บทที่ 1

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

โปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลส์โปรตีน ซึ่งผลิตได้จาก พืช สัตว์ และจุลชีพ โดยโปรตีเอสในระยะแรกๆนั้นผลิตได้จากพืชและสัตว์เป็นส่วนใหญ่ โปรตีเอสที่ผลิตได้จากพืช เช่น โบรมีเลนจากสับปะรด ปาเปนที่ผลิตได้จากยางมะละกอ โปรตีเอสที่ได้จากสัตว์ เช่น เรนนินจากกระเพาะลูกวัว โปรตีเอสที่มีบทบาทสำคัญมากที่สุดคือโปรตีเอสที่ได้จากจุลชีพ (ตารางที่ 1) จุลชีพที่สามารถผลิตโปรตีเอสได้มีทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย (MG Halpern,1981) โปรตีเอสนับเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทมากในอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมยา ฟอกหนัง เส้นใยทอผ้า กระดาษ และโดยเฉพาะอุตสาหกรรมการผลิตสารซักฟอก(Detergents)มีปริมาณการใช้และคิดเป็นมูลค่ามากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอุตสาหกรรมอื่นๆ (Helle,1991) (ตารางที่ 2)

การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์โปรตีเอสในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ มีลักษณะการใช้งานและแหล่งของเอนไซม์ที่ใช้ต่างกัน ดังรวบรวมไว้ในตารางที่ 3 ในปี ค.ศ.1905 Rohm ได้นำ pancreatic protease มาใช้ในการฟอกหนังและกำจัดขนที่ติดอยู่กับหนัง และได้เริ่มนำมาใช้เป็นสารซักล้าง (Detergents) เป็นครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ.1913 แต่ยังมีความสามารถในการย่อยสลายของเอนไซม์และความคงทนในสภาวะที่เป็นด่างไม่ดี จนกระทั่งปี ค.ศ.1959 บริษัทในประเทศสวิทซ์เซอร์แลนด์ได้ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เป็นผลิตภัณฑ์ภายใต้ชื่อทางการค้า Bio-40 ซึ่งมีคุณสมบัติที่ดีกว่า pancreatic protease ปี ค.ศ.1960 บริษัท NOVO ได้ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อ *B. licheniformis* โดยเอนไซม์นี้มีชื่อเรียกกันทั่วไปว่า Subtilisin Carlsberg ใช้ชื่อทางการค้าในขณะนั้นว่า Biotex และเริ่มเข้าสู่ตลาดในสหรัฐอเมริกาโดยมีส่วน

แบ่งการตลาดประมาณ 45-50 % ในปีค.ศ.1971 คณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหรัฐ-อเมริกา (FDA) ได้ให้คำประกาศรับรองเอนไซม์นี้สามารถใช้ร่วมกับการซักล้างได้โดยไม่มีอันตราย จึงทำให้ความต้องการของเอนไซม์เริ่มมีมากขึ้นเรื่อยๆ และนับตั้งแต่นั้นมาก็มีการพัฒนาคุณสมบัติและความสามารถของเอนไซม์ที่ได้จากจุลชีพ ไม่เพียงแต่อุตสาหกรรมการผลิต

ตารางที่ 1 แสดงมูลค่าและส่วนแบ่งทางการตลาดของเอนไซม์รบรตีเอสที่ได้จาก พืช สัตว์ และจุลชีพชนิดต่างๆ

ชนิดของเอนไซม์	มูลค่า (ล้านดอลลาร์)	ส่วนแบ่งทางการตลาด (%)
1. Bacterial protease	145	60
2. Animal rennet	50	21
3. Microbial rennet	12	5
4. Papain	15	6
5. Pancreatin	12	5
6. Bromelain	5	2
7. Fungal protease	3	1
รวม	242	100

ที่มา : Hepner & Male, 1986

ตารางที่ 2 แสดงมูลค่าและส่วนแบ่งทางการตลาดของเอนไซม์โปรตีเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ

อุตสาหกรรม	มูลค่า (ล้านดอลลาร์)	ส่วนแบ่งทางการตลาด (%)
1. Detergents	140	89.2
2. Microbial rennets	12	7.6
3. Baking protease	3	1.9
4. Leather	1	0.6
5. Miscellaneous	1	0.7
รวม	157	100.0

ที่มา : Hepner & Male, 1986

ตารางที่ 3 การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์โปรตีเอสในทางอุตสาหกรรม

ประเภทของอุตสาหกรรม	ขบวนการที่ใช้	แหล่งของเอนไซม์
Baking and Milling	Bread baking	Fungal
Brewing	Chillproofing	Papain,bromelain, pepsin,fungal, bacteria
Cereals	Condiments	Papain,bromelain, pepsin,fungal, bacteria
Dairy	Milk prevention or oxidized flavor	Pancreatin
	Milk protein hydrolysate	Papain,bromelain pancreatin,bacteria, fungal
	Evaporate milk, stabilization	Pancreatin,pepsin, bromelain,fungal
Animal feeds	Pig starter ration	Pepsin,pancreatin, bacterial,fungal
	Poultry ration	Bacterial,fungal
	Cattle ration	
Meat,fish	Meat tenderizing	Papain,bromelain,
	Tenderizing casings	fungal,bacteria
	Condensed fish soluble	

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 (ต่อ) การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์โปรตีเอสในทางอุตสาหกรรม

ประเภทของอุตสาหกรรม	ขบวนการที่ใช้	แหล่งของเอนไซม์
Pharmaceutical and clinical	Digestive aids	Papain,bromelain, pancreatin,fungal, bacteria
	Wound debridement	Bacterial,animal,
	Treatment of bruises, inflammation,etc.	plant
Leather	Bating	Bacterial,pancreatin, fungal
	Unhairing	Bacterial,fungal, plant
Laundry	Spot removal	Bacterial,pancreatin,
	Cold-soluble laundry starch	fungal
Photographic	Recovery of silver from spent film	Bacterial
Textile	Desizing fibrics	Bacterial,fungal, pancreatin

ที่มา : Miller & Litsky (1976)

สารซักล้างเท่านั้น แต่ยังมีการพัฒนานำเอาเอนไซม์โปรตีเอสจากจุลชีพไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น ในอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง ก็มีการนำเอาโปรตีเอสที่ได้จากเชื้อรามาใช้แทนเรนเนท เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีเอสที่ได้จากจุลชีพ เป็นเอนไซม์ที่สร้างและขับออกสู่นอกเซลล์ (extracellular enzyme) จึงง่ายต่อการแยกสกัดและสามารถผลิตได้ในปริมาณสูง (Ward,1983)

โปรตีเอสจากจุลชีพสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆ โดยอาศัยความแตกต่างของสภาวะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (Hartley,1960) คือ

1. Acid protease EC.3.4.23 จุลชีพที่ผลิตเอนไซม์นี้ส่วนใหญ่เป็นจำพวกรา และยีสต์ มีแบคทีเรียบางชนิดที่ผลิตได้ เอนไซม์มีสภาวะการทำงานที่เหมาะสมอยู่ในช่วง pH 3-4 ลักษณะโครงสร้างคล้ายกับเอนไซม์เพปซิน เรนนิน ถูกยับยั้งการทำงานได้โดยสารจำพวก diazoketone (Mizobe,1973) แต่ไม่ถูกยับยั้งโดยสาร ethylene-diamine tetra-acetic acid (EDTA) และ di-isopropryl fluorophosphate (DFP) น้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 30,000-40,000 สามารถเกิดปฏิกิริยาจำเพาะได้ดีกับกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นวง (aromatic amino acid) เชื้อจุลชีพที่ผลิตเอนไซม์นี้ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus spp. Penicillium spp. Rhizopus spp. Mucor spp.* และ *Edothia spp.* การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์ส่วนใหญ่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตผลิตภัณฑ์โปรตีนจากถั่วเหลือง เช่น ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมขนมอบและเนยแข็ง

2. Thiol protease EC.3.4.22 เป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในช่วงที่ pH เป็นกลาง ถูกเร่งปฏิกิริยาได้ดีเมื่อมีสารรีดิวซ์ ได้แก่ HCN หรือ กรดอะมิโนซีสเตอีน และถูกยับยั้งปฏิกิริยาโดยสารจำพวก sulphydryl reagent เช่น p-chloromercuribenzoate สำหรับสาร DFP จะมีผลต่อการยับยั้งปฏิกิริยาเพียงเล็กน้อยเท่านั้น มีมวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 30,000-50,000 เชื้อจุลชีพที่ผลิตเอนไซม์นี้ได้แก่ *Clostridium spp.* และ *Streptococcus spp.*

3. Metallo protease EC.3.4.24 เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า neutral protease เป็นเอนไซม์ที่มีอะตอมของโลหะอยู่ในโครงสร้างซึ่งมักจะเป็นสังกะสี (zinc) สามารถ

ทำปฏิกิริยาได้ดีกับกรดอะมิโนไลซีน สามารถถูกยับยั้งปฏิกิริยาได้ด้วยสารจำพวก chelating agent เช่น EDTA (Ward,1983) มีความสามารถสูงสุดในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนที่สภาวะความเป็นกรด-ด่าง(pH)ประมาณ 7 แต่มีความเสถียรในช่วง pH 5-10 โมเลกุลของเอนไซม์จะเสถียรขึ้นเมื่อมีแคลเซียมไอออน เชื้อจุลชีพที่สามารถสร้างเอนไซม์นี้ส่วนใหญ่ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Bacillus spp.* เช่น *B.subtilis* *B.cereus* *B.megaterium* *B.thermoproteolyticus* (Keay,1972) *B.thuringiensis* *B.pumilus* และ *B.polymyxa* (Griffin and Fogarty,1973) เป็นต้น ตัวอย่างของเมทัลโลโปรตีเอสที่สำคัญได้แก่ Thermolysin ซึ่งผลิตได้จากเชื้อ *B.thermoproteolyticus* การใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม เช่น การผลิตเบียร์ อุตสาหกรรมฟอกหนัง และอุตสาหกรรมอาหารอื่นๆ

4. Alkaline protease EC.3.4.21.14 มีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า serine protease เนื่องจากมีหมู่กรดอะมิโนเซรีนอยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์(active site) ถูกยับยั้งปฏิกิริยาได้ด้วยสาร di-isopropryl fluorophosphate และ phenyl-methyl sulfonyl fluoride (PMSF) มีช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ค่อนข้างกว้างอยู่ระหว่าง 7-11 และเมื่อมีอะตอมของโลหะแคลเซียมไอออนจะช่วยให้เอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้น มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 25,000-30,000 แอลคาไลน์โปรตีเอสผลิตได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus spp.* เป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ *B.licheniformis* *B.subtilis* และ Alkalophilic bacillus โดยเอนไซม์จะถูกสร้างและปล่อยออกเป็นอิสระในน้ำเลี้ยงเชื้อและอาจจะรวมกับเอนไซม์โปรตีเอสอื่นด้วย คือ นิวทรัลโปรตีเอส โดยที่สร้างแอลคาไลน์โปรตีเอสพร้อมๆกับนิวทรัลโปรตีเอส หรืออาจสร้างนิวทรัลโปรตีเอสก่อนแอลคาไลน์โปรตีเอสก็ได้ (MG Halpern,1981)

แอลคาไลน์โปรตีเอสสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยอาศัยความแตกต่างของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบรวมทั้งคุณสมบัติทางอิมมูนวิทยา และจลนศาสตร์ได้ดังนี้

<u>กลุ่มที่1</u> Subtilisin Carlsberg พบครั้งแรกเมื่อปี 1947 (Aunstrup,1979) โดย Linderstrom Lang และ Ottesen ที่ห้องปฏิบัติการเมือง Carlsberg ผลิตได้จากเชื้อ *B.licheniformis* และ *B.pumilus* ลักษณะเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวมีกรดอะมิโน 274 ตัว แต่ไม่พบพันธะไดซัลไฟด์ เนื่องจากไม่มีกรดอะมิโนซิสเตอีน หรือ

ซิสทีน โครงสร้างเอนไซม์เป็นรูปทรงกลม ขนาดเส้นผ่าเส้นศูนย์กลาง 4.2 นาโนเมตร บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ประกอบด้วย กรดอะมิโนเซรีน 221 ฮีสติดีน 64 และแอสปาร์เตท32 มีความจำเพาะต่อสับสเตรทกว้าง ไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์เป็นส่วนใหญ่ และเอสเทอร์บางส่วน ไม่จำเป็นต้องมีตัวกระตุ้นในการเข้าทำปฏิกิริยาไฮโดรไลส์โปรตีน รวมทั้งไม่ต้องมีแคลเซียมไอออน เพื่อช่วยให้เอนไซม์มีความเสถียรเหมือนกับแอลคาไลน์โปรตีเอสชนิดอื่นๆ เอนไซม์มีความเสถียรในช่วง pH ที่กว้าง แต่จะมีช่วง pH ที่เหมาะสมแก่การทำปฏิกิริยาไฮโดรไลส์โปรตีนคือ pH 8-9 และแอคติวิตีของเอนไซม์นี้จะลดลงเมื่อมี pH ต่ำกว่า 5 หรือ สูงกว่า 11 เอนไซม์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงประมาณ 55-60 องศาเซลเซียส แต่จะถูกทำลายได้อย่างรวดเร็วเมื่อมีสารไฮเปอร์คลอไรท์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Aunstrup,1979)

<u>กลุ่มที่2</u> ได้แก่ Subtilisin BPN' หรือ Subtilisin NOVO ผลิตได้จากเชื้อ *B.amyloliquefaciens* แยกและเตรียมให้อยู่ในรูปผลึกครั้งแรกเมื่อปีค.ศ.1954 โดย Hagihara ลักษณะเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวที่มีกรดอะมิโน 275 ตัว เมื่อเปรียบเทียบกับ subtilisin carlsberg แล้วมีกรดอะมิโนส่วนใหญ่เหมือนกัน แตกต่างกันเพียง 58 ตัวเท่านั้น โดยไม่มีกรดอะมิโนซิสเตอีน บริเวณเร่งของเอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโนเซรีน 221 ฮิสติดีน 54 และแอสปาร์เตท 32 แคลเซียมไอออนจะช่วยทำให้เอนไซม์มีความเสถียรขึ้นโดยเฉพาะที่อุณหภูมิสูงหรือpHที่ต่ำหรือสูงมาก มีความจำเพาะต่อการไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์และเอสเทอร์แตกต่างจาก subtilisin carlsberg

แอลคาไลน์โปรตีเอสที่นอกเหนือจาก 2 กลุ่มที่กล่าวมาแล้ว ยังมีอีกกลุ่มหนึ่งที่ได้จาก Alkalophilic bacilli ได้แก่ *B.subtilis* และ *B.licheniformis* เชื้อเจริญได้ดีที่ pH สูง เอนไซม์ที่ได้นี้มีแอคติวิตีและความทนต่อสภาวะที่เป็นด่างได้สูงถึง pH 13 ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ถึง 60 องศาเซลเซียส เป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 20,000-30,000 ความจำเพาะในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์กว้าง (Aunstrup,1979;Ward,1983) ตัวอย่างของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ที่ใช้ผลิตเอนไซม์ในอุตสาหกรรม เช่น *Bacillus spp.* no.221 (Horikoshi, 1971) *Bacillus spp.* AH-101 (Hideto,1990) *Bacillus spp.* GX6638 (Don,1987)

การสร้างเอนไซม์และความสำคัญ

เอนไซม์โปรตีเอสมีบทบาทที่สำคัญ คือ ไฮโดรไลส์สับสเตรทที่เป็นโพลีเปปไทด์สายใหญ่ให้เป็นโมเลกุลเล็กลง ทำให้เซลล์สามารถที่จะดูดซึมเพื่อใช้เป็นสารอาหารได้ซึ่งไม่เพียงแต่เฉพาะเอนไซม์โปรตีเอสที่ได้จากจุลินทรีย์เท่านั้น แต่ยังรวมถึงเอนไซม์ที่ได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมด้วย (Ward,1983) นอกจากนี้โปรตีเอสยังมีความสำคัญอีกมากมาย แต่จะขอกล่าวถึงเฉพาะจุลชีพเท่านั้น โดยเฉพาะ *Bacillus spp.* ซึ่งเป็นจุลชีพที่สำคัญที่สุดในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

การสร้างเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อ *Bacillus spp.* จะเกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อโดยการสร้างเอนไซม์จะเกิดขึ้นในช่วงปลายของการเจริญแบบทวีคูณ (Exponential phase or Logarithmic phase) หรือในช่วงระยะแรกของการเจริญแบบคงที่ (Stationary phase) ใน complex media (Millet และคณะ,1969) การสังเคราะห์เอนไซม์จะถูกจำกัดโดยปริมาณกรดนิวคลีอิก โดยที่ปริมาณของกรดนิวคลีอิกจะลดน้อยลง ในขณะที่เซลล์มีการเจริญเซลล์จะนำกรดนิวคลีอิกจำนวนมากไปใช้ในการสังเคราะห์ rRNA เพื่อสังเคราะห์ไรโบโซมและเมื่อเซลล์หยุดการเจริญ การสร้างไรโบโซมจะหยุดลงจึงมีกรดนิวคลีอิกเหลือพอที่จะนำไปใช้สังเคราะห์เอนไซม์ จึงทำให้มีการสร้างเอนไซม์ในปริมาณสูงในช่วง stationary phase (Coleman,1967) การสังเคราะห์เอนไซม์เกิดขึ้นที่ไรโบโซมโดยมีสารตั้งต้น(precursor)เป็นกรดอะมิโนชนิดไฮโดรโฟบิคที่บริเวณปลายด้านอะมิโนของสายโพลีเปปไทด์ทำหน้าที่เป็น leading sequence ทำให้สายเปปไทด์ที่ถูกสร้างขึ้นผ่านออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ได้ จากนั้น signal sequence จะถูกตัดออกโดยเอนไซม์เพปติเดสซึ่งอยู่ด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อถูกตัดออกแล้วโปรตีนส่วนที่เป็นเอนไซม์ก็จะพับอยู่ในรูปที่เสถียร (Ward,1985;Sheeler และ Bianchi,1987)

การสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *Bacillus spp.* เกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์ จากการศึกษาของ Dancer และ Mandelstam (1975) พบว่า *B.subtilis* 168 ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอสได้ 2 ชนิดคือ แอลคาไลน์โปรตีเอสและนิวทรัลโปรตีเอส ทำการผ่าเหล่าแล้ว พบว่า สายพันธุ์ผ่าเหล่าที่ไม่สร้างนิวทรัลโปรตีเอสจะสามารถสร้างสปอร์ได้ ในขณะที่สายพันธุ์ผ่าเหล่าที่ไม่สร้างแอลคาไลน์โปรตีเอสจะไม่สามารถสร้างสปอร์ได้ และจากการ block การสร้างสปอร์ในระยะต่างๆ พบว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจะลด

ลงทุกระยะในขณะที่นิวทรัลโปรตีเอสยังมีปริมาณคงที่ แสดงให้เห็นว่าแอลคาไลน์โปรตีเอสมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์ โดยการสร้างเอนไซม์จะเกิดในระยะแรกของการสร้างสปอร์ซึ่งเป็นช่วงปลายของการเจริญระยะ logarithmic phase ในขณะเดียวกันจีนส์ที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ถูกกดการทำงาน(repressed)ไว้โดยปริมาณของกลูโคสที่มีมากเมื่อเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อนั้นก็จะถูก derepressed เนื่องจากปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงหรือหมดไปในช่วงของการสร้างสปอร์ การ derepressed จีนส์ยังผลให้เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอส (Doi,1973)

Jolliffe และคณะ(1980) พบว่าการ turnover ของ peptidoglycan ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของผนังเซลล์ใน *B.subtilis* สายพันธุ์ที่ผ่าเหล่าและไม่สามารถสร้างโปรตีเอสได้นั้น มีอัตราการ turnover สูงกว่าสายพันธุ์เดิม และเมื่อเติมเอนไซม์ subtilisin ซึ่งเป็นแอลคาไลน์โปรตีเอสลงไปในสายพันธุ์ที่ผ่าเหล่า จะทำให้เกิดการ turnover ของผนังเซลล์ลดลง จึงสันนิษฐานว่าการ turnover ของผนังเซลล์ในเชื้อ *B.subtilis* น่าที่จะถูกควบคุมโดยโปรตีเอสที่อยู่ภายนอกเซลล์

Carole และคณะ(1984) ได้รายงานเกี่ยวกับการสลาย (degradation) ของโปรตีนของแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานในสภาพที่ขาดแคลนแหล่งคาร์บอน อัตราการสลายโปรตีนจะสูงกว่าในสภาพปกติ และในการสลายก็จำเป็นต้องใช้เอนไซม์โปรตีเอส ถ้าหากขาดเอนไซม์โปรตีเอสก็จะไม่สามารถที่จะใช้แหล่งไนโตรเจนแทนได้ทำให้อัตราการอยู่รอดของเซลล์ลดน้อยลง

อีกบทบาทหนึ่งของโปรตีเอส คือ การช่วยไฮโดรไลส์เอนไซม์อื่นที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นและอยู่ในรูปของ inactive precursor form ภายนอกเซลล์ให้อยู่ในสภาพที่พร้อมที่จะทำงานได้ Aiyappa และคณะ (1977) พบว่า แอลคาไลน์โปรตีเอสที่อยู่ภายนอกเซลล์ *B.licheniformis* สามารถที่จะเปลี่ยนเอนไซม์เพนนิซิลินเนสที่เกาะติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ในรูปของ precursor ให้อยู่ในรูปที่เป็นอิสระและแสดงแอคติวิตีของเอนไซม์ได้

ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์

อิทธิพลของแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนโดยเฉพาะกลูโคส ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ง่าย กลูโคสในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยให้เซลล์มีการเจริญที่พอเหมาะไม่มากเกินไป การสร้างเอนไซม์ของเชื้อก็จะดำเนินไปตามปกติ (สุพจน์,2530) คือ เมื่อแหล่งอาหารและพลังงานเริ่มลดน้อยลง การสร้างสปอร์ของเชื้อก็จะเกิดขึ้นพร้อมๆกับการสร้างเอนไซม์ แต่เมื่อมีปริมาณของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อมากเกินไป ก็จะทำให้เกิด catabolic repression โดยกลูโคส (Doi,1973) กดการทำงานของจีนส์ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ไม่ให้มีการสร้างเอนไซม์ออกมาหรือทำให้สร้างออกมาช้าลง (Bernlohr,1964) เช่น การผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *B.subtilis* NRLL-B3411 จะลดลงทันทีเมื่อเติมกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Heineken และ Conner,1972)

สนธยา ศรีเมฆ (2533) ได้ทำการศึกษาผลของกลูโคสที่เติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 ในช่วงการเจริญ stationary phase พบว่าหลังจากเติมกลูโคส 2 % ลงไป 1 ชั่วโมง แอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่วัดได้ลดลงเพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับการเติมกลูโคสในช่วงการถ่ายเชื้อจะลดลงอย่างมาก และการกดดันการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสโดยกลูโคสยังขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย นอกจากกลูโคสที่เป็นแหล่งคาร์บอนแล้ว ยังมีแหล่งคาร์บอนอื่นที่ใช้เลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ได้อีก

Yuki และคณะ(1990) ได้ศึกษาถึงการใช้กรดซิตริคเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสทำการเลี้ยงเชื้อ *B.alcalophilus* KP 1239 เพื่อผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส พบว่าสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสได้โดยเอนไซม์มีค่าแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดเมื่อเทียบกับการใช้กรดอินทรีย์ชนิดอื่น

Ulrich และคณะ(1991) ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ *B.licheniformis* ให้ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส โดยการควบคุมความเข้มข้นของกลีเซอรอลให้อยู่ในระดับที่ต้องการ พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ได้

อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน

การสร้างเอนไซม์โปรตีเอสมีความสัมพันธ์กับแหล่งไนโตรเจน Heineken และ Conner (1972) ได้ศึกษาการสร้างเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสใน *B.subtilis* NRLL-B3411 พบว่า แอมโมเนียมคลอไรด์ที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้นมีผลต่อปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสและนิวทรัลโปรตีเอสที่เชื้อสร้างขึ้น ในขณะที่แหล่งคาร์บอนมีผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ α-amylase

การสร้างเอนไซม์โปรตีเอสจะถูกกดดัน (repressed) เมื่อมีกรดอะมิโนหรือเปปไทด์ในอาหาร โดยที่กรดอะมิโนแต่ละชนิดมีความสามารถในการกดดันการสร้างเอนไซม์ได้ต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อด้วย ในเชื้อบาซิลลัสแต่ละสปีชีส์ กรดอะมิโนชนิดเดียวกันก็จะมีผลต่อการกดดันการสร้างเอนไซม์ได้ต่างกัน (Chaloupka และ Kreckova,1968)

กรดอะมิโนหรือเปปไทด์หลายชนิดอยู่ร่วมกันก็จะมีผลต่อการกดดันการสร้างเอนไซม์ได้มากกว่ากรดอะมิโนชนิดเดียว (Jaroslav และคณะ,1987) นอกจากจะมีบทบาทในการกดดันการสร้างเอนไซม์แล้วยังพบว่า แหล่งไนโตรเจนมีส่วนในการกระตุ้นช่วยให้เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอสได้ด้วยในสภาพที่อาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ (Doi,1973)

สนธยา ศรีเมฆ (2533) ได้ศึกษาถึงแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 พบว่ากรดอะมิโนที่ผสมกันได้แก่ กลูตาเมท แอสปาร์เตท แอสปาราจีน จะมีผลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์โดยช่วยให้มีการเจริญสูงขึ้นและสร้างเอนไซม์ได้มากกว่าการใช้กรดอะมิโนชนิดเดียวเสริมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะมิโนขึ้น การเจริญจะสูงขึ้นแต่แอคติวิตีของเอนไซม์จะต่ำลง แสดงว่าชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์

อิทธิพลของฟอสเฟต

ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบของสารพันธุกรรม (DNA, RNA)และโปรตีน ในขบวนการสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอส ฟอสเฟตจะช่วยเพิ่มความเสถียรของ mRNA ด้วยการยับยั้งเอนไซม์ RNAase หรือช่วยให้เอนไซม์โปรตีเอสที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ปล่อยออกนอกเซลล์ได้ดีขึ้น ถ้าปริมาณของฟอสเฟตมีมากเกินไปในการเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อ จะมีผลยับยั้งการเจริญและกดดันการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสด้วย(Seung-Hyeon Moon,1990)

อิทธิพลของไอออนโลหะ

ไอออนของโลหะมีส่วนสำคัญในการเจริญและสร้างเอนไซม์ของเชื้อบาซิลลัส เช่น แมกนีเซียมไอออนมีความสำคัญและจำเป็นต่อการเจริญ การแบ่งตัวใน complex media นอกจากนี้ยังมีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่นๆมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ และยังมีผลต่อขนาด รูปร่างของเซลล์ แมกนีเซียมที่มีปริมาณมากเกินไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อด้วย (Webb,1949)

บทบาทของไอออนชนิดอื่นในการสร้างเอนไซม์ เช่น แมงกานีสและเหล็ก พบว่าเป็น cofactor สำหรับเอนไซม์หลายชนิดในขบวนการเมแทบอลิซึมของไนโตรเจน (John, 1991) โดยมีเอนไซม์กลูตามีนซินทิเตสเป็นเอนไซม์สำคัญในการใช้ไนโตรเจนจากอนินทรีย์ไนโตรเจน

อิทธิพลของสภาวะแวดล้อม ได้แก่ pH อุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจน

สภาวะแวดล้อมในระหว่างการเลี้ยงเชื้อหรือเริ่มต้น มีผลต่อการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส โดยเฉพาะแอลคาไลน์โปรตีเอสพบว่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์และปริมาณเอนไซม์ที่เชื้อสร้างขึ้น Roger และ Bernard (1972) ได้เลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* โดยเริ่มต้นที่ pH ต่างๆตั้งแต่ 5-12 พบว่าที่ pH 7.5-9.5 จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ดีที่สุด

อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์จะต้องเหมาะสม มีรายงานการศึกษาในเชื้อ *B.megaterium* โดยอุณหภูมิจะมีอิทธิพลต่อระดับของการ แปรรหัสของ mRNA สำหรับสร้างเป็นเอนไซม์โปรตีเอส (Jaroslav และคณะ,1991)

ปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจะช่วยให้เซลล์ของจุลชีพเจริญและสร้างเอนไซม์ได้ ออกซิเจนที่มีปริมาณต่ำจะทำให้การใช้กลูโคสไม่สมบูรณ์ อัตราการเจริญของเชื้อก็จะลดลง (Seung-Hyeon Moon,1990) ในการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *B.licheniformis* แบบ fed-batch โดยควบคุมปริมาณออกซิเจนให้มีค่าการละลายอยู่ที่ 5 % พบว่าจะช่วยเพิ่มปริมาณเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสได้ถึง 4.6 เท่าเมื่อเทียบกับการเลี้ยงเชื้อโดยที่ไม่ได้ควบคุมปริมาณออกซิเจน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณออกซิเจนในระหว่างการเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการสร้างเอนไซม์ด้วย (Ulrich,1991)

การพัฒนาการผลิตและการเพิ่มประสิทธิภาพเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส

แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรม ปัจจุบันแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ Subtilisin Carlsberg และ Subtilisin NOVO หรือ BPN' มีปริมาณการใช้มากถึง 40 % ของเอนไซม์ทั้งหมด (Ward,1983) จึงทำให้มีการพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ให้มีปริมาณสูง เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการทำงานและเหมาะสมกับสภาพในการใช้งานในอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น การใช้ความรู้ทางด้านพันธุวิศวกรรม ทำการตัดต่อเฉพาะจีนส์ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสในเชื้อ *B.amyloliquefaciens* (David,1988) การทำให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์บนเอนไซม์ Subtilisin E ที่ได้จาก *B.subtilis* ซึ่งจะทำให้สามารถทนต่ออุณหภูมิสูง (Hiroshi,1990) หรือการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่กรดอะมิโนบางตัวในเอนไซม์ Subtilisin มีผลทำให้เอนไซม์ใหม่ที่ได้จะทนต่ออุณหภูมิสูงและทนต่อสาร sodium dodecyl sulfate ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการผลิตสารซักฟอก (Linda,1991) เป็นต้น

การศึกษาขบวนการหมักและวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเพื่อให้ต้นทุนการผลิตเอนไซม์ต่อหน่วยมีราคาต่ำ เช่น การผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน การค่อยๆเติมกากน้ำตาลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังที่ได้ทำการเลี้ยงเชื้อไปแล้ว 14 ชั่วโมง พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ได้ดีกว่าการเติมลงในอาหารก่อนที่จะเลี้ยงเชื้อครั้งเดียวทั้งหมด (Guido,1972) การศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสโดยเชื้อ *B.licheniformis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วยสารละลายที่แบ่งเป็น 2 ชั้น (Aqueous two-phase system) คือ 5 % w/v polyethylene glycol 6000 และ 5 % w/w dextran T-5000 พบว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจะอยู่ในชั้นของ polyethylene glycol 6000 และถูกผลิตอย่างต่อเนื่องหลังจากทำการเลี้ยงเชื้อไปแล้ว 50 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดาที่ไม่เติม polyethylene glycol และ dextran ซึ่งจะมีการผลิตเอนไซม์ลดลงหลังจากทำการเลี้ยงเชื้อไปแล้ว 50 ชั่วโมง (Lee,1990)

มีรายงานการใช้วัตถุดิบซึ่งเป็นของเสียที่ได้จากขบวนการแปรรูปทางอุตสาหกรรมเป็นแหล่งไนโตรเจน Nobuaki และ Kazuhiko(1987) ใช้อินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่

soybean meal, polypeptone, casein, yeast extract, cornsteep liquor และ bonito extract อนินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ เกลือแอมโมเนียมและยูเรีย เป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus spp.* B21-2 เปรียบเทียบปริมาณแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้ พบว่า bonito extract (เป็นของเสียที่ได้จากขบวนการแปรรูปอาหาร)ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงที่สุด

เนื่องจากเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสมีความสามารถในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์และเอสเทอร์ในสภาวะที่เป็นด่าง มีความเสถียรต่ออุณหภูมิค่อนข้างสูง และในปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ในเชิงการค้า จึงเป็นที่มาของการศึกษาและวิจัยค้นหาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์นี้ ได้มีผู้ทำการศึกษาสมบัติและการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์นี้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดินในประเทศไทย โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 เปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน *B.licheniformis* ATCC 21415 ในอาหารสูตรปรับต่ำประกอบด้วย KH_2PO_4 0.44 % w/v, Na_2HPO_4 0.48 % w/v, $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 %w/v, $CaCl_2.2H_2O$ 0.0005 % w/v, $FeSO_4.7H_2O$ 0.004 % w/v เสริมด้วยกลูโคสและกลูตาเมท 0.1 % w/v ปรับ pH เท่ากับ 6.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อทั้งสองชนิดสามารถผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสได้ไม่แตกต่างกันนัก และเมื่อทำการศึกษาสมบัติในด้านกายภาพ เคมี จลนศาสตร์ ความจำเพาะในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของเอนไซม์โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์มาตรฐานคือ Subtilisin Carlsberg และ Subtilisin BPN' พบว่ามีความจำเพาะในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์เหมือนกับเอนไซม์ทั้งสองชนิด แต่มีความแตกต่างกันบ้างในการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ (ร.อ. ปกรณ์,2532)

สนธยา ศรีเมฆ (2533) ได้ศึกษาถึงผลของแหล่งต้นตอคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการผลิตโปรตีเอสและเอนไซม์ในไนโตรเจนเมแทบอลิซึมของ *B.subtilis* TISTR 25 พบว่า ปริมาณกลูโคสและชนิดของกรดอะมิโนแต่ละชนิดมีผลต่อการกดดันการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส กรดอะมิโนบางชนิดเมื่ออยู่ร่วมกันจะช่วยให้การสร้างเอนไซม์สูงขึ้น จึงน่าที่จะนำมาศึกษาด้านการผลิตในระดับต่างๆต่อไป

การเลือกใช้วัตถุดิบในการผลิตเอนไซม์มีความสำคัญโดยจะช่วยให้สามารถลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตได้ แหล่งวัตถุดิบที่พิจารณามักเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการ

019427

แปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์แล้ว มีราคาถูกและจำนวนมากตลอดเวลาไม่มีข้อจำกัดทางฤดูกาล เช่น วัสดุเหลือทิ้งที่ได้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันพืช กากเมล็ดธัญญพืชที่สกัดเอาน้ำมันออกแล้ว ส่วนใหญ่จะใช้เป็นส่วนผสมอาหารสัตว์ แต่ยังมีสารอาหารเหลืออยู่มากโดยเฉพาะโปรตีนจะยังคงมีเหลืออยู่ถึง 40 % (Church,1982) การนำเอาวัสดุเหล่านี้มาใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์เป็นการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งจากการแปรรูปทางอุตสาหกรรมที่ดีทางหนึ่ง แต่ถ้าสามารถนำวัสดุเหล่านี้มาใช้ในการผลิตเอนไซม์ซึ่งมีมูลค่าสูงกว่า ก็จะเป็นการเพิ่มคุณค่าการใช้ประโยชน์มากยิ่งขึ้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 โดยหาแหล่งวัตถุดิบราคาถูกในประเทศที่เหมาะสมจะใช้เป็นสารต้นตอไนโตรเจนและคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ผลิตเอนไซม์ซึ่งมีแอคติวิตีสูง แล้วขยายสเกลการผลิตเพื่อให้ได้เอนไซม์มากขึ้น รวมทั้งหาวิธีในการเตรียมเอนไซม์ในรูปผงที่สามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน