บทที่ 1
บทนำ

โปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนและเปปไทด์สายสั้นๆ (Ward, 1983) ค้นพบมากว่าสองร้อยปี (Mihalyai, 1972 ; Adler-Nissen, 1986) เอนไซม์ชนิดนี้พบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลชีพ โปรตีเอสที่ผลิตได้จากพืชได้แก่ ปาเปนจากยางมะละกอ โบรมีเลนจากสับปะรด โปรตีเอสที่ได้จากสัตว์ เช่น เรนนินจากกระเพาะลูกวัว และโปรตีเอสที่มีบทบาทมากที่สุดคือโปรตีเอสที่ผลิตได้จากจุลชีพซึ่งผลิตได้ทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย (MG Halpern, 1981)

โปรตีเอสมีหลายชนิด แตกต่างกันทางด้านความจำเพาะต่อซับสเตรท บริเวณเร่งกลไกการเร่งปฏิกิริยา ช่วง pH และอุณหภูมิในการทำงาน รวมทั้งความเสถียรของเอนไซม์ จากคุณสมบัติของโปรตีเอสที่แตกต่างกัน สามารถนำไปใช้เป็นประโยชน์ได้อย่างมากมาย เช่น อุตสาหกรรมฟอกหนัง อาหาร เครื่องดื่ม เบียร์ ยา และอุตสาหกรรมผลิตสารซักฟอก (Detergents) ซึ่งเป็นอุตสาหกรรมที่มีปริมาณการใช้ มูลค่าการส่งออก และส่วนแบ่งทางการตลาดสูงที่สุดเมื่อเทียบกับอุตสาหกรรมอื่นๆ (Helle, 1990)

การนำโปรตีเอสมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆมีลักษณะการใช้งานและแหล่งของเอนไซม์ที่ใช้แตกต่างกัน โปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่ถูกค้นพบเป็นชนิดที่สองของโลก หลังจากพบ " Amylase" โดย Kirchoff ในปีค.ศ. 1814 โปรตีเอสที่พบจากพืชชนิดแรก คือ ปาเปนในยางมะละกอ ซึ่งพบโดย Wurt & Bouchut ในปี ค.ศ. 1879 ต่อมาปีค.ศ. 1905 Rohm นำโปรตีเอสจากสัตว์คือ โปรตีเอสจากตับอ่อน (Pancreatic protease) มาใช้ในการฟอกหนังและกำจัดขนที่ติดอยู่กับหนังสัตว์ และในปีค.ศ.1913 ได้เริ่มนำโปรตีเอสมาใช้เป็นสารซักล้าง (Detergents) ครั้งแรก แต่พบว่า ความสามารถในการย่อยสลายของเอนไซม์และความเสถียรในสภาวะที่เป็นด่างไม่ดี ต่อมาในปีค.ศ. 1954 Guntelberg & Ottesen ได้ค้นพบโปรตีเอสจากจุลชีพชนิดแรก คือ *Bacillus subtilis* โดยตั้งชื่อว่า "Subtilisin" และในปีค.ศ. 1959 บริษัทในประเทศสวิทซ์เซอร์แลนด์ได้ผลิตโปรตีเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เป็นผลิตภัณฑ์ ภายใต้ชื่อการค้าว่า Bio-40 ซึ่งมีคุณภาพดีกว่าโปรตีเอสจากตับอ่อน ต่อมาในปีค.ศ. 1960 บริษัท NOVO ได้ผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus licheniformis* ซึ่งเรียกเอนไซม์นี้โดยทั่วไปว่า Subtilisin Carlsberg และใช้ชื่อทางการค้าว่า Biotex และเริ่มเข้าสู่ตลาดในสหรัฐอเมริกาโดยมีส่วนแบ่งตลาดประมาณ 45-50 เปอร์เซนต์ ปีค.ศ. 1971 คณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (FDA) ให้คำรับรองโปรตีเอสว่าสามารถนำมาใช้ร่วมกับการซักล้างได้โดยไม่มีอันตราย นอกจากอุตสาหกรรมการผลิตสารซักฟอกแล้ว ยังมีการพัฒนานำเอาโปรตีเอสจากจุลชีพไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ อีก เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งโปรตีเอสจะช่วยเพิ่มคุณภาพ ความเสถียร และช่วยในการละลายของอาหารให้ดีขึ้น

เนื่องจากโปรตีเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่จะได้มาจากจุลชีพ เพราะเป็นแหล่งที่เหมาะสมในการผลิตปริมาณมากอีกทั้งเอนไซม์มีการสร้างและขับออกสู่ภายนอกเซลล์ (Extracellular enzyme) จึงง่ายต่อการแยกสกัดและผลิตได้ในปริมาณสูง (Ward, 1983)

โปรตีเอสที่ผลิตได้จากจุลชีพ สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆ ตามกลไกพื้นฐานของสภาวะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (Hartley,1960 ; Outtrun & Boyce,1990 ; Fox และคณะ, 1991)

1. Acid Protease EC. 3.4.23

จุลชีพที่ผลิตส่วนใหญ่เป็นพวกเชื้อรา และยีสต์ ไม่ค่อยพบในแบคทีเรีย มีกรดอะมิโนแอสปาเทตอยู่ที่บริเวณเร่ง เอนไซม์ทำงานเหมาะสมที่ pH 3-4 เอนไซม์ชนิดนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด ตามลักษณะโครงสร้าง (Matsubara & Feder, 1971) ได้ดังนี้

1.1 **Rennin-like Acid Protease** จุลชีพที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตโปรตีเอสในเชิงการค้า ได้แก่ *Mucor pusillus, Mucor miehei* และ *Endothia parasitica* นิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมทำเนยแข็ง

1.2 **Pepsin-like Acid Protease** นิยมย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองในอุตสาหกรรมทำซีอิ๊ว (Soy Sauce) และปรับปรุงคุณภาพของแป้งที่ใช้ในการทำขนมปัง *Aspergillus oryzae* เป็นจุลชีพที่สำคัญในการผลิตเอนไซม์ในอุตสาหกรรม เอนไซม์ชนิดนี้เป็น Endoprotease มีช่วงการทำงานที่เหมาะสมมีค่า pH เท่ากับ 4-4.5

2. Thiol Protease EC. 3.4.22

เป็นเอนไซม์ทำงานได้ดีในช่วง pH ที่เป็นกลาง น้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 30,000-50,000 ดาลตัน จุลชีพที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ ได้แก่ *Clostridium spp.* และ *Streptococcus spp.* และโปรตีเอสที่ผลิตได้จากพืช ได้แก่ ปาเปน, ไฟซิน และ โบรมีเลน (Ward, 1983)

3. Metallo Protease EC. 3.4.24

เอนไซม์ชนิดนี้เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Neutral Protease พบทั่วไปในแบคทีเรียและเชื้อรา โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัสหลายชนิด เช่น *Bacillus megaterium, Bacillus cereus* และ *Bacillus thermoproteolyticus* ซึ่งจะผลิตเฉพาะนิวทรัลโปรตีเอสเท่านั้น (Priest, 1977) แต่ใน *Bacillus subtilis* พบว่ามีการผลิตทั้งนิวทรัลโปรตีเอสและแอลคาไลน์โปรตีเอส นอกจากนี้ยังมี *Bacillus thuringiensis, Bacillus pumilus* และ *Bacillus polymyxa* (Griffin & Fogarty, 1973) เป็นต้น นิวทรัลโปรตีเอสเป็น Metallo-endoprotease ที่มีอะตอมของโลหะ

เป็นส่วนประกอบของโมเลกุลและมีความสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ไอออนส่วนใหญ่ที่พบคือ Zn^{++} (Zinc) สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับกรดอะมิโนไลซีน และถูกยับยั้งปฏิกิริยาได้ด้วยสารเคมีประเภทคีเลตติ้ง (Chelating Agents) เช่น Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Dithizone (Ward, 1983; Millet และคณะ, 1969) 1,10-Phenanthroline (Pero & Sloma, 1993) ซึ่งจะยับยั้งเอนไซม์โดยการดึงอะตอมของสังกะสีออก แต่ไม่ถูกยับยั้งโดย Di-isopropryl Fluorophosphate (DFP), Sulfhydryl reagent, Soybean trypsin inhibitor และ Potato protease inhibitor ความสามารถสูงสุดในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนที่สภาวะความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7-8 โดยใช้เคซีนเป็นซับสเตรท มีความเสถียรในช่วง pH 5-10 (Endo, 1962) นิวทรัลโปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่มีความเสถียรน้อยมากเมื่อเทียบกับโปรตีเอสชนิดอื่นๆ (Millet และคณะ, 1969) นิวทรัลโปรตีเอสที่สำคัญคือ Thermolysin ซึ่งผลิตจาก *Bacillus thermoproteolyticus* เป็นเอนไซม์ที่มีความเสถียรทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีพบว่าหลังอินคิวเบตที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เอนไซม์ยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 50 เปอร์เซนต์ (Endo, 1962; Ohta, 1966) นิวทรัลโปรตีเอสสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมมีมากมาย เช่น อุตสาหกรรมฟอกหนัง, เบียร์, ซีอิ๊ว, น้ำปลา, ผลิตสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract), อุตสาหกรรมผลิตเนยแข็งและขนมปังต่างๆ มีผู้ศึกษาถึงคุณสมบัติของนิวทรัลโปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* พบว่าช่วยปรับคุณภาพของแป้งขนมปังประเภท Cracker และ Biscuit ทำให้แผ่แป้งเป็นแผ่นบางๆได้โดยไม่ฉีกขาด และช่วยลดฟองอากาศที่เกิดระหว่างการอบ (Barrett,1979; Aunstrup, 1980) และเมื่อใช้เอนไซม์นี้ร่วมกับไลเปส (Lipase) ในการทำเนยแข็ง พบว่าช่วยเพิ่มรสชาติของเนยแข็งและไม่ทำให้เกิดรสขม (Godfrey, 1983)

4. Alkaline Protease EC. 3.4.21.14

เอนไซม์ชนิดนี้เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Serine Protease เนื่องจากมีหมู่กรดอะมิโนเซรีนอยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ (Active site) ถูกยับยั้งปฏิกิริยาด้วยสาร Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride (PMSF) และ Di-isopropryl Fluorophosphate (DFP) ส่วน EDTA ไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์นี้ได้ ช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ค่อนข้างกว้างอยู่ระหว่าง pH 5-12 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อยู่ระหว่าง 60-70 องศาเซลเซียส (Outtrup & Boyce, 1990) แคลเซียมไอออนจะช่วยให้เอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้น มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 25,000-30,000 ดาลตัน (Priest, 1977; Ward, 1983)

แอลคาไลน์โปรตีเอสผลิตได้ทั้งในเชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย โดยเฉพาะพบในแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus spp.* เป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ *Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis* และ Alkalophilic *Bacillus* ซึ่งเอนไซม์จะถูกสร้างและปล่อยออกเป็นอิสระในน้ำเลี้ยงเชื้อ (Extracellular enzyme) และอาจจะสร้างไปพร้อมๆกันร่วมกับนิวทรัลโปรตีเอส หรืออาจจะมีการสร้างนิวทรัลโปรตีเอสก่อนการสร้างแอลคาไลน์โปรตีเอสก็ได้ (MG Halpern, 1981)

แอลคาไลน์โปรตีเอสสามารถแบ่งได้ 2 กลุ่ม โดยอาศัยความแตกต่างของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบรวมทั้งคุณสมบัติทางอิมมูนวิทยาและจลนศาสตร์ (Keay และคณะ, 1970b ; Outtrup & Boyce, 1990) ได้ดังนี้

กลุ่มที่1 Subtilisin Carlsberg พบครั้งแรกโดย Linderstrom Lang และ Ottesen ในปีค.ศ. 1947 ที่ห้องปฏิบัติการเมือง Carlsberg (Aunstrup, 1979) ผลิตได้จาก *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus pumilus* เอนไซม์นี้มีลักษณะเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวประกอบด้วยกรดอะมิโน 274 ตัว เนื่องจากไม่มีกรดอะมิโนซิสเตอีนหรือซิสทีน ดังนั้นจึงไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ โครงสร้างตติยภูมิเป็นรูปทรงกลม (Spherical) มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.2 นาโนเมตร บริเวณเร่งประกอบด้วยเซรีนตำแหน่งที่ 221 ฮีสติดีนตำแหน่งที่ 54 และแอสปาร์เตทตำแหน่งที่ 32 มีความจำเพาะต่อซับสเตรทกว้าง (Broad specificity) จะไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์เป็นส่วนใหญ่และเอสเทอร์บางส่วน ในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลส์โปรตีนไม่จำเป็นต้องมีตัวกระตุ้น (Activators)รวมทั้งไม่ต้องมีแคลเซียมไอออนในการช่วยให้เอนไซม์เสถียรเหมือนกับแอลคาไลน์โปรตีเอสชนิดอื่นๆ เอนไซม์มีช่วง pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลส์โปรตีน คือ pH 8-9 เอนไซม์มีความเสถียรในช่วง pH 5-11 ซึ่งเมื่อ pH ต่ำกว่า 5 หรือสูงกว่า 11 แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลง ซึ่งสันนิษฐานว่าเอนไซม์เกิดการย่อยตัวเอง (Autodigestion) โดยโมเลกุลจะคลายรูป (Unfold) (Ward, 1983) และเอนไซม์ยังมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงประมาณ 55-60 องศาเซลเซียส

กลุ่มที่2 Subtilisin BPN′ (Bacterial Protease Nagarse) หรือ Subtilisin NOVO ซึ่งผลิตจาก *Bacillus amyloliquefaciens* ในปีค.ศ. 1954 Hagihara ได้ทำการเตรียมเอนไซม์นี้ในรูปผลึกครั้งแรก และในปีค.ศ. 1960 Ottesen & Spector ได้แยกเอนไซม์ชนิดนี้ออกจาก Bacterial protease NOVO ซึ่งพบว่าการเรียงตัวของกรดอะมิโนเหมือนกับ Subtilisin BPN′ จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Subtilisin NOVO เอนไซม์ชนิดนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 275 ตัว การเรียงตัวของกรดอะมิโนคล้ายกับ Subtilisin Carlsberg ถึง 85 เปอร์เซนต์ (Pero & Sloma, 1993) บริเวณเร่งของเอนไซม์ประกอบด้วยเซรีนตำแหน่งที่ 221 ฮิสติดีนตำแหน่งที่ 64 และแอสปาร์เตทตำแหน่งที่ 32 (Outtrup & Boyce, 1990) ในโมเลกุลไม่มีกรดอะมิโนซิสเตอีน ดังนั้นจึงไม่มีพันธะไดซัลไฟด์มีอะลานีนเรสซิดิวส์อยู่ที่ปลายด้านหมู่อะมิโนและกลูตามีนเรสซิดิวส์อยู่ที่ปลายด้านหมู่คาร์บอกซิล มีแคลเซียมไอออนช่วยทำให้เอนไซม์เสถียรมากขึ้นโดยเฉพาะที่อุณหภูมิสูง หรือ pH ต่ำหรือสูงมาก เอนไซม์นี้มีความจำเพาะต่อการไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์และเอสเทอร์แตกต่างจาก Subtilisin Carlsberg (Ward, 1983)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นอกจากเอนไซม์สองกลุ่มนี้แล้ว ได้มีการค้นคว้าพัฒนาเอนไซม์อีกกลุ่มหนึ่ง คือ Alkalophilic *bacilli* เพื่อให้มีคุณสมบัติดีขึ้นมีความเสถียรในการซักล้าง (Washing Condition) เช่น pH 9-10 อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส และอยู่ในสภาพที่มี Surfactants และ Sequestering agents ได้ เอนไซม์ชนิดนี้พบในจุลชีพ *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus subtilis* เชื้อเจริญและผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ดีที่ pH สูงกว่า 7.5 และทนต่อสภาวะที่เป็นด่างสูงถึง pH 13 ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ถึง 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์ชนิดนี้มีลักษณะเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว ไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ ไม่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล มีอะลานีนเรสซิดิวส์ที่ปลายด้านหมู่อะมิโนและมีความจำเพาะต่อการไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์กว้าง (Aunstrup, 1979 ; Ward, 1983)

Horikoshi (1971) ได้ทำการศึกษาผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus spp.* No. 221 พบว่าเชื้อผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ดีที่ pH 11.5-12 ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ถึง 60 องศาเซลเซียส แคลเซียมไอออนช่วยทำให้เอนไซม์เสถียรมากขึ้น และเอนไซม์ถูกยับยั้งด้วย Di-isopropylfluorophosphate (DFP) และ Urea

Nehete และคณะ (1985) ศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูงจาก *Bacillus iicheniformis* พบว่าเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพาะเลี้ยงเชื้อซ้ำ 7 ครั้ง พบว่าได้สายพันธุ์ใหม่ที่ผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสมากขึ้นกว่าสายพันธุ์เดิม

Fujiwara และ Yamamoto (1987) ได้ศึกษาการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus spp.* B 21-2 ชนิดที่ทนต่อสภาวะด่างโดยเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกากถั่วเหลืองและสารสกัดจากกระดูกซึ่งเป็นวัตถุดิบราคาถูก เชื้อผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ดีที่ pH 11.5 สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ถึง 60 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ถูกยับยั้งด้วย Di-isopropylfluorophosphate (DFP)

Takami (1989) ได้ทำศึกษาการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus spp.* GX 6638 (ATCC 53278) พบว่าสามารถแยกโปรตีเอสที่ได้เป็น 2 ชนิด ชนิดแรกทนต่อสภาวะด่าง (Alkali stable protease) พบว่าหลังจากบ่มเอนไซม์ที่ pH 12 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ยังมีแอคติวิตีของเอนไซม์เหลืออยู่ 88 เปอร์เซนต์ ชนิดที่สองทนต่ออุณหภูมิสูง (Thermal stable protease) พบว่าที่ pH 9.5 เอนไซม์มี Half Life มากกว่า 200 นาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และ 20 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยที่เอนไซม์ทั้งสองทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส แอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus spp.* No. AH-101 ชนิดทนต่อสภาวะด่าง เชื้อผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ดีที่ pH 12-13 ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ถึง 80 องศาเซลเซียส

การสร้างเอนไซม์และความสำคัญ

โปรตีเอสจะไฮโดรไลส์ซับสเตรทที่เป็นโพลีเปปไทด์สายใหญ่ให้เป็นโมเลกุลเล็ก ทำให้เซลล์สามารถนำอาหารโปรตีนไปใช้ประโยชน์ได้ ในปัจจุบันโปรตีเอสผลิตได้จากจุลชีพเป็นส่วนใหญ่ โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus spp.*

การสร้างโปรตีเอสในกลุ่ม *Bacillus spp.* จะเกิดขึ้นในช่วงปลายการเจริญของเชื้อแบบทวีคูณ (Exponential phase or Logarithmic phase) หรือในช่วงระยะแรกของการเจริญแบบคงที่ (Stationary phase) ใน Complex media (Millet และคณะ,1969 ; Priest, 1977) การสังเคราะห์เอนไซม์ขึ้นอยู่กับปริมาณกรดนิวคลีอิก ในขณะที่เซลล์มีการเจริญ เซลล์จะนำกรดนิวคลีอิกจำนวนมากไปใช้ในการสังเคราะห์ไรโบโซมและเมื่อเซลล์หยุดการเจริญ การสร้างไรโบโซมจะหยุดลงด้วยจึงมีกรดนิวคลีอิกเหลือพอที่จะนำไปควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ในช่วง Stationary phase จึงพบว่าระยะนี้มีปริมาณเอนไซม์สูง (Coleman,1967) เอนไซม์ที่สังเคราะห์จากไรโบโซมด้านปลายอะมิโนจะมี Leading sequence ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดไฮโดรโฟบิค ซึ่งทำให้เอนไซม์ที่สังเคราะห์ขึ้นผ่านออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ได้ จากนั้น Leading sequence ซึ่งถือเป็น Signal sequence จะถูกตัดออกโดยเปปไทด์เปปติเดส ซึ่งอยู่ด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อถูกตัดออกแล้วส่วนที่เป็นเอนไซม์ก็จะพับอยู่ในรูปที่เสถียร (Ward, 1983)

ได้มีผู้ศึกษาการสร้างโปรตีเอสจาก *Bacillus spp.* เกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์พบว่า *Bacillus subtilis* 168 สามารถสร้างเอนไซม์ได้ทั้งนิวทรัลโปรตีเอสและแอลคาไลน์โปรตีเอส แต่หลังจากทำการกลายพันธุ์แล้วพบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ไม่สร้างนิวทรัลโปรตีเอสสามารถสร้างสปอร์ได้ ในขณะที่สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ไม่สร้างแอลคาไลน์โปรตีเอสจะไม่สามารถสร้างสปอร์ได้ และเมื่อใช้ Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride (PMSF) ยับยั้งการทำงานของโปรตีเอส พบว่าสารนี้สามารถยับยั้งการทำงานของแอลคาไลน์โปรตีเอสในระยะการสร้างสปอร์ 2-3 ชั่วโมงแรก ในขณะที่นิวทรัลโปรตีเอสมีปริมาณคงที่ จะเห็นได้ว่าแอลคาไลน์โปรตีเอสมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์ ซึ่งการสร้างโปรตีเอสจะเกิดขึ้นระยะแรกของการสร้างสปอร์ซึ่งเป็นช่วงปลายของการเจริญระยะ Logarithmic phase (Dancer & Mandelstam, 1975)

นอกจากนี้โปรตีเอสยังช่วยไฮโดรไลส์เอนไซม์อื่นที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นและอยู่ในรูป Inactive precursor form ภายนอกเซลล์ให้อยู่ในสภาพที่พร้อมจะทำงานได้ มีผู้ศึกษาโปรตีเอสที่สร้างขึ้นและถูกปล่อยอยู่ภายนอกเซลล์จาก *Bacillus licheniformis* พบว่า สามารถกระตุ้นเพนนิซิลินเนสที่เกาะติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ในรูปของ Inactive precursor form ให้อยู่ในรูปที่เป็นอิสระและแสดงแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ (Aiyappa และคณะ, 1977)

ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์

ปัจจัยพื้นฐานที่สำคัญในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลชีพซึ่งมีผลต่อการเจริญและการสร้างโปรตีเอสของจุลชีพ มีดังนี้

อิทธิพลของแหล่งคาร์บอน

กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ง่าย ปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมจะทำให้เซลล์เจริญและผลิตเอนไซม์ได้ดี (สุพจน์, 2530) ในช่วง Stationary phase แหล่งอาหารและพลังงานลดน้อยลงเชื้อจะเริ่มสร้างสปอร์พร้อมๆกับมีการสร้างเอนไซม์ด้วย และพบว่าถ้ามีปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อมากเกินไป กลูโคสจะกดการทำงานของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ไม่ให้มีการสร้างเอนไซม์ออกมาหรือทำให้มีการสร้างออกมาช้าลง (Catabolic repression) (Doi, 1973 ; Bernlohr, 1964 ; Hübner, 1993)

สนธยา ศรีเมฆ (2533) ได้ทำการศึกษาผลของกลูโคสที่เติมลงไปในอาหารในช่วง Stationary phase ของการเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 พบว่าหลังเติมกลูโคส 2 เปอร์เซนต์ ลงไป 1 ชั่วโมง แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจะลดลงเพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับการเติมกลูโคสในช่วงการถ่ายเชื้อซึ่งจะลดลงอย่างมากและการกดดันการสร้างแอลคาไลน์โปรตีเอสโดยกลูโคสจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย

เกษม พงษ์มณี (2536) ได้ศึกษาการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยใช้วัตถุดิบผสมราคาถูกหลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน จะให้ผลผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้นกว่าเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐาน Basal medium สูตร 1 และ สูตร 2 ที่มีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอน

O'Reilly และ Day (1983) ได้ศึกษาการผลิตโปรตีเอสจาก *Aeromonas hydrophila* โดยใช้วัตถุดิบหลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ซูโครส (Sucrose) และฟรุตโตส (Fructose) เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีการผลิตโปรตีเอสได้สูงสุดเมื่อเทียบกับใช้วัตถุดิบอื่นๆ

Fujiwara และ Yamamoto (1985) ได้ศึกษาการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอส จาก *Bacillus spp.* B 21-2 โดยใช้วัตถุดิบราคาถูกหลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้แป้งและกลูโคส แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้สูงที่สุดเมื่อเทียบกับการใช้แลคโตส (Lactose) , ซูโครส (Sucrose) และกลีเซอรีน (Glycerin) เป็นแหล่งคาร์บอน

Takii และคณะ (1990) ได้ศึกษาการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus alcalophilus* KP 1239 พบว่าใช้กรดซิตริค (Citic acid) เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสได้และมีค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์สูงสุดเมื่อเทียบกับใช้กรดอินทรีย์ชนิดอื่นๆ

Giesecke และคณะ (1991) ได้ศึกษาการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus licheniformis* พบว่า ใช้กลีเซอรอล (Glycerol) เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสได้ โดยควบคุมความเข้มข้นของกลีเซอรอลให้อยู่ในระดับที่ต้องการสามารถเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ได้

Janssen และคณะ (1994) ศึกษาการผลิตโปรตีเอสจาก *Thermus sp.* Rt 41A พบว่าใช้กลูตาเมท (Glutamate) และกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน จะสามารถผลิตโปรตีเอสได้สูงขึ้น ในขณะที่ใช้อะซิเตท (Acetate)และแอล-กลูตาเมท (L-Glutamate) เป็นแหล่งคาร์บอน จะทำให้การเจริญของเชื้อดีขึ้นแต่ไม่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์

อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน

นอกจากแหล่งคาร์บอนแล้ว แหล่งไนโตรเจนก็เป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อีกด้วย

การสร้างโปรตีเอสจะถูกกดดัน (Repressed) เมื่อมีกรดอะมิโนหรือเปปไทด์ในอาหารมากเกินไป ซึ่งความสามารถในการกดดันของกรดอะมิโนต่อการสร้างโปรตีเอสยังขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อด้วย เชื้อต่างชนิดกันจะมีผลกดดันต่อการสร้างโปรตีเอสได้ต่างกัน กรดอะมิโนหรือเปปไทด์ในอาหารหลายชนิดอยู่ร่วมกันจะมีผลต่อการกดดันการสร้างโปรตีเอสได้มากกว่ากรดอะมิโนชนิดเดียว (Votruba และคณะ, 1987)

สนธยา ศรีเมฆ (2533) ได้ทำการศึกษาผลของกรดอะมิโนผสมระหว่าง กลูตาเมท แอสปาร์เตท และแอสปาราจีน เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า มีผลต่อการเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ทำให้มีการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงกว่าใช้กรดอะมิโนชนิดเดียวเสริมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะมิโนการเจริญของเชื้อจะสูงขึ้นแต่การผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสกลับลดต่ำลงแสดงว่าชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์

เกษม พงษ์มณี (2536) ได้ศึกษาการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยใช้วัตถุดิบผสมราคาถูกหลายชนิด เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า เลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวัน อัตราส่วน 1:1 มีไนโตรเจน 0.3 เปอร์เซนต์ จะให้ผลผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงขึ้นกว่าเลี้ยงในอาหารพื้นฐาน Basal medium สูตรที่1 และสูตรที่ 2 ซึ่งมีสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) 2.0 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน

O'Reilly และ Day (1983) ได้ศึกษาการผลิตโปรตีเอสจาก *Aeromonas hydrophila* โดยใช้วัตถุดิบหลายชนิด เป็นแหล่งไนโตรเจน เช่น เคซีน, Casamino Acids, Proteose, Peptone, Neopeptone, Tryptose และไม่ใช้วัตถุดิบใดๆ เลย เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าไม่ใช้วัตถุดิบใดๆ เลย เป็นแหล่งไนโตรเจน การเจริญของเชื้อต่ำมากแต่การผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ผลสูง แต่เมื่อเทียบกับใช้วัตถุดิบชนิดอื่นๆ พบว่าการเจริญของเชื้อสูงมากแต่การผลิต

แอลคาไลน์โปรตีเอสกลับมีปริมาณต่ำลงอาจเนื่องจากความเข้มข้นของกรดอะมิโนที่ไม่เหมาะสมมีผลต่อการกดดันการสร้างโปรตีเอสได้

Fujiwara และ Yamamoto (1987) ได้ศึกษาการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus spp.* B21-2 โดยใช้วัตถุดิบราคาถูกหลายชนิด เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า Bonito extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอส เมื่อเทียบกับใช้วัตถุดิบชนิดอื่นๆ

อิทธิพลของฟอสเฟต

ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบของสารพันธุกรรม (DNA, RNA) และโปรตีน ฟอสเฟตจะช่วยเพิ่มความเสถียรของ mRNA ในขบวนการสร้างโปรตีเอส โดยการยับยั้งเอนไซม์ RNAase และช่วยให้เอนไซม์ที่สร้างขึ้นถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ได้ดีขึ้น แต่ถ้าเริ่มต้นเลี้ยงเซลล์ด้วยปริมาณฟอสเฟตที่มากเกินไปจะมีผลยับยั้งการเจริญและกดดันการสร้างโปรตีเอส (Moon & Parulekar, 1991)

อิทธิพลของไอออนโลหะ

แมกนีเซียมไอออนมีผลต่อการเจริญ การแบ่งตัว ขนาด และรูปร่างของเชื้อ พบว่ามีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแมกนีเซียมมากเกินไปจะมีผลยับยั้งการเจริญและกดดันการสร้างเอนไซม์ (Webb, 1949)

ส่วนไอออนชนิดอื่นๆ เช่น แมงกานีส และเหล็ก พบว่าเป็น Cofactor สำหรับเอนไซม์หลายชนิดในขบวนการเมแทบอลิซึมของไนโตรเจนโดยมีกลูตามีนซินทิเตสเป็นเอนไซม์สำคัญในการใช้ไนโตรเจนจากอนินทรีย์ไนโตรเจน (John, 1991)

อิทธิพลของสภาวะแวดล้อม

ได้แก่ pH อุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจน เป็นต้น ซึ่งได้มีผู้ทำการศึกษาถึงอิทธิพลของสภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อการผลิตโปรตีเอสดังนี้

Roger และ Bernard (1972) ทำการเลี้ยง *Bacillus subtilis* ที่ pH ต่างๆ เริ่มตั้งแต่ pH 5-12 พบว่า pH ที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อคือ pH 7.5-9.5 จะผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ดีที่สุด

Votruba และคณะ (1991) ทำการเลี้ยง *Bacillus megaterium* พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการถอดรหัสของ mRNA ในการผลิตโปรตีเอส

Moon & Parulekar (1991) พบว่า ถ้าออกซิเจนมีปริมาณต่ำจะมีผลทำให้การใช้กลูโคสไม่สมบูรณ์ ทำให้การเจริญของเชื้อลดต่ำลง

Giesecke และคณะ (1991) ทำการเลี้ยง *Bacillus licheniformis* แบบ Fed-batch โดยควบคุมปริมาณออกซิเจนให้ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 เปอร์เซนต์ พบว่าสามารถผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงกว่าไม่ได้ควบคุมปริมาณออกซิเจนถึง 4.6 เท่า

การนำแอลคาไลน์โปรตีเอสไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ

(Ward, 1983 ; Outtrup & Boyce, 1990 ; Fox และคณะ, 1991)

1. การไฮโดรไลส์โปรตีน(Protein Hydrolysis) เป็นการทำให้โมเลกุลของโปรตีนมีขนาดเล็กลง สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่ายและสะดวกขึ้น ตัวอย่างของโปรตีนที่นำมาไฮโดรไลส์ ได้แก่

1.1 เจลาติน สำหรับผสมในเครื่องดื่ม เครื่องสำอาง เป็นต้น

1.2 โปรตีนจากกากถั่วเหลือง ผลิตผลจากการไฮโดรไลส์ถั่วเหลืองได้กรดอะมิโนนำไปผสมในอาหารลดความอ้วน เครื่องดื่ม เป็นต้น

1.3 โปรตีนจากถั่วเหลือง สำหรับหมักซอส

1.4 โปรตีนจากเนื้อปลา สำหรับการหมักน้ำปลา จะช่วยลดระยะเวลาในการหมัก เพิ่มคุณค่าอาหารทางโภชนาการ เพิ่มรสชาติป้องกันการเกิดรสขมในน้ำปลา และช่วยลดปริมาณปลาที่ใช้หมักด้วย

1.5 เคซีนและโปรตีนจากหางนม ช่วยให้โปรตีนละลายน้ำ เพิ่มรสชาติให้ดีขึ้น และทำให้สารละลายใส

1.6 โปรตีนจากเนื้อสัตว์ สำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหารกระป๋อง ซุป โดยทำสารสกัดจากเนื้อติดกระดูกคิดเป็น 5 เปอร์เซนต์ ของน้ำหนักกระดูก และช่วยทำให้เนื้อนุ่มขึ้น (Meat Tenderization)

2. การทำขนมปัง แอลคาไลน์โปรตีเอสทำให้แป้งโด (Dough) มีความยืดหยุ่นและฟูขึ้น

3. อุตสาหกรรมนม ทำให้นมจับตัวเป็นก้อน ในกระบวนการทำเนยแข็ง

4. อุตสาหกรรมเบียร์ เครื่องดื่มประเภทน้ำผลไม้ และไวน์ เอนไซม์จะช่วยย่อยตะกอนโปรตีน ทำให้สารละลายใสขึ้น

5. อุตสาหกรรมสารซักฟอก แอลคาไลน์โปรตีเอสที่นำไปผสมในสารซักฟอก ช่วยย่อยโปรตีนต่างๆ ที่เกาะตามเนื้อผ้า เช่น คราบเลือด คราบอาหาร คราบนม รวมทั้งเหงื่อไคลทำให้ละลายออกมาพร้อมกับน้ำที่ใช้ซักล้าง อีกทั้งช่วยลดปัญหามลพิษของสภาวะแวดล้อมอีกด้วยเนื่องจากเอนไซม์จะสามารถสลายได้ในธรรมชาติไม่ตกค้างเหมือนสารเคมีในผงซักฟอก

6. อุตสาหกรรมการฟอกหนัง มี 2 ขั้นตอน

6.1 Dehairing เป็นขั้นตอนการกำจัดขนออกจากหนังสัตว์ จะนำหนังสัตว์ไปแช่ในน้ำปูนขาว แอลคาไลน์โปรตีเอสช่วยลดปริมาณการใช้ปูนขาวลงถึง 50 เปอร์เซนต์ ลดระยะเวลา

การแช่น้ำปูนขาวลง ลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสียและปลอดภัยสำหรับคนงานในโรงงาน เนื่องจากไม่มีไอระเหยของไฮโดรเจนซัลไฟด์ซึ่งเป็นอันตรายต่อสุขภาพ

6.2 Bating เป็นขั้นตอนการทำให้หนังสัตว์นุ่ม และมีความยืดหยุ่นดี โดยใช้แอลคาไลน์โปรตีเอสจากจุลชีพจะย่อยโปรตีนบางชนิดในหนังสัตว์ก่อนทำการฟอกหนัง

7. ประโยชน์ด้านอื่น ๆ

7.1 ปาเปน โบรมีเลน ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ

7.2 เปปซิน ทริปซิน และปาเปน ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อจุลชีพ

7.3 ปาเปน และนิวทรัลโปรตีเอส ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตสารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) และโปรตีนเซลล์เดียว

7.4 ทริปซิน และแอลคาไลน์โปรตีเอส ใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ (Animal Cell Culture)

7.5 นิวทรัลโปรตีเอส และแอลคาไลน์โปรตีเอสใช้ในการทำความสะอาดเยื่อหุ้มผ่านในเครื่องมือต่างๆ

จะเห็นว่าโปรตีเอส สามารถนำมาใช้เป็นประโยชน์มากมาย ทำให้มีความต้องการใช้เอนไซม์มากขึ้นเรื่อยๆ ปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้าเอนไซม์หลายชนิด เพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมฟอกหนัง อาหารและเครื่องดื่ม เบียร์ ยา และอุตสาหกรรมผลิตสารซักฟอก (Detergents) เป็นต้น สามารถรวบรวมได้ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงมูลค่าการนำเข้าและการส่งออกเอนไซม์ทุกชนิดของประเทศไทย ตั้งแต่ปี คศ. 1991-1995

ปี คศ.	มูลค่าการนำเข้า		มูลค่าการส่งออก	
	ปริมาณ(ล้านตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)	ปริมาณ(แสนตัน)	มูลค่า (ล้านบาท)
1991	1.27	136	1.19	1.10
1992	1.28	204	1.02	1.20
1993	1.60	250	1.21	1.25
1994	2.18	275	1.26	1.30
1995*	1.63	251	0.90	1.10

แหล่งที่มา : กรมศุลกากร ประเทศไทย

ปี 1995* : เก็บข้อมูลตั้งแต่ เดือนมกราคม-เดือนสิงหาคม

ปัจจุบันจะเห็นว่ามูลค่าการนำเข้าเอนไซม์ของประเทศไทยมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆทุกปี แสดงให้เห็นว่าความต้องการในการใช้เอนไซม์มีปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ ดังนั้นประเทศไทยจึงมีการสูญเสียเงินออกนอกประเทศเป็นจำนวนเงินมหาศาลในแต่ละปีในการนำเอนไซม์เข้าประเทศ เพื่อเป็นการลดต้นทุนการนำเข้าและสนองต่อความต้องการใช้เอนไซม์ที่มีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ ดังนั้นจึงต้องมีการปรับปรุงคัดเลือกสายพันธุ์ วิธีการผลิต รวมทั้งพัฒนาคุณสมบัติของโปรตีเอส เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตโปรตีเอสให้สูงขึ้น เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างไม่มีข้อจำกัด

การกลายพันธุ์

ปัจจุบันแอลคาไลน์โปรตีเอสสามารถนำมาใช้เป็นประโยชน์มากมาย ทำให้มีความต้องการใช้เอนไซม์มากขึ้นเรื่อยๆพบว่าการนำจุลินทรีย์มาใช้ในอุตสาหกรรมเริ่มแรกนั้นจุลินทรีย์จะได้จากการคัดเลือกสายพันธุ์จากธรรมชาติซึ่งมักมีความสามารถในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ในปริมาณต่ำ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตโปรตีเอสให้สูงขึ้น เพื่อลดต้นทุนการผลิตลงและเพื่อให้ได้เอนไซม์มากเพียงพอต่อความต้องการที่เพิ่มสูงขึ้น แนวทางในการปรับปรุงคัดเลือกสายพันธุ์อาศัยเทคนิคพื้นฐาน 2 วิธี คือการใช้ความรู้ทางด้านวิศวกรรมทำการตัดต่อยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ (Genetic Engineerring) ซึ่งต้องอาศัยความรู้และความชำนาญด้านเทคนิคอย่างมาก และการกลายพันธุ์ (Mutation) (Baltz, 1986)

สิ่งก่อการกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์คือการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ (Spontaneous mutation) หรือถูกชักนำให้เกิดขึ้นโดยสารชักนำ Mutagen (Induced mutation) โดยทั่วไปการกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติจะมีอัตราการเกิดที่ค่อนข้างต่ำคือน้อยกว่าหนึ่งในล้านเซลล์ ดังนั้นถ้าต้องการเซลล์ที่เกิดการกลายพันธุ์ในอัตราที่สูงขึ้นและง่ายต่อการคัดเลือกต้องอาศัยสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 พวกใหญ่ๆ คือ สารรังสีและสารเคมี โอกาสในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้นอยู่กับ สายพันธุ์จุลินทรีย์ สารชักนำวิธีการกลายพันธุ์ ซึ่งพบว่าถ้าใช้สารชักนำมากกว่าหนึ่งชนิดมาทำการกลายพันธุ์ซ้ำหลายๆ ครั้งจะประสบผลสำเร็จสูง (Calam, 1970) สารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ทุกชนิดมีอันตรายดังนั้นในการทำการทดลองจึงต้องทำด้วยความระมัดระวังเป็นพิเศษ

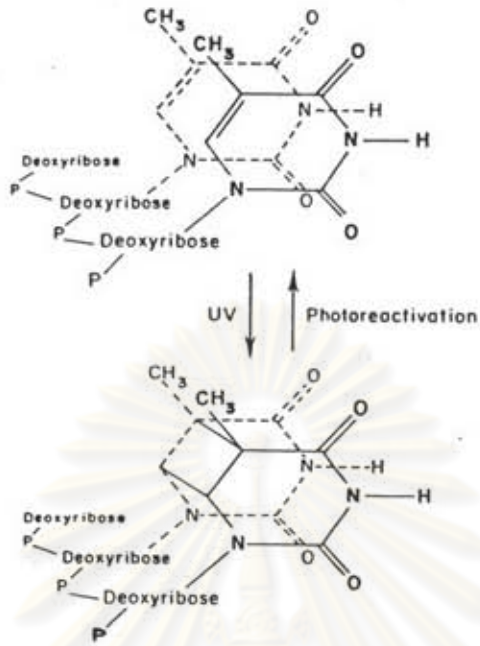
1. สารรังสีที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (Radiation Mutagens) แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1.1 Ionizing radiations

ได้แก่ รังสีแกรมมา (γ), รังสีเอ็กซ์ (χ), นิวตรอน, และอนุภาคต่างๆ ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยทำให้โครโมโซมแตก(Breakage) และมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครโมโซม ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ Translocations, Deletions และ Inversions นอกจากนี้ยังมีผลให้เกิด Deamination, Dehydroxylation ของ Nitrogenous base เกิด Depurination และ Peroxide formation มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครโมโซม (Chromosome abberation) ทำให้เกิดกลายพันธุ์ตำแหน่งแบบ Point mutation (Fantini, 1975)

1.2 แสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet light)

แสงอัลตราไวโอเลตเป็น Physical mutagen ที่นิยมใช้มากเพราะวิธีการทำง่ายและสะดวกรวดเร็ว รวมทั้งก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ผลดี เซลล์หรือสปอร์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตเมื่อเจริญเป็นโคโลนีแล้ว จะสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงของโคโลนีได้ชัดเจน (Hopwood, 1970 ; Fantini, 1975) แสงอัลตราไวโอเลตที่มีประสิทธิภาพนำมาใช้ในการกลายพันธุ์ได้ผลดีจะปล่อยพลังงานในช่วงความยาวคลื่นสั้นประมาณ 200-300 นาโนเมตร ความยาวคลื่นที่เหมาะสมก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ดีที่สุดคือความยาวคลื่น 253.7 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงที่ดีเอนเอสามารถดูดกลืนคลื่นแสงเข้าไปในกรดนิวคลีอิกได้สูงสุดมีผลทำให้เกิดความผิดปกติบนสายดีเอนเอ (Sikyta, 1983) โดยจะทำให้เกิดการจับตัวกันของเบสไพริมิดีน 2 ตัว (Pyrimidine dimer) ที่อยู่ชิดกันบนสายดีเอนเอเดียวกันหรืออยู่ตรงข้ามกันให้เข้ามาเชื่อมอยู่ชิดกัน (Dimerization) ด้วยพันธะโควาเลนท์ (Covalent bond) เกิดเป็น Thymine-Thymine Dimer, Thymine-Cytosine Dimer และ Cytosine-Cytosine Dimer ในอัตราส่วน 2:1:1 (Fantini, 1975) หรือในกรณีที่เกิดไดเมอร์บนสายดีเอนเอเดียวกันแล้วเป็นสาเหตุให้เกิดการบิดตัวของ Double helix ไปจนเสียรูปทำให้เกิดไดเมอร์บนสายดีเอนเอที่อยู่ตรงข้ามกันได้ ไดเมอร์จะมีผลต่อการจำลองตัว (Replication) ของดีเอนเอเพราะพันธะโควาเลนท์ที่เกิดขึ้นจะทำให้สายดีเอนเอทั้งสองสายแยกออกจากกันไม่ได้ ดีเอนเอจึงไม่สามารถจำลองตัวได้ เมื่อดีเอนเอต้องการจำลองตัวจะมีกลไกเข้ามาช่วยซ่อมแซมแต่อาจเกิดความผิดพลาดโดยการนำคู่เบสใหม่เข้ามาแทนที่จาก GC→ AT ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์แบบ Transition mutations เป็นส่วนใหญ่และอาจพบ Tranversion mutations ได้ไม่มาก นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์แบบ Frameshift mutations และ Deletions ได้ (Drake, 1970)



รูปที่ 1 **Thymine-Thymine-Cyclobutane Dimer ที่เกิดจากการกลายพันธุ์โดยแสงอัลตราไวโอเลต (Dale, 1989)**

โดยทั่วไปการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่

1. ความเข้มของแสง
2. ระยะเวลาที่ได้รับการฉายแสง
3. ระยะห่างระหว่างแหล่งแสงกับจุลชีพ
4. ลักษณะและชนิดของจุลชีพ
5. จำนวนของจุลชีพ

แสงอัลตราไวโอเลต ที่นิยมใช้จะเป็นชนิด Low-pressure mercury vapour หรือ Germicidal lamp กำลังงาน 15 วัตต์ ปล่อยคลื่นแสง 253.7 นาโนเมตร ระยะเวลาที่ฉายแสงอยู่ในช่วง 30 วินาที ถึง 20 นาที ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความไว (Sensitivity) ของจุลชีพแต่ละชนิด ระยะห่างระหว่างแหล่งแสงกับจุลชีพอย่างน้อย 20 เซนติเมตรขึ้นไป ความหนาแน่นของเซลล์หรือสปอร์เริ่มต้น $1x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Calam, 1970 ; Fantini, 1975) จุลชีพสายพันธุ์ใหม่จะมีการกลายพันธุ์ได้มากอยู่ในช่วงที่มีเปอร์เซนต์รอดระหว่าง 1-10 เปอร์เซนต์ (Hopwood, 1970; Sikyta, 1983 ; Baltz, 1986) เวลาในการฉายแสงมีผลต่อเปอร์เซนต์รอดของจุลชีพ กล่าวคือเวลาในการฉายแสงมากเปอร์เซนต์รอดจะน้อยลง (Fantini, 1975) สัดส่วนดังกล่าวเกือบเป็นเส้นตรงจนเวลาที่ใช้เพิ่มถึงช่วงหนึ่งจะทำให้เปอร์เซนต์รอดต่ำลงมากจน

สัดส่วนดังกล่าวผิดไป (Hopwood,1970) ในขณะเดียวกันความร้อนจากแสงอัลตราไวโอเลตจะมีผลทำให้จุลชีพอ่อนแอและทำให้เปอร์เซนต์รอดต่ำกว่าค่าที่ควรจะเป็นจริง ดังนั้นในระหว่างการฉายแสงควรมีการกวนสารแขวนลอยเซลล์เบาๆตลอดเวลา เพื่อให้เซลล์มีโอกาสถูกแสงอย่างทั่วถึง การควบคุมแสงที่ดีควรทำโดยการเปิด-ปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish plate) แทนการเปิด-ปิดไฟจากหลอดแสงอัลตราไวโอเลต (Fantini, 1975)

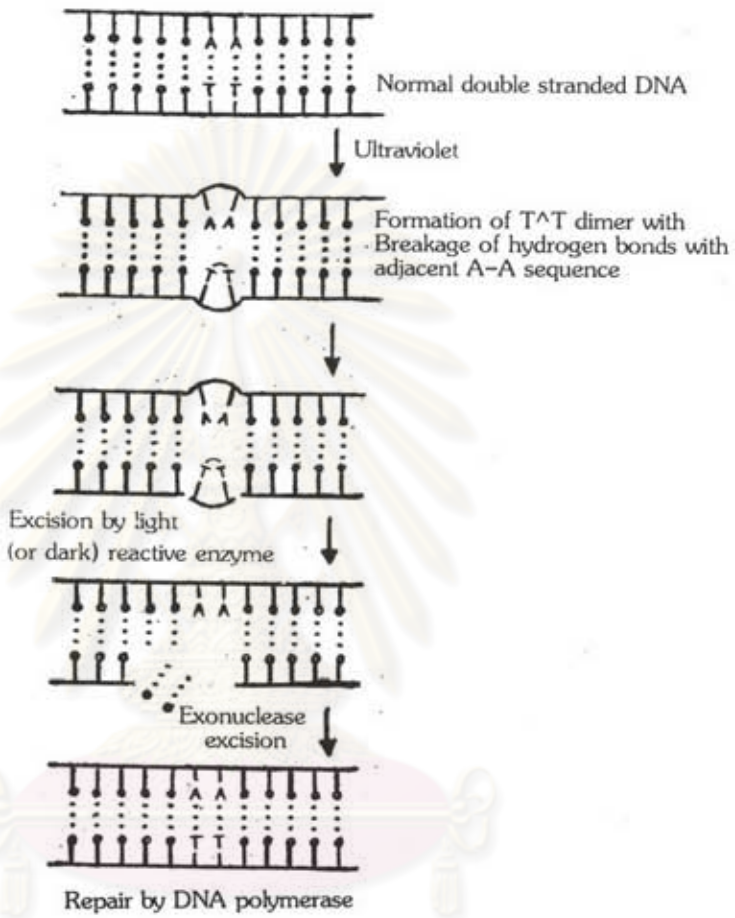
ได้มีผู้ศึกษาพบว่า ในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์นิยมใช้แสงอัลตราไวโอเลตเป็นสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ตัวแรก หลังจากได้สายพันธุ์ใหม่ที่ให้ผลผลิตสูงแล้วสามารถกลายพันธุ์ซ้ำอีก 2-3 ครั้ง โดยใช้สลับกับสารเคมีชักนำตัวอื่นๆ เช่น N-Methyl-N′-Nitro-N-Nitrosoguanidine (NTG) (Calam, 1970 ; Sikyta, 1983)

DNA Repair Mechanism คือ กลไกการซ่อมแซมดีเอนเอให้สามารถกลับคืนสู่สภาพปกติได้

ความผิดปกติของเบสที่เกิดจากการกลายพันธุ์โดยแสงอัลตราไวโอเลต ดีเอนเอสามารถซ่อมแซมกลับคืนสู่สภาพปกติได้ (Dale, 1989) โดยแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. Light-Induced Repair หรือ Photoreactivation

เป็นกลไกการซ่อมแซมดีเอนเอให้สามารถกลับคืนสู่สภาพปกติได้ โดยการนำเซลล์หรือสปอร์ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตแล้ว นำไปฉายแสง Visible light (แสงที่มีความยาวคลื่น 300-450 นาโนเมตร เช่น แสงแดด แสงไฟจากหลอดฟลูโอเรสเซนท์) ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า "Photoreactivation" ซึ่งต้องอาศัยเอนไซม์โฟโตไลเอส (Photolyase) หรือ Photoreactivating enzyme ช่วยในการเกิดปฏิกิริยา โดยเอนไซม์นี้จะเข้าไปตัดไดเมอร์ให้ขาดออกจากกันกลายเป็นโมโนเมอร์ของเบสไพริมิดีน พร้อมๆกับเอนไซม์หลุดออกจากดีเอนเอเอนไซม์โฟโตไลเอสสร้างจากยีนที่ชื่อว่า "Phr gene" (Photoreactivation gene) พบในสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่น จุลชีพ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน พืช สัตว์ และคน เอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีในช่วงความยาวคลื่น 300-600 นาโนเมตร ซึ่งเป็นช่วงที่ไม่ถูกดูดกลืนโดยกรดนิวคลีอิกหรือกรดอะมิโนในโปรตีน ไดเมอร์มากกว่า 80 เปอร์เซนต์ ในจีโนม รวมทั้ง Cross link สามารถเกิดปฏิกิริยา Photoreactivation ได้โดยไม่ผิดพลาดซึ่งทำให้พบว่าไม่มีการกลายพันธุ์เกิดขึ้นเลย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 2 แผนภาพการทำงานของแสงอัลตราไวโอเลตต่อการเกิด T^T Dimers บนสายดีเอนเอและการซ่อมแซมตัวเองของดีเอนเอ ภายหลังจากส่อง Visible Light (Dale,1989)

2. **Dark Repair** เป็นการซ่อมแซมดีเอนเอที่ผิดพลาดโดยไม่ใช้แสง แบ่งออกได้ดังนี้

2.1 **Excision Repair** ช่วยในการซ่อมแซมไพริมิดีนไดเมอร์ โดยเกิดเป็น Nicked หรือช่องว่างก่อนหน้าตำแหน่งที่เกิดไดเมอร์ที่เกิดจากเบสหายไปเนื่องจาก Depurination และซ่อมแซมเบสที่จับคู่ผิดพลาด (Mismatched base) ที่เกิดจากความผิดพลาดของ DNA Polymerase I โดยอาศัยเอนไซม์ Repair endonuclease

2.2. **Recombination Repair** เกิดขึ้นหลังจากมีการสังเคราะห์ดีเอนเอ จึงเรียกว่า Post Replicational Repair หรือ Daughter-Strand Gap Repair เนื่องจาก Replication Fork ไม่สามารถแยกไพริมิดีนไดเมอร์ออกจากกัน ทำให้เกิดช่องว่างทางด้านซ้ายของดีเอนเอและช่องว่างนั้นจะถูกเติมให้เต็มด้วยการแลกเปลี่ยนดีเอนเอจาก Isopolar parental strand ของ Sister molecule ที่เกิดตัดส่วนที่กลายพันธุ์ออกไป (Jacobson, 1984 ; Dale,1989)

หลังการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ควรทำการทดลองขั้นตอนต่อไปภายใต้หลอดไฟสีเหลืองที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร หรือทำในห้องมืดที่มี Wrattern Number OB เป็นตัวกรอง หรืออาจใช้ Sodium vapour lamp ซึ่งปล่อยพลังงานที่ 589 นาโนเมตร และใช้เป็นหลอดไฟส่องถนนได้ จะมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยา Photoreactivation ได้น้อย (Hopwood, 1970: Fantini, 1975)

2. สารเคมีที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ (Chemical Mutagens)

สารเคมีที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ มีมากมายหลายชนิด แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม ตาม Mode of Action (Dale,1989) ดังนี้

2.1 Base Analogue Mutagen

เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกับ 1 ใน 4 เบสของดีเอนเอจึงสามารถนำไปใช้แทนเบสของดีเอนเอในการสร้างดีเอนเอขึ้นมาใหม่จากกระบวนการดีเอนเอ Replication สารเคมีชนิดนี้ ได้แก่ 5-Bromouracil (BU) มีความคล้ายคลึงกับ Thymine เพราะหมู่ Br มีขนาดเท่ากับหมู่ CH_3 ดังนั้นหลังการเกิด replication BU ที่อยู่ในรูป Ketone form จะทำหน้าที่คล้ายกับเป็น Thymine ด้วยการจับคู่กับ Adenine ส่วน BU ที่อยู่ในรูป Enol Form จะทำหน้าที่คล้ายกับเป็น Cytosine ด้วยการจับคู่กับ Gaunine การเปลี่ยนแปลง BU ที่อยู่ในรูป Ketone Form เป็น Enol Form หรือ Enol Form เป็น Ketone Form เรียกว่า "Tautomerization" อย่างไรก็ตาม Ketone Form จะเกิดมากกว่า Enol Form ทำให้หลังเสร็จสิ้น Replication จะเกิดการเปลี่ยนแปลงแบบ "Transition " คือ AT เป็น GC หรือ GC เป็น AT เป็นต้น

2.2 Intercalating Substances

Intercalating substances เป็นสารเคมีที่มีโครงสร้างแบนราบและสามารถใส่เข้าไปในแกนกลางของเกลียวคู่ระหว่าง Nucleotide base pair ที่อยู่ใกล้กัน ต่อมาจะมีการเติม 1 เบส หรือเอาออก 1 เบส เมื่อเกิด Replication ทำให้การอ่านรหัสเบสเป็นกรดอะมิโนผิดพลาดตั้งแต่ที่มีการเติมหรือเอาเบสออก 1 เบส เรียกการกลายพันธุ์แบบนี้ว่า " Frameshift Mutation" สารเคมีกลุ่มนี้ ได้แก่ Acridine orange, Proflavin, Ethidium Bromide เป็นต้น

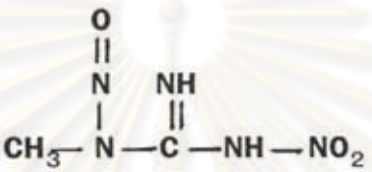
2.3 Chemical Mutagens

Chemical Mutagens เป็นสารเคมีที่ทำปฏิกิริยาเคมีกับเบส 1 ตัวในดีเอนเอแล้วมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการจับคู่เบสแบบ " Transition " หรือ " Transversion" สารเคมีกลุ่มนี้ ได้แก่ Nitrous Acid, Hydroxylamine และ Alkylating Agents

Alkylating Agents เป็นสารเคมีที่ทำปฏิกิริยาเคมีกับดีเอนเอภายในเซลล์มากกว่าการทำปฏิกิริยาเคมีกับดีเอนเอที่แยกออกมา สารเคมีกลุ่มนี้ได้แก่ Methyl Methane Sulfonate (MMS), Ethyl Methane Sulfonate (EMS), N-Methyl-N′-Nitro-N-Nitrosoguanidine (NTG) และ Dimethylnitrosamine เป็นต้น Alkylating Agents ทำหน้าที่ใส่หมู่ Alkyl ให้กับนิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่งต่างๆ เช่น ตำแหน่งออกซิเจนที่หกของ Guanine ทำให้เกิดการจับคู่ของเบสผิดพลาด เช่น G จับกับ T เป็นต้น ดังนั้นเมื่อใช้สารเคมีกลุ่มนี้เป็นสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์จะเกิดเปลี่ยนแปลงแบบ " Transition " คือ GC เป็น AT วิธีนี้เป็นการกลายพันธุ์โดยตรง นอกจากนี้ อาจทำให้เกิด Depurination ของนิวคลีโอไทด์ที่ได้รับหมู่ Aikyl ด้วยการสูญเสีย Purine และเกิดช่องว่างขึ้น สุดท้ายการ Replication ก็จะหยุดและเกิดการซ่อมแซมดีเอนเอแบบ SOS Repair ทำให้เกิด Replication ผ่านช่องว่างนั้น โดยการใส่นิวคลีโอไทด์ที่ผิดพลาดเข้าไปในดีเอนเอสายใหม่เป็นการเปลี่ยน GC เป็น TA แบบ "Transversion" สารเคมีกลุ่มนี้ ได้แก่ NTG

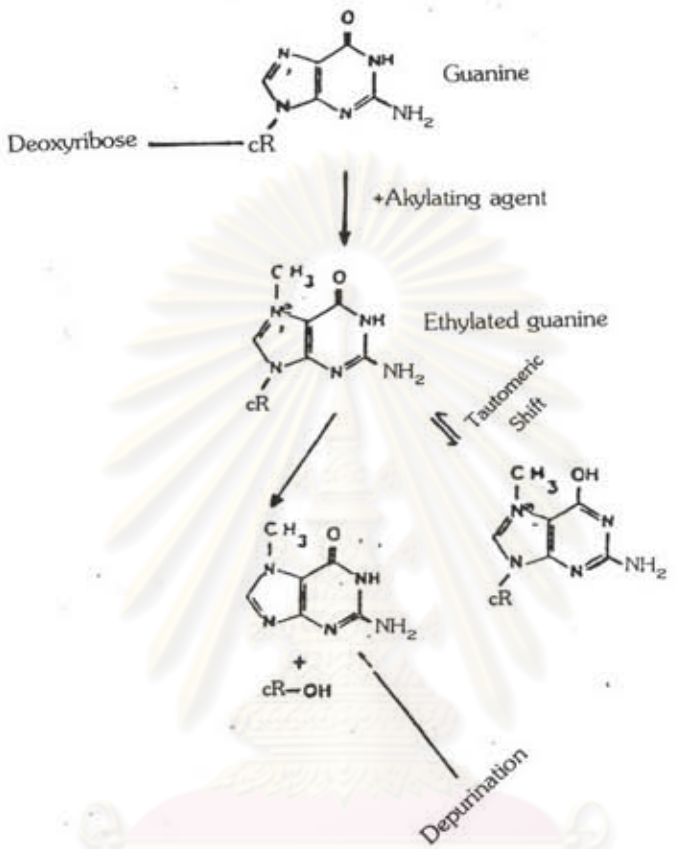
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

N-Methyl-N′-Nitro-N-Nitrosoguanidine (NTG) เป็นสารประกอบทางเคมีที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน เพราะมีประสิทธิภาพในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์สูง มีสูตรโมเลกุล $C_2H_5N_5O_3$ และมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 3 น้ำหนักโมเลกุล 147.1 สามารถละลายน้ำได้สูงสุด 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จุดหลอมเหลว 116 - 118 องศาเซลเซียส สามารถทำงานได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6 - 9 (Hopwood, 1970)



รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างโมเลกุล NTG สารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์

NTG เมื่อมีการแตกตัวออกเป็นอิสระจึงจะเป็นสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ ในสภาวะที่เป็นกรดโดยเฉพาะ 0.1 M HCl NTG จะแตกตัวเป็น Nitrous Acid ได้ช้า ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ไม่ดีนัก ในสภาวะที่เป็นด่าง NTG จะแตกตัวอย่างรวดเร็วเป็น Diazomethane (CH_2N_2) ซึ่งเป็น Strong Methylating Agent แล้วจะเข้าจับกับเซลล์หรือสปอร์อย่างรวดเร็ว (Mandell,1960 ; Calam,1970) NTG เป็นสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูง นิยมละลาย NTG ในสารละลายTris-Maleic Acid Buffer pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Hopwood,1970) ช่วงเวลาที่ NTG สัมผัสกับเซลล์หรือสปอร์นั้นไม่ใช่ปัจจัยหลักที่สำคัญ เพราะ NTG สามารถเข้าจับกับเซลล์หรือสปอร์อย่างรวดเร็ว แต่ในการทดลองควรให้เวลา NTG ในการทำปฏิกิริยาประมาณ 15 นาที (Adelberg,1965 ; Hopwood,1970) ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของ NTG เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ NTG ถ้าความเข้มข้นสูงมากขึ้นเปอร์เซนต์รอดของเซลล์หรือสปอร์จะลดต่ำลง โดยทั่วไปจะพบเซลล์หรือสปอร์ที่กลายพันธุ์ให้ผลผลิตสูงในช่วงเปอร์เซนต์รอด 0-50 เปอร์เซนต์ นิยมใช้ความหนาแน่นของเซลล์หรือสปอร์เริ่มต้นประมาณ $1x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Mandell,1960 ; Calam,1970)



รูปที่ 4 การเติมหมู่อัลคิลให้กับเบสกวานีน ซึ่งเกิดจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี NTG (Sikyta, 1983)

ได้มีผู้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการใช้แสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมีในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ได้แก่

Bautz และ Freese(1960) ทำการศึกษาใช้สารเคมี Ethylethanesulfonate (EES), Methyl Methane Sulfonate (MMS) และ Propylpropanesulfonate (PPS) ในการ กลายพันธุ์ Bacteriophage T4 พบว่า EES ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ดีที่สุด 7-8 เท่า ที่อัตรารอด 1 เปอร์เซนต์ ขณะที่ PPS และ MMS ให้สายพันธุ์ที่มี Reversion สูงถึง 30 เท่า

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Adelberg และคณะ (1965) ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ *E.coli* K-12 โดยใช้สารเคมี NTG พบว่า ที่ความเข้มข้นของ NTG 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย Tris-Maleic Acid Buffer pH 6.0 ใช้เวลาในการบ่ม 15-30 นาที จะได้เปอร์เซนต์รอดมากกว่า 50 เปอร์เซนต์ และมีสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ต้านทานวาลีน (Valine resistant; Val^R) เป็น 40 เปอร์เซนต์ ของเซลล์ที่รอด

Higerd และคณะ (1972) ทำการกลายพันธุ์ *Bacillus subtilis* โดยใช้สารเคมี NTG และ Ethyl Methane Sulfonate (EMS)แยกได้ Mutant 18 สายพันธุ์ ให้โปรตีเอสแอคติวิตีรวมมากกว่าสายพันธุ์เดิม 16 - 37 เท่า

Shah และคณะ (1986) ทำการกลายพันธุ์ *Bacillus licheniformis* โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ที่ระยะห่าง 6 เซนติเมตร พลังงาน 140 ไมโครวัตต์ต่อตารางเซนติเมตร ความหนาแน่นเซลล์ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส พบว่าเวลา 45 วินาที จะมีอัตราการรอด 0.1 เปอร์เซนต์ ได้สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ต้องการ Cysteine ในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอส คิดเป็นเปอร์เซนต์สัมพัทธ์ 106-110 เปอร์เซนต์

Tange (1994) ได้ทำการกลายพันธุ์ยีนของ *E.coli* โดยใช้สาร Hydroxylamine แล้วคัดเลือกสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์โดยดูจากความกว้างบริเวณใส (Clear zone) บนอาหารวุ้นที่มี Skim milk พบว่าหลังจากทำการคัดเลือกความกว้างของบริเวณใสมากกว่าสายพันธุ์เดิม 2 ครั้ง ได้สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ จากนั้นนำยีนนี้ Transform เข้า *Bacillus subtilis* ได้สายพันธุ์ใหม่ที่ผลิต Subtilisin BPN′ สูงขึ้น 120 เปอร์เซนต์ เมื่อคิดเทียบกับสายพันธุ์เดิม

โชตนา (2534) ได้ทำการกลายพันธุ์ *Penicillium chrysogenum* โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี NTG เพื่อเพิ่มผลผลิตเพนิซิลลิน จี โดยใช้ความหนาแน่นสปอร์ $1X10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร มาทำการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต พบว่าเวลา 120 วินาที เป็นเวลาที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ และได้เชื้อราสายพันธุ์ CU1 ผลิตเพนิซิลลิน จี ได้มากกว่าสายพันธุ์เดิม 1.25 เท่า และใช้ความหนาแน่นสปอร์ $1X10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร มาทำการกลายพันธุ์โดยใช้ความเข้มข้น NTG 5×10^{-4} โมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ซ้ำอีก 2 ครั้ง ได้เชื้อราสายพันธุ์ CNN-1 ผลิตเพนิซิลลิน จี ได้มากกว่าสายพันธุ์เดิม 3.84 เท่า

สมศักดิ์ (2537) ได้ทำการกลายพันธุ์ยีสต์ *Candida oleophila* C-73 โดยใช้สารเคมี NTG ต่อเนื่อง 2 ครั้ง ความหนาแน่นเซลล์ 10^7-10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และทำการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยแสงอัลตราไวโอเลตอีก 1 ครั้ง ความหนาแน่นเซลล์ 10^6-10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อเพิ่มผลผลิตกรดมะนาวผลได้สายพันธุ์ N-57, NN-1 และ NNU-62 สามารถผลิตกรดมะนาวได้มากกว่าสายพันธุ์เดิมร้อยละ 20.89, 28.81 และ 37.06 ตามลำดับ

การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี NTG ได้ทำการเปรียบเทียบกลไกที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ ประสิทธิภาพ และผลของการกลายพันธุ์ได้รวบรวมไว้ดังแสดงในตารางที่ 2 (Calam, 1970 ; Sikyta, 1983)

ตารางที่ 2 ความสามารถในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของการใช้แสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี NTG

ชนิดสารชักนำ	กลไกที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์	ประสิทธิภาพ	ผล	หมายเหตุ
UV	เกิดไดเมอร์ของเบสไพริมิดีน	ปานกลาง	GC--->AT Transitions อาจเกิด Transversions, Deletion บางครั้งกระตุ้นให้เกิด insertions และ Chromosomal Rearragements	ใช้อย่างกว้างขวาง เป็นสารชักนำที่ให้ผลดีในช่วง%รอดต่ำ 1-10% ระวังการเกิดปฏิกิริยา Photoreactivation
NTG	เติมหมู่อัลคิลให้เบสกวานีนในระหว่าง Replication	สูงมาก	GC--->AT Transitions อาจเกิด Transversions และ Deletion ในอัตราต่ำ	ใช้อย่างกว้างขวาง เป็นสารชักนำที่ให้ผลดีในช่วง%รอดสูง 0-50% ชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของดีเอนเอหลายตำแหน่ง วิธีทำยุ่งยาก ต้องระมัดระวังในการใช้ทำการทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

ปัจจุบันแอลคาไลน์โปรตีเอสสามารถนำมาใช้เป็นประโยชน์มากมายดังได้กล่าวมาข้างต้น ทำให้มีความต้องการใช้เอนไซม์มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ พบว่าการนำจุลินทรีย์มาใช้ในอุตสาหกรรมเริ่มแรกนั้นจุลินทรีย์จะได้จากการคัดเลือกสายพันธุ์จากธรรมชาติซึ่งความสามารถในการผลิตสารผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้ในปริมาณต่ำดังนั้นจึงต้องมีการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ วิธีการผลิต รวมทั้งพัฒนาคุณสมบัติของโปรตีเอสเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตโปรตีเอสให้สูงขึ้นผลิตได้ปริมาณมากๆเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างไม่มีข้อจำกัดและเป็นการลดต้นทุนการนำเข้าลงอีกด้วย ดังนั้นการศึกษางานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ทำการกลายพันธุ์ด้วยกระบวนการทาง Physical Mutation และChemical Mutation เพื่อเพิ่มการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสให้สูงขึ้น

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ทำการกลายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสในปริมาณสูง ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัยนี้ คือ ได้สายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ที่ให้ผลผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงเพื่อใช้ในการเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์ต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย