บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

1. การลดระยะเวลาการหมักปลา

น้ำปลาเป็นสารปรุงรสที่นิยมใช้กันมานาน ให้ทั้งรสเค็ม,กลิ่นหอมและคุณค่าทางโภชนาการ แต่กรรมวิธีการผลิตยังเป็นแบบดั้งเดิมดังกล่าวแล้วในบทนำ ซึ่งต้องใช้เวลานานประมาณ 12-18 เดือน (อำนวย โชติญาณวงษ์ และคนอื่นๆ ,2526) ปัจจุบันจึงมีผู้คิดค้นวิธีการต่าง ๆ เพื่อลดระยะเวลาการผลิตน้ำปลาให้สั้นลง โดยที่ยังคงคุณภาพน้ำปลาเช่นเดิม ซึ่งเป็นการลดต้นทุนการผลิตและทำให้อุตสาหกรรมน้ำปลาก้าวสู่ยุคอุตสาหกรรมใหม่อย่างแท้จริง ขั้นตอนในกระบวนการหมักน้ำปลาอาจแบ่งได้เป็น 2 ขั้นตอนใหญ่ ๆ คือ ขั้นตอนการย่อยสลายปลาให้กลายเป็นของเหลว และขั้นตอนการเกิดกลิ่น,รส (Saisithi, 1967) ซึ่งการพัฒนากรรมวิธีการผลิตน้ำปลาอาจทำได้ที่ขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งหรือทั้ง 2 ขั้นตอน ดังนี้

1.1 การลดระยะเวลาการย่อยสลายเนื้อปลา เป็นช่วงที่โปรตีนของเนื้อปลาถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์จากตัวปลาเอง และเอนไซม์จากแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากับปลาและ/หรือเกลือหรือจากแบคทีเรียที่มีอยู่เดิมในถังหมัก ให้กลายเป็นเพพไทด์ (peptides) สั้น ๆ และกรดอะมิโนในที่สุด (Amano, 1962; Visco and Fratoni,1963; Voskresensky, 1965) การหมักปลาโดยใช้ปลาที่เอาอวัยวะภายในออกหมดต้องใช้เวลานานขึ้น และกลิ่นรสไม่เหมือนเดิม (Uyenco, Lawas, Briones and Tarue, 1953; Amano, 1962; McIver, Brodes and Reineccinus, 1982) การย่นระยะเวลาการหมักน้ำปลาในขั้นตอนแรกคือการทำให้โปรตีนในเนื้อปลาถูกย่อยสลายเร็วขึ้น ซึ่งอาจกระทำได้หลายวิธีดังนี้

1.1.1 การเพิ่มอุณหภูมิในการหมักน้ำปลา พบว่าอุณหภูมิและปริมาณเกลือมีความสัมพันธ์กัน โดยหากลดอุณหภูมิลงจะต้องใช้ปริมาณเกลือเพิ่มขึ้น (ชิกิโอ มูรายาม่า และคนอื่น, 2505) ในปี 1968 Vardhanabhuti รายงานว่าอุณหภูมิที่ทำให้โปรตีนสลายตัวเกิดเป็นน้ำปลาได้เร็วที่สุดคือ 49 องศาเซลเซียส รองลงมาคือ 37 องศาเซลเซียส แต่ที่ 37 องศาเซลเซียสจะได้น้ำปลาที่มีกลิ่นรสดีกว่า ซึ่งผลนี้สอดคล้องกับการทดลองหมักปลากะตักด้วยเกลือธรรมดาโดยใช้อุณหภูมิต่าง ๆ ของกรมวิทยาศาสตร์ (สุพิศ สาครมงคล และคนอื่นๆ, 2509) ในขณะที่การบดปลาก่อนหมักและอาศัยอุณหภูมิ

จากแสงอาทิตย์ไม่ทำให้ระยะเวลาการหมักสั้นลง (อำนวย โชติญาณวงษ์ และคนอื่น ๆ, 2526)

1.1.2 การย่อยสลายเนื้อปลาด้วยกรด กรดที่นิยมใช้ได้แก่ กรดซัลฟูริค และกรดไฮโดรคลอริค แต่ทางด้านโภชนาการไม่ยินยอมให้นำกรดซัลฟูริคมาใช้เป็นอาหาร (Rederson and Baker, 1954) จึงนิยมใช้กรดไฮโดรคลอริคมากกว่า การย่อยสลายโปรตีนขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ชนิดและความเข้มข้นของกรด รวมทั้งปริมาณสารที่ไม่ใช่โปรตีน (non-protein substances) ที่มีอยู่ (Hill, 1965) การใช้เวลาย่อยสลาย 4 ชั่วโมง ทำให้ได้สัดส่วนของกรดอะมิโนไนโตรเจนต่อไนโตรเจนทั้งหมดในไฮโดรไลเสท (hydrolysate) สูงสุด คือ 60-65 เปอร์เซ็นต์ (Kaneda and Saito, 1948) ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดของกรดไฮโดรคลอริคในการทำน้ำปลา คือ 20 เปอร์เซ็นต์ หากใช้ต่ำกว่านี้ต้องใช้เวลาในการย่อยสลายนานขึ้น และกลิ่นที่ได้จะไม่ค่อยดี เนื่องจากการย่อยโปรตีนไม่สมบูรณ์ (Varavijja et al, 1957) และ การย่อยสลายโปรตีนด้วยกรดทำให้กรดอะมิโนบางชนิด เช่น ทริพโตเฟนถูกทำลายไป

1.1.3 การย่อยสลายเนื้อปลาด้วยด่าง นำด่างมาใช้ย่อยสลายเนื้อปลา จากนั้นทำให้เป็นกลาง, กรอง แล้วเติมเกลือลงไปหมักต่อเพื่อเพิ่มกลิ่นและรส วิธีนี้ได้น้ำปลาเร็วขึ้นและทริพโตเฟนไม่ถูกทำลาย (Hall, 1946) อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ยังไม่เป็นที่นิยม เนื่องจากการย่อยสลายยังเกิดไม่สมบูรณ์ถึงขั้นได้กรดอะมิโนออกมาทั้งหมด และกลิ่นรสไม่ดีเท่ากับการย่อยด้วยกรด

1.1.4 การย่อยสลายเนื้อปลาด้วยเอนไซม์ เอนไซม์โปรติเอสใช้ในการย่อยสลายโปรตีน ซึ่งเป็นโมเลกุลใหญ่ให้เป็นเพพไทด์และกรดอะมิโนจะเกิดตามขั้นตอนดังนี้

$$\text{proteins} \xrightarrow{\text{Proteases}} \text{peptides} \xrightarrow{\text{Peptidases}} \text{amino acids}$$

จากนั้นกรดอะมิโนจะถูกย่อยสลายต่อไปเป็น แอมมีน, กรดคีโต, แอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์ เอนไซม์โปรติเอสอาจได้มาจากพืช, สัตว์, จุลินทรีย์ หรือสังเคราะห์ขึ้น (Perlmann and Lorand, 1970) เช่น ปาเปน (papain) จากยางมะละกอ, โบรมิเลน (Bromelain) จากสับปะรด, ฟิซิน (ficin) จากผลมะเดื่อ, ทริพซิน (Trypsin) และเปปซิน (Pepsin) จากสัตว์, โรไซม์ (Rhozyme) และสับทิลิซิน (Subtilisin) จากจุลินทรีย์ ส่วนไบโอเปส (Biopase) เป็นเอนไซม์ที่สังเคราะห์ขึ้น (artificial enzymes) ชิกิโอ มูรายาม่า และคนอื่นๆ (2505) ทดลองใช้เอนไซม์สังเคราะห์คือ ไบโอเปสและโปรเนสในการหมักน้ำปลา สามารถผลิตน้ำปลาคุณภาพดีใน

ระยะเวลาสั้นประมาณ 70 วัน

Sen, Sripathy, Lahiry, Sreenivasan and Subrahmanyan (1962) พบว่าปาเปนสามารถย่อยเนื้อปลาได้ดี ในช่วง pH 5.0-7.0 และที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์คือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ การย่อยสลายในระยะแรกที่ pH 5.0 อะมิโนไนโตรเจน (amino acid nitrogen) จะถูกปล่อยออกมามากกว่าที่ pH 7.0 และจะมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (free amino acids) สูงมาก

สำรอง เผ่าหอม (2507) สามารถทำน้ำปลาคุณภาพดีจากปลาทู, ปลาหลังเขียว และปลาไส้ตันได้ภายในเวลาเพียง 47 วัน โดยเติมโปรเนสช่วยเร่งปฏิกิริยา ขณะเดียวกันปราโมทย์ สุวรรณศาสตร์ (2507) พบว่าทั้งไบโอเปสและปาเปนสามารถเร่งให้เกิดน้ำปลาได้ภายใน 48 วัน โดยในระยะแรก ปาเปนจะย่อยสลายเนื้อปลาให้อะมิโนไนโตรเจนมากกว่าไบโอเปสและแนะนำให้ใช้ปาเปนในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำปลา เพราะยางมะละกอหาได้ง่ายและราคาถูก

ประเสริฐ กองทิพย์ (2508) ทดลองใช้โบรมิเลนหมักน้ำปลา พบว่าทำให้ได้น้ำปลาคุณภาพดีและเร็วกว่าปกติมาก แต่การเตรียมเอนไซม์บริสุทธิ์จากสับปะรดสิ้นเปลืองมาก ไม่เหมาะในการนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม

Reed (1966) รายงานว่าปาเปนเมื่ออยู่ในรูปสารละลายจะมีความเสถียร (stability) ดีที่ pH 5.0 แต่แอคติวิตีจะลดลงเมื่อ pH ต่ำกว่า 3.0 และสูงกว่า 11.0 และจะคงตัวเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ในยางมะละกอสดนอกจากปาเปนแล้วยังมีไคร์มโมปาเปน (chymopapain) และไลโซไซม์ (Lysozyme)

Santinanalert (1979) ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำปลาจากที่ต่าง ๆ ทั่วประเทศไทย พบว่าแบคทีเรียที่พบโดยทั่วไปได้แก่ Halobacterium spp., Halococcus sp., Bacillus spp. และกลุ่ม Coryneform แต่ Halobacterium spp. และ Halococcus sp. มีปริมาณมากที่สุด สาโรจน์ (2531) พบว่าแบคทีเรียกลุ่มโคโลนีสีแดงซึ่งจะปรากฏในช่วง 12 ถึง 124 วันของการหมักเป็นพวกที่เจริญแบ่งตัวเพิ่มจำนวนโดยมีความสัมพันธ์กับสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนทุกชนิดแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรดอะมิโนอิสระที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จึงอาจจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก และนับว่าเป็นกลุ่มที่ควรศึกษาที่สุด เนื่องจากสามารถเจริญเพิ่มจำนวนในถังหมักปลาได้

1.2 การลดระยะเวลาการเกิดกลิ่นและรส

กลิ่นของน้ำปลาประกอบด้วยกรดไขมันที่ระเหยได้ (Volatile fatty acids) เช่น กรดฟอร์มิค (Formic acid) กรดอะซีติก (Acetic acid) กรดโปรปิโอนิค (Propionic acid) กรดบิวทิลิค (Butyric acid) และกรดไขมัน

ที่ไม่ระเหย (Non-volatile fatty acids) เช่น กรดแลคติค (lactic acid) กรดไขมันเหล่านี้เกิดจากการกระทำของแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลม อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม แบคทีเรียที่สำคัญและพบว่ามีบทบาทในกระบวนการหมักน้ำปลาคือ Pediococcus spp. (สิทธินันธุ์ ไชยนันทน์, 2521) การลดระยะเวลาการเกิดกลิ่น อาจทำได้โดยคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสังเคราะห์กรดไขมันจากถังหมักน้ำปลา นำมาเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์แล้วใส่กลับลงในถังหมัก ณ ช่วงเวลาที่เหมาะสม เพื่อให้ปฏิกิริยาการเกิดกลิ่นเร็วขึ้น

ส่วนรสของน้ำปลานั้นประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด กรดอะมิโนเหล่านี้มีรสเฉพาะตัว กรดอะมิโนที่พบเกือบทุกระยะของการหมัก คือ ไลซีน (lysine)กรดแอสปาติก (aspartic acid) กรดกลูตามิค (glutamic acid) ไกลซีน (glycine) ฮิสติดีน (histidine) ลูซีน (leucine) ไอโซลูซีน (isoleucine) และเฟนนิลอลานีน (phenylalanine) (ประเสริฐ สายสิทธิ์, 2511)

2. ชนิดของแบคทีเรีย

แบคทีเรียอาจจัดออกเป็น 3 กลุ่มตามความต้องการเกลือ ดังนี้

2.1 แบคทีเรียพวกไม่ชอบเกลือ (non-halophilic, halophobic หรือ salt-sensitive bacteria) ซึ่งจะรวมแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคส่วนใหญ่ แบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่สามารถเจริญได้ในที่มีความเข้มข้นเกลือสูงกว่า 6 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้ว่าจะมีชีวิตอยู่ได้ยาวนานในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Shewan, 1961;Larsen, 1962; Ingram and Kitchell, 1967)

2.2 แบคทีเรียพวกทนเค็ม (halotolerant หรือ haloduric bacteria) เป็นกลุ่มที่ไม่ต้องการเกลือสำหรับการเติบโต แต่อาจเติบโตได้ในที่มีความเข้มข้นเกลือตั้งแต่ 10 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ซึ่งได้แก่ แบคทีเรียที่สร้างสปอร์, Micrococci, Staphylococci และแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนบางชนิด โดยเฉพาะ Clostridium botulinum (Kushner, 1968)

2.3 แบคทีเรียพวกชอบเค็ม (halophilic bacteria) ต้องการเกลือในการเติบโตมากกว่า 3 เปอร์เซ็นต์และไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีเกลือ อาจแบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ

2.3.1 แบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง (moderately halophilic) แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถเจริญในที่มีความเข้มข้นเกลือ 3-15 เปอร์เซ็นต์ มักพบมากในน้ำทะเล (Kushner, 1968) ได้แก่ Pseudomonas spp., Achromobacter spp.,

Micrococcus spp., Pediococcus spp., Bacillus spp. และกลุ่ม Coryneform (Larsen, 1962)

2.3.2 แบคทีเรียชอบเค็มสูง (extremely halophilic) แบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องการเกลือสำหรับการเจริญ 12 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป (Buchanan and Gibbons, 1974) ได้แก่ แบคทีเรียในวงศ์ Halobacteriaceae ซึ่งมี 2 สกุล คือ Halobacterium spp. และ Halococcus sp. แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีลักษณะเด่น คือ โคโลนีจะมีสีชมพู ส้มถึงแดงสด เนื่องจากมีรงควัตถุคาโรทีนอยด์สีแดง ซึ่งเป็นตัวกั้น (screen) แสงแดดและรังสีอุลตราไวโอเลต ช่วยให้อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำหรือทะเลที่ถูกแผดเผาอยู่ตลอดเวลาได้ในปี 1962 Larsen และ ในปี 1963 Dundas et.al พบว่า wild type สีแดงทนต่อแสงแดดและรังสีอุลตราไวโอเลตได้ดีกว่า mutant ที่ไม่มีสี wild type โคโลนีค่อนข้างโปร่งแสง แกรมลบ บางสายพันธุ์มีรูปร่างหลายแบบ (highly pleomorphic), resting stage ยังไม่ทราบ มักมีช่องอากาศ (gas "vacuole") ส่วนใหญ่เป็นพวกต้องการออกซิเจน (strict aerobes) อาจมี facultative anaerobes บ้างเจริญได้ดีที่ 40-50 องศาเซลเซียส มีคาตาเลสและออกซิเดส ส่วนใหญ่ย่อยเจลลาทินได้มีความต้องการสารอาหารที่ค่อนข้างซับซ้อน ต้องการกรดอะมิโนและวิตามินหลายชนิด (Dundas et al, 1963; Onishi et al, 1965; Gochnauer and Kushner, 1969)

มักจะพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ในน้ำทะเลที่มีสารอินทรีย์ คาดว่าแบคทีเรียเหล่านี้ต้องมีเอนไซม์โปรติเอสจึงจะดำรงชีวิตอยู่ได้ในปี 1922 Harrison และ Kennedy สามารถแยกแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้สำเร็จจากปลาเค็ม (salted fish) ซึ่งมีลักษณะที่เรียกว่า "Red eye" (Anderson, 1954) ต่อมาแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ได้ชื่อว่า Halobacterium salinarium โดย Volcani (1957) ในปี ค.ศ. 1954 Anderson พบว่าพวก red halophilic bacteria นี้สามารถย่อยได้ทั้งเจลลาทินและเคซีอีน และมีบทบาทสำคัญในการสร้างกลิ่น indole และแอมโมเนีย ส่วน Gibbons (1957) พบว่าแบคทีเรียชอบเค็ม 49 สายพันธุ์ สามารถย่อยเจลลาทินได้ 45 สายพันธุ์ และย่อยเคซีอีนได้ 22 สายพันธุ์ ต่อมาในปี ค.ศ. 1969 Norberg และ Hofsten พบว่า wild type H. salinarium ย่อยเคซีอีนได้น้อยกว่า mutant ซึ่งไม่มีสี และผลิต extracellular proteinase ที่ pH optimum คือ 8.0 โดยใช้เคซีอีนเป็น ซับสเตรท (substrate) ในปีถัดไปคณะผู้ทำการทดลองนี้สามารถทำ halophilic enzyme ให้บริสุทธิ์ได้โดยใช้ column chromatography ซึ่งบรรจุ hydroxylapatite และโซเดียมคลอไรด์ 20 เปอร์เซ็นต์ (Norberg&Hofsten,1970) ในปี ค.ศ. 1977 Colwell ศึกษาอนุกรมวิธาน (Taxonomy) ของแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่ได้จากแหล่งเดียวกับ Gibbons (1957) รวมทั้งที่แยกเชื้อใหม่จากเกลือทะเล พบว่ามีแบคทีเรียชอบเค็มที่มีรูปร่างเป็นแท่งมากกว่า 80

เปอร์เซ็นต์ที่ย่อยเจลลาทินได้ และ 67 เปอร์เซ็นต์ย่อยเคซีอีนได้ ส่วน แบคทีเรียชอบเค็มสีมีรูปร่างกลม มีเจลลาทิน แต่ไม่มีสายพันธุ์ใด ที่ย่อยเคซีอีนได้เลย ในปี ค.ศ. 1979 Santinanalerts วัดเจลลาทินเนสและเคซิเนสแอคติวิตีของ Halobacterium spp. และ Halococcus sp. ที่แยกได้จากน้ำปลา เป็นการสนับสนุนว่าแบคทีเรียเหล่านี้มีส่วนในการย่อยปลาจากโพลีเปปไทด์เป็นโอลิโกเปปไทด์ (oligopeptides) และกรดอะมิโนในที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า 21 เปอร์เซนต์ของ Halobacterium spp. ที่ย่อยเคซีอีนและเจลลาทิน และแทบจะไม่พบอไมโลไลติค และไลโปไลติคแอคติวิตี (amyolytic and lipolytic activities) ส่วน Halococcus sp. พบ 75 เปอร์เซ็นต์ที่ย่อยเจลลาทินเฉพาะเมื่อมีโซเดียมคลอไรด์ 25 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบ Halococcus sp. ที่ย่อยเคซีอีนได้เช่นเดียวกับการทดลองของ Colwell

3. ชนิดของเอนไซม์โปรติเอส

Barrett (1986) จัดเอนไซม์โปรติเอสเป็น 4 กลุ่มตามคุณสมบัติของ catalytic sites ดังนี้

1. ซีรีนโปรติเอส (serine proteases) เอนไซม์กลุ่มนี้มีกรดอะมิโนซีรีนอยู่ที่ active site ของเอนไซม์ การเร่งปฏิกิริยาถูกยับยั้งโดยสาร diisopropyl fluorophosphate (DFP) (Ball and Jansen, 1952) และ phenylmethane sulfonyl fluoride(PMSF) (Fahrney and Gold, 1963) ไม่มีอะตอมของโลหะเป็นกลุ่ม prosthetic แคลเซียมอิออนช่วยทำให้เอนไซม์เสถียร และ ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) ไม่ยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์นี้ pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา (optimum pH) อยู่ระหว่าง 7.0-11.0 ดังนั้น ซีรีน จะมีลักษณะการย่อยโปรตีนเป็นแบบตัดพันธะในสาย (endopeptidase) (Ward, 1983; Horikoshi and Akiba, 1982) ตัวอย่างเอนไซม์โปรติเอสในกลุ่มนี้ ได้แก่ ทริพซิน, ทรอมบิน (thrombin)

2. นิวทรัลโปรติเอส (neutral proteases) เป็นเอนไซม์ที่มีอะตอมของโลหะ ซึ่งมักเป็นสังกะสี (Zn) ยึดจับกับเอนไซม์ค่อนข้างแน่นในลักษณะเป็นกลุ่ม prosthetic จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า metalloproteases (Ward, 1983) อะตอมโลหะช่วยให้ความเสถียรแก่โครงสร้างของเอนไซม์ (structural stability) นิวทรัลโปรติเอสมีแอคติวิตีที่เหมาะสม (optimum activity) ในการย่อยเคซีอีนในช่วง pH 7.0-8.0 แต่มีความเสถียรในช่วง pH ค่อนข้างกว้าง คือ pH 5.0-6.0 และเมื่อมีแคลเซียมไอออนจะมีความเสถียรเพิ่มขึ้น สาร EDTA ทำหน้าที่เป็น chelating agent ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยเกาะกับอะตอมของสังกะสี ทำให้เอนไซม์ทำงานไม่ได้ (inactive) สารยับยั้งชนิดอื่น ได้แก่ 1,10-phenanthroline, α , α -bipyridine และ

dipicolinic acid ตัวอย่างของโปรติเอสในกลุ่มนี้ได้แก่ thermolysin ผลิตโดยเชื้อ Bacillus thermoproteolyticus ซึ่งต้องการอิออนของสังกะสี, carboxy-peptidase ต้องการโคบอลอิออน (Co^{++}) และนิเกิลอิออน (Ni^{++}), leucine aminopeptidase ต้องการแมกนีเซียมอิออน (Mg^{++}) หรือแมงกานีสอิออน (Mn^{++}) (Williams and Lansford, 1967) เอนไซม์ในกลุ่มนี้เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนที่ตำแหน่งพันธะเพพไทด์ ซึ่งเกิดจากกรดอะมิโนที่มี non-polar group คือ อะลานีน (alanine) วาลีน (valine) ลูซีน ไอโซลูซีน โพรลีน (proline) เฟนิลอะลานีน ทริพโตเฟน และเมธไทโอนีน (methionine)

3. แอสพาร์ติคโปรทีนเนส (aspartic proteinases) (Wagner, 1986) เอนไซม์ในกลุ่มนี้ทำงานได้ดีในช่วง pH 1.0-3.0 จึงจัดเป็น acid proteases เอนไซม์จะไม่มีความเสถียร (instability) และเสียสภาพ (denature) เมื่อ pH สูงกว่า 6.0 การเร่งปฏิกิริยาจะถูกยับยั้งโดย diazoketones (Fruton, 1976) และสารยับยั้งที่ได้จากจุลินทรีย์ เช่น pepstatin (Aoyagi and Umezawa, 1975) ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ เปปซิน และเรนนิน เป็นต้น

4. ซีสเตอีนโปรติเอส(cysteine proteases) แอคติวิตีของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ขึ้นกับการมีซิสเตอีน (cysteine) อยู่ที่ active site ของโมเลกุล ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ เช่น ปาเปน,ฟิซิน และโบรมิเลน

โดยทั่วไปในการตรวจสอบแอคติวิตีของโปรติเอสมีการใช้เคซิอีนและฮีโมโกลบิน (hemoglobin) เป็นซับสเตรท ดังนี้

เอนไซม์โปรติเอส	แหล่งที่มา	ซับสเตรทที่ใช้ในการทดสอบแอคติวิตี แอคติวิตี	เอกสารอ้างอิง
ปาเปน	ยางมะละกอ	ฮีโมโกลบิน เคซีอีน	Arnon, 1970
โบรมิเลน	สับปะรด	เคซีอีน ∝-N- benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) ∝-N- benzoyl-L-arginine amide (BAA)	Murachi, 1970
ฟิซิน	มะเดื่อ	เคซีอีน ซับสเตรทที่สังเคราะห์ขึ้น (synthetic substrate) เช่น p-nitrophenyl carbobenzoxy glycine	Liener and Friedenson, 1970
สับทิลิซิน	Bacillus subtilis	เคซีอีน urea denatured hemoglobin	Ottensen and Svendson, 1970
นิวทรัล โปรติเอส	Bacillus subtilis	เคซีอีน ซับสเตรทที่สังเคราะห์ขึ้น เช่น hyppuryl-L-leucinamide	Yasunobu and McConn, 1970
อัลคาไลด์ โปรติเอส	Aspergillus sp.	เคซีอีน ฮีโมโกลบิน	Nakagawa, 1970
โปรทีนเนส ที่ถูกซับออกนอกเซล	Penicillium notatum	เคซีอีน	Belew and Porath, 1970