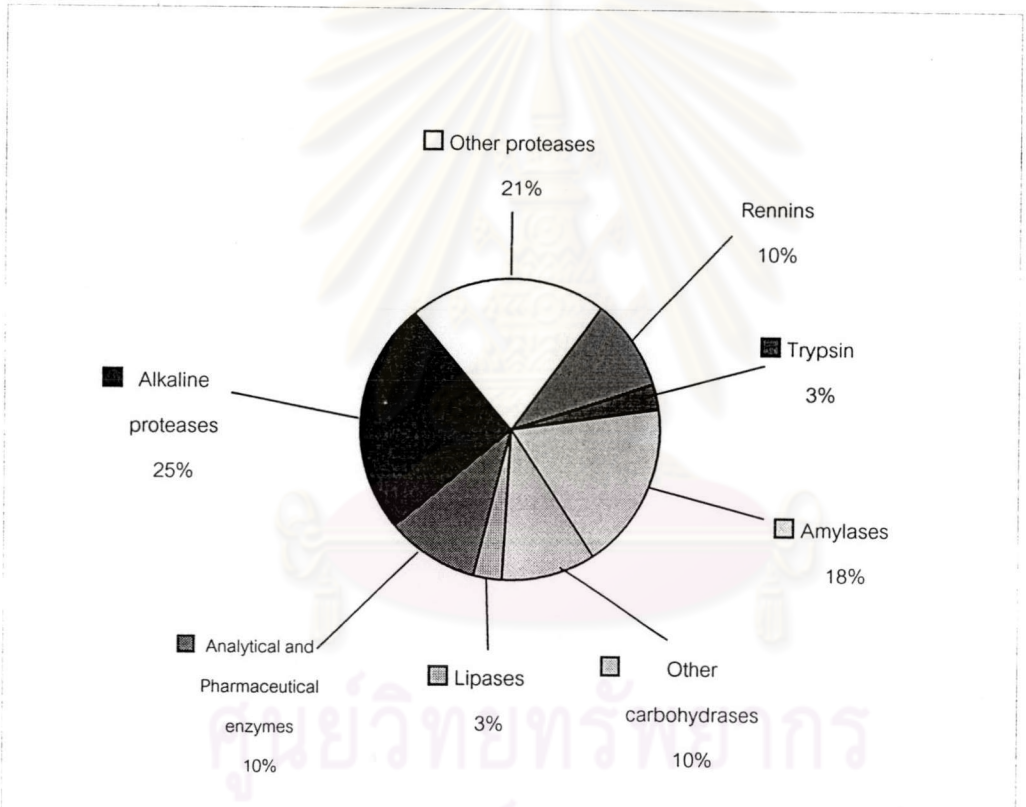
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอนไซม์โปรติเอส

โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนในสภาวะที่มีน้ำอยู่ในสารละลายปฏิกิริยา และเป็นเอนไซม์ที่นำมาใช้อย่างแพร่หลาย Godfrey และ West (1996) รายงานว่า มีมูลค่าในการซื้อขายเอนไซม์ในทางอุตสาหกรรมถึง 1 พันล้านเหรียญสหรัฐ ซึ่งโปรติเอสเป็นกลุ่มที่มีการซื้อขายมากถึง 60 % ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ปริมาณการขายเอนไซม์ชนิดต่างๆ (Godfrey และ West, 1996)

2.2 แหล่งของโปรติเอส

โปรติเอสเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาสำหรับการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิต จึงมีความหลากหลายและผลิตโดยสิ่งมีชีวิตทุกชนิด เช่น พืช, สัตว์ และจุลินทรีย์

2.2.1 โปรติเอสจากพืช

การใช้พืชเป็นแหล่งผลิตโปรติเอสจะต้องคำนึงถึงลักษณะพื้นที่ที่จะเพาะปลูกและลักษณะภูมิอากาศที่เหมาะสมในการปลูกพืชที่เป็นแหล่งของโปรติเอส นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัดในเรื่องของเวลา เนื่องจากต้องใช้ระยะเวลามากกว่าพืชจะให้ผลผลิตเมื่อเปรียบเทียบกับโปรติเอสที่ได้จากแหล่งอื่น โปรติเอสจากพืชซึ่งเป็นที่รู้จักกันดี ได้แก่ ปาเปน (Papain) สกัดได้จากยางของมะละกอ, โบรมีเลน(Bromelain) สกัดได้จากสับปะรด

2.2.2 โปรติเอสจากสัตว์

โปรติเอสจากสัตว์ส่วนใหญ่ได้จากตับอ่อนของสัตว์ เช่น ทริปซิน (Tripsin), ไครโม-ทริปซิน(Chymotrypsin), เปปซิน (Pepsin) และ เรนนิน (Rennin) เป็นต้น

2.2.3 โปรติเอสจากจุลินทรีย์

ได้จาก แบคทีเรีย รา และ ไวรัส โปรติเอสจากจุลินทรีย์เป็นที่ต้องการของตลาดมากกว่าโปรติเอสจากแหล่งอื่น และมีส่วนแบ่งการตลาดถึง 40% ในการซื้อขายเอนไซม์ในทางอุตสาหกรรมทั่วโลก (Godfrey และ West, 1996) ส่วนใหญ่โปรติเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรมจะได้จากแบคทีเรีย และเป็นนิวทรัลโปรติเอสกับแอลคาไลน์โปรติเอสเป็นส่วนใหญ่ นิว-ทรัลโปรติเอสจะเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ช่วงค่าความเป็นกรดด่างกว้างคือ 5.0-8.0 (Rao และคณะ, 1998) เหมาะสำหรับการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมทางอาหารมากกว่าโปรติเอสจากสัตว์ เพราะผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีความขมน้อยกว่า ส่วนแอลคาไลน์โปรติเอสจะเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่าง 10.0 และมีความจำเพาะต่อซับสเตรตกว้าง ซึ่งเหมาะจะใช้ในอุตสาหกรรมซักฟอก

2.3 ชนิดของโปรติเอส

การจัดกลุ่มของเอนไซม์อยู่บนพื้นฐาน 3 ข้อ คือ 1. ตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยาเร่ง 2. ลักษณะทางเคมีของบริเวณที่เกิดการเร่งปฏิกิริยา (Chemical Nature of Catalytic Site) 3. ความสัมพันธ์ด้านวิวัฒนาการของโครงสร้าง (Structural Evolution Relationship)(Barett, 1994) เนื่องจากโปรติเอสมีความหลากหลายมาก ทั้งในด้านกลไกการเร่งปฏิกิริยาและโครงสร้าง จึงจัดกลุ่มตามระบบปกติไม่ค่อยลงตัว ตามการจัดของ Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology 1992 โปรติเอสถูกจัดอยู่ใน subgroup ที่ 4 ของเอนไซม์กลุ่มที่ 3 คือกลุ่ม Hydrolases มีการจัดกลุ่มของโปรติเอสอยู่ 3 แบบใหญ่ๆคือ

2.3.1 โปรติเอสสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ตามตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยาการตัดพันธะเปปไทด์ (Barrett (1990) คือ

1. เอกโซเปปติเดส (Exopeptidases) เป็นโปรติเอสที่ทำหน้าที่บริเวณปลายของสายพอลิเปปไทด์ แบ่งเป็น

อะมิโนเปปติเดส (Aminopeptidase) ตัดพันธะเปปไทด์ที่ตำแหน่งปลาย N ของสายพอลิเปปไทด์

คาร์บอกซีเปปติเดส (Carboxypeptidase) ตัดพันธะเปปไทด์ที่ตำแหน่งปลาย C ของสายพอลิเปปไทด์

2.เอนโดเปปติเดส (Endopeptidases) เป็นโปรติเอสที่ตัดพันธะเปปไทด์ภายในสายของพอลิเปปไทด์

2.3.2 โปรติเอสสามารถแบ่งได้ตามลักษณะทางเคมีของบริเวณที่เกิดการเร่งปฏิกิริยา คือ

1. ซีรีนโปรติเอส (Serine proteases) เป็นโปรติเอสที่มีหมู่ซีรีนตรงบริเวณเร่ง การตัดพันธะเปปไทด์ทั้งแบบเอกโซเปปติเดสและเอนโดเปปติเดส เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในช่วง 7.0-11.0 มีค่า Isoelectric point อยู่ระหว่าง 4.0-6.0 และมีความจำเพาะต่อซับสเตรตกว้าง มีมวลโมเลกุล 18-35 กิโลดาลตัน ซีรีนโปรติเอสถูกยับยั้งแบบย้อนกลับไม่ได้โดย 3,4-dichloro isocoumarin (3,4-DCI), L-3-Carboxytrans-2,3-epoxypropyl-leucylamido (4-guanidine) (E-64), diisopropylfluoro phosphate (DFP), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) และ tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) นอกจากนี้ซีรีนโปรติเอสบางชนิดถูกยับยั้งโดย thiol reagents เช่น p-chloromercuribenzoate (PCMB) ซีรีนโปรติเอสสามารถแบ่งกลุ่มย่อยได้อีกเป็น 4 กลุ่ม (Morihara, 1974)

- Trypsin-like serine proteases เป็นโปรติเอสที่ตัดพันธะเปปไทด์ตรงตำแหน่งกรดอะมิโนที่ให้หมู่คาร์บอกซิล มี side chain เป็นประจุบวก เช่น ไลซีน (Lysine) และอาร์จีนิน (Arginine) มีค่าความเป็นกรดด่างเหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 8.0 ถูกยับยั้งโดย DFP, Soybean trypsin inhibitor และ TLCK มีมวลโมเลกุล 20 กิโลดาลตัน และมี Isoelectric point เท่ากับ 9.0

- Chymotrypsin-like serine alkaline proteases จะตัดพันธะเปปไทด์ตรงตำแหน่งกรดอะมิโนที่ให้หมู่คาร์บอกซิล มี side chain เป็นหมู่อะโรมาติก (aromatic groups) หรือ หมู่ไฮโดรโฟบิก (hydrophobic groups) เช่น

ไธโรซีน (Tyrosine), ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) และ ลิวซีน (Leucine) ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาสูงถึง 10.0 ค่า Isoelectric point คือ 9.0 มีมวลโมเลกุล 15-30 กิโลดาลตัน ถูกยับยั้งโดย DFP แต่ไม่ถูกยับยั้งโดย tosyl-L-Phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) และ TLCK โปรติเอสที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ สับทิลิซิน (subtilisin) เช่น Subtilisin Carlsberg ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* และ Subtilisin Novo หรือ BPN' ซึ่งผลิตจาก *Bacillus amyloliquefaciens*

- Elastase-like serine proteases ตัดพันธะเปปไทด์ตรงตำแหน่งกรดอะมิโนที่ให้หมู่คาร์บอกซิล มี side chain เป็น aliphatic groups เช่น Alanine เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่าง 9.0 ถูกยับยั้งโดย DFP มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 20 กิโลดาลตัน

- Staphylococcal proteinases ตัดพันธะเปปไทด์ตรงตำแหน่งกรดอะมิโนที่ให้หมู่คาร์บอกซิล มี side chain ที่มีประจุสุทธิเป็นลบ เช่น กรดแอสปาร์ติก (Aspartic acid) และ กรดกลูตามิก(Glutamic acid) มีมวลโมเลกุล 12 กิโลดาลตัน เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่าง 3.5-9.5 ถูกยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาโดย DFP

2. แอสปาร์ติกโปรติเอส (Aspartic proteases) หรือที่รู้จักทั่วไปคือ แอซิดิกโปรติเอส (acidic proteases) ส่วนใหญ่ผลิตจากยีสต์ และรา พบน้อยในแบคทีเรีย ตัดพันธะเปปไทด์แบบเอนโดเปปติเดส มี Aspartic residue ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วย แอสปาร์เตต (Aspartate), Xaa และไกลซีน (Glycine) (Xaa อาจเป็น ซีรีน หรือ ธรีโอนีน (Threonine)) เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่าง 3.0-4.0 มี Isoelectric point อยู่ระหว่าง 3.0-4.5 มีมวลโมเลกุล 30-45 กิโลดาลตัน ถูกยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาโดย Pepstatin, Diazo acetyl-DL-norleucine methylester (DAN) และ 1,2 epoxy-3-(p-nitrophenoxy) propane (EPNP) แอสปาร์ติกโปรติเอสจากจุลินทรีย์แบ่งเป็น 2 กลุ่ม (Rao และคณะ, 1998) คือ

- Pepsin-like enzymes ซึ่งผลิตโดย *Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp., *Penicilium* spp. และ *Neurospora* spp.
- Rennin-like enzymes ซึ่งผลิตโดย *Endothia* spp. และ *Mucor* spp.

3. ซีสเทอิน หรือ ไธออลโปรติเอส (Cysteine/Thiol proteases) แอคติวิตีของโปรติเอสนี้ขึ้นอยู่กับcatalytic dryad ประกอบด้วย ซีสเทอิน (Cysteine) และฮีสทีดีน (Histidine) มีแอคติวิตีเฉพาะในสภาวะที่มี reducing agent เป็น HCN และ ซีสเทอินค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมคือสภาวะที่เป็นกลาง มีการเร่งปฏิกิริยาบ้างเล็กน้อยที่ค่าความเป็นกรด

ด่างต่ำ การเร่งปฏิกิริยาถูกยับยั้งได้โดย sulfhydryl reagents เช่น PCMB แต่ไม่ถูกยับยั้งโดย DFP หรือ metal chelating reagents

4. เมทัลโลโปรติเอส (Metalloproteases) เป็นโปรติเอสที่มีลักษณะจำเพาะ คือ ต้องการไอออนโลหะ สำหรับเร่งในปฏิกิริยา มีทั้งแบบ exopeptidases และ endopeptidases เช่น เทอร์โมไลซิน(Thermolysin) จาก *Bacillus stearothermophilus* ซึ่งเป็นนิวทรัลโปรติเอสที่เป็นเปปไทด์สายเดี่ยว ไม่มี disulfide bridge มีมวลโมเลกุล 34 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย Zn^{++} อะตอมฝังในโครงสร้างพับตัวของโปรตีน และมี Ca^{++} 4 อะตอม ซึ่งทำให้โปรติเอสชนิดนี้ทนความร้อน, คอลลาจีเนส (Collagenase) สร้างจาก *Achromobacter iophagus* และจุลินทรีย์อื่นๆ ซึ่งเร่งปฏิกิริยาในการย่อยคอลลาเจนและเจลาตินเท่านั้น เป็นต้น เมทัลโลโปรติเอส ถูกยับยั้งได้ด้วยสารที่เป็น metal chelating agent เช่น EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), 1,10-phenanthroline

2.3.3 กลุ่มโปรติเอสตามค่าความเป็นกรดด่างที่เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีแบ่งเป็น 3 กลุ่ม (Keay และ Wildi, 1970) ดังนี้

1. แอซิดโปรติเอส (Acid proteases) เป็นโปรติเอสที่เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างระหว่าง 3.0-4.0 ส่วนใหญ่พบในรา และยีสต์ พบน้อยในแบคทีเรีย ไม่ถูกยับยั้งด้วยตัวยับยั้งซีรีนโปรติเอส (serine protease inhibitors) เช่น diisopropylfluoro phosphate (DFP) หรือ sulfhydryl group reagents เช่น PCMB แต่ถูกยับยั้งด้วยสารประกอบ diazoketone เช่น diazoacetyl-DL-norleucine methylester โปรติเอสชนิดนี้มักใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็งและอุตสาหกรรมอาหารทั่วไป

2. นิวทรัลโปรติเอส (Neutral proteases) เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างระหว่าง 7.0-8.0 มักพบในแบคทีเรีย และรา ถูกยับยั้งด้วย metal chelating agents เช่น EDTA บางครั้งจะอยู่ในกลุ่ม เมทัลโลโปรติเอส มักใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

3. อัลคาไลน์โปรติเอส (Alkaline proteases) มักพบในแบคทีเรีย และรา เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างระหว่าง 9.0-11.0 สามารถตัดพันธะเปปไทด์ได้หลายชนิด ไม่ถูกยับยั้งด้วย metal chelating agents แต่ถูกยับยั้งด้วย DFP มักใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอก การฟอกหนัง และอุตสาหกรรมอาหาร

2.4 การประยุกต์ใช้โปรติเอสในเชิงอุตสาหกรรมและพานิชย์

ปัจจุบันมีการนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ทางอุตสาหกรรมอย่างแพร่หลาย เอนไซม์จากจุลินทรีย์มีความเหมาะสมที่จะใช้แทนที่เอนไซม์จากสัตว์และพืช เนื่องจากการเลี้ยงและการควบคุมจุลินทรีย์ให้ผลิตเอนไซม์ ที่ต้องการทำได้ง่ายและสะดวกกว่าพืชและสัตว์ และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้หลากหลาย การนำโปรติเอสมาใช้ในอุตสาหกรรมในปัจจุบันมีดังตัวอย่างต่อไปนี้

2.4.1 อุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอก

การซักฟอกคือการขจัดคราบสกปรกออกจากเสื้อผ้าโดยวิธีต่างๆ ส่วนใหญ่สารซักล้างประกอบด้วย สารลดแรงตึงผิว (surfactants หรือ สารกำจัดคราบสกปรก) และด่าง เป็นต้น เสื้อผ้าที่สกปรกจะดูดซับสิ่งสกปรกจากสิ่งแวดล้อม หรือจากร่างกาย มีทั้งคราบโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ในการซักฟอก ความร้อน ความเป็นด่าง สารลดแรงตึงผิว และสารกำจัดคราบสกปรกจะช่วยขจัดคราบออก และสารฟอกขาวจะช่วยขจัดสีย้อมออกไป แต่โปรตีนจะไม่สามารถถูกขจัดออกไปได้ และยังคงติดอยู่กับเส้นใยเสื้อผ้า เพราะโปรตีนจะแข็งตัวเป็นก้อน และไม่ละลายที่ค่าความเป็นกรดด่างเป็นด่าง (9.0-10.0) การใช้โปรติเอสในสารซักฟอกสามารถนำมาใช้แก้ปัญหาได้ เพราะเอนไซม์จะย่อยโปรตีนที่เกาะอยู่บนเสื้อผ้า ทำให้มีประสิทธิภาพในการซักล้างมากขึ้น โปรติเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรมซักฟอกควรมีความเฉพาะเจาะจงกับซับสเตรตเป็นช่วงกว้าง ซึ่งจะสามารถซักล้างคราบที่เกิดจากอาหาร,เลือด และสารคัดหลั่ง นอกจากนี้ยังควรเป็นโปรติเอสที่มีความเสถียรในภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่างสูง และมีความทนทานต่อ oxizing และ chelating agents โปรติเอสที่ซื้อขายในอุตสาหกรรมซักฟอกได้แก่ Alcalase, Esperase และ Savinase จาก Novo Industry

2.4.2 อุตสาหกรรมการฟอกหนัง

การใช้โปรติเอสในการฟอกหนังแบ่งเป็น 2 ข้อ (Outtrup และ Boyce, 1990)

1. การกำจัดขนสัตว์ (dehairing) มีการนำอัลคาไลน์โปรติเอสจากจุลินทรีย์มาใช้แทนสารเคมี ซึ่งข้อดีของการใช้โปรติเอสคือลดปัญหาการบำบัดของเสียจากโรงงาน เนื่องจากสารเคมีที่ใช้

2. การแช่หนังสัตว์ในด่าง (bating) เพื่อทำให้หนังมีความนุ่มและยืดหยุ่นมากขึ้น แต่เดิมการแช่หนังสัตว์ให้มีความนุ่มและยืดหยุ่นใช้เอนไซม์จากตับอ่อน เช่น Trypsin และ Pancreatin จึงมีการนำอัลคาไลน์โปรติเอสมาใช้ร่วมกันซึ่งได้ผลดี แหล่งอัลคาไลน์โปรติเอสผลิตจาก Aspergillus oryzae, Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus licheniformis ที่มีขายในชื่อการค้าได้แก่ PIN, Pyrase, Novocor AD ,NUE เป็นต้น

การใช้โปรติเอสในการฟอกหนังไม่เพียงช่วยลดปัญหามลพิษยังช่วยประหยัดพลังงานอีกด้วย (Rao และคณะ 1998)

2.4.3 อุตสาหกรรมอาหาร

ในอุตสาหกรรมอาหาร มีความต้องการปรับปรุงอาหารโดยใช้วิธีที่ไม่สูญเสียคุณค่าทางโภชนาการ นอกจากนี้ยังมีการจำกัดสารเติมแต่ง การใช้วิธีทางเคมีไม่เป็นที่ยอมรับเพราะเกิดปฏิกิริยาที่รุนแรง การเกิดปฏิกิริยาที่ไม่จำเพาะ และความยากในการแยกออกจากผลิตภัณฑ์ภายหลัง เอนไซม์มีข้อได้เปรียบคืออัตราการเกิดปฏิกิริยาเร็วแต่ไม่รุนแรง มีความจำเพาะสูง และสามารถแยกออกจากผลิตภัณฑ์ได้ง่าย

<u>อุตสาหกรรมการทำเนยแข็ง</u>

การใช้เอนไซม์เรนเนตจากกระเพาะลูกวัว ทำให้เกิดการตกตะกอนของน้ำนมอย่างรวดเร็วในค่าความเป็นกรดด่างที่เป็นกลาง ซึ่งมีการสลายตัวของโปรตีนในน้ำนมต่ำ แต่เอนไซม์เรนเนตจากกระเพาะลูกวัวมีข้อเสียคือ ต้องสกัดจากกระเพาะที่สี่ของลูกวัว ซึ่งถ้าเกิดปัญหาลูกวัวขาดแคลนจะทำให้มีต้นทุนของเนยแข็งสูงตามไปด้วย จึงมีการนำเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่มีลักษณะใกล้เคียงมาแทน เช่น Rennin-like enzyme จาก *Mucor michei, Mucor pusillus* และ *Endothia parasitica* เป็นต้น

อุตสาหกรรมการทำเบเกอรี

การนำโปรติเอสมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงโปรตีนในแป้งสาลีหรือกลูเตน (gluten) ในก้อนแป้งสาลี (dough) ตามต้องการ (Outtrup และ Boyce, 1990) เช่น ในการทำ cracker และ biscuit ส่วนมากใช้แอซิดโปรติเอสจากราทำให้กลูเตนถูกย่อยสลาย ทำให้อากาศไม่สามารถถูกกักเก็บในก้อนแป้งระหว่างการหมักจากยีสต์ จึงทำให้ก้อนแป้งไม่พอง เมื่อนำไปอบจะได้เนื้อแป้งที่กรอบมาก โปรติเอสที่ใช้ เช่น จาก *Bacillus amyloliquefaciens* ซึ่งเป็นนิวทรัลโปรติเอส นอกจานี้ยังมีการใช้โปรติเอสเพื่อทำให้เบเกอรีมีรสชาติที่ดีขึ้นจากสารให้กลิ่นของกรดอะมิโน ทำให้เกิดกลิ่นที่น่ารับประทาน (Poutanen, 1977)

อุตสาหกรรมการหมักเบียร์

ในขั้นตอนการผลิตของการหมักเบียร์ ซึ่งเป็นการนำข้าวบาร์เล่ย์มาหมัก หรือเรียกว่ามอลต์ (malt) หลังจากหมักจะนำมากรองของเหลวที่มีรสหวาน นำมาต้มกับดอกฮอบส์ (hops) โดยของเหลวที่ได้จะถูกทำให้เย็นและเติมยีสต์ หลังจากหมักจะได้เป็นเบียร์สด แหล่ง

ผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการหมักเบียร์คือยีสต์ ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญ ถ้ายีสต์ที่ใช้ผลิตเอนไซม์น้อย เบียร์ที่ได้จะมีคุณภาพไม่ดี ยีสต์ที่ใช้เป็นยีสต์ที่มีชีวิตและยังต้องการสารอาหารเพื่อการเจริญ เช่น โปรตีน ถ้ามีกรดอะมิโนอิสระไม่เพียงพอการหมักก็จะไม่ดี จึงมีการนำนิวทรัล โปรติเอส จากแบคทีเรียมาเติมในการหมัก เพื่อเพิ่มปริมาณกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งเป็นการปรับปรุงคุณภาพเบียร์ให้ดีขึ้น นอกจากนี้ในขั้นตอนการเก็บเบียร์ในอุณหภูมิต่ำจะเกิดความขุ่น เนื่องจากมีสารประกอบพอลิฟีนอล, คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน ดังนั้นการใส่โปรติเอสจะทำให้เบียร์มีความใสมากขึ้น (Aunstrup, 1979)

ผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง

ในอุตสาหกรรมการทำซีอิ๊ว (soy sauce) มีการใช้เอนไซม์โปรติเอสจากราในการย่อยสลายโปรตีนในถั่วเหลือง เช่น *Aspergillus oryzae* และ *Aspergillus sojae* เป็นต้น (Rao และคณะ, 1998)

2.4.4 อุตสาหกรรมการปรุงยา

ความหลากหลายและความเฉพาะเจาะจงของโปรติเอสเป็นข้อดีในการนำมาผลิตยาที่ประสิทธิภาพเช่น การใช้คอลลาจีเนส หรือ สับทิลิซิน ผสมผสานกับยาปฏิชีวนะแบบ broad-spectrum ในการรักษาบาดแผล, การใช้แอสปาร์จีเนส (asparginase) ย่อยแอสปาร์จีน (aspargine) ในเส้นเลือดจากโรค lymphocytic leukemia และ การใช้อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Conidiobolus coronatus* แทนทริปซินในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อของสัตว์ (Chiplonkar,1985) เป็นต้น

2.5 การหาแอคติวิตีของโปรติเอส

เนื่องจากธรรมชาติของโปรติเอสมีความแตกต่างกันหลายชนิด วิธีการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของโปรติเอสจึงมีมากมายหลายวิธีดังนี้ (Sarath และคณะ, 1989)

2.5.1 การใช้สับสเตรตจากธรรมชาติ

เหมาะสำหรับใช้หาแอคติวิตีของเอนโดโปรติเอส สับสเตรตที่นิยมใช้ได้แก่

- casein (Hagihara และคณะ, 1958; Ohta, 1967; Feder และ Schuck, 1970; Millet, 1970; Uehara และคณะ, 1979; Takami และคณะ 1990; Mansfeld และคณะ, 1997; Matta และ Punj, 1998)

- hammarstein casein (Matsuzawa และคณะ, 1983; Fujii และคณะ, 1983; Lee และคณะ, 1996; Kim และคณะ, 1999; Kumar และคณะ, 1999)
- haemoglobin (Wu และ Hang, 1998)
- azocasein (Millet, 1970; Ohta และคณะ, 1995; Choi และคณะ,1999; Takii และคณะ, 1998; Nongporn และคณะ, 1999; Boonyaras และคณะ, 2000)
- azoalbumin (Sarath และคณะ, 1989)

การหาแอคติวิตีของ casein, hammarstein casein และ haemoglobin จะวัดจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นซึ่งไม่ตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก เช่น ไธโรซีน หรือ ทริปโทฟาน โดยเทคนิค spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 275 ถึง 280 นาโนเมตร (สุรีย์ ฟูตระกูล และคณะ, 2536) หรือเติม Folin phenol reagent ลงไปแล้ววัดที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (Keay และ Wildi, 1970)

สำหรับ azocasein และ azoalbumin :ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีสี (Chromogenic proteins) นิยมใช้ในเชิงพานิชย์ เนื่องจากการวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเป็นสายเปปไทด์มวลโมเลกุลต่ำที่มีสีได้สะดวก เพราะอยู่ในช่วงแสงธรรมดา (visible light) จึงใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีราคาถูกได้ กล่าวไม่ต้องมีระบบวัดค่าดูดกลืนแสงในช่วงเหนือม่วง(UV light)

2.5.2 การใช้สับสเตรตสังเคราะห์

เหมาะสำหรับการใช้ทดสอบความจำเพาะของโปรติเอส สามารถแบ่งแยกเป็น 3 ประเภท (Sarath และคณะ, 1989) ได้แก่ สับเตรตสำหรับเอนโดเปปติเดส, สับเตรตสำหรับอะมิโนเปปติเดส (aminopeptidase substrates) และสับเตรตสำหรับคาร์บอกซีเปป-ติเดส (carboxypeptidase substrates)

2.5.3 การวัดแอคติวิตีแบบ solid-phase

วัดโดยการทำให้เอนไซม์ไม่เคลื่อนที่ หรือสับสเตรตไม่เคลื่อนที่ หรือทั้งสองไม่เคลื่อน ตัวอย่างเช่น การย้อมแอคติวิตีบนอีเลคโทรโฟรีซีส (activity staining) และ การวัดรัศมีการแพร่บนวุ้นที่มีสับสเตรต (plate assay)(Schmacher และ Schill, 1972) เป็นต้น

2.6 โปรติเอสจากแบคทีเรียชอบร้อน (thermophilic bacteria)

โปรติเอสที่เสถียรต่ออุณหภูมิสูงพบในจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรียชอบร้อน ดังตัวอย่างในตารางที่ 2.1 เนื่องจากจุลินทรีย์เป็นแหล่งสำคัญในอุตสาหกรรมผลิตโปรติเอสที่เสถียรต่ออุณหภูมิสูง ทำให้มีการวิจัยค้นหาและศึกษาสมบัติต่างๆของโปรติเอสที่เสถียรต่ออุณหภูมิสูงที่ได้จาก

จุลินทรีย์ชอบร้อน ซึ่งโปรติเอสที่เสถียรต่ออุณหภูมิสูงมีข้อดีในการนำไปประยุกต์ใช้ได้หลายประการ (สุรีย์ ฟูตระกูล และคณะ, 2536) ตัวอย่างเช่น ความสามารถในการใช้ในกระบวนการที่มีอุณหภูมิสูง, การลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่เจริญที่อุณหภูมิต่ำเนื่องจากการใช้ปฏิกรณ์ที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น และความเสถียรของโปรติเอสต่อสภาวะที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ (ความเป็นกรดด่าง, สารลดแรงตึงผิว, ความแรงของไอออน และตัวทำละลายอินทรีย์)

ตารางที่ 2.1 จุลินทรีย์จำพวกชอบร้อนที่สร้างโปรติเอสที่เสถียรต่ออุณหภูมิสูง (Kusek และ Kinsella, 1988)

เอนไซม์	แหล่งของเอนไซม์	ประเภทของโปรติเอส	มวลโมเลกุล	ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)
Protease	*Thermospora fusca* YX	Serine	14,500	9.0	80
Protease	*Thermus caldophilus* GX24	Serine	31,000	7.8	90
Subtilisin carlberg	*Bacillus licheniformis*	Serine	27,000	9.0	60
Thermitase	*Thermoactinomyces vulgaris*	Serine	28,400	8.5	85
Thermolysin	*Bacillus thermoproteolyticus*	Metal	34,500	7.2	60

โปรติเอสที่ได้จากจุลินทรีย์จำพวกเอ็กทรีมเทอร์โมไฟล์ (extreme thermophile, อุณหภูมิที่เจริญเติบโตได้ดีสูงกว่า 65 องศาเซลเซียส (Cowan, 1992)) มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงได้ดีกว่าโปรติเอสจากเทอร์โมไฟล์ (thermophile, อุณหภูมิที่เจริญเติบโตได้ดีมากกว่า 50 องศาเซลเซียส) และมีโซไฟล์ (mesophile, อุณหภูมิที่เจริญเติบโตได้ดีอยู่ต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส) ดังตารางที่ 2.2 ดังนั้นถ้าสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงๆ น่าจะช่วยให้ได้โปรติเอสที่เสถียรต่ออุณหภูมิได้ดีขึ้น

ตารางที่ 2.2 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของโปรติเอสที่ได้จากจุลินทรีย์จำพวกเอ็กทรีมเทอร์โมไฟล์, เทอร์โมไฟล์ และมีโซไฟล์ (Cowan และคณะ, 1985)

จุลินทรีย์ที่ผลิตโปรติเอส	อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ (องศาเซลเซียส)	เวลาครึ่งชีวิตของโปรติเอส (นาที)	อุณหภูมิทดสอบเอมไซม์ (องศาเซลเซียส)
B. subtilis	37	10	60
B. stearothermophilus NCIB 8924	55	15	74
Mulbranchea pulchella var *sulfurea*	55	120	73
Streptomyces rectus var. *proteolyticus*	50	32	82
Thermus aquaticus T351	75	1800	80
T. aquaticus YT1	75	180	80
T. caldolyticus	72	>480	80
T. caldophilus	70	120	80

โปรติเอสจากเทอร์โมไฟล์ที่ได้มีผู้ศึกษาและวิจัยอย่างมาก ได้แก่ เทอร์โมไลซิน ซึ่งเป็นนิวทรัลโปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus thermoproteolyticus* มีข้อดีคือมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูง มีครึ่งชีวิตเป็นเวลา 1 ชม.ที่ 80 องศาเซลเซียส (Rao และคณะ 1998) นอกจากนี้ยังมีผู้ศึกษาเกี่ยวกับโปรติเอสที่ได้จากจุลินทรีย์พวกเอ็กทรีมเทอร์โมไฟล์ ตัวอย่างเช่น aqualysin I ได้จาก *Thermus aqualyticus* YT-1 เป็นอัลคาร์ไลน์โปรติเอสที่มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูง และทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส (Matsuzawa และคณะ, 1983) และ caldolysin ซึ่งได้จาก *Thermus aqualyticus* T-351 (Cowan และคณะ, 1985)

2.7 การทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์

มีรายงานมากมายที่เกี่ยวกับการทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์ ผู้วิจัยจึงตรวจเอกสารให้จำกัดเฉพาะโปรติเอสที่เสถียรต่อความร้อน เพื่อเป็นแนวทางในการทำวิจัย

Chopra และ Mathur ปี ค.ศ. 1985 ศึกษาโปรติเอสที่ส่งออกนอกเซลล์ จาก *Bacillus stearothermophilus* RM-67 ทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต อิ่มตัว 40-70 % ,นำมาผ่านลงในคอลัมน์เจลฟิลเทรชั่นเซฟาเดกซ์ จี 100 (Sephadex G-100) และคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุไดเอธิลอะมิโนเอธิลเซฟาเดกซ์ A 50 (diethylaminoethyl-Sephadex A-50 ion-exchange chromatography) พบว่ามีเอนไซม์ 2 ชนิดแตกต่างกัน คือ โปรติเอส 1 บริสุทธิ์ขึ้น 39.5 เท่า เหลือแอคติวิตี 8.1 % มีมวลโมเลกุล 67,610 และโปรติเอส 2 บริสุทธิ์ขึ้น 87.8 เท่า เหลือแอคติวิตี 59.7 % มีมวลโมเลกุล 19,950 เมื่อนำมาศึกษาสมบัติเอนไซม์ พบว่าโปรติเอสทั้งสองเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างเป็น 8.0 และอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

Matta และคณะ ปี ค.ศ. 1994 ศึกษาการทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์จาก *Pseudomonas* sp. AFT-36 โดยนำ crude enzyme มาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ,ตกตะกอนด้วยอะซิโตน และนำมาลงในคอลัมน์เจลฟิลเทรชั่นเซฟาเดกซ์ จี 100 (Sephadex G-100) โปรติเอสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว เหลือแอคติวิตี 25 % ในเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เอนไซม์ภูกยับยั้งได้ด้วย EDTA และ 1,10-phenanthroline และมีมวลโมเลกุล 39 กิโลดาลตัน

Gey และ Unger ปี ค.ศ. 1995 ศึกษาโปรติเอสที่เสถียรต่อความร้อน จาก *Bacillus stearothermophilus* TP 26 และทำให้บริสุทธิ์โดยทำ crude filtrate ให้เข้มข้น แล้วนำมาผ่านลงในคอลัมน์ซีเอ็ม เซฟาคริล เอส-200 (Sephacryl S-200) รวมส่วนที่มีแอคติวิตีและนำมาแยกโดย HPLC size exclusion column (BIO-SIL TSK-) พบว่า เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส

Ohta และคณะ ในปี ค.ศ. 1995 ศึกษาการทำนิวทรัลโปรติเอสทนร้อนให้บริสุทธิ์ จาก *Bacillus stearothermophilus* No 2 โดยนำ crude filtrate มาตกตะกอนด้วยอะซิโตน ,ผ่านลงในคอลัมน์ไฮดรอกซิลแอพพาไทท์, ดีอีเออี เซพฟาเด็กซ์ เอ-50 (DEAE-Sephadex A-50) แล้วทำให้เข้มข้นด้วยอัลตราฟิลเทรชั่น และนำไปผ่านคอลัมน์เซพฟาเด็กซ์ จี-75 (Sephadex G-75 superfine) พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 46.32 เท่า เหลือแอคติวิตี 8.2 % เมื่อศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 7.5-8.0 และอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักโมเลกุล 35 กิโลดาลตัน

Prescott และคณะ ในปี ค.ศ. 1995 ศึกษาการทำแอสิดโปรติเอสให้บริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. Wai219 โดยใช้คอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุลบ, คอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุบวก และคอลัมน์ฟีนิล-เซพฟาโรส (phenyl-Sepharose) เมื่อศึกษาลักษณะสมบัติของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 3.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของโปรติเอสไม่ถูกยับยั้งด้วยตัวยับยั้งของซีรีน, ซิสเทอีน และเมทัลโลโปรติเอส นอกจากนี้ตัวยับยั้งของแอสพาร์เทสโปรติเอส (pepstatin) ก็ไม่สามารถยับยั้งแอคติวิตีได้ โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. Wai219 ถูกจัดให้อยู่ในจำพวก แอสพาร์เทสโปรติเอสในกลุ่มที่ไม่ไวต่อ pepstatin

Ferrero และคณะ ในปี ค.ศ. 1996 ศึกษาเชื้อ *Bacillus licheniformis* MIR 29 ซึ่งสามารถสร้างโปรติเอสทนร้อนที่ส่งออกนอกเซลล์ได้ เชื้อนี้เจริญได้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และความเป็นกรดด่าง 9.0 โดยมีเคซีนเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการสร้างโปรติเอส โปรติเอสที่ได้เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างเป็น 12.0 และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จัดเป็นอัลคาไลน์ ซีรีน โปรติเอส เพราะถูกยับยั้งได้ด้วย PMSF เมื่อตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลด้วย SDS-PAGE พบแถบของอัลคาไลน์แอคติวิตี 2 แถบ คิดเป็นน้ำหนักโมเลกุล 25 และ 40 กิโลดาลตัน

Lu และ Chang .ในปี ค.ศ. 1996 ได้แยกเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* CCRC 15541 จากไต้หวันซึ่งเชื้อนี้สร้างนิวทรัลโปรติเอสที่มีความเสถียรต่อความร้อน จากการศึกษาสมบัติเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 7.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส-เอนไซม์เหลือแอคติวิตี 85 % ในเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และถูกยับยั้งได้ด้วย EDTA

Schokker และ vanBoekel ในปี ค.ศ. 1997 ศึกษาโปรติเอสที่ส่งออกนอกเซลล์ จาก *Pseudomonas fluorescens* 22F ทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำมาทำ hydrophobic interaction chromatography ,อัลตราฟิลเทรชั่น (ultrafiltration) และเจลฟิลเทรชั่น(gel filtration พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 57 เท่า เหลือแอคติวิตี 40 % มีมวลโมเลกุล 57 กิโลดาลตันเมื่อคำนวณด้วยวิธี SDS-PAGE และ 47 กิโลดาลตันเมื่อคำนวณด้วยวิธีเจลฟิลเทรชั่น เมื่อนำมาศึกษาสมบัติเอนไซม์ พบว่าโปรติเอสเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างเป็น 9.5-10.0 และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

Matta และ Punj ปี ค.ศ. 1998 ศึกษาการทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์บางส่วนจาก *Bacillus polymyxa* B-17 โดยนำ crude enzyme มาตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และนำมาผ่านลงในคอลัมน์เจลฟิลเทรชั่นเซฟาเดกซ์ จี 100 (Sephadex G-100) พบว่าโปรติเอสบริสุทธิ์ขึ้น

40.38 เท่า เหลือแอคติวิตี 78.35 % จากการศึกษาสมบัติเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 7.5 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักโมเลกุล 30 กิโลดาลตัน และถูกยับยั้งได้ด้วย metal chelating agents

Jung และคณะ ปี ค.ศ. 1999 ศึกษาการทำเมทัลโลโปรติเอสให้บริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. JH 108 โดยใช้วิธีตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว แล้วผ่านลงในคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุลบ, คอลัมน์เจลฟิลเทรชั่น และคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุบวก ได้เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล 36 กิโลดาลตัน จากการศึกษาสมบัติเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างเป็น 8.0-9.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นอกจากนี้โปรติเอสยังถูกยับยั้งได้ด้วย metal chelating agent คือ EDTA และ 1,10-phenanthroline

Nongporn และคณะ ในปี ค.ศ. 1999 ศึกษาการทำอัลคาไลน์โปรติเอสให้บริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. PS719 โดยใช้วิธีตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว แล้วผ่านลงในคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุดีอีเออี-เซลลูโลส DE-52 (DEAE-cellulose DE-52) และคอลัมน์แอฟฟินิตี อัลฟา-เคซีน อกาโรส (α-casein agrose column) ได้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น 18.5 เท่า เหลือแอคติวิตี 39 % และมีน้ำหนักโมเลกุล 42 กิโลดาลตัน จากการศึกษาสมบัติเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างเป็น 9.0 และอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส มีความเสถียรต่ออุณหภูมิมากกว่า 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โปรติเอสนี้จัดเป็น ซีรีนโปรติเอส เพราะถูกยับยั้งได้ด้วย PMSF, DCI และ TLCK

Venter และคณะ ปี ค.ศ. 1999 ศึกษาการทำโปรติเอสที่เสถียรต่อความร้อนให้บริสุทธิ์จาก *Chryseobacterium indologenes* Ix9a โดยใช้คอลัมน์เมทัลแอฟฟินิตี (metal affinity chromatography) ได้เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล 24 กิโลดาลตัน จากการศึกษาสมบัติเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างเป็น 6.5 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้โปรติเอสยังถูกยับยั้งได้ด้วย metal chelating agent คือ EDTA และ 1,10-phenanthroline จัดเป็นเมทัลโลโปรติเอส

Boonyaras และ คณะ ปี ค.ศ. 2000 ศึกษาโปรติเอส จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี 3 คอลัมน์ ได้ คอลัมน์ไลซีนแอฟฟินิตี (lysine affinity chromatography), คอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุลบ (strong anion exchange Q HyperD chromatography) และคอลัมน์เจลฟิลเตรชันอัลตราเจล เอซี เอ 44 (Ultrogel AcA 44 gel

filtration) พบว่าสามารถแยกโปรติเอสได้ 3 ตัว คือโปรติเอส เอส, เอ็น และ บี เมื่อนำมาศึกษาลักษณะสมบัติพบว่าเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่าง 8.5, 7.5 และ7.0 ตามลำดับ, อุณหภูมิ 75, 85 และ 90 องศาเซลเซียสตามลำดับ และมีแอคติวิตีลดลงครึ่งหนึ่งในเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 72, 78 และ 90 องศาเซลเซียสตามลำดับ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 36, 53 และ 71 กิโลดาลตันตามลำดับ นอกจากนี้โปรติเอสทั้งสามยังถูกยับยั้งได้ด้วย metal chelating agent คือ EDTA และ 1,10-phenanthroline

Chung และ คณะ ปี ค.ศ. 2002 ศึกษาเมทไธโอนีน อะมิโนเปปติเดส (Methionine aminopeptidase (MetAP)) จาก *Bacillus stearothermophilus* (KCTC 1752) ทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยความร้อน และผ่านคอลัมน์โครมาโทรกราฟี 4 คอลัมน์ (ได้แก่ คอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุดีอีเออี เซพฟาโรส (DEAESepharose ion exchange), ไฮดรอกซิลแอพพาไทท์, อัลตราเจล เอซี เอ .54 (hydroxylapatite, Ultrogel AcA 54 gel filtration), และ รีแอคทีฟ เรด 120 ดาย (Reactive red 120 dye affinity chromatography)) จากการศึกษาสมบัติเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 8.0 ,อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสและมีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที มีน้ำหนักโมเลกุล 81,300 ดาลตัน และมีหน่วยย่อย 2 หน่วยที่ขนาดเท่ากัน 41,000 ดาลตัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย