5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเพียง 1 ชั่วโมง ปรากฏว่าแอคติวิตีสัมพัทธ์เท่ากับ 0 % นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดของบัฟเฟอร์มีผลต่อแอคติวิตีของเรนนิน โดยเมื่อใช้อะซิเตทบัฟเฟอร์ละลายตะกอน แอคติวิตีของเรนนินเพิ่มขึ้นในขณะที่เมื่อใช้ซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พบว่าแอคติวิตีของเรนนินลดลง

Whitaker (1970) ได้สกัดเอนไซม์เรนนินเพื่อทำให้บริสุทธิ์จาก *Endothia parasitica* โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 60 % แล้วนำไปผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100 (Sephadex G-100) นำมาตกตะกอนอีกครั้งด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 90 % จากนั้นนำมาทำโครมาโตกราฟีบนดีอีเออี-เซลลูโลสโดยใช้โซเดียมคลอไรด์เกรเดียนท์ เข้มข้น 0-0.6 โมลาร์ พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4.23 เท่า และจากการศึกษาสมบัติของเอนไซม์พบว่าเรนนินเสถียรในช่วง pH 3.8-4.5 และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 37,500 ดาลตัน จากการผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100 และเท่ากับ 34,000 ดาลตัน จากการผ่านคอลัมน์ไบโอเจล พี-100 (Biogel P-100) ตามลำดับ

Arima และคณะ(1970)ศึกษาเอนไซม์เรนินบริสุทธิ์จาก *Mucor pusillus* var. Lindt.โดยการทำโครมาโตกราฟีบนแอมเบอร์ไรต์ ซีจี - 50 (Amberlite CG-50) แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 (DEAE-Sephadex A-50) โดยใช้โปตัสเซียม-คลอไรด์เกรเดียนท์ ความเข้มข้น 0-0.5 โมลาร์ จากนั้นตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 %นำไปผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100(Sephadex G-100) และตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 70 % อีกครั้งหนึ่งสุดท้ายได้แอคติวิตีของเรนินเท่ากับ 511 หน่วยต่อมิลลิกรัม และจากการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ พบว่า pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ 5.5 และเอนไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 29,000 ดาลตัน

Kobayashi และคณะ (1983) ได้สกัดเรนินจากรา *Irpex lacteus* และทำให้บริสุทธิ์ โดยผ่านดีอีเออี-เซลลูโลสคอลัมน์ (DEAE-Celluloses) ชะด้วยโซเดียมคลอไรด์เกรเดียนท์เข้มข้น 0.02 โมลาร์ แล้วนำไปผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-100 ได้แอคติวิตีของเรนินเท่ากับ 10.47 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน พบว่าเอนไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุล 36,000 ดาลตัน สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ pH ประมาณ 3.0 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรอยู่ในช่วง pH 3.0-6.0 อุณหภูมิไม่เกิน 45 องศาเซลเซียส

Mashaly และคณะ (1987) ศึกษาการทำให้เอนไซม์เรนินบริสุทธิ์จาก *Mucor pusillus* M 15 โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 80 % ผ่านคอลัมน์อัลตราเจลเอซี-เอ-44(Ultragel-A-44) ได้แอคติวิตีของเรนินเท่ากับ 270.92 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ ดีอีเอดี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 โดยใช้โซเดียมคลอไรด์เกรเดียนท์เข้มข้น 0-1 โมลาร์ พบว่าแอคติวิตีของเรนินลดลงเหลือ 175 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เอนไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 29,000 ดาลตัน สภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ pH 5.55 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรอยู่ในช่วง pH 3-6 อุณหภูมิไม่เกิน 45 องศาเซลเซียส

Smith และ Yada (1991) ศึกษาเอนไซม์เรนินจาก *Mucor miehei* โดยผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-25 และโรโตฟอร์ พีเพเรทีฟ ไออีเอฟ (Rotofor preparative IEF) พบว่าได้เรนินออกมา 2 ส่วน มีความบริสุทธิ์ 34 และ 42 เท่า มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 48,000 และ 42,000 ดาลตัน สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ pH 4.0 และ 5.5 อุณหภูมิ 50 และ 45 องศาเซลเซียส มีความเสถียรอยู่ในช่วง pH 2.0-7.5

และจากรายงานที่ผ่านมา กลุ่มราที่ผลิตเรนินนั้น ส่วนใหญ่เป็นพวกไม่มีผนังกั้นหรือกลุ่ม Phycomyces และลูกแป้งก็เป็นแหล่งอาหารที่รับประทานได้ ถือเป็นแหล่งราและยีสต์หลายชนิดที่ใช้ผลิตเอนไซม์อมิเลส และกลูโคอมิเลสในการทำข้าวหมากและกระแช่ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายที่จะคัดเลือก (screening) ราจากกลุ่มที่ไม่มีผนังกั้น (non septate) ที่สามารถผลิตเรนินได้จากลูกแป้ง นำมาศึกษาองค์ประกอบของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างเรนินของราที่คัดเทียบได้ รวมทั้งทำให้เอนไซม์เรนินบริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟี และหาสมบัติบางประการพร้อมทั้งน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาระดับขยายส่วนการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Rotary Shaker) ของบริษัท New Brunswick Scientific, U.S.A.

2. เครื่องเหวี่ยงปรับความเย็น (Refrigerated Centrifuge) รุ่น J 2-21 ของบริษัท Beckman ,U.S.A.

3. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH Meter) รุ่น 240 ของบริษัท P.Intertrade, Thailand.

4. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch and Lomb, U.S.A.

5. เครื่องวัดค่าดูดกลืนลำแสงคู่ (Double Beam Spectrophotometer) รุ่น UV-160A ของบริษัท Shimadzu Corporation,Japan.

6. เครื่องระเหิดแห้ง (Lyophilizer) รุ่น FD-1 ของบริษัท Tokyo Rikakikai, Japan.

7. เครื่องเก็บลำดับส่วน (Fraction Collector) รุ่น Frac-100 ของบริษัท Pharmacia Fine Chemicals, Sweden.

8. เครื่องทำอิเลคโตรโฟริซิส (Electrophoresis) ของบริษัท Hoefler Scientific Instrument, San Francisco, U.S.A.

เคมีภัณฑ์

1. เคมีภัณฑ์สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

น้ำแช่ข้าวโพด (Corn Steep liquor) ของ Sigma Chemical, U.S.A.

เด็กโทรส (Dextrose) ของ Difco Laboratories, U.S.A.

เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$) ของ Ajax Chemicals, Australia.

กลูโคส (Glucose) ของ E. Merck Darmstadt, Germany.

โปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl) ของ E. Merck Darmstadt, Germany.

โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของ E. Merck Darmstadt Germany

แลคโตส (Lactose) ของ Difco Laboratories, U.S.A.

ผงสกัดมอลท์ (Malt Extract) ของ Difco Laboratories, U.S.A.

ผงสกัดยีสต์ (Yeast extract) ของ Difco Laboratories, U.S.A.

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4\ 7H_2O$) ของ E. Merck Darmstadt, Germany.

โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) ของ Fluka AG.Buchs, Switzerland.

แบคโตเปปโตน (Bacto-Peptone) ของ Difco Laboratories, U.S.A.

ซูโครส (Sucrose) ของ E. Merck Darmstadt, Germany.

2. เคมีภัณฑ์สำหรับวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีน

นมผงพร่องไขมัน (Skim Milk) ของ Difco Laboratories, U.S.A.

แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ของ Fluka AG Buchs, Switzerland.

เคซีน (Casein,Hammersten Grade) ของ Sigma Chemical,U.S.A.

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของ E. Merck, Germany.

กรดฟอสฟอริค (Phosphoric acid) ของ E. Merck, Germany.

กรดไตรคลอโรอะซิติค (Trichloroacetic acid) ของ E. Merck, Germany.

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ของ E. Merck, Germany.

ฟินอลรีเอเจนต์ (Folin-Ciocalteu'sphenol reagent) ของ E. Merck, Darmstadt, Germany.

อัลบูมิน (Fraction V, 96-99 % Albumin,Bovine) ของ Sigma Chemical, U.S.A.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอนไซม์เรนนิน (Rennin from *Mucor pusillus*) ของ Sigma Chemical, U.S.A.

เอนไซม์เรนเนต (Rennet from Calf Stomach) ของ Sigma Chemical, U.S.A.

เอนไซม์เปปซิน (Pepsin from Porcine Stomach Mucosa) ของ Sigma Chemical, U.S.A.

เอนไซม์ปาเปน (Papain from *Carica papaya*)ของ Fluka AG. Buchs, Switzerland.

3. เคมีภัณฑ์สำหรับการทำโครมาโตกราฟี และอิเลคโตรโฟริซิส

ดีอีเออี-โตโยเพิร์ล 650 เอ็ม (DEAE-Toyopearl 650 M) ของบริษัท TOSOH,JAPAN.

เซฟาเด็กซ์ จี-75 (Sephadex G-75) ของบริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ ของ E. Merck, Germany.

อะคริลาไมด์ (Acrylamide) ของบริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

บิส (N,N-Methylene Bis Acrylamide) ของบริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

ทริส (Tris(Hydroxymethyl)Aminomethane) ของบริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl Ethylenediamine) ของบริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammonium Persulfate) ของบริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

ไรโบฟลาวิน (Riboflavin) ของบริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

ไกลซีน (Glycine) ของ Sigma Chemical, U.S.A.

กรดอะซิติค (Acetic Acid) ของ E.Merck, Germany.

เมธานอล (Methanol) ของ E. Merck, Germany.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium Dodesyl Sulfate) ของ BDH Chemicals, England

สีโคแมสซีบลู จี-250 (Coomassie Brilliant Blue G-250) ของ Fluka AG. Buchs, Switzerland.

วิธีการทดลอง

1. แยกราจากลูกแป้ง

ใช้ลูกแป้งเหล้า 4 ชนิด, ลูกแป้งกระแช่ 8 ชนิดและลูกแป้งข้าวหมาก 8ชนิด บดให้ละเอียด ชั่ง 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 มิลลิลิตร แล้วนำ 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหารวุ้นวายเอ็ม(ภาคผนวก ก. หมายเลข 1.1)บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง แยกราที่ขึ้นเป็นโคโลนีเดี่ยวแต่ละชนิด แล้วเก็บในอาหารวุ้นเอียงวายเอ็ม

2. การคัดเทียบ(screening)ราที่สามารถผลิตเอนไซม์เรนนิน

เลี้ยงราแต่ละชนิดที่ได้จากข้อ 1ในอาหารเหลววายเอ็มผสมนมพร่องไขมัน (ภาคผนวก ก. หมายเลข 2) โดยใช้แท่งเจาะวุ้น (Cock Borrer) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซ็นติเมตร เจาะอาหารวุ้นวายเอ็มที่มีราเจริญอยู่จำนวน 5 ชิ้น ใส่ลงในอาหารเหลววายเอ็มผสมนมพร่องไขมันปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบ Reciprocal Shakerด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน กรองเซล นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่กรองได้วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนิน ตั้งแต่วันที่ 3 จนถึงวันที่ 5

3. การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนิน

ตามวิธีการของBerridge(1952) นำสารละลายนมพร่องไขมัน 12 เปอร์เซนต์ ในแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.01โมลาร์ (ภาคผนวก หมายเลข 1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลายเอนไซม์ 2.5 มิลลิลิตร จับเวลาการเริ่มแข็งตัว (Clotting Time) โดยถือว่า เวลาที่เห็นนมเริ่มจับตัวกันเป็นฝ้าข้างหลอดทดลองคือค่าเวลาแข็งตัวของนม(Milk Clotting Time)

กำหนดให้ 1 หน่วยของเรนนินคือปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้สารละลายนมพร่องไขมันปริมาตร 10 มิลลิลิตรแข็งตัวภายใน 10 นาที ภายใต้สภาวะที่ตรวจสอบแอคติวิตีดังกล่าวข้างต้น

4. การตรวจสอบแอคติวิตีของโปรติเอสเอนไซม์

เป็นการวัดปริมาณกรดอะมิโนที่เกิดจากการย่อยสลายเคซีน ซึ่งเป็นตัวแทนของโปรตีน ตามวิธีของ Kesy และ Wildi (1970) โดยนำสารละลายเคซีน (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมสาร-ละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ปล่อยให้ปฏิกิริยาดำเนินไป 10 นาทีแล้วหยุดปฏิกิริยา โดยเติมกรดไตรคลอโรอะซิติค เข้มข้น 0.4 โมลาร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) 2 มิลลิลิตร บ่มต่ออีก 20 นาที แล้วกรอง นำส่วนใสที่ได้ 1 มิลลิลิตรมาเติมโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.4 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร และฟินอลรีเอเจนต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 2) 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร คำนวณค่าความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตราฐานโดยใช้ไทโรซีน (Tyrosine) ความเข้มข้น 0-60 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์โปรติเอส คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยเคซีนแล้วได้กรดอะมิโนไทโรซีน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่ตรวจสอบแอคติวิตีดังกล่าวข้างต้น

5. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ตามวิธีการของ Lowryและคณะ (1951) นำสารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตรมาเติมสารละลาย ลอรี ซี (ภาคผนวก ข) 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15-20 นาที เติมสารละลายฟินอลรีเอเจนต์ (ภาคผนวก ข) 0.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ-ห้อง 30 นาที แล้วนำส่วนผสมนี้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

เทียบค่าปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine Serum Albumin) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

6. การจำแนกเชื้อ

หลังจากคัดเทียบรา และพบว่า *Rhizopus* sp. สามารถผลิตเอนไซม์เรนินได้สูงสุด จากจำนวน 51 สายพันธุ์ นำมาศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และส่งไปจำแนกสายพันธุ์ที่สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ พบว่าราที่คัดเลือกได้นี้คือ *Rhizopus microsporus* S_1

7. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงรา เพื่อให้ผลิตเอนไซม์เรนิน

7.1 ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

เตรียมสปอร์แขวนลอยในน้ำ (Spore Suspension) อายุ 2 วัน โดยใส่น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 มิลลิลิตร ในจานเลี้ยง *R. microsporus* S_1 ที่คัดเทียบแล้วว่าสามารถผลิตเอนไซม์เรนินได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นจากข้อ 6 ใช้แท่งแก้วงอ ค่อยๆเขี่ยสปอร์ให้หลุดออกมาอยู่ในน้ำ นับสปอร์เริ่มต้นให้ได้ประมาณ 10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แล้วใส่ 1 มิลลิลิตร ลงใน 50 มิลลิลิตรของอาหารเหลว 6 ชนิด (ภาคผนวก ก หมายเลข 2-7) ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน กรองเชล นำสารละลายที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีน และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ ตามวิธีการทดลองในข้อ 3-5

7.2 ชนิดของแหล่งคาร์บอนรวมทั้งผลของแหล่งไนโตรเจนและเกลือแร่

ใส่สปอร์แขวนลอยในน้ำของ *R. microsporus* S_1 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวตามสูตรของ Wang และคณะ(1969) แปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนได้แก่ แป้งสาลี แป้งข้าวจ้าวและรำข้าว พร้อมทั้งเติมแบคโตเปปโตน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวแทนของแหล่งไนโตรเจน (ภาคผนวก ก หมายเลข 13-15) หรือ ใช้สารละลายชาเพคดอกซ์ เป็นตัวแทนของแหล่งเกลือแร่ (ภาคผนวก ก หมายเลข 10-12) เทียบกับเมื่อไม่เติม เลี้ยงราในสภาวะเดียวกันกับข้อ 7.1 แล้วหาปริมาณโปรตีน และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

จากการทดลองพบว่า รำข้าว เป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดจึงแปรความเข้มข้นของรำข้าวตั้งแต่ 1 - 5 เปอร์เซ็นต์ และเลี้ยงราในสภาวะเดียวกันเพื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์

7.3 ผลของ pH ต่อการผลิตเอนไซม์เรนนิน

เตรียมอาหารเหลวสูตรเดียวกับข้อ 6.2 และปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเป็น 6.5, 6.7, 7, 7.3 และ 7.5 เลี้ยงราให้สภาวะเดียวกันกับข้อ6.1 หาปริมาณโปรตีนและวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนิน

7.4 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์เรนนิน

ใส่สปอร์แขวนลอยในน้ำของ *R. microsporus* S_1 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสูตรเดียวกับข้อ 6.3 ที่มี pH ตั้งต้นเป็น 7.3 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ 25,28,30 35 และ 40 องศาเซลเซียส หาปริมาณโปรตีนและวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

7.5 ความเร็วรอบของเครื่องเขย่าต่อการผลิตเอนไซม์เรนนิน

เลี้ยง *R. microsporus* S_1 ในอาหารเหลวสูตรเดียวกับข้อ6.3 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่ปรับความเร็วรอบของเครื่องเขย่าต่างกัน คือ 100,150,200 และ 250 รอบต่อนาที เพื่อศึกษาผลของการให้อากาศต่อการผลิตเอนไซม์เรนนิน วัดปริมาณโปรตีนและแอคติวิตีของเอนไซม์

8. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างเอนไซม์และการเจริญของ *Rhizopus microsporus* S_1

ใส่สปอร์แขวนลอยในน้ำของ *R. microsporus* S_1 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวที่มีการปรับแล้วว่าให้แอคติวิตีสูงสุด บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วัดการเจริญของราในแต่ละวัน โดยการหาน้ำหนักแห้ง, ปริมาณโปรตีน, แอคติวิตีของเอนไซม์เรนนิน และเอนไซม์โปรติเอส รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของ pH ในระหว่างการเลี้ยง

9. การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 30-75 %

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตรทั้งหมด 2000 มล.เลี้ยงราในสภาวะที่เหมาะสมตามข้อ 8 เป็นเวลา 4 วัน แยกเซลและกากอาหารที่เหลือออกจากส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยการกรอง นำส่วนน้ำใสทั้งหมดมาวัดปริมาตรแล้วคำนวนหาปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 30 เปอร์เซนต์ของปริมาตรทั้งหมด (Wang และคณะ, 1968) โปรยผงแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียดลงในสารละลายเอนไซม์อย่างช้า ๆ พร้อมทั้งคนเบา ๆ ด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic Stirrer)ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นกวนต่อไปอีกประมาณ 1-2 ชั่วโมง นำไปปั่นตกตะกอนโปรตีนที่ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้มาตกตะกอนโปรตีนต่อ โดยโปรยผงแอมโนเนียมซัลเฟตลงไปจนมีความเข้มข้นเป็น 75 เปอร์เซนต์ของปริมาตรทั้งหมดของสารละลายเอนไซม์ และกวนตลอดเวลา เช่นเดียวกับตอนต้น หลังจากนำไปปั่นตกตะกอนโปรตีนที่ 10,000 รอบต่อนาทีแล้วละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วย 0.05โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ในปริมาตรที่น้อยที่สุดที่ตะกอนละลายได้หมด ไดอาไลส์ข้ามคืนในบัฟเฟอร์ดังกล่าว ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนออก วัดปริมาตร หาปริมาณโปรตีน และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

10. การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ DEAE-Toyopearl 650 M

เทเจล DEAE-Toyopearl 650 M ลงในบีกเกอร์ประมาณ 200 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้แยกส่วน เทส่วนน้ำใสทิ้งและเติม 1โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ 500 มิลลิลิตรลงไปโดยกวนเป็นครั้งคราวเป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดอิออนบางชนิดที่ปนเปื้อนอยู่ในเจล เทส่วนน้ำใสพร้อมเจลละเอียดบนผิวหน้าทิ้งล้างด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 2-3 ครั้งจนไม่มีโซเดียมคลอไรด์เหลืออยู่ ตรวจสอบโดยนำน้ำที่ล้างมาทำปฏิกริยากับสารละลายซิลเวอร์ไนเตรต($AgNO_3$)จนไม่เห็นตะกอนขุ่นขาวของซิลเวอร์คลอไรด์ (AgCl) เกิดขึ้น จากนั้นเติม 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 500 มิลลิลิตรลงในเจลที่เตรียมไว้ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อทำให้สมดุลด้วยการอิ่มตัว (Equilibrate) แล้วนำไปบรรจุลงในคคอลัมน์แก้ว ขนาด 2.5x40 เซ็นติเมตร ให้ได้เจลสูงประมาณ 35 เซ็นติเมตร ผ่านอะซิเตทบัฟเฟอร์ ชนิดเดียวกันข้ามคืนจนเจลอยู่ในสภาพสมดุลที่อัตราการไหล 24 มิลลิลิตร/ชั่วโมง ค่อย ๆใส่เอนไซม์ที่ต้องการทำให้บริสุทธิ์ ปริมาตร 6 มล.

(หลังจากไดอะไลซ์ ข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส) ลงบนผิวหน้าเจลเบา ๆ ชะโปรตีนส่วนที่ไม่ถูกจับด้วยอิออนของเม็ดเจลออกให้หมดด้วย 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ติดตามโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนมีค่าเข้าใกล้ 0 จากนั้นจึงชะโปรตีนที่ถูกจับอยู่กับเจลออกด้วย 0 - 0.8 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์เกรเดียนท์ เก็บสารละลายโปรตีนหลอดละ 3 มิลลิลิตร นำไปวัดปริมาณโปรตีนที่ค่าการดูดกลืนแสง 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เรนินในแต่ละหลอด จากนั้นรวมหลอดที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์สูงเข้าด้วยกัน วัดปริมาตรพร้อมทั้งแอคติวิตีและหาปริมาณโปรตีน

11. การทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ Sephadex G - 75

โปรย Sephadex G - 75 ประมาณ 10 กรัม ลงในน้ำกลั่น นำไปต้มจนเดือดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็น เทส่วนน้ำใสพร้อมเจลละเอียดบนผิวหน้าทิ้ง เติม 0.05 โมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ปริมาตร 500 มิลลิลิตรลงไป กวนเป็นครั้งคราวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เทส่วนน้ำใสทิ้ง นำเจลไปบรรจุในคอลัมน์แก้วขนาด 1.6x70 เซ็นติเมตร แล้วผ่านอะซิเตทบัฟเฟอร์ดังกล่าวข้ามคืน จนเจลอยู่ในสภาพสมดุลอิ่มตัว(Equilibrate)ที่อัตราการไหล 12 มิลลิลิตร/ชั่วโมง นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ DEAE และทำให้แห้งโดยเครื่องระเหิดแห้ง (Lyophilizer) มาละลายในอะซิเตทบัฟเฟอร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (น้อยกว่า 3 เปอร์เซนต์ของปริมาตรเจลทั้งหมดในคอลัมน์) ผ่านลงคอลัมน์ Sephadex G-75 เก็บสารละลายโปรตีนลำดับส่วนละ 3 มิลลิลิตร วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เรนิน จากนั้นรวมหลอดที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์สูงเข้าด้วยกัน วัดปริมาตรพร้อมทั้งแอคติวิตี และปริมาณโปรตีน

12. การตรวจความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ ด้วยโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิสชนิดแท่ง(Disc Polyacrylamide gel electrophoresis)ตามวิธีของ Williams และ Reisfeld (1964)

บรรจุสารละลายผสม 7 % เซพาเรติงเจล(Seperating gel)ตามภาคผนวก ข หมายเลข 4 ลงในหลอดแก้วขนาด 0.5 x 8.0 เซ็นติเมตร ให้มีความสูงของแท่งเจล 6.5

เซ็นติเมตร ปิดทับหน้าเจลด้วยน้ำสุง 0.5 เซ็นติเมตรเพื่อให้ผิวหน้าเจลเรียบ หลังจากเจลแข็งตัวแล้ว ซับน้ำที่ผิวเจลให้แห้ง เทสารละลายผสมของสแตกกิงเจล (Stacking Gel) ตามภาคผนวก ข หมายเลข 4 ให้มีความสูงประมาณ 1 เซ็นติเมตร ปิดทับหน้าเจลด้วยน้ำตั้งทิ้งไว้ภายใต้แสงฟลูออเรสเซนต์ จนกระทั่งเจลแข็งตัว ซับน้ำที่ผิวหน้าเจลให้แห้ง แล้วนำไปบรรจุในชุดทำอิเลคโตรโฟริซิส พร้อมทั้งเททริส-ไกลซีน บัฟเฟอร์ pH 8.3 ให้ท่วมแท่งเจล หยอดสารละลายเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบที่มีปริมาณโปรตีน 50-100ไมโครกรัมใน 40 ไมโครลิตร กลีเซอรอล และ 10 ไมโครลิตรของ 0.005 เปอร์เซนต์บรอมฟีนอลบลู ลงในแท่งเจล และทำอิเลคโตรโฟริซิส ผ่านกระแสไฟฟ้า 6.0 มิลลิแอมแปร์ต่อแท่งเจล จนกระทั่งสีของบรอมฟีนอลบลูเคลื่อนลงมาถึงปลายสุดของเจล นำเจลออกจากแท่งแก้ว แล้วแช่ในน้ำยาย้อมสีโปรตีน (Staining Solution) วิธีเตรียมดังภาคผนวก ข หมายเลข 4 จากนั้นล้างสีส่วนเกินออกโดยใช้น้ำยาล้างสี (Destaining Solution) ตามภาคผนวก ข หมายเลข 4 หลาย ๆ ครั้ง จนเห็นแถบของโปรตีนชัดเจน ตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์บนแท่งเจลโดยใช้แท่งที่ไม่ได้ผ่านการย้อมสีมาตัดเป็นชิ้นขนาด 0.3 เซ็นติเมตร หลาย ๆ ชิ้น โดยเปรียบเทียบกับแท่งเจลที่ผ่านการย้อมสี แล้วชะโปรตีนออกจากเจลโดยนำมาแช่ใน 0.05 โมลาร์อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วนำส่วนน้ำใสวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

13. การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ โดยการทำอิเลคโตรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลโพลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น ตามวิธีของ Laemmli (1970)

โดยประกบแผ่นแก้วขนาด 16 x 18 เซ็นติเมตร 2 แผ่นเข้าด้วยกันสอดแผ่นพลาสติกหนา 3 มิลลิเมตร ที่ขอบด้านข้างทั้ง 2 ข้าง เทสารละลายผสมของเรซาเรดิงเจล (Seperating Gel)ที่มีเจลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 5) ลงไปในแผ่นแก้วให้ได้ความสูง 9 เซ็นติเมตร หยอดน้ำลงบนผิวหน้าเจลให้มีความสูง 2 มิลลิเมตร ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 45 นาที จนกระทั่งเจลแข็งตัว เทน้ำออกแล้ววางแผ่นพลาสติก สำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง(Slot Former)ลงระหว่างแผ่นแก้วทั้งสอง เทสารละลายผสมของสแตกกิงเจล (Stacking Gel Solution)ซึ่งมีองค์ประกอบดังแสดงในภาคผนวก ข หมายเลข.5 เมื่อเจลแข็งตัวแล้วดึงแผ่นพลาสติกออก ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยอิเลคโตรดบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 5) 2-3 ครั้ง แล้วเติมอิเลคโตรดบัฟเฟอร์ลงในช่องใส่ตัวอย่างจนเต็ม นำโปรตีน

ที่จะวิเคราะห์ และโปรตีนมาตรฐาน ตัวอย่างละ 20ไมโครกรัม ละลายใน 50 ไมโครลิตรของบัฟเฟอร์ ซึ่งส่วนประกอบแสดงในภาคผนวก ข หมายเลข 5 และต้มให้เดือดที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นหยอดลงในช่องตัวอย่างบนแผ่นเจลผ่านกระแสไฟฟ้า 60 มิลลิแอมแปร์ จนกระทั่งสีของบรอมฟีนอลบลู เคลื่อนลงมาถึงปลายสุดของแผ่นเจล นำแผ่นเจลมาแช่ในน้ำยาย้อมสีโปรตีน (ภาคผนวก ข หมายเลข 5)เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างสีส่วนเกินออกโดยใช้น้ำยาล้างสี (ภาคผนวก ข หมายเลข 5)หลาย ๆ ครั้ง จนเห็นแถบของโปรตีนชัดเจน เปรียบเทียบตำแหน่งแถบโปรตีนของเอนไซม์ กับโปรตีนมาตรฐาน

14. การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์เรนนิน

14.1 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์เข้มข้น 13 หน่วย ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายนมพร่องไขมัน 12 เปอร์เซนต์ใน 0.01 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 30-70 องศาเซลเซียส วัดแอคติวิตีของเอนไซม์

14.2 การหา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์เข้มข้น 13 หน่วย ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายนมพร่องไขมัน 12 เปอร์เซนต์ที่มี 0.01 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ อยู่ในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีช่วงของ pH ต่างกัน ตั้งแต่ 2.0 - 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส วัดแอคติวิตีของเอนไซม์

บัฟเฟอร์ที่ใช้ได้แก่ 0.05 โมลาร์ ไกลซีนไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 2.0 - 4.5

0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4.5 - 6.5

14.3 ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความร้อน

บ่มสารละลายเอมไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 30 - 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำเอนไซม์ในแต่ละอุณหภูมิมาทำปฏิกิริยากับสารละลายนมพร่องไขมัน 12 เปอร์เซนต์ที่มี 0.01โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ อยู่ใน 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์

pH 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือเทียบกับเอนไซม์เริ่มต้น ก่อนนำไปบ่ม

14.4 ความเสถียรของเอนไซม์ต่อ pH

นำสารละลายเอนไซม์เข้มข้น 13 หน่วยมาเจือจาง 2 เท่า ด้วย 0.05 โมลาร์ของบัฟเฟอร์ที่ pH ต่าง ๆ ตั้งแต่ 2.5-9.0 เป็นเวลา 30 นาที แล้วปรับเป็น pH 5.5 โดยเจือจาง 5 เท่า ด้วย 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับสารละลายนมพร่องไขมัน 12 % ที่มี 0.01 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์อยู่ใน 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือเทียบกับเอนไซม์เริ่มต้นก่อนนำไปบ่ม

บัฟเฟอร์ที่ใช้ได้แก่ 0.05 โมลาร์ ไกลซีนไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 2.5 - 4.0

0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4.0 - 6.5

0.05 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 - 8.5

0.05 โมลาร์ ทริสบัฟเฟอร์ pH 8.5 - 9.0

14.5 ความเข้มข้นของนมผงพร่องไขมัน(สับสเตรท) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์เข้มข้น 13 หน่วยปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรทำปฏิกิริยากับสารละลายนมผงพร่องไขมัน ความเข้มข้นต่างๆ คือ 6 - 24 เปอร์เซนต์ที่มี 0.01 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ผสมอยู่ใน 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส วัดแอคติวิตีของเอนไซม์

14.6 ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์เข้มข้น 13 หน่วย ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลายนมพร่องไขมัน 10 เปอร์เซนต์ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ คือ 5 - 35 มิลลิโมลาร์ ใน 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสวัดแอคติวิตีของเอนไซม์

15. การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของโปรติเอสเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์เข้มข้น 0.01 หน่วย ปริมาตร 1 มล. ทำปฏิกิริยากับสารละลายเคซีนในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 1 มล. บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 30 - 70 องศาเซลเซียส วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีการทดลองข้อ 4.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ผลการทดลอง

การแยกและคัดเทียบราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เรนินได้สูง

จากตัวอย่างลูกแป้งสุรา 8 ตัวอย่าง, ลูกแป้งกระแช่ 8 ตัวอย่าง และลูกแป้งข้าวหมาก 4 ตัวอย่าง ซึ่งได้มาจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศ นำมาแยกเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารวุ้นวายเอ็ม ได้ราทั้งหมด 51 สายพันธุ์โดยเป็นราที่เส้นใยไม่มีผนังกั้น 38 สายพันธุ์ และมีผนังกั้น 13 สายพันธุ์

จากการคัดเทียบราที่ผลิตเอนไซม์เรนิน โดยเลี้ยง ในอาหารเหลววายเอ็มผสมนมพร่องไขมัน เพื่อให้นมพร่องไขมันเป็นตัวเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์เรนิน พบว่ามีราเพียง 9 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เรนิน และมีอยู่ 2 สายพันธุ์ที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์เรนินสูงเท่ากัน โดยสามารถทำให้นมตกตะกอนกลายเป็นลิ่มนมได้ภายในเวลา 10 นาที คือ *Rhizopus* sp.และ *Chlamydomucor* sp.ซึ่งแยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก จังหวัดปทุมธานีและอยุธยาตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

และเมื่อนำรา 2 สายพันธุ์นี้มาเลี้ยงในอาหารเหลววายเอ็มผสมนมพร่องไขมันเปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์เรนิน และโปรติเอสเอนไซม์โดยใช้กล้าเชื้ออายุ 2 และ 3 วันตามวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 3 และ 4 พบว่าอายุของกล้าเชื้อมีผลต่อแอคติวิตีของเรนินโดย *Rhizopus* sp.กล้าเชื้ออายุ 2 วัน ให้แอคติวิตีของเรนินดีกว่าอายุ 3 วัน และแอคติวิตีจะสูงสุดในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ ส่วน *Chlamydomucor* sp. พบว่ากล้าเชื้ออายุ 3 วันให้แอคติวิตีดีกว่าอายุ 2 วัน และให้แอคติวิตีดีในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเท่ากับ 0.26 หน่วย/มก. โปรตีน แต่ก็ยังน้อยกว่า *Rhizopus* sp. อายุ 2 วันในวันที่ 4 ของการเลี้ยง ซึ่งมีแอคติวิตีเท่ากับ 0.36 หน่วย/มก.โปรตีน และเมื่อพิจารณาแอคติวิตีของโปรติเอส จะเห็นว่าในแต่ละวันของการเลี้ยงโปรติเอส แอคติวิตีจะต่างกันไม่มาก และอายุของกล้าเชื้อก็มีผลต่อแอคติวิตีของโปรติเอสเช่นเดียวกับแอคติวิตีของเรนิน เมื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีของโปรติเอสระหว่าง*Rhizopus* sp. กับ *Chlamydomucor* sp. จะเห็นว่าเชื้อ *Chlamydomucor* sp. มีแอคติวิตีของโปรติเอสมากกว่า ดังแสดงในตารางที่ 2 ดังนั้นจึงเลือก *Rhizopus* sp.

ตารางที่ 1 สายพันธุ์ราที่มีการผลิตเอนไซม์เรนินในอาหารเหลววายเอ็มผสมนมพร่องไขมัน เมื่อเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 4 วัน

แหล่งเชื้อและสถานที่	สกุลราที่แยกได้	เวลา* (นาที)	แอคติวิตี (หน่วยต่อมล.)
ลูกแป้งสุรา จังหวัด อยุธยา	*Chlamydomucor* sp.	30	0.13
ลูกแป้งน้ำขาว จังหวัด ปทุมธานี	*Rhizopus* sp.	120	0.03
	Aspergillus sp.	240	0.02
ลูกแป้งข้าวหมาก จังหวัดอุดรธานี	*Chlamydomucor* sp.	120	0.03
ลูกแป้งข้าวหมาก จังหวัด ปทุมธานี	*Rhizopus* sp.**	10	0.40
ลูกแป้งน้ำขาว จังหวัด อยุธยา	*Chlamydomucor* sp.	30	0.13
ลูกแป้งสุรา จังหวัด ปทุมธานี	*Rhizopus* sp.	60	0.07
	Chlamydomucor sp.	240	0.02
ลูกแป้งข้าวหมาก จังหวัด อยุธยา	*Chlamydomucor* sp.**	10	0.40

* หมายถึง ระยะเวลาตั้งแต่เริ่มทำปฏิกิริยาจนกระทั่งโปรตีนในนมเริ่มจับตัวเป็นฝ้าข้างหลอดทดลอง

** หมายถึง เชื้อราที่ใช้ในการศึกษาต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 อายุของกล้าเชื้อต่อแอคติวิตีของเรนินและแอคติวิตีของโปรติเอสจากเชื้อ *Rhizopus* sp.และ *Chlamydomucor* sp.ในอาหารวายเอ็มผสมนมพร่องไขมัน เมื่อเลี้ยงบนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 °C เป็นเวลา 3-5 วัน

เชื้อ	แอคติวิตีของเรนิน, แอคติวิตีของโปรติเอส (หน่วยต่อ มก.โปรตีน)		
	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5
Rhizopus sp.			
อายุ 2 วัน	0.16,0.011	0.36,0.012	0.27,0.012
3 วัน	0.19,0.010	0.26,0.010	0.04,0.010
Chlamydomucor sp.			
อายุ 2 วัน	0.18,0.011	0.21,0.012	0.23,0.012
3 วัน	0.14,0.012	0.21,0.012	0.26,0.013

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เพื่อใช้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เรนินต่อไป

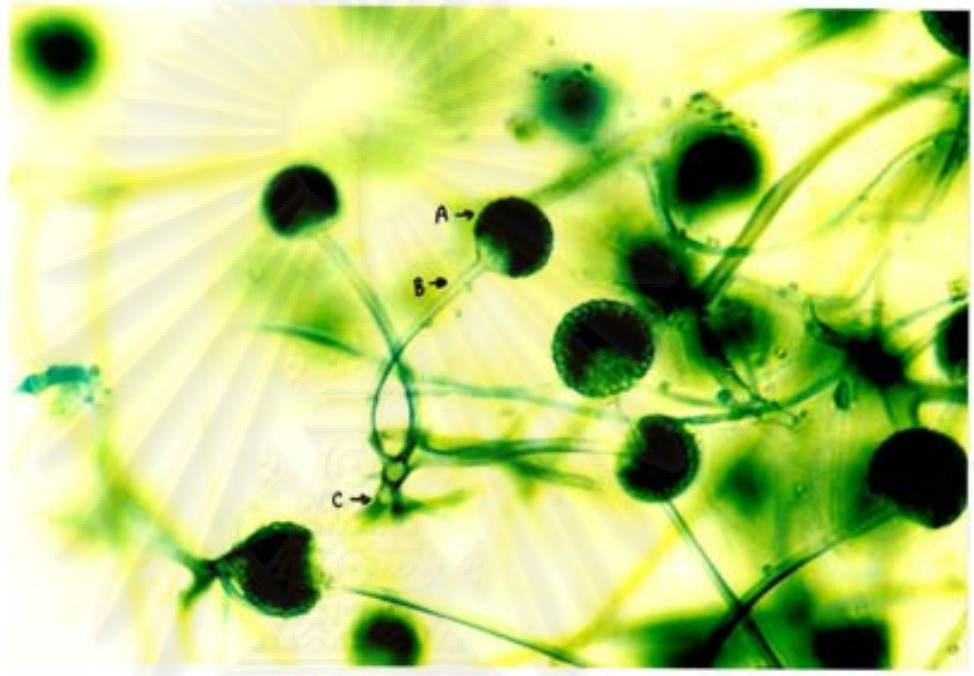
และเมื่อศึกษาลักษณะของ *Rhizopus* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พร้อมทั้งส่งไปจำแนกหาชนิดของสายพันธุ์ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ พบว่าราที่คัดเทียบได้นี้คือ *Rhizopus microsporus* S_1 (รูปที่ 2)

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *R. microsporus* S_1 เพื่อผลิตเอนไซม์เรนิน

1. ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

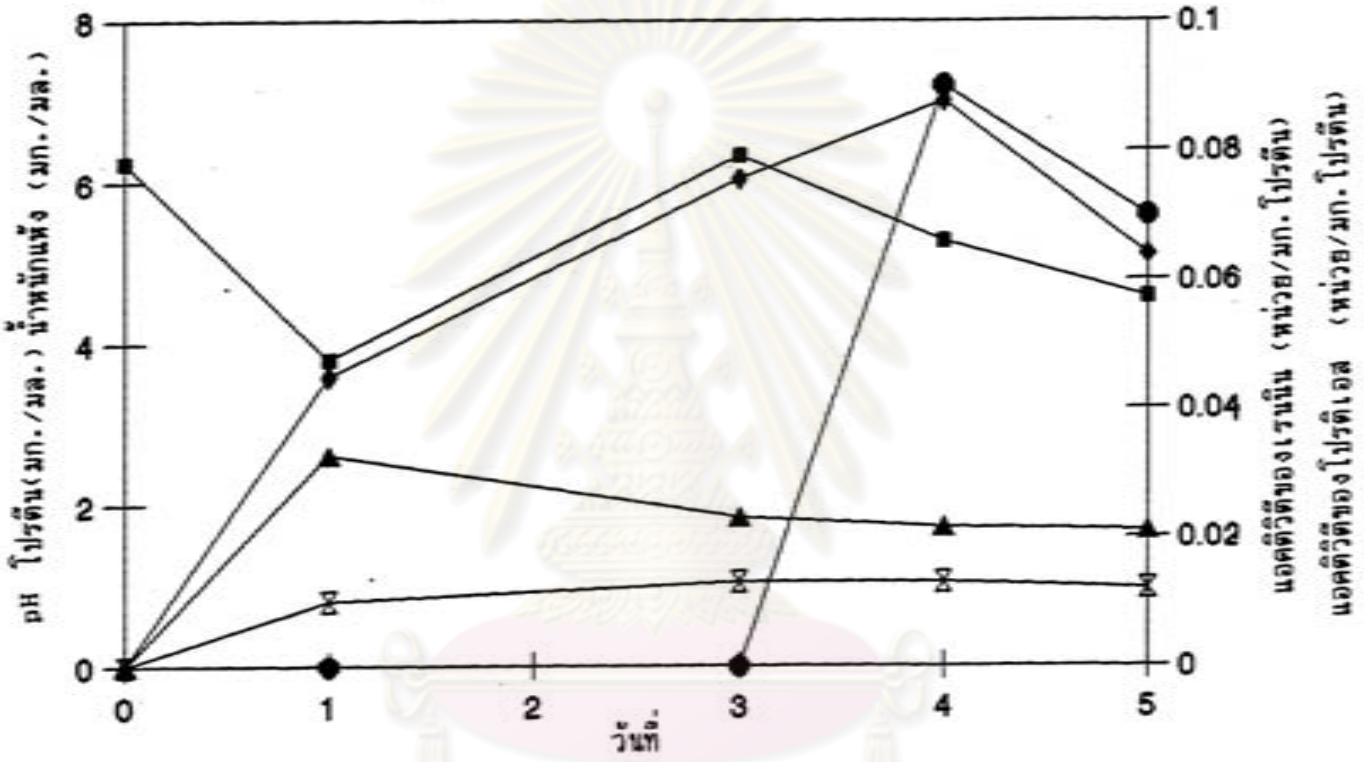
เมื่อเลี้ยง *R. microsporus* S_1 ในอาหารเหลววายเอ็ม (ภาคผนวก ก. หมายเลข 1) เปรียบเทียบกับเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลววายเอ็มผสมนมพร่องไขมัน (ภาคผนวก ก. หมายเลข 2) จะเห็นว่า *R. microsporus* S_1 สามารถสร้างเอนไซม์เรนินได้ ถึงแม้ไม่มีสารเหนี่ยวนำในอาหาร แต่ถ้ามีการเติมสารเหนี่ยวนำลงไป ในที่นี้คือนมพร่องไขมันจะทำให้ *R. microsporus* S_1 ผลิตเรนินได้สูงขึ้น โดยในอาหารวายเอ็มตรวจพบเรนินในวันที่ 4 ของการเลี้ยงได้แอคติวิตีเท่ากับ 0.09 หน่วย/มก.โปรตีน แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารวายเอ็มผสมนมพร่องไขมัน ซึ่งมีการเติมนมพร่องไขมัน 0.2 เปอร์เซ็นต์ลงไปในอาหาร พบว่า *R. microsporus* S_1 ผลิตเรนินได้ไวและมากกว่าเดิม คือตรวจพบเรนินในวันที่ 3 ของการเลี้ยง และมีแอคติวิตีมากกว่าในอาหารวายเอ็มประมาณ 4 เท่า คือได้แอคติวิตีเท่ากับ 0.4 หน่วย/มก.โปรตีน ในวันที่ 4 ของการเลี้ยง ส่วนแอคติวิตีของโปรติเอสพบว่าเริ่มสร้างตั้งแต่วันแรกของการเลี้ยง และมีปริมาณใกล้เคียงกันในอาหารทั้งสอง คือประมาณ 0.012 หน่วย/มก.โปรตีน และจากการเปรียบเทียบ pH ของทั้งสองอาหารนี้พบว่า นมพร่องไขมันช่วยควบคุม pH ระหว่างการเลี้ยงไม่ให้เปลี่ยนแปลงมาก โดยในอาหารวายเอ็ม pH ของการเลี้ยงจะอยู่ในช่วง 4-6 แต่ในอาหารวายเอ็มผสมนมพร่องไขมัน pH ของการเลี้ยงจะประมาณ 4.9 ส่วนน้ำหนักแห้งและโปรตีนของ *R. microsporus* S_1 ในอาหารวายเอ็มผสมนมพร่องไขมันมีมากกว่าในอาหารวายเอ็ม ดังรูปที่ 3 และ 4

เมื่อเลี้ยง *R.microsporus* S_1 ในอาหารซูโครส (ภาคผนวก ก.หมายเลข 3) พบว่า *R. microsporus* S_1 ไม่สร้างเอนไซม์เรนิน สร้างแต่โปรติเอสเอนไซม์ใน



รูปที่ 2 sporangium (A) sporangiophore (B) และ rhizoid (C) ของ *R.microsporus* S_t (กำลังขยาย 40 เท่า) เมื่อเลี้ยงในอาหารแข็ง YM ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

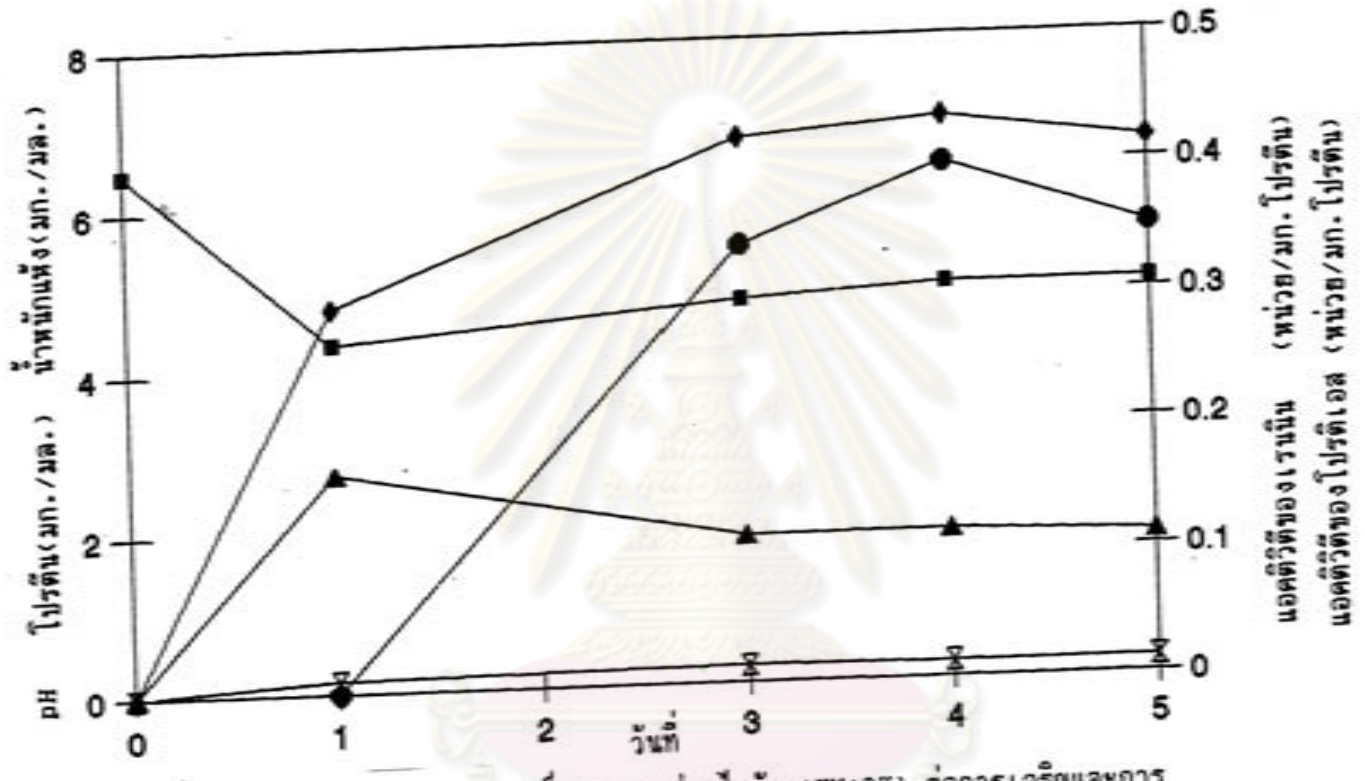
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 ผลของอาหารเพลววายเอ็ม (YM) ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของ *R. microspores* S_1 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

- pH
- โปรตีน(มก./มล.)
- น้ำหนักแห้ง (มก./มล.)
- แอคติวิตีของเรนนิน (หน่วย/มก.โปรตีน)
- แอคติวิตีของโปรติเอส (หน่วย/มก.โปรตีน)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 ผลของอาหารเหลววายเอ็มผสมนมพร่องไขมัน (YM+SK) ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของ *R. microspores* S_1 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

- pH
- โปรตีน(มก./มล.)
- น้ำหนักแห้ง(มก./มล.)
- แอคติวิตีของเรนนิน (หน่วย/มก.โปรตีน)
- แอคติวิตีของโปรติเอส (หน่วย/มก.โปรตีน)

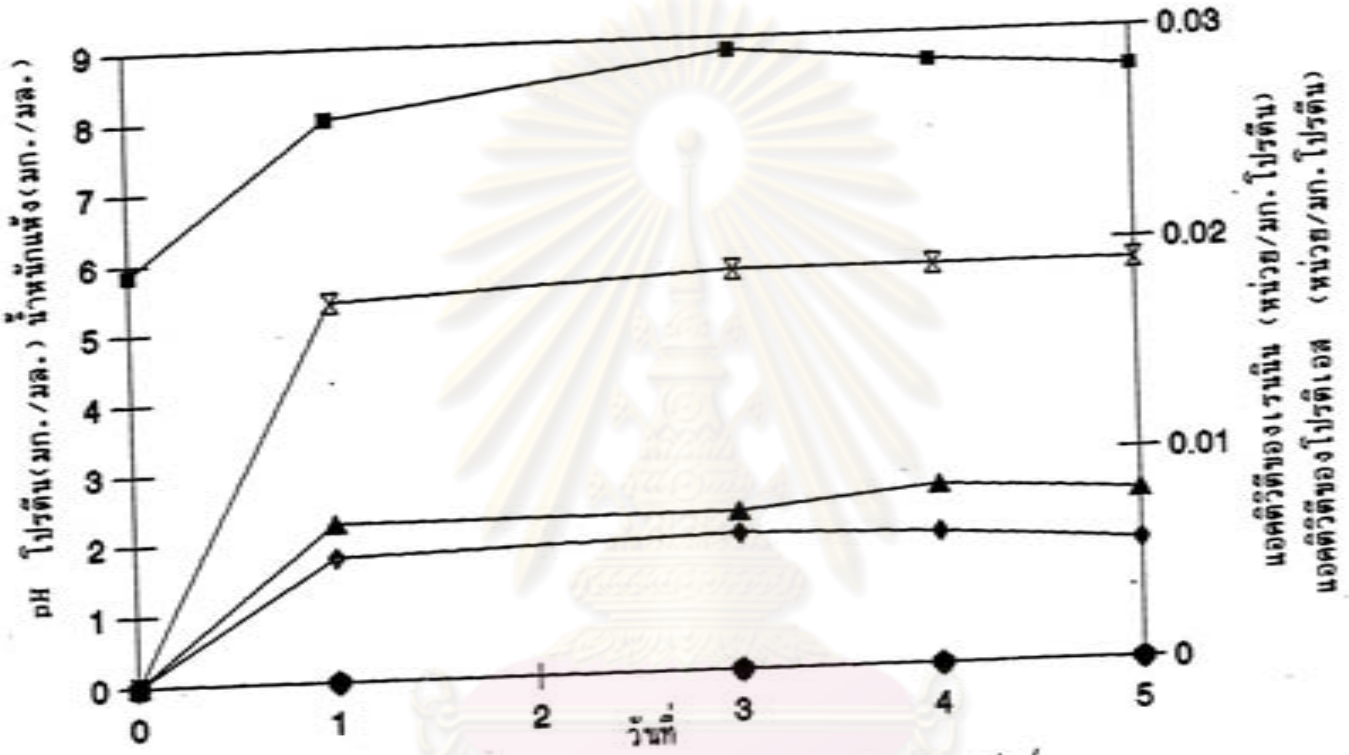
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริมาณที่มากกว่าในอาหารวายเอ็ม และวายเอ็มผสมนมพร่องไขมัน ส่วนปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นมากกว่าในอาหารวายเอ็มและวายเอ็มผสมนมพร่องไขมันเพียงเล็กน้อย แต่ปรากฏว่าน้ำหนักแห้งน้อยกว่าในอาหารทั้งสองมาก ขณะที่ pH ในระหว่างการเลี้ยงค่อนไปทางด่าง และเมื่อพิจารณาการเลี้ยง *R.micorsporus* S_1 ในอาหารชูโครสผสมนมพร่องไขมัน(ภาคผนวก ก. หมายเลข 4)ซึ่งเป็นการเติมนมพร่องไขมัน 1 เปอร์เซ็นต์ ลงไปในอาหารชูโครส เพื่อเหนี่ยวนำให้ *R. micorsporus* S_1 สร้างเรนนิน พบว่าเชื้อก็ยังไม่สร้างเรนนิน แต่การเติมนมพร่องไขมันทำให้ได้น้ำหนักแห้งมากกว่าในอาหารชูโครส แต่ก็ยังน้อยกว่าอาหารวายเอ็มและวายเอ็มผสมนมพร่องไขมัน ส่วนโปรตีนและแอคติวิตีของโปรติเอส พบว่ามีปริมาณสูงกว่าในอาหารชูโครสในช่วง 3 วันแรก โดยเฉพาะแอคติวิตีของโปรติเอสจะมีค่าสูงมากในวันแรกของการเลี้ยง แต่พอวันท้าย ๆ ก็มีปริมาณอยู่ในระดับเดียวกับอาหารชูโครส ขณะที่ pH ในระหว่างการเจริญค่อนไปทางด่างเหมือนในอาหารชูโครส ดังรูปที่ 5 และ 6

อาหารชนิดต่อมาที่ศึกษาคือ อาหารนมพร่องไขมัน (ภาคผนวก ก. หมายเลข 5) มีนมพร่องไขมันอยู่มากถึง 5 เปอร์เซ็นต์ และมีเด็กโทรสอยู่ 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อไม่สร้างเอนไซม์เรนนิน แต่มีน้ำหนักแห้งมากกว่าในอาหารชนิดอื่นๆ และเนื่องจากอาหารนี้มีสารอาหารประเภทโปรตีนอยู่มาก จึงทำให้มีปริมาณโปรตีนและโปรติเอสเอนไซม์สูงกว่าอาหารชนิดอื่น โดยเฉพาะโปรติเอสเอนไซม์ซึ่งมีค่าสูงมากในวันแรกของการเลี้ยง ในขณะที่ pH ระหว่างการเลี้ยงไม่เป็นกรดหรือด่างจนเกินไป ดังรูปที่ 7

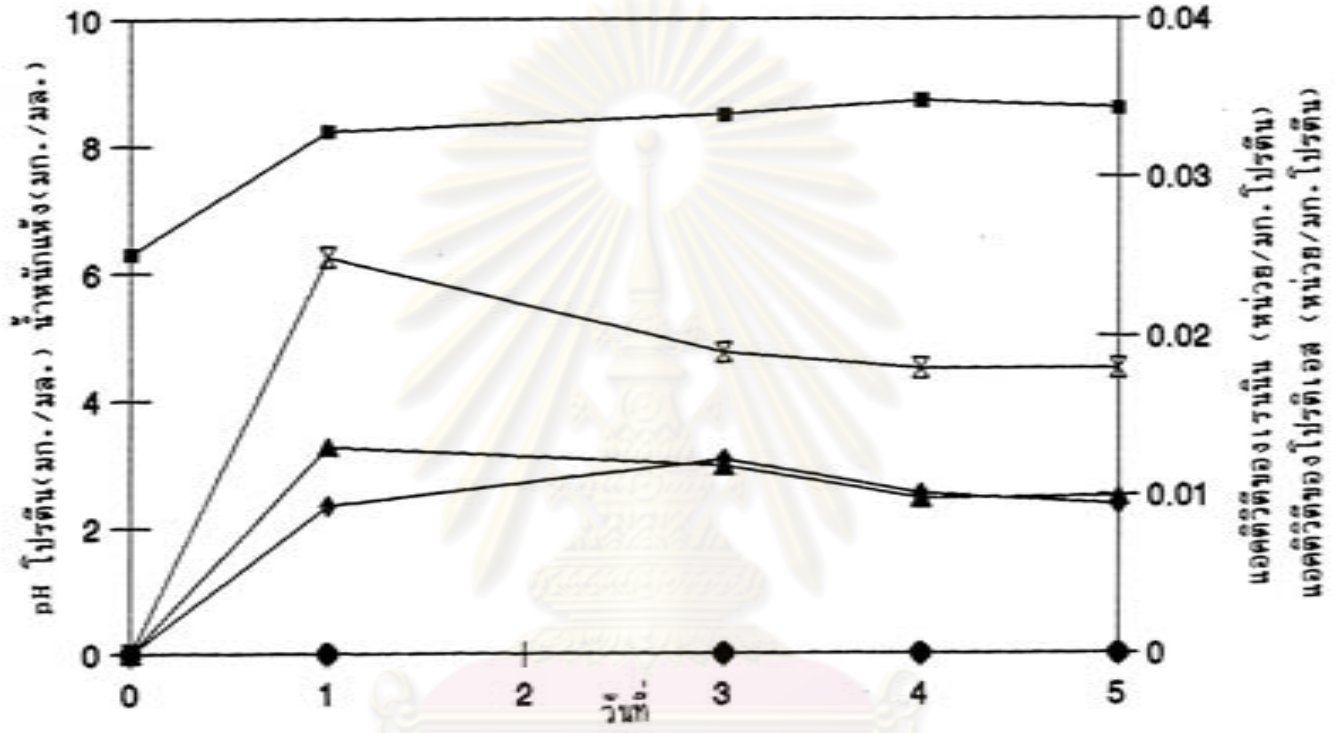
เมื่อเลี้ยง *R. micorsporus* S_1 ในอาหารน้ำแช่ข้าวโพดผสมแลคโตส (ภาคผนวก ก. หมายเลข 6) พบว่า *R. micorsporus* S_1 สามารถสร้างเอนไซม์เรนนินและโปรติเอสเอนไซม์ได้สูงกว่าในอาหารชนิดอื่นที่กล่าวมาแล้วข้างต้น โดยสร้างเรนนินได้สูงกว่าในอาหารวายเอ็มถึง 9.4 เท่าคือได้แอคติวิตีเท่ากับ 0.85 หน่วย/มก.โปรตีน ในวันที่ 4 ของการเลี้ยง แต่สร้างโปรติเอสเอนไซม์ได้สูงกว่าในอาหารวายเอ็มถึง 15.6 เท่า คือได้แอคติวิตีเท่ากับ 0.203 หน่วย/มก.โปรตีนในวันที่ 4 ของการเลี้ยง ขณะที่โปรตีนและน้ำหนักแห้งมีค่าค่อนข้างต่ำ ส่วน pH ค่อนไปทางกรดเล็กน้อยดังรูปที่ 8

เมื่อเลี้ยง *R.micorsporus* S_1 ในอาหารเหลวแป้งสาลี (ภาคผนวก ก. หมายเลข 7) พบว่า *R.micorsporus* S_1 สามารถผลิตเอนไซม์เรนนิน ได้มากกว่าในอาหารชนิดอื่น ๆ โดยสร้างเรนนินได้สูงกว่าในอาหารวายเอ็มถึง 40 เท่า คือได้แอคติวิตีเท่ากับ 3.54 หน่วย/มก.โปรตีน ในวันที่ 4 ของการเลี้ยงขณะที่โปรติเอสเอนไซม์ในอาหารนี้



รูปที่ 5 ผลของอาหารเหลวซูโครส (SU) ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของ *R. microspores* S_1 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

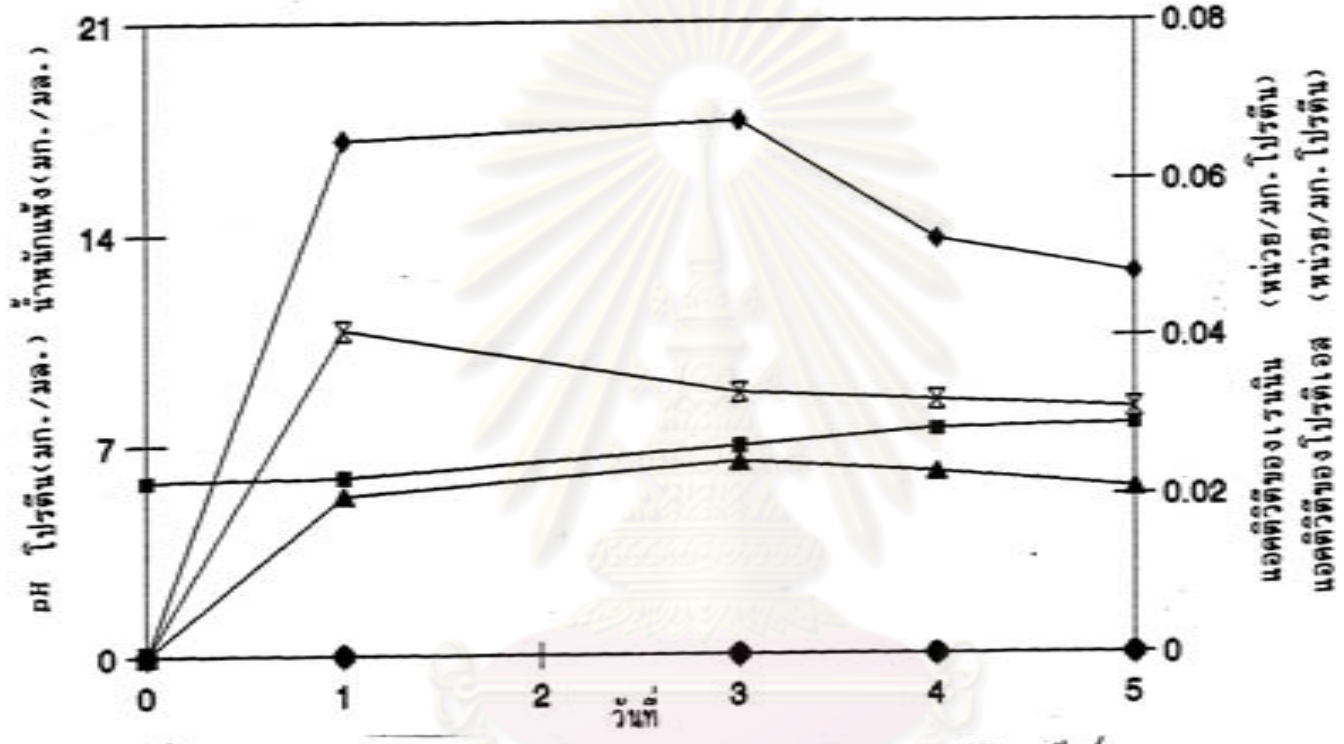
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 ผลของอาหารเหลวชูโครสผสมนมพร่องไขมัน (SU+SK) ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของ *R. microspores* S_1 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

- pH
- โปรตีน(มก./มล.)
- น้ำหนักแห้ง(มก./มล.)
- แอคติวิตีของเรนนิน (หน่วย/มก.โปรตีน)
- แอคติวิตีของโปรติเอส (หน่วย/มก.โปรตีน)

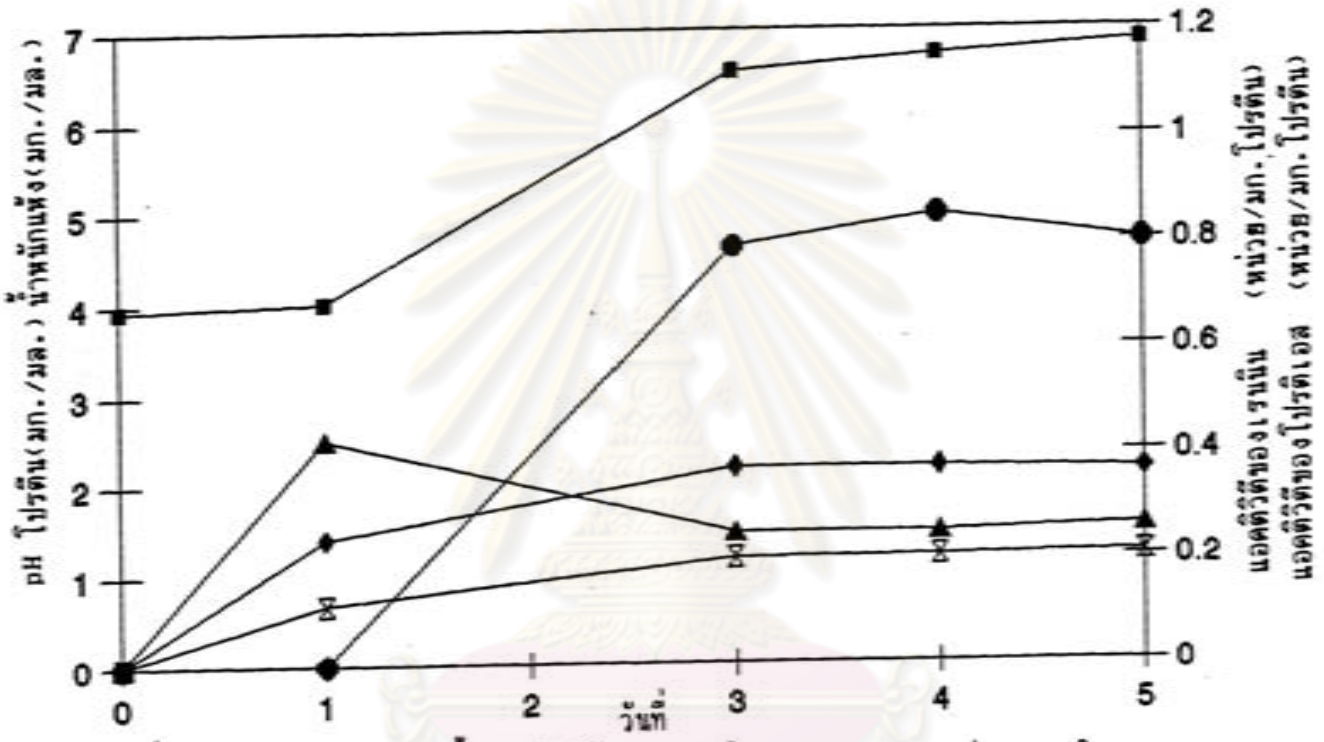
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 ผลของอาหารเหลวนมผงร่องไขมัน (SK) ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของ *R. microspores* S_1 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

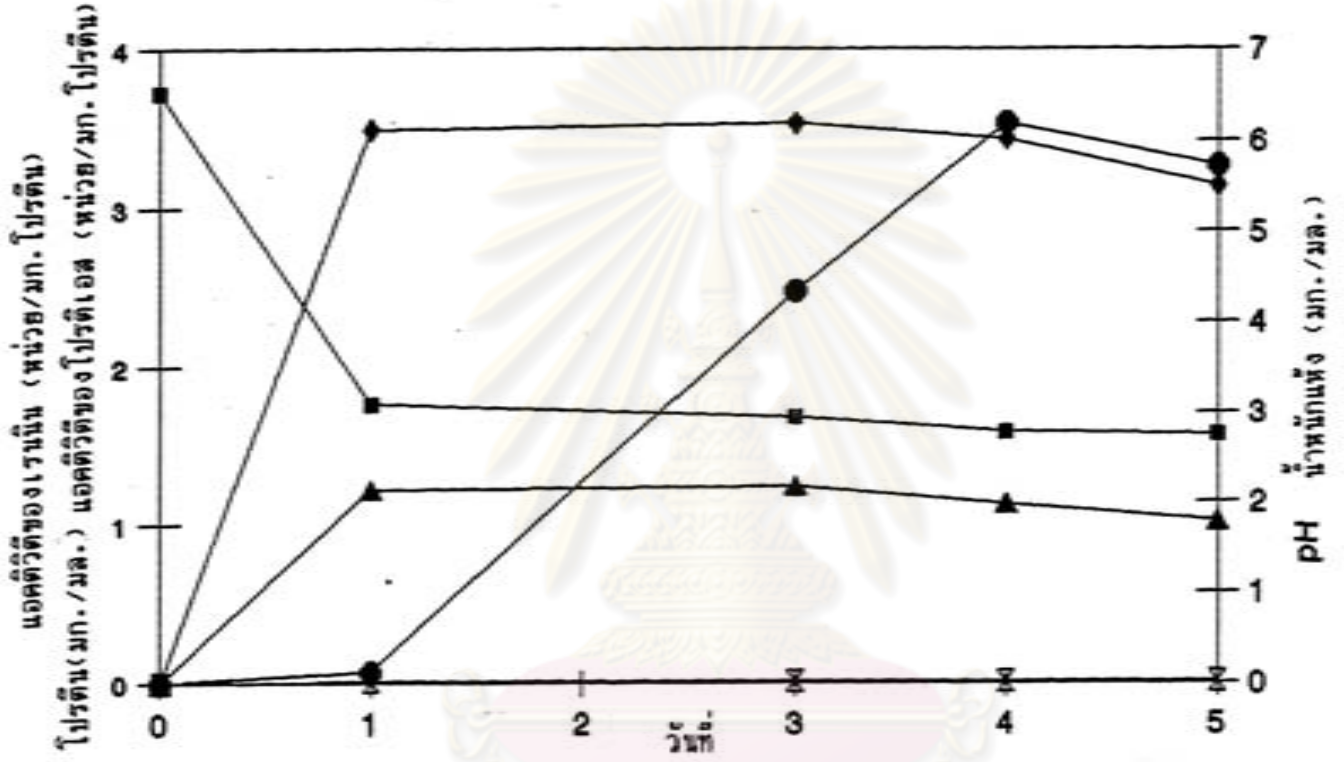
- pH
- โปรตีน(มก./มล.)
- น้ำหนักแห้ง(มก./มล.)
- แอคติวิตีของเรนนิน (หน่วย/มก.โปรตีน)
- แอคติวิตีของโปรติเอส (หน่วย/มก.โปรตีน)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 ผลของอาหารเหลวน้ำสกัดข้าวโพดผสมแลคโตส (CORN+LAC) ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของ *R. microspores* S_1 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 ผลของอาหารเหลวแป้งสาลี 2 % (WF) ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของ *R. microspores* S_1 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

R. micorsporus S_t สร้างได้ในปริมาณพอๆ กับในอาหารวายเอ็มคือมีแอคติวิตีของโปรติเอสประมาณ 0.013 หน่วย/มก.โปรตีน ส่วนปริมาณโปรตีนพบว่ามีน้อยกว่าอาหารชนิดอื่นคือประมาณ 1.1-1.2 มก./มล.และ pH ในระหว่างการเลี้ยงค่อนข้างจะต่ำคือประมาณ 2.8 - 3ในขณะที่น้ำหนักแห้งมีค่าประมาณ 6 มก./มล. พอ ๆ กับในอาหารวายเอ็ม และวายเอ็มผสมนมพร่องไขมันดังรูปที่ 9

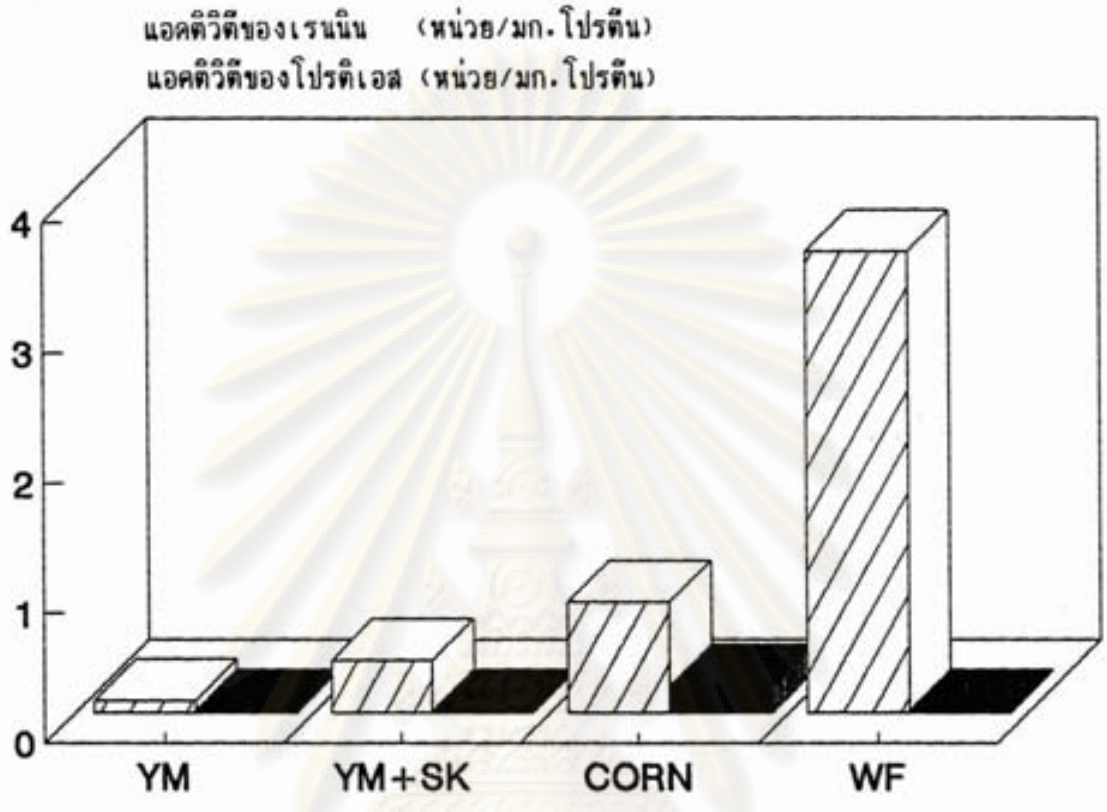
เมื่อเทียบสัดส่วนของแอคติวิตีของเรนินกับแอคติวิตีของโปรติเอส ในอาหาร 4 ชนิดที่ *R micorsporus* S_t สามารถผลิตเอนไซม์เรนนิน คืออาหารวายเอ็ม, วายเอ็มผสมนมพร่องไขมัน, น้ำแช่ข้าวโพดผสมแลคโตส และอาหารแป้งสาลี พบว่าอาหารแป้งสาลีเป็นอาหารที่เมื่อเลี้ยง *R. micorsporus* S_t แล้วมีสัดส่วนของแอคติวิตีของเรนินต่อแอคติวิตีของโปรติเอสสูงที่สุด ดังรูปที่ 10

2. <u>ชนิดของแหล่งคาร์บอนรวมทั้งผลของแหล่งไนโตรเจนและเกลือแร่</u>

เมื่อเลี้ยง *R. micorsporus* ในอาหารเหลวตามภาคผนวก ก. หมายเลข 7 โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน ได้แก่ แป้งสาลี แป้งข้าวจ้าว และรำข้าว พร้อมทั้งเติมสารละลายชาเพคตอกซ์เป็นตัวแทนของแหล่งเกลือแร่ และแบคโตเปปโตน 0.5 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวแทนของแหล่งไนโตรเจนเทียบกับเมื่อไม่เติม โดยเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน พบว่ารำข้าว 2 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำกลั่นที่ไม่เติมสารละลายชาเพคตอกซ์ และแบคโตเปปโตน 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีแอคติวิตีของเรนินสูงที่สุด คือได้เท่ากับ 6.16 หน่วย/มก. โปรตีน ดังรูปที่ 11 และมีอัตราส่วนของแอคติวิตีของเรนินต่อแอคติวิตีของโปรติเอสสูงที่สุด คือได้เท่ากับ 880 ดังรูปที่ 12

เมื่อแปรผันความเข้มข้นของรำข้าวในอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 1 - 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์เรนินและอัตราส่วนของแอคติวิตีของเรนินต่อแอคติวิตีของโปรติเอสจะสูงสุดเมื่อใช้รำข้าวเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ดังผลการทดลองในรูปที่ 13

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

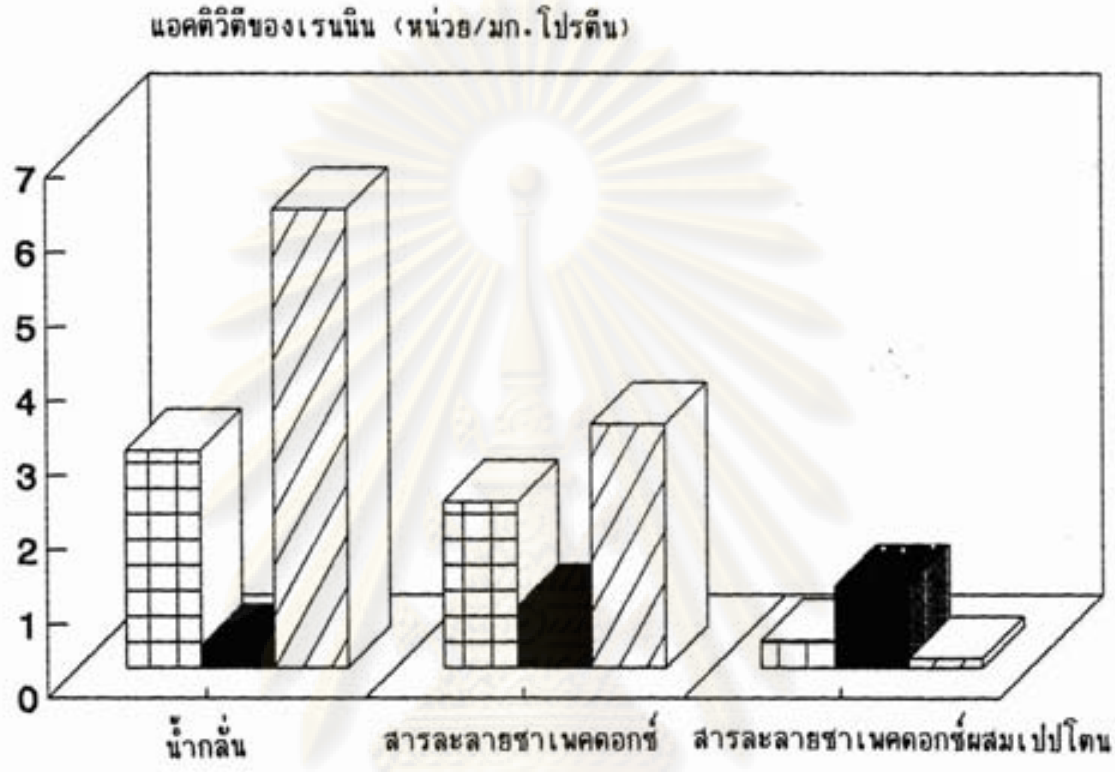


รูปที่ 10 แอคติวิตีของเรนินและแอคติวิตีของโปรติเอสจาก *R. microsporus* S$_1$ เมื่อเลี้ยงในอาหาร YM, YM+SK, CORN+LAC และ WF บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

▨ แอคติวิตีของเรนนิน (หน่วย/มก.โปรตีน)

■ แอคติวิตีของโปรติเอส (หน่วย/มก.โปรตีน)

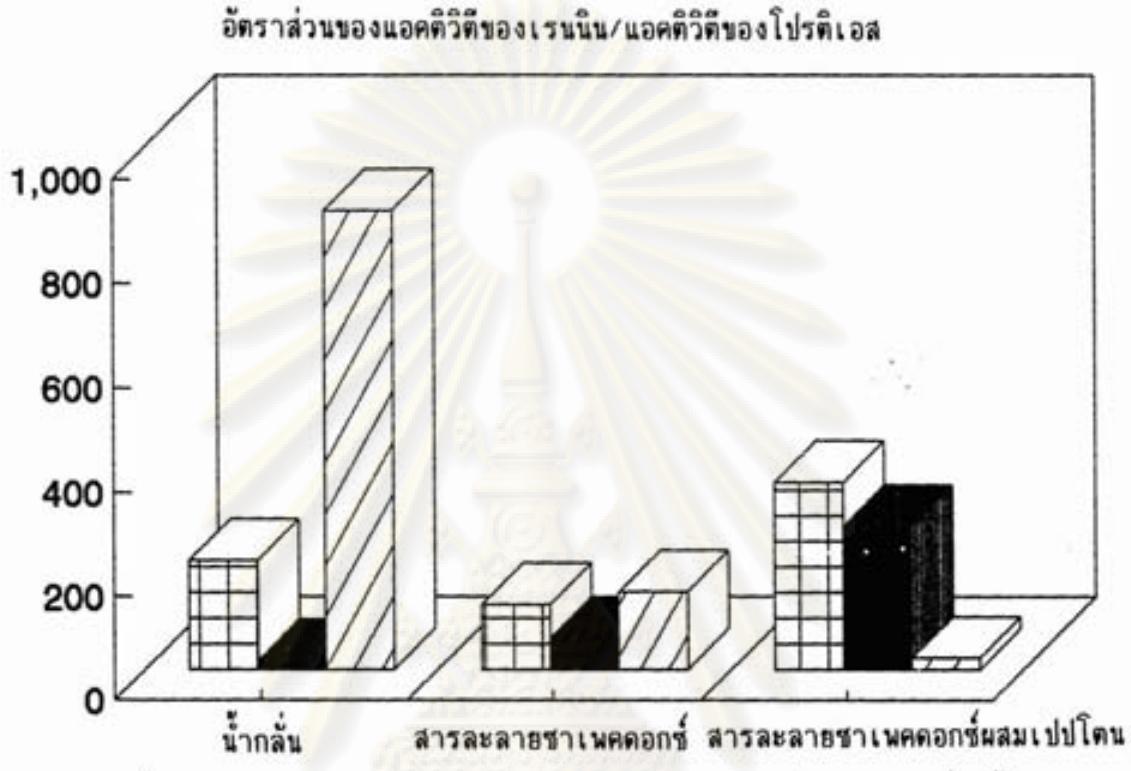
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 แอคติวิตีของเรนินของ *R. microsporus* S_1 เมื่อเลี้ยงในอาหารแป้งสาลี, แป้งข้าวจ้าวและรำข้าวเข้มข้น 2 % ในน้ำกลั่น, สารละลายชาเพคตอกซ์และสารละลายชาเพคตอกซ์ผสมเปปโตน 0.5 % บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

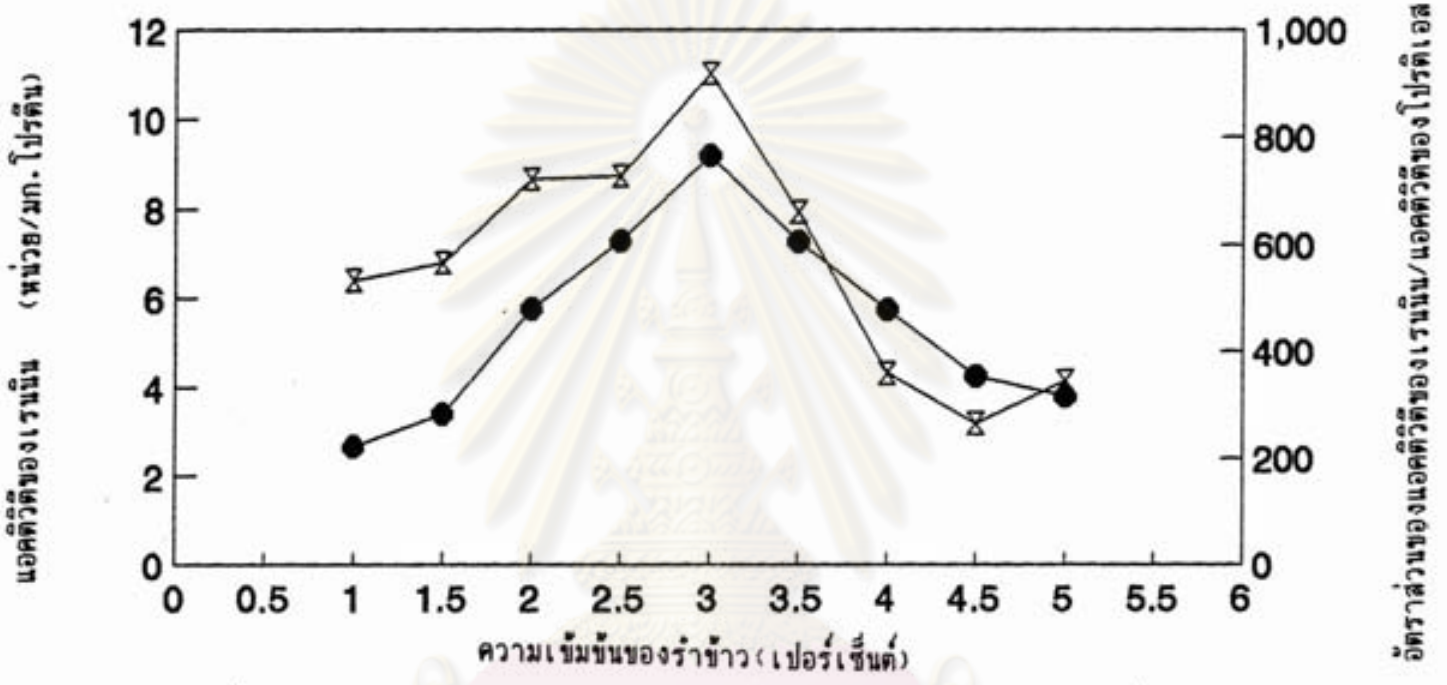
แป้งข้าวจ้าว
แป้งสาลี
รำข้าว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 อัตราส่วนของแอคติวิตีของเรนินต่อแอคติวิตีของโปรติเอส เมื่อเลี้ยง *R. microsporus* S$_1$ ในอาหารแป้งสาลี, แป้งข้าวจ้าวและรำข้าวเข้มข้น 2 % ในน้ำกลั่น, สารละลายชาเพคดอกซ์และสารละลายชาเพคดอกซ์ผสมเปปโตน 0.5 % บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 ผลของการแปรผันความเข้มข้นของรำข้าว 1-5 % ต่อการผลิตเอนไซม์เรนนิน โดย *R. microsporus* S_t เมื่อเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

● แอคติวิตีของเรนนิน (หน่วย/มก.โปรตีน)

⧖ อัตราส่วนของแอคติวิตีของเรนนิน/แอคติวิตีของโปรติเอส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ผลของ pH ต่อการผลิตเอนไซม์เรนนิน

จากการเลี้ยง *R. micorsporus* S_1 ในอาหารรำข้าว 3 เปอร์เซ็นต์ และแปรผัน pH เริ่มต้น ในช่วง 6.5-7.5 พบว่า แอคติวิตีของเอนไซม์และอัตราส่วนของแอคติวิตีของเรนนินต่อแอคติวิตีของโปรติเอสจะสูงที่สุดเมื่อใช้ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.3 ดังแสดงในตารางที่ 3

4. ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์เรนนิน

เมื่อเลี้ยง *R. micorsporus* S_1 ในอาหารรำข้าว 3 เปอร์เซ็นต์ และปรับ pH เริ่มต้น เท่ากับ 7.3 นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิต่างๆ กันคือ 25, 28, 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าแอคติวิตีของเรนนินที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสสูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเล็กน้อย โดยที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสได้แอคติวิตีของเรนนินเท่ากับ 7 หน่วย/มก.โปรตีน ขณะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสได้เรนนินแอคติวิตีเท่ากับ 6.85 หน่วย/มก. โปรตีน และเมื่อพิจารณาอัตราส่วนของแอคติวิตีของเรนนินต่อแอคติวิตีของโปรติเอสพบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีอัตราส่วนของแอคติวิตีของเรนนินต่อแอคติวิตีของโปรติเอสสูงกว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสได้อัตราส่วนของแอคติวิตีของเรนนินต่อแอคติวิตีของโปรติเอส เท่ากับ 856.25 ขณะที่อุณหภูมิ35 องศาเซลเซียส ได้อัตราส่วนของแอคติวิตีของเรนนินต่อแอคติวิตีของโปรติเอส เท่ากับ 777.78 ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เรนนินคือ 30 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 14

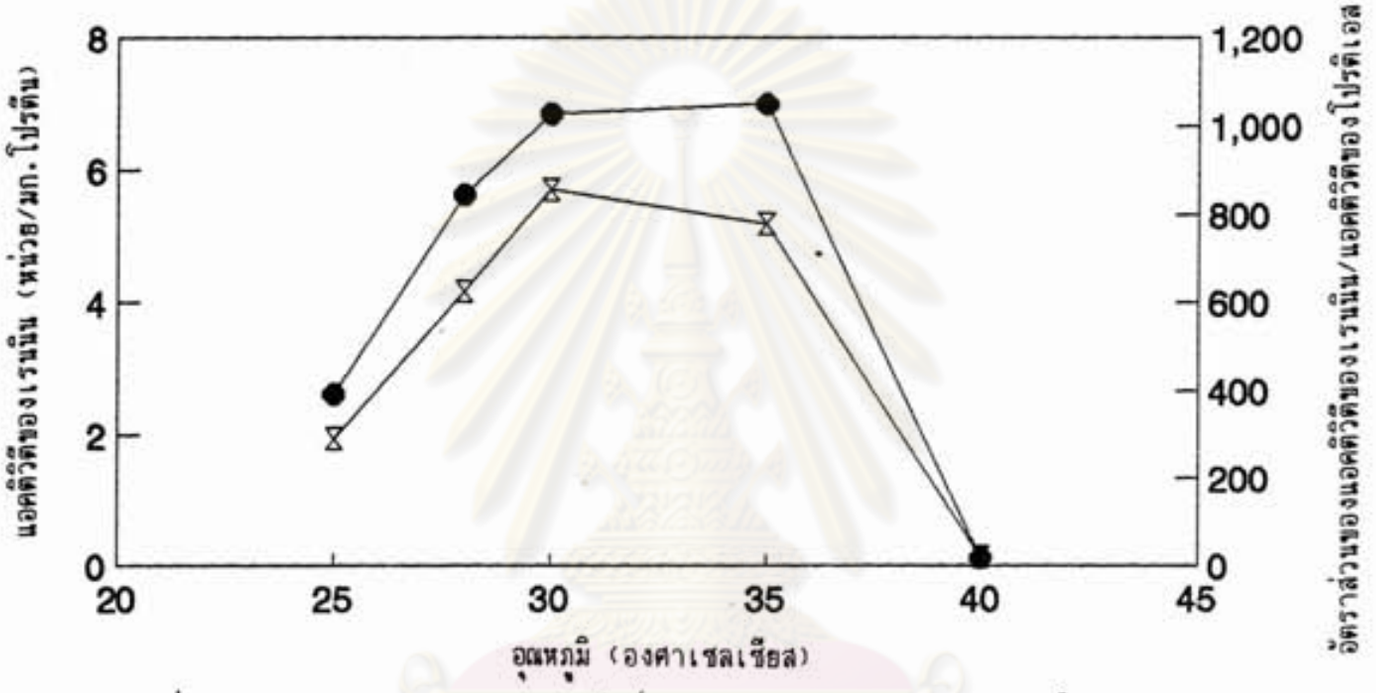
5. ความเร็วรอบของเครื่องเขย่าต่อการผลิตเอนไซม์เรนนิน

เมื่อเลี้ยง *R. micorsporus* S_1 ในอาหารรำข้าวเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.3 บนเครื่องเขย่า เพื่อเพิ่มอากาศที่ความเร็วรอบต่างกันคือ 100,150,200และ 250 รอบ/นาที พบว่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที *R. micorsporus* S_1

ตารางที่ 3 ผลของ pH เริ่มต้นในอาหารรำข้าว 3 เปอร์เซนต์ ต่อการผลิตเอนไซม์เรนนินของ *Rhizopus microsporus* S_1 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

pH เริ่มต้น	pH สุดท้าย	แอคติวิตีของเรนนิน (หน่วยต่อมก.โปรตีน)	แอคติวิตีของเรนนินต่อแอคติวิตีของโปรติเอส
6.5	4.61	2.58	286.67
6.7	4.64	2.74	342.50
7.0	4.69	3.42	380.00
7.3	4.78	5.97	663.33
7.5	4.86	3.74	467.50

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์เรนินของ *R. microsporus* S ในอาหารรำข้าวเข้มข้น 3 % และมี pH เริ่มต้น 7.3 บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 4 วัน

● แอคติวิตีของเรนนิน (หน่วย/มก.โปรตีน)

⧖ อัตราส่วนของแอคติวิตีของเรนนิน/แอคติวิตีของโปรติเอส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มีแอคติวิตีของเรนินและอัตราส่วนของแอคติวิตีของเรนินต่อแอคติวิตีของโปรติเอสสูงที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 15

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตเอนไซม์และการเจริญของ R. micorsporus S_t

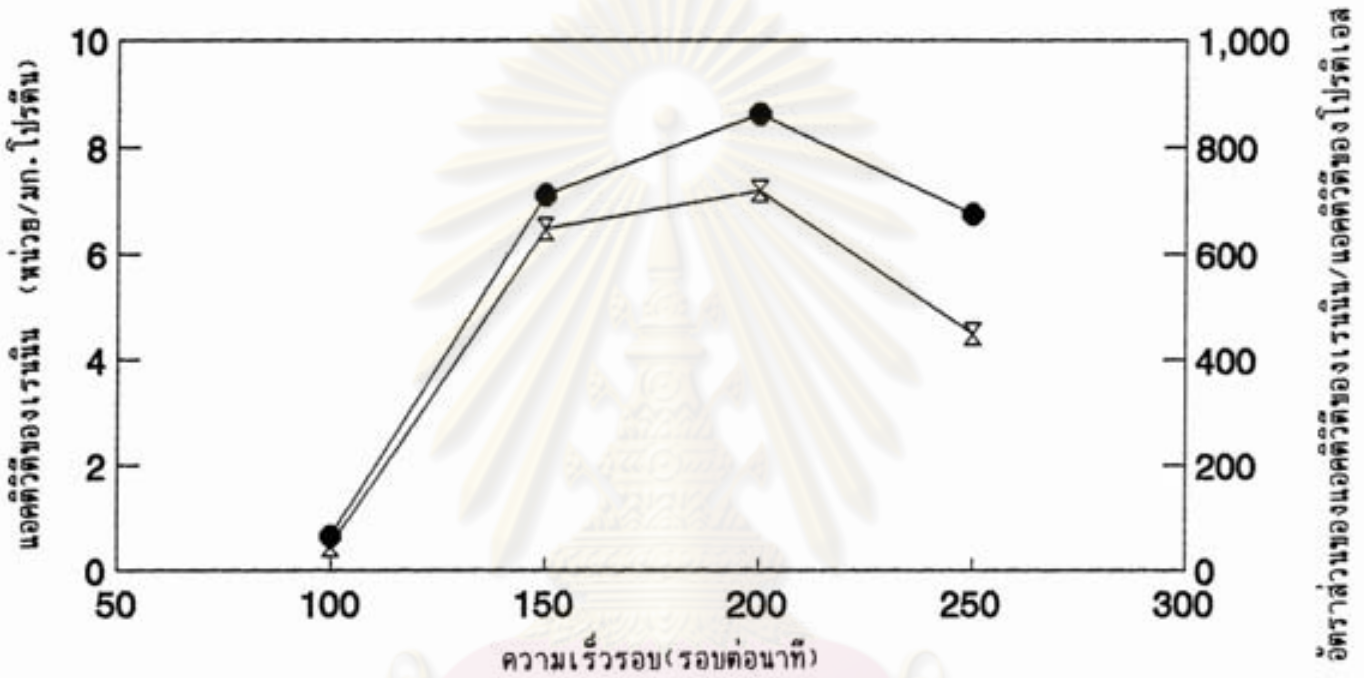
เมื่อเลี้ยง *R. micorsporus* S_t ในอาหารรำข้าวเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ที่มี pH เริ่มต้น 7.3 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน พบว่าได้แอคติวิตีของเรนินสูงสุดในวันที่ 5 ของการเลี้ยง คือได้เท่ากับ 10.08 หน่วย/มก.โปรตีน ในขณะที่วันที่ 4 ของการเลี้ยงได้แอคติวิตีของเรนินต่ำลงมาเล็กน้อยคือได้เท่ากับ 10 หน่วย/มก.โปรตีน ส่วนแอคติวิตีของโปรติเอสในวันที่ 4 และ 5 ของการเลี้ยงพบว่ามีค่าเท่ากันคือ 0.012 หน่วย/มก.โปรตีน ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปคือการทำให้เอนไซม์เรนินบริสุทธิ์จะใช้น้ำเลี้ยงเชื้อของวันที่ 4 ส่วนpHในระหว่างการเลี้ยงพบว่ามีค่าประมาณ 4-5 ขณะที่น้ำหนักแห้งและโปรตีน มีค่าประมาณ 9- 9.6 และ 1.2-1.4 มก./มล. ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 16

การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 30 - 75 เปอร์เซ็นต์

จากการนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4(Whatman NO.4) เพื่อแยกเซลและกากอาหารออก นำมาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวความเข้มข้น 30-75 เปอร์เซ็นต์ พบว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้น 2.6 เท่า เมื่อเทียบกับแอคติวิตีจำเพาะในสารสกัดเอนไซม์เริ่มต้น และยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 45.43 เปอร์เซ็นต์ดังแสดงในตารางที่ 4

โครมาโตกราฟีบนดีอีเออี - โทโยเพิร์ล 650 เอ็ม

นำโปรตีนปริมาณ 404.98 มก.ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 30-75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแขวนลอยใน 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 มาผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-โทโยเพิร์ล 650 เอ็ม ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion-exchanger)

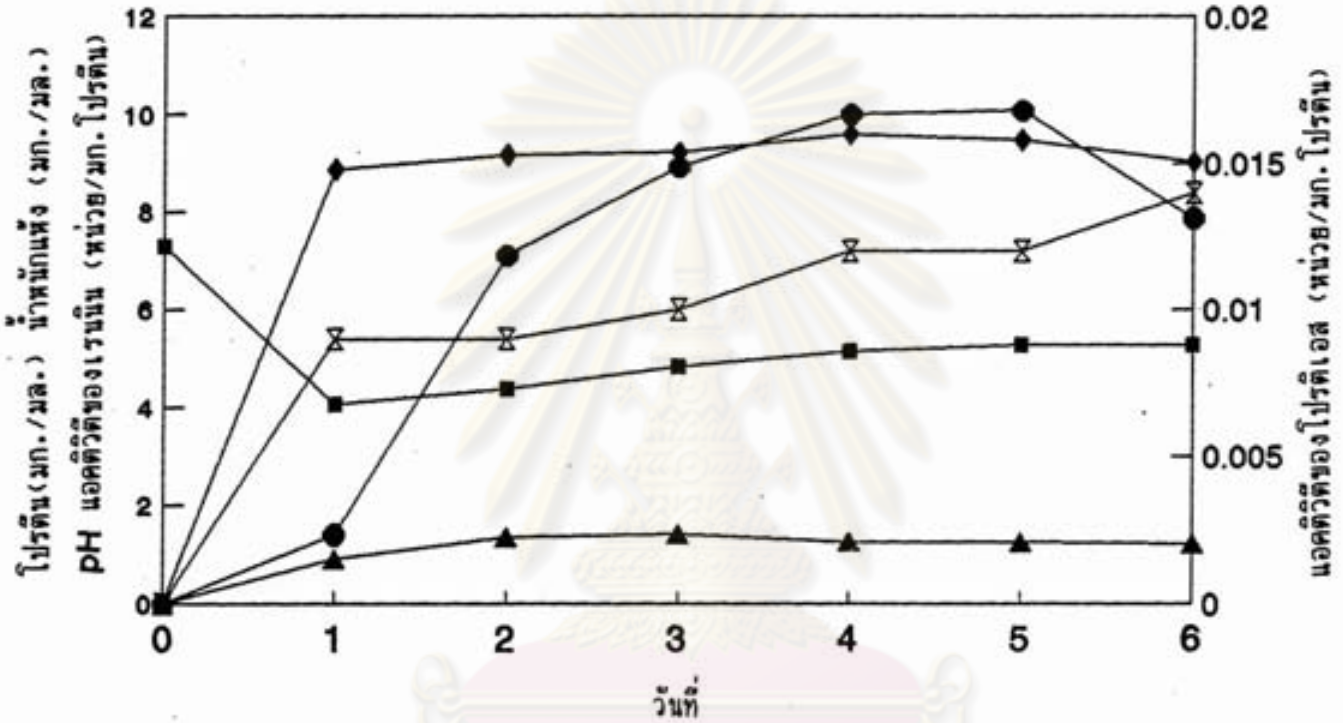


รูปที่ 15 ผลของความเร็วรอบในการเขย่าเมื่อเลี้ยง *R. microsporus* S_1 ต่อการผลิตเอนไซม์เรนินในอาหารรำข้าวเข้มข้น 3 % และมี pH เริ่มต้น 7.3 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

● แอคติวิตีของเรนนิน (หน่วย/มก.โปรตีน)

⧖ อัตราส่วนของแอคติวิตีของเรนนิน/แอคติวิตีของโปรตีเอส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตเอนไซม์เรนินและการเจริญของ *R. microsporus* S$_1$ เมื่อเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน

- pH
- โปรตีน (มก./มล.)
- น้ำหนักแห้ง (มก./มล.)
- แอคติวิตีของเรนนิน (หน่วย/มก.โปรตีน)
- แอคติวิตีของโปรติเอส (หน่วย/มก.โปรตีน)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่4 สรุปขั้นตอนต่างๆ ในการทำเอนไซม์เรนนินจาก *R. microsporus* S_1 ให้บริสุทธิ์

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตรทั้งหมด (มล.)	โปรตีนทั้งหมด (มก.)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมก. โปรตีน)	ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ (เท่า)	ปริมาณเอนไซม์ (%)
สารสกัดของเอนไซม์ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น	1,730	2318.2	23060.9	9.95	1.0	100
30-75 %	40	404.98	10476.18	25.87	2.6	45.43
โครมาโตกราฟีบนดีอีเออี-โทโยเพิร์ล 650 เอ็ม	21	42.48	3809.52	89.68	9.01	16.52
โครมาโตกราฟีบนเซฟาเด็กซ์จี-75	24	10.64	2526.24	237.43	23.86	10.95

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

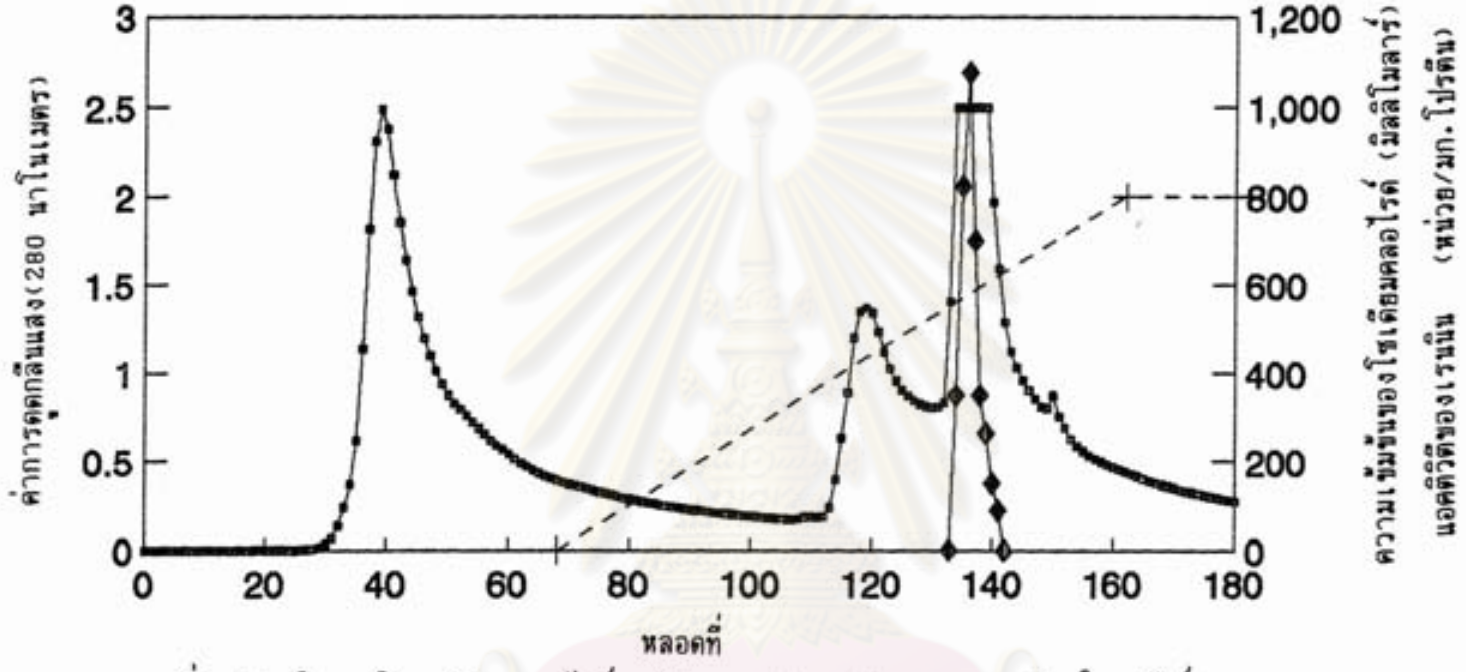
เพื่อกำจัดโปรตีนอื่นที่มีประจุตรงข้ามกับเอนไซม์ออกไป และยังสามารถกำจัดโปรตีนที่มีประจุต่างกับเอนไซม์มาก ๆ ออกด้วยโดยใช้ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ต่างกันดังวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 10 ได้ผล ดังแสดงในรูปที่ 17 พบว่า เอนไซม์เรนินจะถูกชะออกมาในลำดับส่วนที่ 134 -142 ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 550 ถึง 600 มิลลิโมลาร์ แสดงว่าเอนไซม์เรนินมีประจุเป็นลบ เมื่อรวมลำดับส่วนที่ 134-142 เข้าด้วยกัน ได้แอคติวิตีรวมของเอนไซม์เท่ากับ 3809.52 หน่วย แอคติวิตีจำเพาะ 89.68 หน่วย/มก.โปรตีน และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9 เท่าขณะที่ยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 16.52 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4

<u>โครมาโตกราฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี - 75</u>

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนนี้ อาศัยหลักการแยกโปรตีนที่มีขนาดแตกต่างจากเอนไซม์ออกไป โดยนำมาผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75 ดังวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 11 โดยผ่านโปรตีน 42.48 มก. ซึ่งแขวนลอยอยู่ใน 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ลงบนคอลัมน์ เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ลำดับส่วนละ 3 มล.มาวัดโปรตีนและแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ผลดังรูปที่ 18 พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์อยู่ในลำดับส่วนที่ 16-24 และเมื่อรวมลำดับส่วนเหล่านี้เข้าด้วยกัน วัดแอคติวิตีรวมของเอนไซม์ได้ 2526.24 หน่วย และพบว่ามีแอคติวิตีจำเพาะ 237.43 หน่วย/มก.โปรตีน และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเอนไซม์เริ่มต้น 23.86 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 4

<u>การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิสชนิดแท่ง</u>

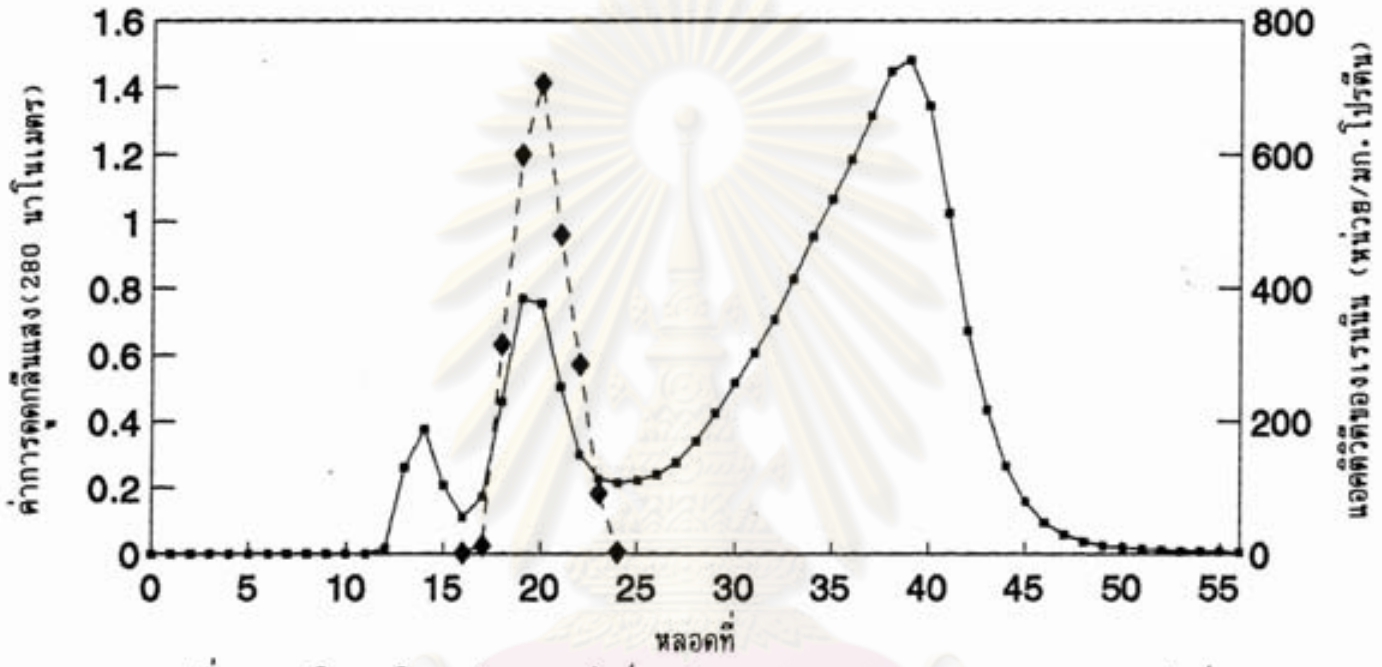
เป็นการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เรนิน ดังรายละเอียดของการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 12 พบจำนวนแถบโปรตีนบนแท่งเจลลดลงเมื่อผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้บริสุทธิ์ และในขั้นตอนสุดท้ายพบโปรตีน 2 แถบอยู่ชิดกันบนแท่งเจล ดังแสดงในรูปที่ 19 โดยวัดค่า Rfได้ 0.70 และ 0.73 ตามลำดับ จากการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ตรงตำแหน่งที่มีแถบโปรตีนไม่พบแอคติวิตีของเรนินจากทั้งสองแถบ สันนิษฐานว่าเกิดจากทริส - ไกลซีนบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำอิเลคโตรโฟริซิสซึ่งมีค่าความเป็นด่างสูงถึง 8.3 ทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตี ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในข้อ 9.4 ของการวิจัยนี้ที่พบว่าทริส บัฟเฟอร์ ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์



รูปที่ 17 โครมาโตกราฟีของเอนไซม์เรนนินจาก *R. microsporus* S_1 ในคอลัมน์ DEAE-Toyopearl 650M โดยผ่านเอนไซม์ลงในคอลัมน์ขนาด 40x2.5 ซม. ชะเอนไซม์ออกด้วย 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ที่มีการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์แบบเกรเดียนท์เส้นตรง(0-800 มิลลิโมลาร์) เก็บสารละลายเอนไซม์หลอดละ 3 มล. ที่อัตราการไหล 24 มล.ต่อชั่วโมง

- แอคติวิตีของเรนนิน (หน่วย/มก.โปรตีน)
- ค่าการดูดกลืนแสง(280 นาโนเมตร)
- ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (มิลลิโมลาร์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

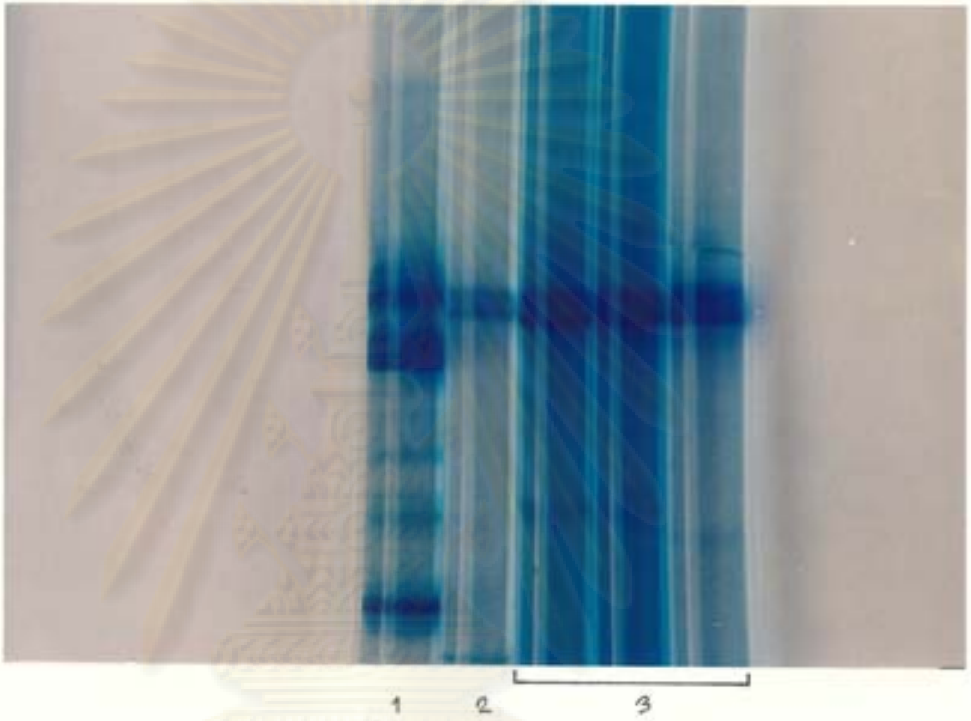


รูปที่ 18 โครมาโตกราฟีของเอนไซม์เรนินจาก *R. microsporus* S_t บนคอลัมน์ Sephadex G-75 ขนาด 70x1.6 ซม. ชะเอนไซม์โดยใช้ 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 เก็บสารละลายเอนไซม์หลอดละ 3 มล. ที่อัตราการไหล 12 มล.ต่อชั่วโมง

◆ แอคติวิตีของเรนนิน (หน่วย/มก.โปรตีน)

— ค่าการดูดกลืนแสง(280 นาโนเมตร)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 19 โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซีส ของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่าง ๆ ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ รายละเอียดการทดลองกล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 12

1. แอมโมเนียมซัลเฟต (ปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัม)
   30 ถึง 75 เปอร์เซนต์
2. ดีอีเออี-โทโยเพิร์ล 650 เอ็ม (ปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัม)
3. เซฟาเด็กซ์ จี - 75 (ปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัม)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เรนนิน

การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ เป็นการนำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขั้นสุดท้ายมาศึกษาองค์ประกอบของหน่วยย่อยของเอนไซม์ โดยการทำอิเลคโตรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลิอะคริลาไมด์เจล ดังการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 13 ได้ผลการทดลองในรูปที่ 20 พบว่าเรนนินจาก *R. microsporus* S_1 ให้แถบโปรตีนที่ติดสีสองแถบชิดกัน แสดงว่าเอนไซม์นี้มี 2 โมเลกุล ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 18,000 และ 19,000 ดาลตัน เมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ 21) และเมื่อเปรียบเทียบเรนนินจาก *R. microsporus* S_1 กับเรนนินจาก *M. pusillus* และเรนเนตจากเยื่อบุกระเพาะลูกวัว พบว่าเรนนินจาก *R. microsporus* S_1 มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับเรนเนตจากเยื่อบุกระเพาะลูกวัว ซึ่งมีแถบโปรตีนติดสีเพียงแถบเดียว แสดงว่า มีความบริสุทธิ์มากในขณะที่เรนนินจาก *M. pusillus* มีแถบโปรตีนหลายแถบ แสดงว่ามีหลายหน่วยย่อย หรืออาจจะมีโปรตีนชนิดอื่นปนเปื้อน

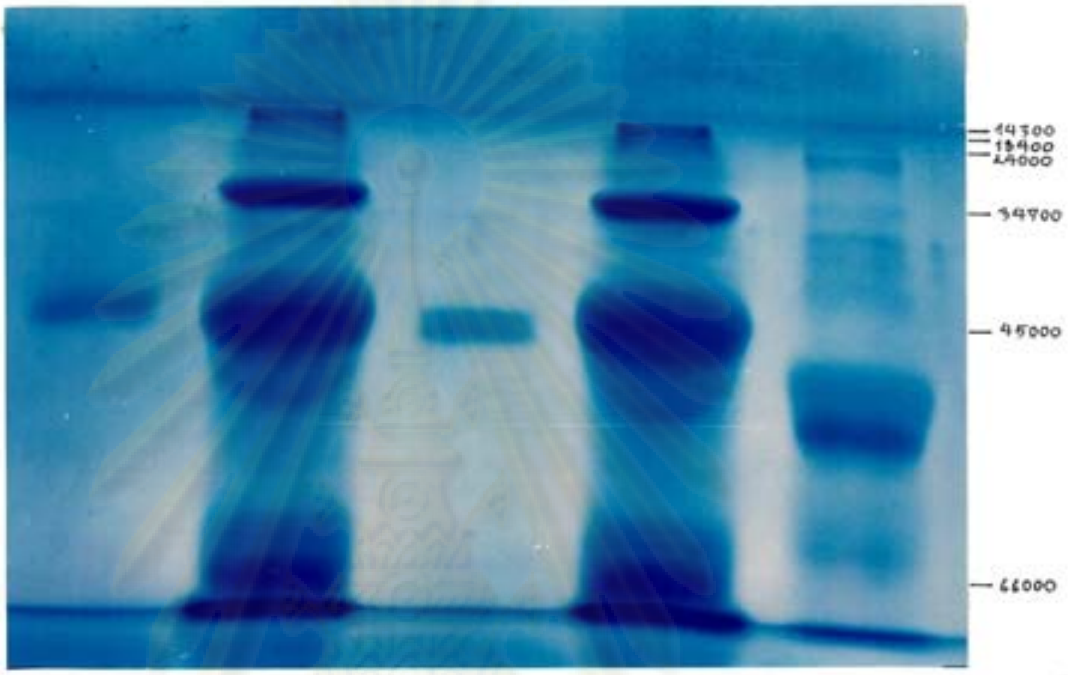
การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์เรนนิน

1. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์เรนนินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ปริมาณ 13 หน่วย มาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 3 โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 30 35 40 45 50 55 60 65 และ 70 องศาเซลเซียส ผลการทดลองดังรูปที่ 22 พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะสูงสุดที่ 55 องศาเซลเซียส ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจะใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

2. pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

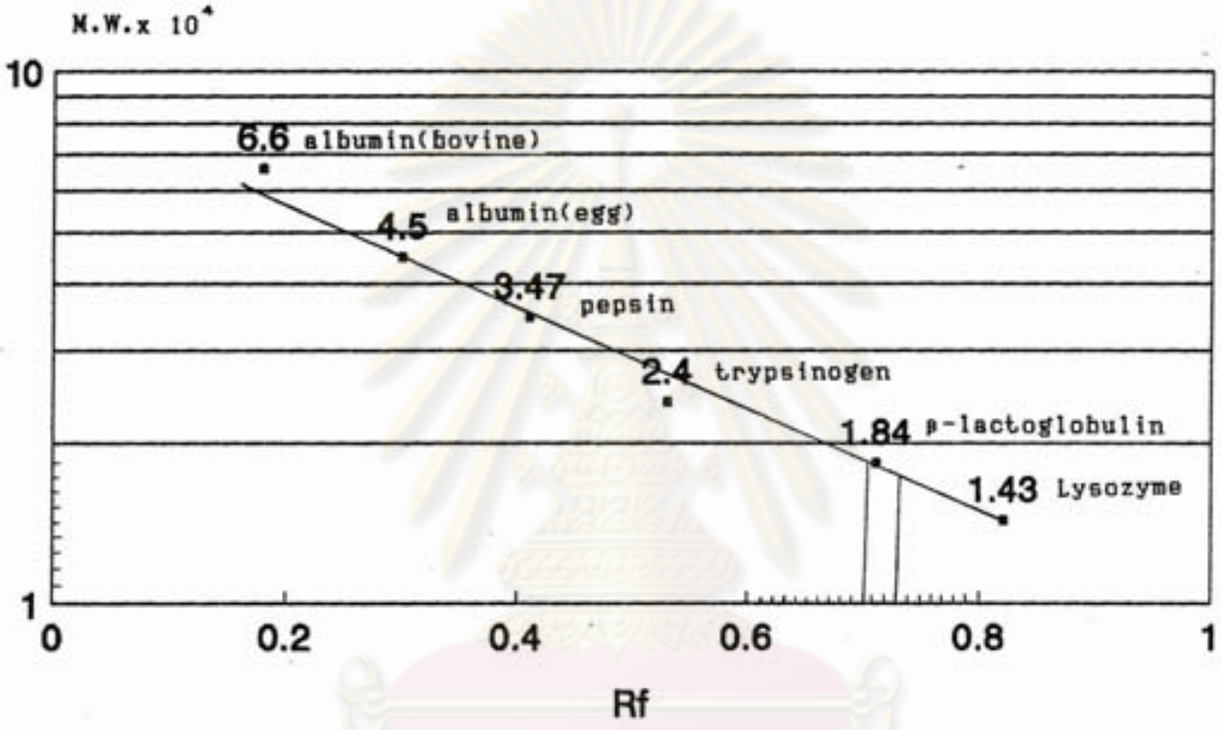
นำเอนไซม์มาบ่มในส่วนผสมของปฏิกิริยาเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 3 ยกเว้นใช้บัฟเฟอร์ที่มีช่วง pH ต่างๆ กัน (2.5 - 6.5) ละลายนพร่องไขมันทำให้ส่วนผสมของปฏิกิริยามี pH อยู่ในช่วง 5.5 - 6.5 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ผลการทดลองดังรูปที่ 23



รูปที่ 20 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส ของเอนไซม์เรนิน

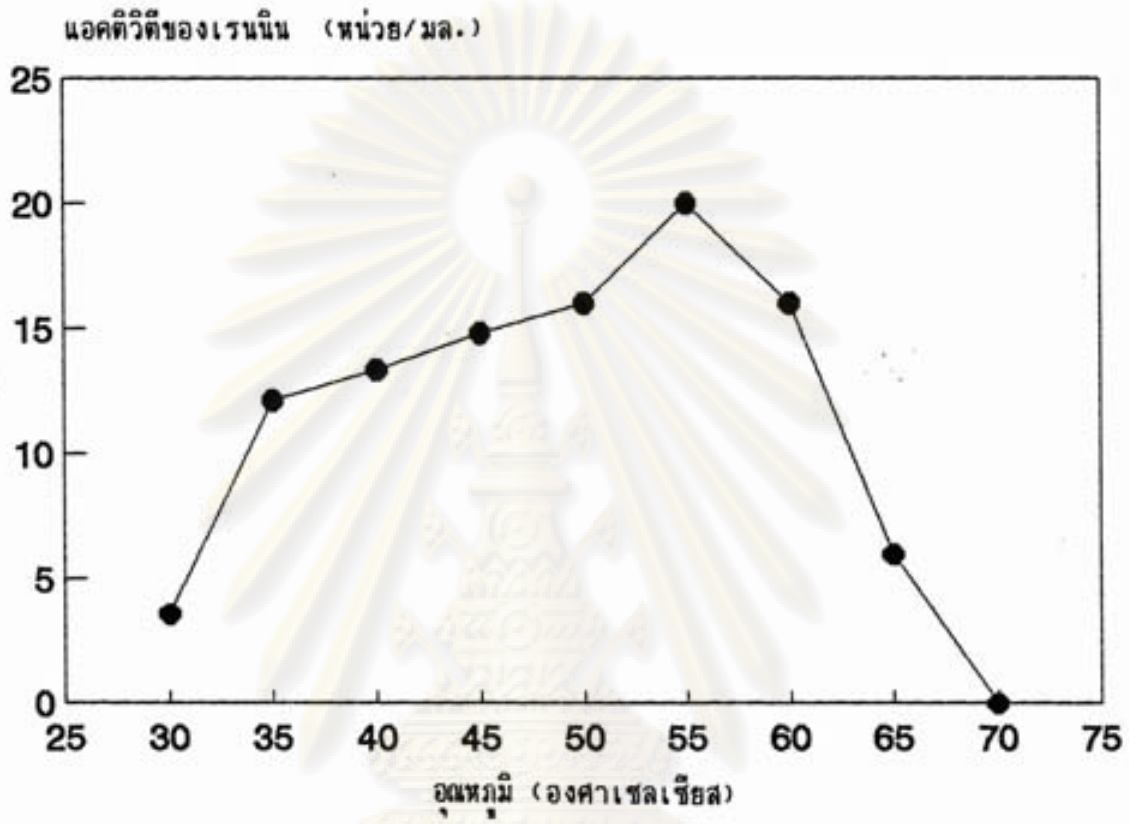
1. เอนไซม์เรนเนตจาก เยื่อบุกระเพาะลูกวัว (ปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัม)
2. 4โปรตีนมาตรฐาน (ปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัม)
3. เอนไซม์เรนินจาก *R.microsporus* S (ปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัม)
5. เอนไซม์เรนินจาก *Mucor pusillus* (ปริมาณโปรตีน 100 ไมโครกรัม)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



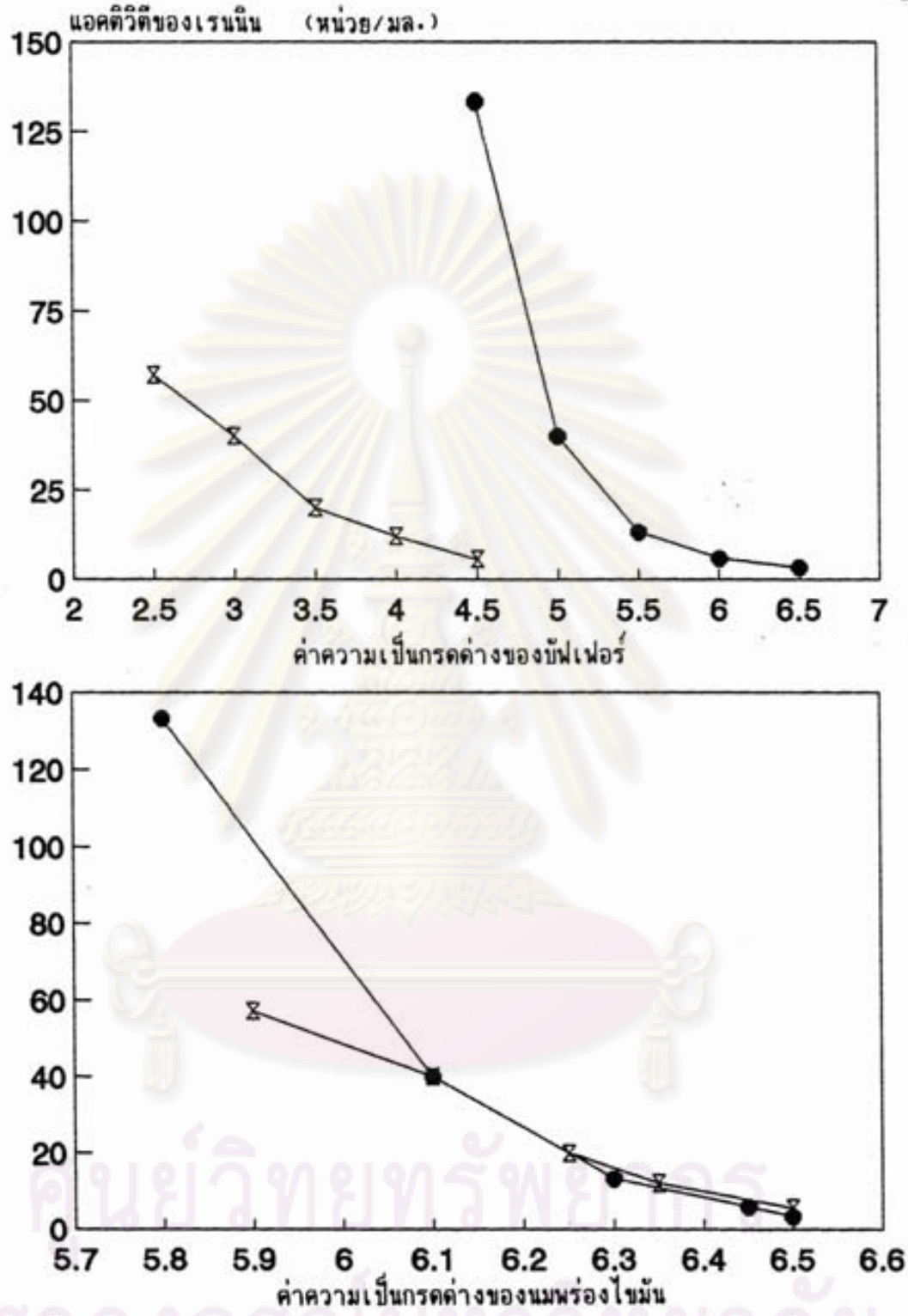
รูปที่ 21 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน (โดยการทำโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซีส) และลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 22 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์เรนินที่ผลิตโดย *R. microsporus* S_1 ทำการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เรนิน ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 3 ยกเว้นอุณหภูมิที่ใช้ทำปฏิกริยา ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ 13 หน่วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 23 ผลของความเป็นกรดด่าง(pH)ต่อการทำงานของเอนไซม์เรนนินที่ผลิตโดย *R. microsporus* S_1 ทำการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนิน ตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 3 ยกเว้น pH ที่ใช้ในการศึกษา อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ 13 หน่วย

-⧖- ไกลซีนบัฟเฟอร์

-●- อะซิเตทบัฟเฟอร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในสภาวะเป็นกรด และชนิดของบัฟเฟอร์ก็มีผลต่อการทำงานเอนไซม์ จากการทดลองนี้อะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 4.5 ละลายนมพร่องไขมันแล้วส่วนผสมของปฏิกิริยามี pH 5.8 ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงที่สุด ดังนั้นในการทดลองต่อๆ ไป การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์จะใช้อะซิเตท บัฟเฟอร์ pH 4.5 ในการละลายนมพร่องไขมัน

3. ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความร้อน

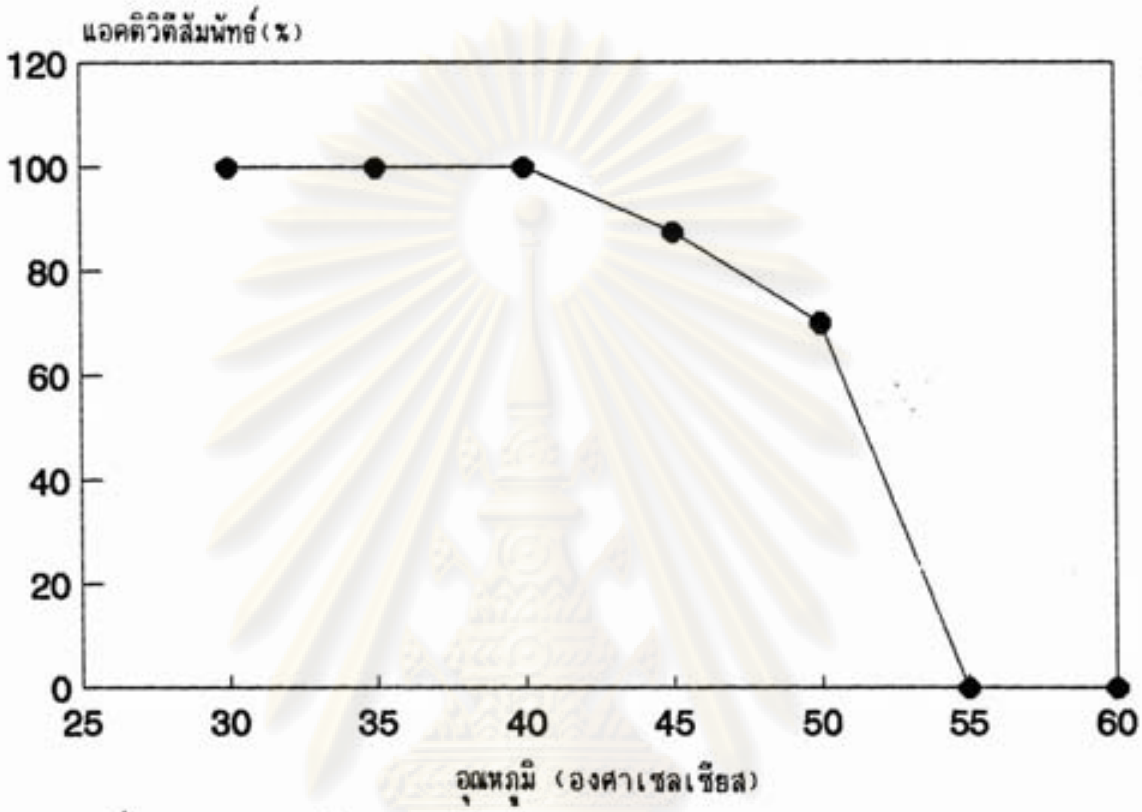
เมื่อนำเอนไซม์ที่เตรียมได้ ปริมาณ 13 หน่วย ไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตั้งแต่ 30 - 60 องศาเซลเซียส ใน 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปตรวจหาแอคติวิตีที่เหลือ ตามวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 3 พบว่าที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส แอคติวิตีลดลงเหลือ 70 - 85 เปอร์เซ็นต์และสูญเสียแอคติวิตีโดยสิ้นเชิงที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ดังผลการทดลองในรูปที่ 24

4. ความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเป็นกรดด่าง

นำเอนไซม์ ปริมาณ 13 หน่วย มาบ่มกับบัฟเฟอร์ที่ช่วง pH ต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 2.5-9.0 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปตรวจหาแอคติวิตีที่เหลือตามวิธีในบทที่ 2 ข้อ 3. ได้ผลการทดลองในรูปที่ 25 พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรต่อ pH ในช่วงกว้างคือ ตั้งแต่ 2.5-7.5

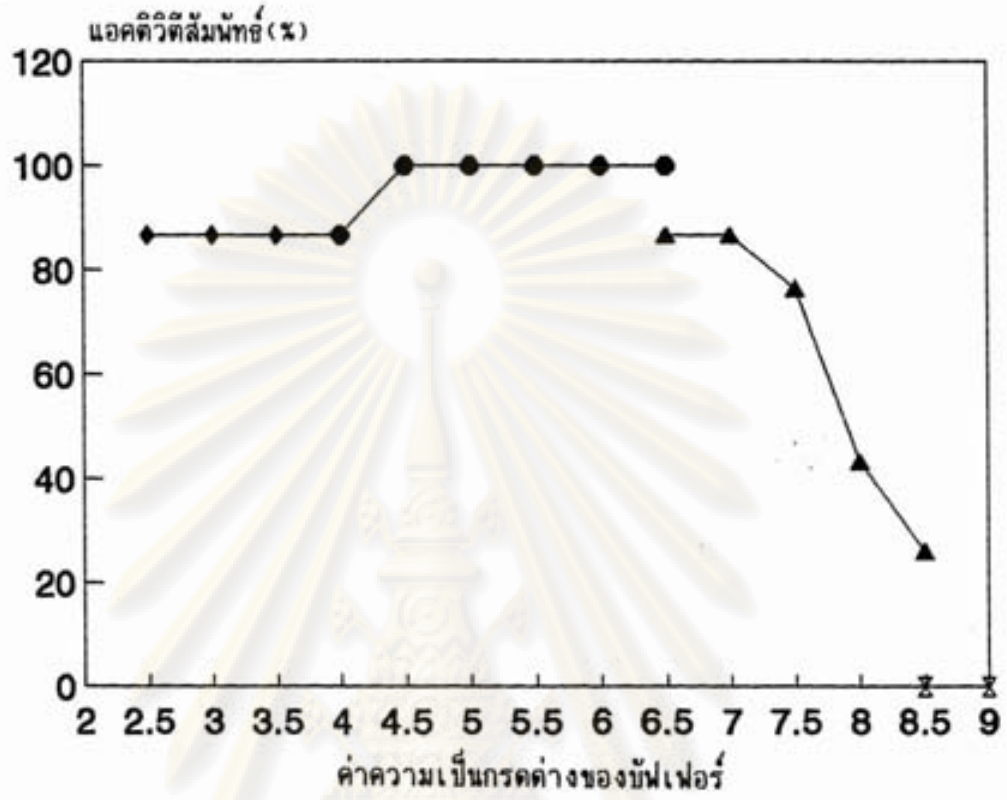
5. ความเข้มข้นของนมพร่องไขมันที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วมาวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 3 โดยใช้นมพร่องไขมันที่ความเข้มข้นต่างๆตั้งแต่ 6-24 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองดังรูปที่ 26 พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้นมพร่องไขมันเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นสับสเตรท



รูปที่ 24 ความเสถียรของเอนไซม์เรนินจาก *R. microsporus* S_1 ต่ออุณหภูมิ โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา30 นาที ตรวจสอบแอคติวิตีที่เหลือตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 3 ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ 13 หน่วย

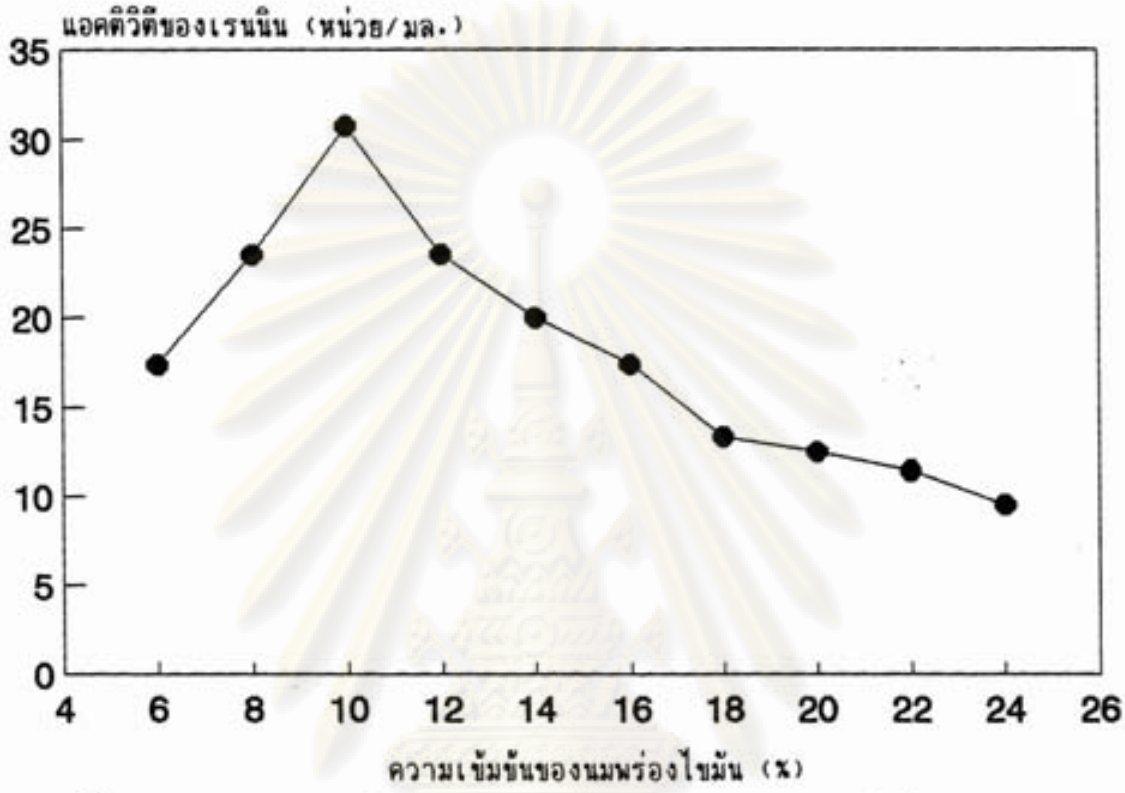
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 25 ความเสถียรของเอนไซม์เรนินจาก *R. microsporus* S_t ต่อค่าความเป็นกรดด่าง โดยบ่มเอนไซม์ 13 หน่วย ที่ pH ต่างๆ โดยใช้บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือ ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 3

- ไกลซีนบัฟเฟอร์
- อะซิเตทบัฟเฟอร์
- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์
- ทริสบัฟเฟอร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 26 ผลของความเข้มข้นของนมพร่องไขมันต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนินจาก *R. microsporus* S_1 การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนิน ทำตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 3 ยกเว้นความเข้มข้นของนมพร่องไขมัน ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการทำงานเอนไซม์

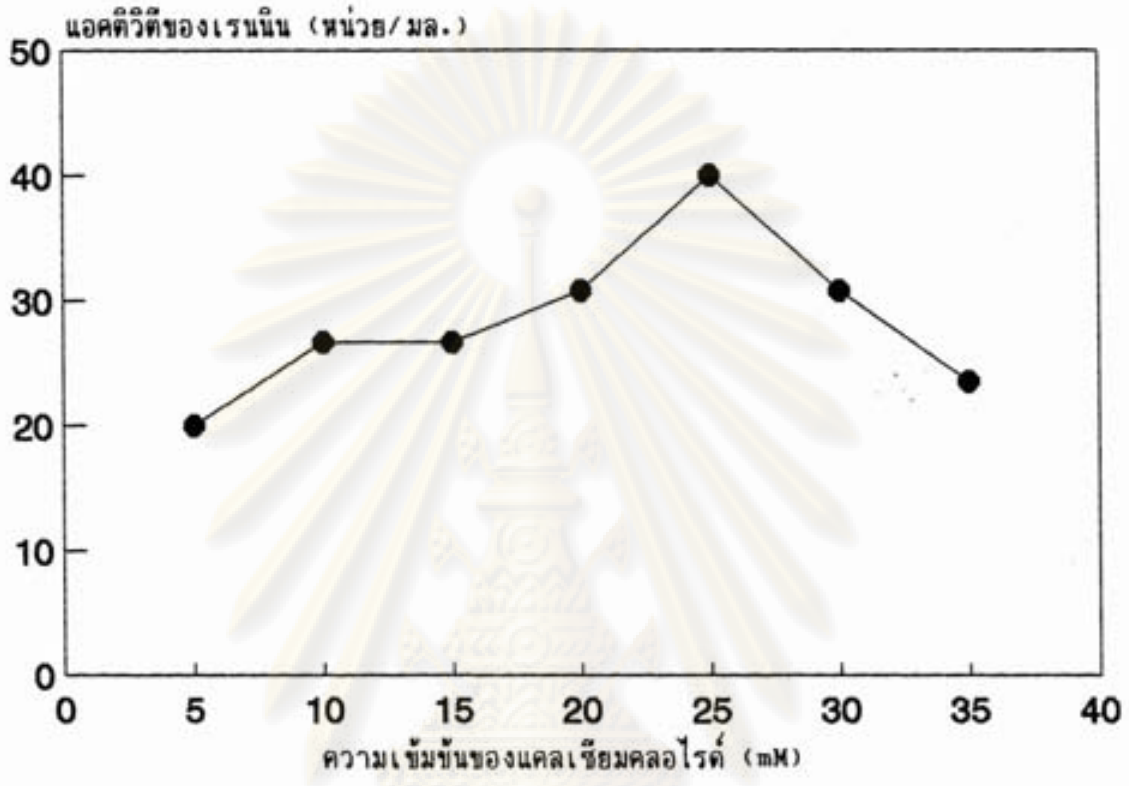
นำสารละลายเอนไซม์มาวัดแอคติวิตี ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 3 โดยใช้แคลเซียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 5 - 35 มิลลิโมลาร์ ผลการทดลองดังรูปที่ 27 พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้แคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์

การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว ปริมาณ 0.01 หน่วย ทำปฏิกิริยากับสารละลายเคซีนในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 30-70 องศาเซลเซียส ตามวิธีการทดลองข้อ 4. ผลการทดลองดังรูปที่ 28 พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดที่ 35 องศาเซลเซียส

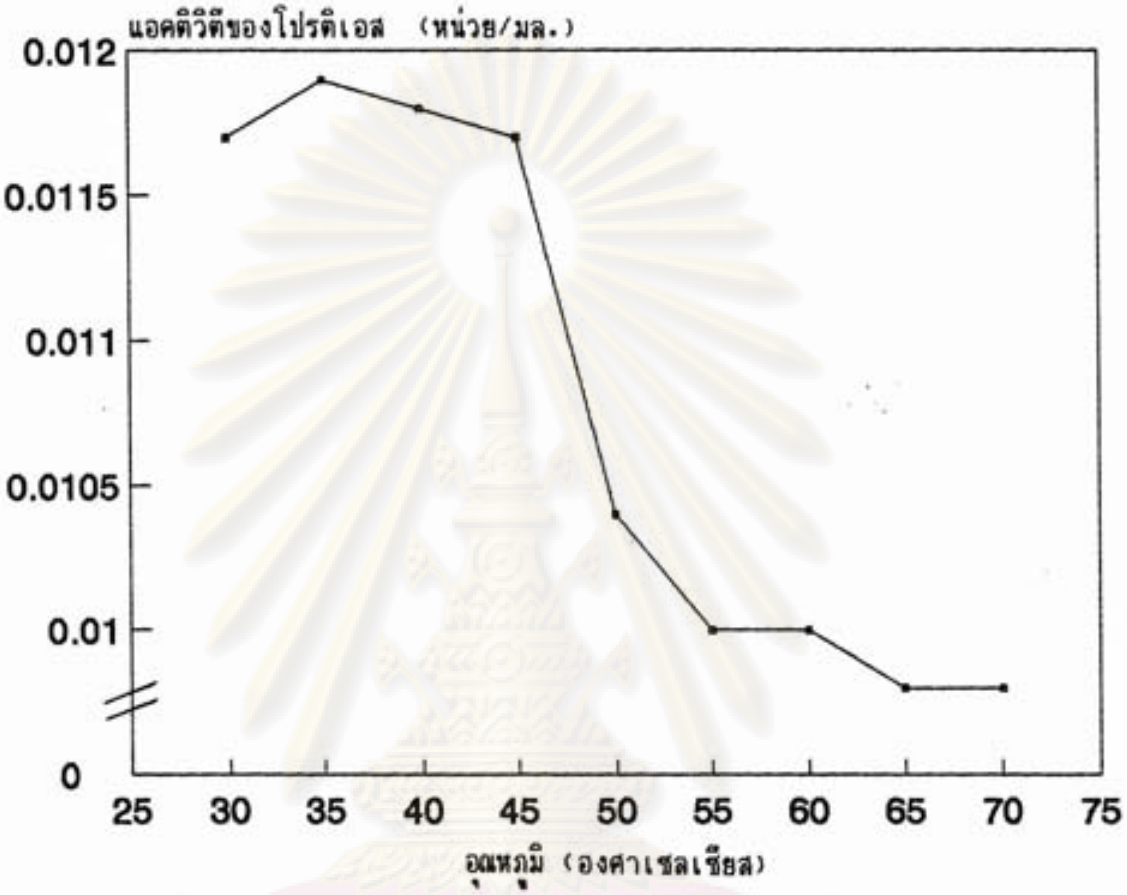
การเปรียบเทียบแอคติวิตีของเรนินและแอคติวิตีของโปรติเอส ของเอนไซม์เรนินจาก *R. microsporus* S_1 กับเอนไซม์จากแหล่งอื่น

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ของ *R. microsporus* S_1 จากแต่ละขั้นของการทำให้บริสุทธิ์มาหาแอคติวิตีของเรนินและโปรติเอสเอนไซม์ตามวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 3 และ 4 เปรียบเทียบกับเอนไซม์เรนินที่ได้จาก *M. pusillus* เอนไซม์เรนเนตจากเยื่อบุกระเพาะลูกวัว และโปรติเอสเอนไซม์อีก 2 ชนิดคือ เปปซินซึ่งเป็นโปรติเอสเอนไซม์ที่ได้จากสัตว์ (หมู) และปาเปนซึ่งเป็นโปรติเอสเอนไซม์ที่ได้จากพืช(มะละกอ) ได้ผล ดังตารางที่ 5 พบว่าในแต่ละขั้นของการทำให้เอนไซม์เรนินจาก *R. microsporus* S_1 บริสุทธิ์ นอกจากแอคติวิตีจำเพาะของเรนินจะเพิ่มขึ้นแล้วแอคติวิตีจำเพาะของโปรติเอสก็เพิ่มขึ้นด้วย แต่อัตราการเพิ่มขึ้นของเรนินเอนไซม์มากกว่าโปรติเอสเอนไซม์ และเมื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีของเรนินจาก *R. microsporus* S_1 กับเอนไซม์ที่ใช้ในทางการค้า พบว่าแอคติวิตีของเรนินจาก *R. microsporus* S_1 ยังต่ำอยู่และในกลุ่มของเอนไซม์ที่ใช้ในทางการค้าทั้ง 4 ชนิดจะเห็นว่าเรนินจาก *M. pusillus* มีแอคติวิตีดีที่สุด รองลงมาคือเปปซิน ส่วนปาเปนพบว่ามีเรนินแอคติวิตีต่ำที่สุด



รูปที่ 27 ผลของความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์เรนินจาก *R. microsporus* S$_t$ การตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์เรนิน ทำตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 3 ยกเว้นความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 28 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส จาก *R. microsporus* S ทำการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ ตามวิธีการในบทที่ 2 ข้อ 4 ยกเว้นอุณหภูมิที่ใช้ทำปฏิกริยา ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ 0.0118 หน่วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบแอคติวิตีของเรนินและแอคติวิตีของโปรติเอส ของเอนไซม์เรนินจาก *Rhizopus microsporus* S$_1$ ในแต่ละขั้นตอนของการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์กับเอนไซม์ที่ใช้ทางการค้า(โดยใช้ปริมาณโปรตีน 0.03 มก./มล.)

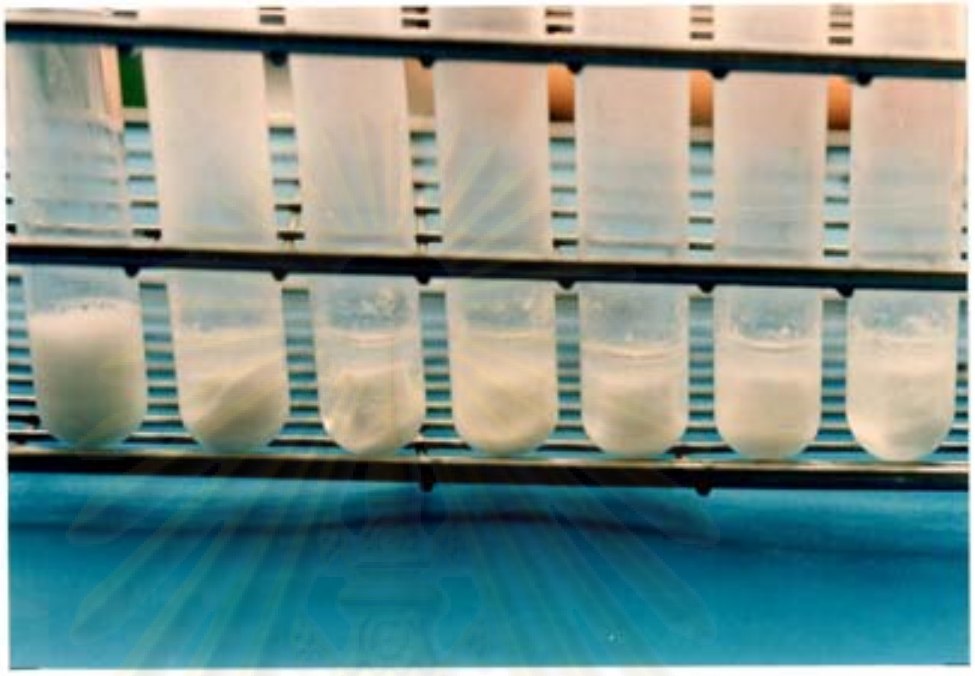
ชนิด	เวลา นาที*(วินาที)*	แอคติวิตีของเรนิน (หน่วยต่อมก.โปรตีน)	แอคติวิตีของโปรติเอส (หน่วยต่อมก.โปรตีน)
เอนไซม์เริ่มต้น	13.40	9.95	0.010
30-75%แอมโมเนียม ซัลเฟต	5.15	25.89	0.031
คอลัมท์ดีอีเออี-โทโย เพิร์ล 650 เอ็ม	1.49	89.48	0.044
คอลัมท์เซฟาเด็กซ์ จี-75	0.56(9)	238.09	0.062
เรนินจาก*M.pusillus*	0.23(7)	579.71	0.076
เรนเนตจากเยื่อบุ กระเพาะลูกวัว	0.38(9)	350.88	0.190
เปปซิน(pepsin)	o.26(12)	512.82	0.064
ปาเปน(papain)	133(20นาที)	1.00	0.122

*หมายถึง ระยะเวลาตั้งแต่เริ่มทำปฏิกริยา จนกระทั่งโปรตีนในนมเริ่มจับตัวเป็นฝ้าข้างหลอดทดลอง

*หมายถึง ระยะเวลาตั้งแต่โปรตีนในนมเริ่มจับตัวกันเป็นฝ้าข้างหลอดทดลอง จนกระทั่งนมแข็งตัวหมด

เมื่อพิจารณาระยะเวลาตั้งแต่นมเริ่มจับตัวกันเป็นฝ้าข้างหลอดทดลอง จนกระทั่งนมแข็งตัวหมด พบว่าเอนไซม์ที่ได้จาก *R. microsporus* S_1 และเยื่อบุกระเพาะลูกวัวมีระยะเวลาเท่ากัน คือ 9 วินาที ส่วนเอนไซม์จาก *M. pusillus* ใช้เวลาเพียง 7 วินาที ในขณะที่เปปซิน และปาเปน ใช้เวลา 12 และ 20 วินาที ตามลำดับ ส่วนลักษณะก้อนนมภายหลังการแข็งตัวพบว่า ก้อนนมที่เกิดจากเอนไซม์เรนนินของ *R.microsporus* S_1 มีลักษณะอยู่ตัวมากกว่าก้อนนมที่เกิดจากเอนไซม์ที่ใช้ในทางการค้าอื่น ๆ ดังรูปที่ 29

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 29 ลักษณะก้อนนมที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับนมพร่องไขมันในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (รายละเอียดตามวิธีการทดลองในบทที่ 2 ข้อ 3)

1. ปาเปน (ปริมาณโปรตีน 0.03 มก./มล.)
2. เปปซิน (ปริมาณโปรตีน 0.03 มก./มล.)
3. เรนเนตจากกระเพาะลูกวัว (ปริมาณโปรตีน 0.03 มก./มล.)
4. เรนินจาก *M.pusillus* (ปริมาณโปรตีน 0.03 มก./มล.)
5. เรนินจาก *R.microsporue* S_1 (ปริมาณโปรตีน 0.03 มก./มล.) (เซฟาเด็กซ์ จี - 75)
6. เรนินจาก *R.microsporue* S_1 (ปริมาณโปรตีน 0.03 มก./มล.) (ดีอีเออี-โทโยเพิร์ล 650 เอ็ม)
7. เรนินจาก *R.microsporue* S_1 (ปริมาณโปรตีน 0.03 มก./มล.) (แอมโมเนียมซัลเฟต 30 ถึง 75 เปอร์เซนต์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผล

ในการแยกเชื้อราจากลูกแป้งสุรา ลูกแป้งกระแช่ และลูกแป้งข้าวหมาก ทั้งหมด 20 ตัวอย่างสามารถแยกเชื้อราได้ทั้งสิ้น 51 สายพันธุ์ โดยเป็นราที่เส้นใยไม่มีผนังกั้น 38 สายพันธุ์ และมีผนังกั้น 13 สายพันธุ์ เมื่อนำราทั้ง 51 สายพันธุ์นี้ไปคัดเทียบโดยเลี้ยงในอาหารเหลววาย-เอ็มผสมนมพร่องไขมัน เพื่อให้นมพร่องไขมันเป็นตัวเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์เรนนิน พบว่ามีอยู่ 2 สายพันธุ์ที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนินสูงเท่ากัน โดยสามารถทำให้นมตกตะกอนกลายเป็นลิ่มนมได้ภายในเวลา 10 นาที คือ *Rhizopus* sp. และ *Chlamydomucor* sp. ซึ่งแยกได้จาก ลูกแป้งข้าวหมาก จังหวัดปทุมธานี และอยุธยา ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

เมื่อนำรา 2 สายพันธุ์นี้ มาเลี้ยงเปรียบเทียบใน อาหารเหลววายเอ็มผสมนมพร่อง-ไขมัน โดยใช้กล้าเชื้ออายุ 2 และ 3 วัน พบว่าอายุของกล้าเชื้อมีผลต่อแอคติวิตีของเรนนินโดย *Rhizopus* sp. กล้าเชื้ออายุ 2 วันให้แอคติวิตีของเรนนินดีกว่าอายุ 3 วัน เนื่องจากลักษณะสปอร์ของ *Rhizopus* sp. อายุ 2 วัน มีสีเทาเข้มแสดงว่า เป็นสปอร์อ่อน มีความพร้อมที่จะ-เจริญ ในขณะที่ *Rhizopus* sp. อายุ 3 วัน สปอร์จะเป็นสีน้ำตาลแสดงว่า เป็นสปอร์ที่แก่เกินไป ความพร้อมในการเจริญจะน้อยกว่าสปอร์อ่อน ดังนั้น *Rhizopus* sp. ที่มีอายุ 2 วันจึงมีแอคติวิตีที่ดีกว่า 3 วัน และให้แอคติวิตีสูงสุดในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ ส่วน *Chlamydomucor* sp. พบว่า กล้าเชื้ออายุ 3 วัน ให้แอคติวิตีดีกว่ากล้าเชื้ออายุ 2 วัน เพราะรานี้สร้าง chlamydospore ซึ่งเป็นสปอร์ที่มีผนังหนางอกได้ช้ากว่า sporangiospore ซึ่งมีเป็นส่วนน้อย ทำให้ *Chlamydomucor* sp.ที่มีอายุ 2 วัน มีจำนวนสปอร์ที่งอกเป็นเส้นใยพร้อมจะเจริญเติบโตน้อยกว่า *Chlamydomucor* sp.ที่มีอายุ 3 วัน ซึ่ง chlamydospore งอกออกเป็นเส้นใยมากขึ้น ทำให้ *Chlamydomucor* sp. ที่มีอายุ 3 วันมีแอคติวิตีดีกว่ากล้าเชื้อที่มีอายุ 2 วัน และให้แอคติวิตีมาก ในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเท่ากับ 0.26 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน แต่ก็ยังน้อยกว่า *Rhizopus* sp.ที่มีอายุ 2 วันในวันที่ 4 ของการเลี้ยงซึ่งมีแอคติวิตีเท่ากับ 0.36 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อพิจารณาแอคติวิตีของโปรติเอสระหว่าง *Rhizopus* sp.กับ *Chlamydomucor* sp.พบว่า *Chlamydomucor* sp. มีแอคติวิตี

ของโปรติเอสมากกว่าดังแสดงในตารางที่ 2 ดังนั้นจึงเลือก *Rhizopus* sp. เพื่อใช้ศึกษาการผลิตเอนไซม์เรนินต่อไป

เมื่อศึกษาลักษณะของ *Rhizopus* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พร้อมทั้งส่งไปจำแนกชนิดของสายพันธุ์ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติพบว่า ราที่คัดเทียบได้นี้ คือ *Rhizopus microsporus* S_1 (รูปที่ 2)

ผลการเปรียบเทียบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อรา 7 ชนิดที่ศึกษามีเพียง 4 ชนิดที่ *Rhizopus microsporus*.S_1 สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์เรนินได้ คือ วายเอ็ม วายเอ็มผสมนมพร่องไขมัน น้ำแช่ข้าวโพดผสมแลคโตสและแป้งสาลี โดยแป้งสาลีเป็นอาหารที่เมื่อเลี้ยง *Rhizopus microsporus* S_1 แล้ว มีแอคติวิตีของเรนินและสัดส่วนของแอคติวิตีของเรนินต่อแอคติวิตีของโปรติเอสสูงที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 10 และในการศึกษาผลของอาหารแต่ละชนิด ทำให้ทราบปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เรนินของ *Rhizopus microsporus* S_1 ดังนี้คือ

1.*Rhizopus microsporus* S_1 สามารถสร้างเอนไซม์เรนินได้ถึงแม้จะไม่มีสารเหนี่ยวนำในอาหาร แต่ถ้ามีการเติมสารเหนี่ยวนำลงไปในที่นี้คือ นมพร่องไขมัน *Rhizopus microsporus* S_1 จะสร้างเอนไซม์เรนินได้ไวและมากกว่าเดิม ซึ่งเป็นผลที่ได้จากการเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์เรนินจากอาหารวายเอ็ม และวายเอ็มผสมนมพร่องไขมัน (รูปที่ 3 และ 4)ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Mashaly และคณะ(1986)ที่ศึกษา *Mucor pusillus* และพบว่า สารเหนี่ยวนำมีผลต่อการสร้างเอนไซม์เรนินโดยการเติมเคซีน โบวินซีรั่ม อัลบูมิน หรือ อิโมโกลบิน ลงในอาหาร ทำให้แอคติวิตีของเรนินสูงขึ้น โดยเฉพาะเคซีน 0.5 % จะทำให้แอคติวิตีของเรนินสูงที่สุด และจากรายงานของ Kolaczkowska และคณะ (1988) ที่ศึกษา *Fusarium moniliforme* ก็พบว่าเคซีนกระตุ้นการสร้างเอนไซม์เรนิน ส่วน Thakur และคณะ (1990) ศึกษารา *Mucor miehei* พบว่าการเติมนมผงพร่องไขมัน 1 เปอร์เซนต์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้แอคติวิตีของเรนินสูงขึ้น

นอกจากนี้ยังพบว่า นมพร่องไขมันช่วยควบคุม pH ในระหว่างการเลี้ยงไม่ให้เปลี่ยนแปลงมาก โดยพบว่าในอาหาร วายเอ็มผสมนมพร่องไขมัน pH ในระหว่างการเลี้ยงจะคงที่มากกว่าในอาหาร วายเอ็ม ซึ่งการที่นมพร่องไขมันช่วยให้ pH ของการเลี้ยงคงที่นี้อาจเนื่องมาจากนมพร่องไขมัน มีแคลเซียมเคซีนเนตเป็นองค์ประกอบเมื่ออยู่ในสภาพสารละลาย จึงมีสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ ทำให้ pH ในการเลี้ยงไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงดังรายงานของ Abdel-Fattah และคณะ (1974)

2.เรนนินจาก *Rhizopus microsporus* S_t เป็น acid protease ซึ่งจะสร้างและทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดโดยจะเห็นได้จากอาหารที่ *Rhizopus microsporus* S_t สามารถสร้างเอนไซม์เรนนิน คือ วายเอ็ม วายเอ็มผสมนมพร่องไขมัน น้ำแช่ข้าวโพดผสมแลคโตส และแป้งสาลี pHในระหว่างการเลี้ยงค่อนข้างจะเป็นกรด ส่วนอาหาร ซูโครส ซูโครสผสมนมพร่องไขมัน และนมพร่องไขมัน ซึ่ง *Rhizopus microsporus* S_t ไม่สร้างเอนไซม์เรนนิน pH ในระหว่างการเลี้ยงจะเป็นกลางถึงด่าง (รูปที่ 2 ถึง 8) ซึ่งมีรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์เรนนินที่สร้างจากราหลายสายพันธุ์ว่าเป็น acid protease ได้แก่ *Mucor miehei*(Smith และ Yada,1991) *Rhizomucor miehei*(Bailey และ Siikasho,1988) *Mucor pusillus* (Mashaly และคณะ,1987) *Irpx lacteus*(Kobayashi และคณะ,1983) และ *Endothia parasitica* (Whitaker,1970) เป็นต้น

3.แหล่งคาร์บอนมีอิทธิพลต่อการเจริญ และการสร้างเอนไซม์เรนนิน มากกว่าแหล่งไนโตรเจน โดยจากการเลี้ยง *Rhizopus microsporus* S_t ในอาหารซูโครส (รูปที่ 5) พบว่า *Rhizopus microsporus* S_t ไม่สร้างเรนนิน และน้ำหนักแห้งน้อย ซึ่งเมื่อพิจารณาองค์ประกอบของอาหาร จะเห็นว่ามีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว ส่วนแหล่งไนโตรเจนคล้ายกับอาหารวายเอ็ม ดังนั้นการที่ *Rhizopus microsporus* S_t ไม่สร้างเรนนินอาจเนื่องมาจาก รานี้ไม่มีเอนไซม์อินเวอร์เตส จึงไม่สามารถย่อยซูโครสให้เป็นฟรุกโตส และกลูโคสเพื่อนำไปใช้ได้ จึงใช้เพียงแหล่งไนโตรเจน ทำให้ได้น้ำหนักแห้งน้อย

เมื่อเลี้ยง *Rhizopus microsporus* S_t ในอาหารซูโครสผสมนมพร่องไขมัน(รูปที่ 6)ซึ่งเป็นการเติมนมพร่องไขมันลงไปเหนี่ยวนำพบว่าเชื้อก็ยังไม่สร้างเรนนินแสดงว่า สภาวะในการเลี้ยงมีผลต่อการสร้างเรนนินมากกว่าการเหนี่ยวนำ เพราะในอาหารซูโครสผสมนมพร่องไขมัน pH ระหว่างการเลี้ยงเป็นด่าง แต่การเติมนมพร่องไขมันทำให้ได้น้ำหนักแห้งมากขึ้น

ขณะที่เมื่อเลี้ยง *Rhizopus microsporus* S_t ในอาหารนมพร่องไขมัน(รูปที่ 7)ซึ่งมีนมพร่องไขมันอยู่มากถึง 5 เปอร์เซนต์ และมีเด็กโทรสอยู่ 0.2 เปอร์เซนต์ พบว่าเชื้อไม่สร้างเอนไซม์เรนนินแต่มีน้ำหนักแห้งมากกว่าอาหารชนิดอื่น แสดงว่า เชื้อนี้ใช้เด็กโทรสได้ แต่เนื่องจากเด็กโทรสมีปริมาณน้อย และในอาหารมีสารอาหารประเภทโปรตีนอยู่แล้ว เชื้อจึงใช้เด็กโทรสในการเจริญมากกว่าที่จะสร้างเอนไซม์เรนนิน จากการศึกษาอาหารนี้ ทำให้แน่ใจได้ว่า แหล่งคาร์บอนมีผลต่อการสร้างเอนไซม์เรนนิน มากกว่าแหล่งไนโตรเจน

4. *Rhizopus microsporus* S_t สร้างเอนไซม์เรนินได้ดี ในอาหารที่เป็นสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อน จากการเลี้ยง *Rhizopus microsporus* S_t ในอาหารทั้ง 7 ชนิด พบว่า *Rhizopus microsporus* S_t สร้างเอนไซม์เรนินได้ดีที่สุด ในอาหารแป้งสาลี 2 เปอร์เซนต์ รองลงมาคือ อาหารน้ำแช่ข้าวโพดผสมแลคโตส (รูปที่ 8 และ 9) ซึ่งแป้งสาลี และน้ำแช่ข้าวโพด เป็นสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อน โดยแป้งสาลีประกอบด้วยแป้งเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก และ *Rhizopus microsporus* S_t เป็นราที่แยกได้จากลูกแป้ง ดังนั้นจึงมีเอนไซม์อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส ย่อยแป้งให้กลายเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ และกลูโคสที่พร้อมจะนำไปใช้ได้ (นภา ,2535) นอกจากนี้ภายในแป้งยังประกอบด้วย กรดอะมิโน และเกลือแร่ที่เพียงพอ (Fennema ,1970) ต่อการเจริญของเชื้อ ส่วนน้ำแช่ข้าวโพดประกอบด้วยกรดอะมิโนต่าง ๆ เป็นส่วนใหญ่ และมีแป้งปนอยู่ด้วย ซึ่งก็เพียงพอต่อการเจริญของเชื้อเช่นกัน และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างอาหารสองชนิดนี้จะเห็นว่าแหล่งคาร์บอนมีอิทธิพลต่อการสร้างเอนไซม์เรนินมากกว่าแหล่งไนโตรเจน ซึ่งสนับสนุนแนวคิดในข้อ 3 โดยแป้งสาลีเป็นอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนคือ แป้งเป็นส่วนใหญ่ และ *Rhizopus microsporus* S_t สามารถผลิตเอนไซม์เรนินในอาหารแป้งสาลีนี้ได้มากที่สุด มากกว่าในอาหารน้ำแช่ข้าวโพดผสมแลคโตส ที่มีสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อน ประเภทไนโตรเจน เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งบทสรุปในข้อนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Abdel-Fattah และ Saleh (1988) ที่พบว่า สารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อน (complex organic compounds) เป็นอาหารที่เสริมการสร้างเอนไซม์เรนินของ *Aspergillus versicolor*

เมื่อเลี้ยง *Rhizopus microsporus* S_t ในอาหารโดยเปลี่ยนแป้งสาลีเป็นแป้งข้าวจ้าวและรำข้าว พร้อมทั้งเติมสารละลายชาเพคตอกซ์ เป็นตัวแทนของเกลือแร่ และแบคโตเปปโตน 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นตัวแทนของแหล่งไนโตรเจนเทียบกับเมื่อไม่เติม พบว่า รำข้าว 2 เปอร์เซนต์ ในน้ำกลั่นที่ไม่เติมสารละลาย ชาเพคตอกซ์ และแบคโตเปปโตนให้แอคติวิตีของเรนินสูงที่สุด คือเท่ากับ 6.16 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังรูปที่ 11 และมีอัตราส่วนของแอคติวิตีของเรนินต่อแอคติวิตีของโปรตีเอสสูงที่สุด เท่ากับ 880 ดังรูปที่ 12 เนื่องจากในรำข้าวมีสารอาหารต่าง ๆ อยู่ครบถ้วนอยู่แล้ว โดยมีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน กรดอะมิโนต่าง ๆ เป็นแหล่งไนโตรเจน รวมทั้งมีพวกเกลือแร่ และวิตามินอยู่ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Somkuti และ Babel(1967) ที่เลี้ยง *Mucor pusillus var.Lindt* ในอาหารรำข้าว 4 เปอร์เซนต์ พบว่า เมื่อเติมกลูโคสลงไปในอาหาร เชื้อจะเพิ่มเส้นใย แต่ปริมาณเอนไซม์ลดลง

เมื่อแปรผันความเข้มข้นของรำข้าวพบว่า รำข้าวเข้มข้น 3 เปอร์เซนต์ *Rhizopus microsporus* S_t สามารถผลิตเอนไซม์เรนินได้สูงสุด (รูปที่ 13) จึงใช้อาหารรำข้าว 3 เปอร์เซนต์ ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์เรนินต่อไป ซึ่งพบว่า pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7.3 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เรนินของ*Rhizopus microsporus* S_t ได้แอคติวิตีของเรนินสูงสุดในวันที่ 5 ของการเลี้ยงคือได้เท่ากับ 10.08 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในขณะที่วันที่ 4 ได้แอคติวิตีของเรนินต่ำลงมาเล็กน้อยคือ เท่ากับ 10 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนแอคติวิตีของโปรติเอสในวันที่ 4 และ 5 ของการเลี้ยงมีค่าเท่ากัน คือ 0.012 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังนั้นในการศึกษาขั้นต่อไปคือ การทำให้เอนไซม์เรนินบริสุทธิ์จะใช้น้ำเลี้ยงเชื้อของวันที่ 4 ส่วน pHในระหว่างการเลี้ยงพบว่ามีค่าประมาณ 4 ถึง 5 ขณะที่น้ำหนักแห้ง และปริมาณโปรตีนมีค่าประมาณ 9-9.6 และ 1.2-1.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 16)

ขั้นตอนต่อมาที่ศึกษาคือ การทำเอนไซม์เรนินให้บริสุทธิ์ โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 30-75 เปอร์เซนต์ พบว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้น 2.6 เท่าเมื่อเทียบกับแอคติวิตีจำเพาะในสารสกัดเอนไซม์เริ่มต้น และยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ประมาณ 45 เปอร์เซนต์ ดังแสดงในตารางที่ 4 นำเอนไซม์ที่ได้นี้มาผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-โทโยเพิร์ล 650 เอ็ม จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 800 มิลลิโมลาร์ใน 0.05 โมลาร์ อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 5.5 ให้ผลดังรูปที่ 17 พบโปรตีนที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์เรนินเพียงยอดเดียว และจะถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 550 ถึง 600 มิลลิโมลาร์ เมื่อรวมสารละลายเอนไซม์เข้าด้วยกัน วัดแอคติวิตีรวมของเอนไซม์ได้เท่ากับ 3809.52 หน่วย มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9.01 เท่า และมีปริมาณเอนไซม์เหลือ 16.52 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4) สรุปได้ว่า เอนไซม์เรนินจาก *Rhizopus microsporus* S_t มีประจุเป็นลบค่อนข้างสูง เนื่องจากถูกชะออกมาที่ช่วงความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ค่อนข้างสูง (550-600 มิลลิโมลาร์)

เมื่อรวมสารละลายเอนไซม์ดังกล่าวเข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำโครมาโตกราฟีบนเซฟาเด็กซ์ จี-75 และชะล้างคอลัมน์ด้วย 0.05 โมลาร์ อะซิเตด pH 5.5 พบว่า ยอดของโปรตีนที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์เรนินมีเพียงยอดเดียว (รูปที่ 18) เมื่อรวมสารละลายของเอนไซม์เข้าด้วยกันพบว่ามีแอคติวิตีรวม 2526.24 หน่วย ซึ่งจะเห็นว่าแอคติวิตีรวมลดลงเมื่อ

เทียบกับหลังจากผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-โทโยเพิร์ล 650 เอ็ม แต่แอคติวิตีจำเพาะจะเพิ่มจากเดิม 89.68 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนเป็น 237.43 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจากเดิม (สารสกัดเอนไซม์) 23.86 เท่าและมีปริมาณเอนไซม์เหลือ 10.95 เปอร์เซนต์ เมื่อนำเอนไซม์จากขั้นตอนต่าง ๆ คือ สารสกัดเอนไซม์ สารละลายหลังจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 30 ถึง 75 เปอร์เซนต์ สารละลายหลังผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-โทโยเพิร์ล 650 M และสารละลายหลังผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75 มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยทำอิเลคโตรโฟริซิส บนโพลีอะคริลาไมด์เจล พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น ตามลำดับ โดยจำนวนแถบโปรตีนที่ปรากฏจะลดลง และในขั้นตอนสุดท้าย ปรากฏแถบโปรตีน 2 แถบ อยู่ชิดกัน (รูปที่ 19) จากการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ ไม่พบแอคติวิตีของเรนินจากทั้งสองแถบ สันนิษฐานว่า เกิดจากทริสไกลซีนบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทำอิเลคโตรโฟริซิส ซึ่งมีค่าความเป็นด่างสูงถึง 8.3 ทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในข้อ 9.4 ของงานวิจัยนี้ที่พบว่าทริสบัฟเฟอร์ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยการทำอิเลคโตรโฟริซิสบนเอสดีเอสโพลีอะคริลาไมด์เจล เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่า เอนไซม์เรนินจาก *Rhizopus microsporus* S$_1$ มีสองโมเลกุล และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 18,000 และ 19,000 ดาลตัน (รูปที่ 20 และ21) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเรนินจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นพบว่า เรนินเอนไซม์จากราแต่ละชนิดมีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน โดย Smith และ Yada(1991)ได้ศึกษาเอนไซม์เรนินจาก *Mucor miehei* พบว่า เรนิน 1 และเรนิน 2 มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 48,000 และ 42,000 ดาลตัน เมื่อวิเคราะห์โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-25 และโรโตฟอร์พรีแพราทีฟ ไออีเอฟ ตามลำดับ

Mashaly และคณะ(1987)พบว่า เอนไซม์เรนินจาก *Mucor pusillus* มีน้ำหนักโมเลกุล 29,000 ดาลตัน โดยศึกษาจากคอลัมน์อัลตร้าเจล เอซี-เอ-44

Kobayashi และคณะ(1983)ศึกษาเอนไซม์เรนินจาก *Irpex lacteus* พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 36,000 ดาลตัน โดยหาน้ำหนักโมเลกุลจาก Sephadex G-100 และ SDS-PAGE

Whitaker และคณะ(1970)ศึกษา *Endothia parasitica* พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 37,500 และ 34,000 จากการผ่านเอนไซม์ลงคอลัมน์ Sephadex G-100 และไบโอเจล พี-100 ตามลำดับ

สำหรับการศึกษาสมบัติของเรนนินจาก *Rhizopus microsporus* S_1 พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 55 องศาเซลเซียส แต่มีความเสถียรต่อความร้อนในเวลา 30 นาทีได้เพียง 40 องศาเซลเซียส โดยที่ 45 และ 50 องศาเซลเซียส แอคติวิตีลดลงเหลือ 70-85 เปอร์เซ็นต์ และแอคติวิตีจะหมดอย่างสิ้นเชิงที่ 55 องศาเซลเซียส ดังรูปที่ 22 และ 24 ซึ่งมีรายงานเกี่ยวกับการที่เอนไซม์เรนนินมีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่ต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน ได้แก่

Mashaly และคณะ (1987) ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เรนนินจาก *Mucor pusillus* พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คือ 50 องศาเซลเซียส แต่เสถียรถึงแค่ 45 องศาเซลเซียส

Abdel-Fattah และ Amr(1987) ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์เรนนินจาก *Pen. expansum* พบว่า เสถียรถึงอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แต่วัดแอคติวิตีได้สูงสุดที่ 52 องศาเซลเซียส

Park และคณะ(1985) พบว่า เอนไซม์เรนนินที่สร้างจากแบคทีเรียที่แยกได้จากดินมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 75 องศาเซลเซียส แต่มีความเสถียรถึงแค่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นต้น

การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสพบว่าอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่ pH 7.0 ให้แอคติวิตีของโปรติเอสสูงสุด ดังรูปที่ 28 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mashaly และคณะ(1987) ที่ศึกษา *M. pusillus* พบว่าแอคติวิตีของโปรติเอสสูงสุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ส่วน pH พบว่า เอนไซม์เรนนินจาก *Rhizopus microsporus* S_1 สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดและเสถียรในช่วง pH ที่กว้างคือ 2.5-7.5 ซึ่งสอดคล้องกับบทสรุปของงานวิจัยในตอนต้นที่พบว่า เอนไซม์นี้เป็น acid protease ซึ่งจะถูกสร้างและทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด และชนิดของบัฟเฟอร์ก็มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ (รูปที่ 23, 25) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Osman และคณะ(1969)ที่ศึกษาเอนไซม์เรนนินใน *A.niger* และพบว่า ชนิดของบัฟเฟอร์มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โดย อะซิเตทบัฟเฟอร์ เพิ่มแอคติวิตีของเรนนิน ในขณะที่ ซิเตรทฟอตเฟตบัฟเฟอร์ ลดแอคติวิตีของเรนนิน จากงานวิจัยนี้พบว่าอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 4.5 ละลายนมพร่องไขมันแล้วส่วนผสมของปฏิกิริยามี pH เท่ากับ 5.8 เหมาะสมที่สุด จากรายงานที่ผ่านมา ในปี 1991 Smith และ Yada ศึกษา *Mucor miehei*

พบว่า เรนนิน 1 และ เรนนิน 2 มีสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานคือ 4 และ 5.5 ตามลำดับ และมีความเสถียรในช่วงที่กว้างคือ 2-7.5

Mashaly และคณะ (1987) พบว่า เรนนินจาก *Mucor pusillus* มี pH ที่เหมาะสมในการทำงานเท่ากับ 5-5.5 และมีความเสถียรของ pH อยู่ในช่วง 3-6

Kobayashi และคณะ (1983) ศึกษา *Irpex lacteus* พบว่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเรนนิน A และเรนนิน B คือ 3 และ 2.9 ตามลำดับ และมีความเสถียรของ pH อยู่ในช่วง 3-5 และ 3-6 ตามลำดับ

เมื่อศึกษาความเข้มข้นของนมพร่องไขมันที่เหมาะสมในการใช้เป็นสับเตรท พบว่า นมพร่องไขมันเข้มข้น 10 เปอร์เซนต์เหมาะสมที่สุด (รูปที่ 26) ต่างจากงานวิจัยของ Abdel-Fattah และ Amr(1987) ที่ศึกษา *Penicillium expansum* พบว่า นมพร่องไขมัน 8 เปอร์เซนต์ เหมาะสมที่สุด ส่วนความเข้มข้นของ $CaCl_2$ ที่เหมาะสมในงานวิจัยนี้ พบว่าเท่ากับ 25 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 27) ซึ่งต่างจากงานวิจัยของ Nand และ Rao (1989) ที่ศึกษา *Rhizopus oligosporus* พบว่า $CaCl_2$ เข้มข้น 30 มิลลิโมลาร์ เหมาะสมที่สุด ขณะที่ Foda (1981) พบว่าเอนไซม์จาก *Aspergillus niger* ทำงานได้ดีเมื่อใช้ $CaCl_2$ เข้มข้น 80 มิลลิโมลาร์

การเปรียบเทียบ แอคติวิตีของเรนนิน และแอคติวิตีของโปรติเอสของเอนไซม์เรนนินจาก *Rhizopus microsporus* S_1 กับเอนไซม์จากแหล่งอื่น (ตารางที่ 5) พบว่า ในแต่ละขั้นตอนของการทำให้เอนไซม์เรนนินจาก *Rhizopus microsporus* S_1 บริสุทธิ์ นอกจากแอคติวิตีจำเพาะของเรนนินจะเพิ่มแล้ว แอคติวิตีจำเพาะของโปรติเอสก็เพิ่มขึ้นด้วย แต่อัตราการเพิ่มขึ้นของเรนนินเอนไซม์มากกว่าโปรติเอสเอนไซม์ และเมื่อเปรียบเทียบแอคติวิตีของเรนนินจาก *Rhizopus microsporus* S_1 กับเอนไซม์ที่ใช้ในทางการค้า พบว่า แอคติวิตีของเรนนินจาก *Rhizopus microsporus* S_1 ยังต่ำอยู่ และในกลุ่มของเอนไซม์ที่ใช้ในทางการค้าทั้ง 4 ชนิด จะเห็นว่าเรนนินจาก *Mucor pusillus* มีแอคติวิตีดีที่สุด รองลงมาคือ เปปซิน ส่วนปาเปนพบว่า มีแอคติวิตีของเรนนินต่ำสุด

เมื่อพิจารณาระยะเวลาตั้งแต่โปรตีนในนมเริ่มจับตัวกันเป็นฝ้าข้างหลอดทดลอง จนกระทั่งแข็งตัวหมด พบว่าเอนไซม์ที่ได้จาก *Rhizopus microsporus* S_1 และเยื่อบุกระเพาะลูกวัวมีระยะเวลาเท่ากันคือ 9 วินาที ส่วนเอนไซม์ที่ได้จาก *M. pusillus* ใช้เวลาเพียง 7 วินาที ในขณะที่เปปซิน และปาเปน ใช้เวลา 12 และ 20 วินาที ตามลำดับ ส่วนลักษณะลิ่มนม

ภายหลังการแข็งตัวพบว่า ลิ่มนมที่เกิดจากเอนไซม์เรนนินของ *Rhizopus microsporus* S. มีลักษณะอยู่ตัวมากกว่าลิ่มนมที่เกิดจากเอนไซม์ที่ใช้ในทางการค้าอื่น ๆ (รูปที่ 29) เนื่องจากมีโปรติเอสเอนไซม์ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนโดยรวมอยู่น้อย ถือเป็นลักษณะของเอนไซม์เรนนินที่ดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

นภา โล่ห์ทอง. ลูกแป้ง. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. กรุงเทพมหานคร: พันนี่พับบลิชชิ่ง, 2535

ปราณี อ่านเปรื่อง. เรนนินดริงรูปสำหรับอุตสาหกรรมเนยแข็ง. เอนไซม์ทางอาหารตอนที่ 2. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2534.

ภาษาอังกฤษ

Abdel-Fattah, A.F., and Amr, A.S. Preparation and some properties of a partially purifed rennin - like enzyme from *Penicillium expansum*. Biol.Wastes. 20 (1987): 35-41.

_____,El-Hawwary, N.M., and Amr, A.S. Studies on the production of milk clotting enzymes, proteolytic enzymes and mucilage by fungi. J.Gen.Microbiol. 84 (1974): 327-331.

_____,Ismail, A.S., and El-Aassar, S.A. Production of rennin - like enzyme by Absidia cylindrospora. Agri.waste 11 (1984):125-131.

_____, Mabrouk, S.S., and El - Hawwary, N.M. Production and some properties of rennin - like milk - clotting enzyme from *Penicillium citrinum*. J.Gen.Microbiol. 70 (1972): 151-155.

_____, and Saleh, S.A. Properties of milk - clotting enzyme from *Aspergillus versicolor* and isolation of rennin like enzyme. Biol.Wastes. 25 (1988): 109-115.

Arima. K., Yu, J., and Iwasaki, S. Milk clotting enzyme from *Mucor pusillus var.Lindt*. Methods in Enzymology. 19 (1970): 446-461.

Arnon, R. Method in Enzymology. 19 (1970): 226, cited by Ernstrom, C.A., and Wong, N.P. Milk clotting enzymes and cheese chemistry. In N.P. Wong, R.Jenness, M.Keeney, and E.H.Marth (eds.), Fundamentals of dairy chemistry, pp. 663 - 771. New York: Van Nostrad Reihold co., 1988.

Bailey, M.J., and Siika-aho, M. Production of microbial rennin. Biot. lett. 10 (1988): 161-166.

Berridge, N.J. Some observations on the determination of the activity of rennet. Analyst Lond. 77 (1952):57-63.

Campos, R., Guerra, R., Aguilar, M., Ventura, O., and Camacho, L. Chemical characterization of protease extracted from wild thistle (*Cynara cerduncu(us*) Food Chem. 35 (1990): 89-97.

Ernstrom, C.A., and Wong, N.P. Milk clotting enzymes and cheese chemistry. In N.P. Wong, R. Jenness, M. Keeney, andE.H. Marth (eds.), Fundementals of dairy chemistry. pp.663 - 771. New York: Van Nostrand Reihold Co., 1988.

Fennema, O.R. Principles of food sciences, part 1, food chemistry. New York: Mercel Dekker Inc., 1976, อ้างถึงใน คคิเกษม ทองธงค์ และพรรณี เดชกำแหง. เคมีอาหารเบื้องต้น. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, 2530. หน้า 85-109.

Foda, M.S. Characterization of rennin - like enzyme produced in submerged cultures of *Aspergillus niger*. Zentralbl.Bakteriol. Parasitenkd.Infektionskv.Hyg. Zweite.Naturwiss.Abt.Mikrobiol landwirtsch.Technol.Umweltschutzes. 136 (1981): 219-224.

Foltmann, B. Methods in Enzymology. 19(1970): 421, cited by Ernstrom, C.A., and Wong, N.P. Milk clotting enzymes and cheese chemistry. In N.P. Wong, R. Jenness, M. Keeney, and E.M.Marth (eds.), Fundamentals of dairy chemistry, pp.663 - 771. New York: Van Nostrand Reihold co., 1988.

_____, FEBS Lett. 17 (1971a): 87, cited by Ernstrom, C.A., and Wong, N.P. Milk clotting enzymes and cheese chemistry. In N.P. Wong, R. Jenness, M. Keeney, andE.M.Marth(eds.), Fundamentals of dairy chemistry, pp. 663 - 771. New York: Van Nostrand Reihold co., 1988.

_____, B. Milk protein,Chemistry and Molecular Biology. 136(1971b): 217, cited by Ernstrom, C.A., and Wong, N.P. Milk clotting enzymes and cheese chemistry. In N.P. Wong, R. Jenness, M. Keeney, and E.M. Marth (eds.), Fundamentals of dairy chemistry, pp.663 - 771. New York: Van Nostrand Reihold co., 1988.

_____, B. Jensen, A.L., Lonblad, P., Smidt, E., and Axelsen, N.H. A developmental analysis of the production of chymosin EC-3.4.23.4 and pepsin EC-3.4.23.1 in pigs. Comp. Biochem. Physiol.B Comp.Biochem. 68 (1981): 9-14

Fryer, T.F. Dairy Sci Abstr. 31 (1969): 471, cited by Ernstrom, C.A., and Wong, N.P. Milk clotting enzymes and cheese chemistry. In N.P. Wong, R. Jenness, M. Keeney, and E.M. Marth (eds.), Fundamentals of dairy chemistry, pp.663 - 771. New York: Van Nostrand Reihold co., 1988.

Ismail, A-M.S., El-Aassar, S.A., and Abdel-Fattah, A.F. Production of milk clotting and proteolytic enzymes by fungi. Agri.Wastes. 10 (1984): 95-102.

Jenness, R., and Patton, S. Principles of dairy chemistry. New York: Robert E. Krieger Publishing co., 1976, อ้างถึงใน นรินทร์ ทองศิริ. เทคโนโลยีอาหารนม. เชียงใหม่: โรงพิมพ์คาว คอมพิวกราฟิค, 2531. หน้า 23.

Jensen, T., Axelsen, N.H., and Foltmann, B. Isolation and partial characterization of pro chymosin and chymosin EC-3.4.23.4 from cat. Biochim.Biophys. Acta. 705 (1982): 244-256.

Jiao, Q., Qian, S., and Meng, G. Biosynthesis and properties of milk clotting enzyme from *Mucor pusillud*. Acta.Microbiol.Sin. 32 (1992): 30-35.

Jolles, J., Alais, C., and Jolles, P. Biochim. Biophys. Acta. 168 (1968): 591, cited by Ernstrom, C.A., and Wong, N.P. Milk clotting enzymes and cheese chemistry. In N.P. Wong, R. Jenness, M. Keeney, and E.M. Marth (eds.), Fundamentals of dairy chemistry, pp.663-771. New York: Van Nostrand Reihold co., 1988.

Kawai, M., and Mukai, N. Studies on milk clotting enzymes produced by basidiomycetes. Agric.Biol.Chem. 34 (1970): 159-163.

Keay, L., and Wildi, B.S. Proteases of the genus *Bacillus*.1.neutral protease. Biotech.Bioeng. 12 (1970): 179-212.

Kobayashi, H., Kusakabe, I., and Murakami, K. Purification and characterization of two milk clotting enzymes from *Irpex lacteus*. Agric.Bio.Chem. 47 (1983): 551-558

Kolaczkowaska, M., Chrzanowska, J., Jacyk, A., Szoltysek, K., and Polanowski, A. Factors affecting rennin - like proteinase production by *Fusarium moniliforme*. Milchwissesschaft. 43 (1988): 83-86.

Laemmli, U.K. Clevage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T-4. Nature. 227 (1970): 680-685.

Leitch, R.H. Congr.Intern.Tech.et Chim.Ind.Agr.Compt.Rend.5 th Congr. 2 (1937): 307, cited by Ernstrom, C.A., and Wong, N.P. Milk clotting enzymes and cheese chemistry. In N.P. Wong, R. Jenness, M. Keeney, and E.M. Marth (eds.), Fundamentals of dairy chemistry, pp.663 - 771. New York: Van Nostrand Reihold co., 1988.

Liener, I.E., and Friedenson, B. Methods In Enzymology. 19 (1970): 261, cited by Ernstrom, C.A., and Wong, N.P. Milk clotting enzymes and cheese chemistry. In N.P. Wong, R. Jenness, M. Keeney, and E.M. Marth (eds.), Fundamentals of dairy chemistry, pp.663 - 771. New York: Van Nostrand Reihold co., 1988.

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

Mackinlay, A.G., and Wake, R.G. Milk Proteins,Chemistry and Molecular Biology. 2 (1971):175, cited by Ernstrom, C.A., and Wong, N.P. Milk clotting enzymes and cheese chemistry. In N.P. Wong, R. Jenness, M. Keeney, and E.M. Marth (eds.), Fundamentals of dairy chemistry, pp.663-771. New York: Van Nostrand Reihold co., 1988.

Mashaly, R.I., Mohamed, S.A., Tahoun, M.K., Ismail, A.A., and Mohamed, M.S. Purification and characterization of *Mucor pusillus* extracellular proteases. Ind. Dai. J. Sci. 40 (1987): 315-321.

_____, R.I., Tahoun, M.K., Ismail, A.A., and Safwat, M.M. Factors affecting the production of rennin like enzyme from *Mucor pusillus*. DTSCH.LEBENSM.RUNDSCH. 82 (1986): 365-367.

Murachi, T. Methods In Enzymology. 19(1970): 273, cited by Ernstrom, C.A., and Wong, N.P. Milk clotting enzymes and cheese chemistry. In N.P. Wong, R. Jenness, M. Keeney, and E.M. Marth (eds.), Fundamentals of dairy chemistry, pp.663 - 771. New York: Van Nostrand Reihold co., 1988.

Nand, K., and Rao, K. Preliminary studies on rennin-like enzyme from *Rhizopus oligosporus* for cheese making. CHEM.MIKROBIOL,TECHNOL.LEBENSM. 12 (1989): 97-104.

Olson, N.F. Dairy Record. 71 (1971): 8, cited by Ernstrom, C.A., and Wong, N.P. Milk clotting enzymes and cheese chemistry. In N.P. Wong, R. Jenness, M. Keeney, and E.M. Marth (eds.), Fundamentals of dairy chemistry, pp.663-771. New York: Van Nostrand Reihold co., 1988.

Osman, H.G., Abdel-Fattah, A.F., Abdel-Samie, M., and Mabrouk, S.S. Production of a milk clotting enzyme preparation by *Aspergillus niger* and the effect of various factors on its activity. effect of various factors on its activity. J.Gen.Microbiol. 59 (1969) : 125-129.

Otani, H., Iwagaki, M., and Hosono, A. The screening of trees having milk clotting activity. ANIM.SCI.TECHNOL. 62 (1991): 417-432.

Park, Y.W., Kobayashi, H., Kusakabe, I., and Murakami, K. Production and properties of a soymilk-clotting enzyme system from a microorganism. Agric.Biol.Chem. 49 (1985): 3215-3219.

Shamsuzzaman, K., and Haard, N.F. Milk clotting and cheese making properties of a chymosin like enzyme from harp seal mucosa. J.Food.Biochem. 9 (1985): 173-192.

Smith, J.L., and Yada, R.Y. Characterization of two aspartyl proteinase from a commercial fungal (*Mucor miehei*) rennet. Can.Inst.Food.Sci.Technol.J. 24 (1991): 48-56.

Somkuti, G.A., and Babel, F.J. Conditions influencing the synthesis of acid protease by *Mucor pusillus* Lindt. Appl.Microbiol. 15 (1967):1309-1312.

Tamer, T.M. Identification and partial purification of a novel milk clotting enzyme from *Onopordum turcicum*. Biotech.lett. 15 (1993): 427-432.

Tewari, B., and Singh, S. Microbial rennet-its production and use Indian Dairyman. 40 (1988): 79-82.

Thakur, M.S., Karanth, N.G., and Nand, K. Production of fungal rennet by *Mucor miehei* using solid state fermentation. Appl. Microbiol.Biotechnol. 32 (1990): 409-413.

Wang, H.L., Ruttle, D.I., and Hesseltine, C.W. Milk clotting activity of proteinases produced by *Rhizopus* sp. Can.J.Microbiol. 15 (1969): 99-104.

Wheelock, J.V., and Sinkinson, G. Biochem. Biophys. Acta. 194(1969) : 597, cited by Ernstrom, C.A., and Wong, N.P. Milk clotting enzymes and cheese chemistry. In N.P. Wong, R. Jenness, M. Keeney, and E.M. Marth(eds.) Fundamentals of dairy chemistry, pp. 663-771. New york: Van Nostrand Reihold co., 1988.

Whitaker, J.R. Protease of *Endothia parasitica*. Method in Enzymology. 19 (1970): 436-445.

Williams, and Reisfeld. Disc electrophoresis in polyacrylamide gels : extension to new condition of pH and buffer. N.Y,Acad.Annals. 121(2), (1964): 373-375.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อวายเอ็ม (YM, yeast malt extract medium)

ผงสกัดยีสต์	0.3 %
ผงสกัดมอลท์	0.3 %
แบคโตเปปโตน	0.5 %
กลูโคส	1.0 %

ละลายในน้ำกลั่นแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที ถ้าทำอาหารวุ้นวายเอ็ม (YM agar) เติมวุ้น 2 % ผสมลงไปก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

2. อาหารเลี้ยงเชื้อวายเอ็มผสมนมพร่องไขมัน (YM + Skim Milk)

ผงสกัดยีสต์	0.3 %
ผงสกัดมอลท์	0.3 %
แบคโตเปปโตน	0.5 %
กลูโคส	0.8 %
นมพร่องไขมัน	0.2 %

ละลายน้ำกลั่นแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1 ปอนด์ นาน 10 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรของ Abdel-Fattah และ Saleh (1988)

(1) แบคโตเปปโตน	0.5 %
ผงสกัดยีสต์	0.3 %
โปตัสเซี่ยมไดโอโดรเจนฟอสเฟต	0.1 %

แมกนีเซียมซัลเฟต 0.05 %

ละลายในน้ำกลั่นแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

(2) ซูโครส 5 %

ละลายในน้ำกลั่นแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 1 ปอนด์ นาน 10 นาที ก่อนจะใช้เลี้ยงเชื้อให้นำส่วน (1) และ (2) มาผสมกันในอัตรา 4 ส่วน ต่อ 1 ส่วน

4. อาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรของ Abdel-Fattah และSaleh (1988)ที่ผสมนมผงพร่องไขมัน

(1) แบคโตเปปโตน 0.5 %

ผงสกัดยีสต์ 0.3 %

โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 %

แมกนีเซี่ยมซัลเฟต 0.05 %

นมผงพร่องไขมัน 1 %

ละลายในน้ำกลั่นแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

(2) ซูโครส 4 %

ละลายในน้ำกลั่นแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 14 ปอนด์ นาน 10 นาที ก่อนจะใช้เลี้ยงเชื้อให้นำส่วน (1) และ (2) มาผสมกันในอัตรา 4 ส่วน ต่อ 1 ส่วน

5. อาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรของ Park และคณะ (1985)

(1) เปปโตน 0.2 %

นมพร่องไขมัน 5.0 %

ผงสกัดยีสต์ 0.2 %

โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟ 0.5 %

ละลายในน้ำกลั่นแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

(2) เด็กโทรส 0.2 %

ละลายในน้ำกลั่นแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 14 ปอนด์ นาน 10 นาที ก่อนจะใช้เลี้ยงเชื้อให้นำส่วน (1) และ (2) มาผสมกัน ให้อัตรา 4 ส่วน ต่อ 1 ส่วน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. อาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรของ Abdel-Fattah และ Amr (1987)

น้ำแช่ข้าวโพด	2	%
แลคโตส	2	%

ละลายในน้ำกลั่นแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

7. อาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรของ Wang และคณะ (1969)

แป้งสาลี	2	%

ละลายในน้ำกลั่นแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

8. อาหารเลี้ยงเชื้อแป้งข้าวจ้าว

แป้งข้าวจ้าว	2	%

ละลายในน้ำกลั่นแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

9. อาหารเลี้ยงเชื้อรำข้าว

รำข้าวบดละเอียด	2	%

ละลายในน้ำกลั่นแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

10. อาหารเลี้ยงเชื้อชาเพคดอกซ์ผสมแป้งสาลี (Czapek's dox + wheat flour)

แป้งสาลี	2	%
โซเดียมไนเตรท	0.3	%
ไดโปตัสเซี่ยมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.1	%
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 . 7H_2O$)	0.05	%
โปตัสเซี่ยมคลอไรด์	0.05	%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เหล็กซัลเฟต ($Feso_4 .7H_2O$)	0.001 %

ละลายในน้ำกลั่นแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

11. อาหารเลี้ยงเชื้อชาเพคดอกซ์ผสมแป้งข้าวจ้าว

แป้งข้าวจ้าว	2 %
โซเดียมไนเตรท	0.3 %
ไดโปตัสเซี่ยมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.1 %
แมกนีเซี่ยมซัลเฟต ($MgSO_4 .7H_2O$)	0.05 %
โปตัสเซี่ยมคลอไรด์	0.05 %
เหล็กซัลเฟต ($FeSO_4 .7H_2O$)	0.001 %

ละลายในน้ำกลั่นแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

12. อาหารเลี้ยงเชื้อชาเพคดอกซ์ผสมรำข้าว

รำข้าวบดละเอียด	2 %
โซเดียมไนเตรท	0.3 %
ไดโปตัสเซี่ยมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.1 %
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 .7H_2O$)	0.05 %
โปตัสเซี่ยมคลอไรด์	0.05 %
เหล็กซัลเฟต ($FeSO_4 .7H_2O$)	0.001 %

ละลายในน้ำกลั่นแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

13. อาหารเลี้ยงเชื้อแป้งสาลีผสมเปปโตน

แป้งสาลี	2 %
แบคโตเปปโตน	0.5 %
โซเดียมไนเตรท	0.3 %
ไดโปตัสเซี่ยมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.1 %

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แมกนีเซียมซัลเฟต	0.05 %
โปตัสเซี่ยมคลอไรด์	0.05 %
เหล็กซัลเฟต	0.001 %

ละลายในน้ำกลั่น แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

14. อาหารเลี้ยงเชื้อ แป้งข้าวจ้าวผสมเปปโตน

แป้งข้าวจ้าว	2 %
แบคโตเปปโตน	0.5 %
โซเดียมไนเตรท	0.3 %
ไดโปตัสเซี่ยมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.1 %
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.05 %
โปตัสเซี่ยมคลอไรด์	0.05 %
เหล็กซัลเฟต	0.001 %

ละลายในน้ำกลั่นแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

15. อาหารเลี้ยงเชื้อ รำข้าวผสมเปปโตน

รำข้าวบดละเอียด	2 %
แบคโตเปปโตน	0.5 %
โซเดียมไนเตรท	0.3 %
ไดโปตัสเซี่ยมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.1 %
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.05 %
โปตัสเซี่ยมคลอไรด์	0.05 %
เหล็กซัลเฟต	0.001 %

ละลายในน้ำกลั่นแล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ นาน 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารละลายที่ใช้ในการทดลอง

1.สารละลายสำหรับตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เรนนิน(Berridge,1952)

สารละลายแคลเซี่ยมคลอไรด์ เข้มข้น 0.01 โมลาร์

ชั่งแคลเซี่ยมคลอไรด์ 0.57 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

2.สารละลายสำหรับตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส (Keay และ Widi ,1970)

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มอล

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร

สารละลายกรดฟอสฟอร์ค เข้มข้น 85 % และเจือจาง 1 ต่อ 3

กรดฟอสฟอร์ด 100 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร

สารละลายเคซีน

ชั่งเคซีน 2 กรัม ทำให้ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 20 มิลลิลิตรแล้วเติมน้ำ 50 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 7 ด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริค แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติค เข้มข้น 0.4 โมลาร์

ชั่งกรดไตรคลอโรอะซิติค 32.68 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เข้มข้น 0.4 โมลาร์

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 21.20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

สารละลายฟินอลรีเอเจนต์

สารละลายโฟลินฟินอลรีเอเจนต์ 1 ส่วน ต่อน้ำกลั่น 3 ส่วน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.สารละลายสำหรับวัดปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ, 1951)

สารละลายลอรี เอ (Lowry A)

โซเดียมคาร์บอเนต	60	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	12	กรัม
โซเดียมโปตัสเซี่ยมทาร์เทรต	0.6	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	3,000	มิลลิลิตร

สารละลายลอรี บี (Lowry B)

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 .5H_2O$)	50	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

สารละลายลอรี ซี (Lowry C)

สารละลายลอรีเอ 50 ส่วน ผสมกับสารละลายลอรี บี 1 ส่วน

สารละลายฟีนอลรีเอเจนต์

สารละลายโฟลินฟีนอลรีเอเจนต์ 1 ส่วน ต่อน้ำกลั่น 1 ส่วน

4.สารละลายสำหรับการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส (Williams และ Reisfeld,1964)

สารละลายเอ (Soletion A)

กรดเกลือเข้มข้น 1 นอร์มอล	48	มิลลิลิตร
ทริส (Tris (hydvoxymethyl)aminomethane)	36.3	กรัม
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylenediamine)	0.23	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	100	มิลลิลิตร

pH 8.8-9.0

สารละลาย บี (Solution B)

กรดเกลือเข้มข้น 1 นอร์มอล	48	มิลลิลิตร
ทริส	5.98	กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TEMED	0.46	มิลลิลิตร
เติมน้ำให้ครบ	100	มิลลิลิตร
pH 6.7		

สารละลาย ซี (Solution C) เก็บในขวดสีชาที่ 4 องศาเซลเซียส

อะคริลาไมด์	28	กรัม
BIS (N,N-Methylene bis acrylamide)	0.7	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

สารละลาย ดี (Solution D) เก็บในขวดสีชา ที่ 4 องศาเซลเซียส

อะคริลาไมด์	10	กรัม
BIS	2.5	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

สารละลาย อี (Solution E)

ไรโบเฟลวิน	4	มิลลิกรัม
ละลายในน้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

สารละลาย เอฟ (Solution F) ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.14	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ PH 8.3

ทริส	3	กรัม
ไกลซีน	14.4	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

สารละลายผสมของเซพาเรติงเจล (Sepavating gel)

สารละลาย เอ	1	ส่วน
สารละลาย ซี	2	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน
สารละลาย เอฟ	4	ส่วน

สารละลายผสมของสแตกกิลเจล (Stacking gel)

สารละลาย บี	1	ส่วน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลาย ดี	2	ส่วน
น้ำกลั่น	4	ส่วน
สารละลาย อี	2	ส่วน

สารละลายสำหรับย้อมสี (Staining Solution)

โคแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี-250	0.23	%
กรดอะซิติค	10	%
เมธานอล	49	%

สารละลายสำหรับล้างสี (Destaining Solution)

กรดอะซิติค	7	%
เมธานอล	30	%

5.สารละลายที่ใช้ในการทำเอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิส

สารละลายทริสไกลซีนอิเลคโทรดบัฟเฟอร์

ทริส	15.15	กรัม
ไกลซีน	72	กรัม
โซเดียมไดเดซิลซัลเฟต	5	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	5,000	มิลลิลิตร

pH 8.3

สารละลายทริส-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต

ทริส	39.4	กรัม
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	2	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	1,000	มิลลิลิตร

pH 6.8

สารละลายทริส-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต

ทริส	118.2	กรัม
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	2	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	1,000	มิลลิลิตร

pH 8.8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บัฟเฟอร์ที่ใช้กับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (Sample Buffer)

สารละลายทริส-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต PH 6.8	50	มิลลิลิตร
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	4	กรัม
กลีเซอรอล	30	มิลลิลิตร
สารละลายบรอมฟินอลบลู 1 %	1	มิลลิลิตร
เบต้า-เมอร์แคปโทเอธานอล (B-Mercaptoethanol)	10	มิลลิลิตร
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น	100	มิลลิลิตร

เก็บในขวดสีชาที่ปิดสนิท

สารละลายอะคริลาไมด์(Acrylamide Stock)เก็บในขวดสีชาที่ 4 องศาเซลเซียส

อะคริลาไมด์	30	กรัม
BIS	0.8	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น	100	มิลลิลิตร

สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	1	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น	10	มิลลิลิตร

สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ก่อนใช้

สารละลายผสมของเซพาเรติงเจล (Seperating gel solution)

สารละลายอะคริลาไมด์	20.8	มิลลิลิตร
สารละลายทริส-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต PH 8.8	7.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	31.6	มิลลิลิตร
TEMED	16	ไมโครลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 %	0.4	มิลลิลิตร

สารละลายผสมของสแตกกิงเจล (Stacking gel Solution)

สารละลายอะคริลาไมด์	3.4	มิลลิลิตร
สารละลายทริส-โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต PH 6.8	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	6.6	มิลลิลิตร
TEMED	10	ไมโครลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 %	0.16	มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารละลายสำหรับย้อมสี (Staining Solution)

โคแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี-250	0.12	%
กรดอะซิติค	8	%
เมธานอล	48	%

สารละลายสำหรับล้างสี (Destaining Solution)

กรดอะซิติค	7	%
เมธานอล	5	%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวสุทธินี มิชอบธรรม เกิดเมื่อวันที่ 30 พฤศจิกายน พ.ศ.2513 ที่จังหวัดนนทบุรี สำเร็จการศึกษาขั้นปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปีการศึกษา 2534 และเข้ารับการศึกษาต่อขั้นปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2535

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย