หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

โปรตีเอส เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารจำพวกโปรตีน พบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลชีพ ประกอบไปด้วยเอนไซม์หลายชนิด ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกันทางด้านความจำเพาะต่อสับสเตรท บริเวณเร่ง กลไกในการเร่งปฏิกิริยา ช่วง pH และอุณหภูมิในการทำงาน และเสถียรภาพของเอนไซม์ ด้วยคุณสมบัติโปรตีเอสจึงถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหาร เครื่องหนัง ยา สารซักฟอก เป็นต้น ในทางการค้าพบว่ากลุ่มเอนไซม์โปรตีเอสมีส่วนแบ่งตลาดถึง 60 % เมื่อเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่น (Ward,1983)

ในธรรมชาตินั้น โปรตีเอสมีหน้าที่มากมาย เช่น ไฮโดรไลส์สารโพลีเปปไทด์ขนาดใหญ่ให้เล็กลงจนกระทั่งเซลล์สามารถนำไปใช้ได้ โปรตีเอสจากตับอ่อน ลำไส้ กระเพาะ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทำหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการย่อย และดูดซึมสารเข้าเซลล์ นอกจากนี้โปรตีเอสยังมีบทบาทกับเมแทบอลิซึมต่างๆในสิ่งมีชีวิต เช่น การสร้างสปอร์ การงอกของสปอร์ การประกอบตัวของไวรัส กระตุ้นไวรัสทำให้สิ่งมีชีวิตอื่นมีอาการของโรค การจับตัวของเลือด ควบคุมความดันเลือด การแสดงออกของยีน กระตุ้นการเปลี่ยนโปรตีนให้อยู่ในรูปที่พร้อมจะทำงาน และช่วยให้สารที่เซลล์สร้างขึ้นหลั่งออกนอกเซลล์ได้ (Ward,1983)

ชนิด และสมบัติของเอนไซม์โปรตีเอส

เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนอาจแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ตามตำแหน่งพันธะเปปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลส์ คือ เอกโซเปปติเอส (exopeptidase) จะย่อยพันธะเปปไทด์จากด้านนอกเข้ามา และเอนโดเปปติเดส (endopeptidase) จะย่อยในสายโพลีเปปไทด์

เอนไซม์โปรตีเอสที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มเอนโดเปปติเดส จัดเป็น 4 กลุ่ม (Enzyme Nomenclature,1978)

1. ซีรีนโปรตีเอส(Serine protease) เอนไซม์กลุ่มนี้มีกรดอะมิโนซีรีน และฮีสทิดีนอยู่ที่บริเวณเร่ง แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย (Morihara,1974)

1.1 โปรตีเอสที่มีสมบัติคล้ายทริปซิน (Trypsin-like protease) พบใน *Streptomyces spp.* เอนไซม์กลุ่มนี้จะไฮโดรไลส์เฉพาะพันธะเปปไทด์ระหว่าง Arg-Gly และ Lys-Ala เท่านั้น สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ คือ Diisopropyl fluorophosphate (DFP) Soybean trypsin inhibitor และ tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) ตัวอย่างเอนไซม์สำคัญในกลุ่มนี้ ได้แก่ ทริปซิน ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบการย่อย สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องหนัง และยา เอนไซม์ทำงานได้ดีในช่วง pH 4-11 อุณหภูมิ 50° ซ

1.2 อัลคาไลน์โปรตีเอส (Alkaline protease) พบในแบคทีเรียหลายชนิด ยีสต์ รา และยังพบในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมด้วย เอนไซม์สำคัญ ได้แก่ Subtilisin Carlsberg และ Subtilisin BPN (Bacterial Protease Nagarase) สมบัติของเอนไซม์ทั้งสองแสดงในตาราง ก.

2. ไทออลโปรตีเอส (Thiol protease) มีกรดอะมิโนซิสตีนอยู่ที่บริเวณเร่ง ซิสตีน และ ไฮโดรเจนไซยาไนด์ กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ส่วนสารออกซิไดซ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pH ในการทำงานของเอนไซม์ค่อนข้างเป็นกลาง เอนไซม์สำคัญ ได้แก่ ปาเปน ไฟซิน และ โบรมีเลน สมบัติของเอนไซม์ทั้งสามแสดงในตาราง ข.

3. แอซิดโปรตีเอส (Acid protease) พบมากในเซลล์สัตว์ รา และยีสต์ ในแบคทีเรียพบบ้างแต่น้อย โมเลกุลของเอนไซม์มี aspartate อยู่ที่บริเวณเร่ง pH 3-4 เป็น pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ คือ Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และ DFP แบ่งเอนไซม์ออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ เรนนิน และ โปรตีเอสที่มีสมบัติคล้ายเรนนิน นิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเนยแข็ง และกลุ่ม เปปซิน และ โปรตีเอสที่มีสมบัติคล้ายเปปซิน ใช้ในอุตสาหกรรมหมักซอส และปรับปรุงคุณภาพของแป้งที่ใช้ในการทำขนมปัง

4. เมทัลโลโปรตีเอส (Metalloprotease) อิออนของโลหะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ และพบที่บริเวณเร่ง แบ่งเป็น 2 กลุ่ม

4.1 นิวทรัลโปรตีเอส (Neutral protease) เป็นเอนไซม์ที่มีอิออนของสังกะสีอยู่ที่บริเวณเร่ง แอคติวิตีของเอนไซม์สูงเมื่อใช้สับสเตรทสังเคราะห์ FAGLA (furylacrolylglycylleucinamide) ที่ pH เป็นกลาง และถูกยับยั้งด้วย EDTA เอนไซม์สำคัญได้แก่ Thermolysin จาก *Bacillus stearothermophilus* ซึ่งมีสมบัติเด่นคือ มีความเสถียรสูง เช่น เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 80 °ซ 1 ชม. ยังคงมีแอคติวิตีของเอนไซม์เหลือถึง 50 % เนื่องจากในโครงสร้างของเอนไซม์มีแคลเซียมอิออน 4 อะตอม (Endo,1962) เมื่อเทียบกับนิวทรัลโปรตีเอสจาก *B. amyloliquefaciens* ซึ่งแอคติวิตีของเอนไซม์จะเหลือ 50 % หลังจากบ่มที่ 59 °ซ 15 นาที เนื่องจากมีแคลเซียม 2 อะตอมในโครงสร้างเอนไซม์ นอกจากนี้ยังพบนิวทรัลโปรตีเอสในรา *Aspergillus oryzae* อีกด้วย นิวทรัลโปรตีเอส นิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เบเกอรี่ เครื่องหนัง อาหารสัตว์ และอุตสาหกรรมยา

4.2 อัลคาไลน์เมทัลโลโปรตีเอส (Alkaline-metalloprotease) เป็นเอนไซม์ที่มีโลหะเป็นส่วนประกอบที่บริเวณเร่ง ทำงานได้ดีในช่วง pH 7-9 ในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วย EDTA นั้น ต้องใช้ EDTA ที่มีความเข้มข้นมากกว่า 10^{-2} โมลาร์ จึงสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซึ่งเมื่อเทียบกับนิวทรัลโปรตีเอส ใช้ EDTA เข้มข้นเพียง 10^{-3} โมลาร์ ก็สามารถยับยั้งแอคติวิตีได้แล้ว (Hampson,1963) เมื่อบ่มเอนไซม์โปรตีเอสจาก *B. subtilis* ที่อุณหภูมิ 60 °ซ pH 9 เป็นเวลา 1 ชม. พบว่ายังคงมีแอคติวิตีสมบูรณ์ นอกจากนี้เอนไซม์ยังทนต่อสารยับยั้งโดย EDTA สารประกอบฟอสเฟต และสารออกซิไดซ์ เช่น เปอร์บอเรตได้ดี จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสารซักฟอก (Godfrey และ Reichet, 1983)

<u>เอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus spp.*</u>

เอนไซม์โปรตีเอสจากแบคทีเรียส่วนใหญ่ได้จาก *B. licheniformis* และ *B. amyloliquefaciens* คากล่าวข้างต้นมีผู้คัดค้าน เนื่องจากแบคทีเรียทั้งสองชนิดจัดเป็น

มิวแตนท์ของ *B. subtilis* จึงควรที่จะรายงานว่าเป็นโปรตีเอสที่ได้จาก *B. subtilis* มากกว่า (Aunstrup,1979) จากการทดลองของ Keay และคณะ แสดงว่า Subtilisin Carlsberg ที่ได้จาก *B. licheniformis* มีแอคติวิตีดีที่สุดที่ pH 10.5 ซึ่งมากกว่าของ Subtilisin Novo สมบัติของ Subtilisin Novo คล้ายคลึงกับ Subtilisin BPN ที่ได้จาก *B. subtilis* NRRL B3411 ที่มีแอคติวิตีดีที่สุดที่ pH 10 ซึ่งสูงกว่า Subtilisin Carlsberg และสูงกว่าตลอดทั้งช่วง pH 7-10 จึงมีการพัฒนาสายพันธุ์ *Bacillus sp.* ที่ทนต่อสภาวะด่างเพื่อผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอส ให้มีแอคติวิตีที่ pH สูง และทนต่อสภาวะด่าง (alkali stability) ได้ดีกว่า Subtilisin Carlsberg (Aunstrup,1980) และ *B. licheniformis* เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่เจริญได้ดีในสภาวะด่างที่ได้รับการพัฒนามาเพื่อผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่นำไปใช้ในอุตสาหกรรมสารซักฟอก และ *B. amyloliquefaciens* ได้รับการพัฒนาเพื่อผลิต แอลฟา-อะไมเลส นิวทรัลโปรตีเอส และ Subtilisin Novo

คศ.1972 เริ่มมีอุตสาหกรรมผลิตเอนไซม์โปรตีเอสเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมสารซักฟอก โดยใช้ถังหมักขนาด 130-220 m^3 ทำการผลิตเอนไซม์ปริมาณ 1-25 ตันต่อถังหมัก (Keay และคณะ, 1972) Aunstrup (1981) ประมาณว่า โลกต้องการใช้โปรตีเอสจากบาซิลลัส (เฉพาะในอุตสาหกรรมสารซักฟอก) ถึง 500 ตัน และในช่วงปี คศ. 1960-1969 บริษัท Novo Industry ประสบความสำเร็จด้านการตลาดกับการผลิตโปรตีเอสจากบาซิลลัสที่นำไปใช้ในสารซักฟอก จากนั้น 2-3 ปี จึงเริ่มมีบริษัทอื่นเริ่มเข้ามาลงทุนทำการวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์ชนิดนี้ (Aunstrup และคณะ,1971 ; Feldman และ Delecourt,1971 ; Shimamura และคณะ,1971; Schindler และคณะ,1972 ; Shimamura และคณะ ,1972; Ajinomoto Co. Inc.,1973) Aunstrup และคณะ (1971) แยกแบคทีเรียชนิดทนต่อสภาวะด่างที่ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้หลายสายพันธุ์ จากดินตัวอย่างใน " Danish village garden " และมูลของเสือ โปรตีเอสที่มีประโยชน์ในการนำไปใช้กับสารซักฟอกมากที่สุด คือ ซีรีนอัลคาไลน์โปรตีเอส ส่วนเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดอื่น พบว่ามักทำให้เกิดอาการแพ้แก่ผู้ใช้ ปัญหานี้ได้รับการแก้ไขโดยการทำมิวเตชันของ *B. licheniformis* เพื่อให้ผลิตเฉพาะอัลคาไลน์โปรตีเอส (Tang และคณะ,1980) Shah และคณะ (1986) ปรับปรุงการผลิตเอนไซม์โดยทำ "Cysteine auxotrophic mutant" ของ *B. licheniformis* และ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สายพันธุ์นี้สามารถแยกได้ใหม่โดยง่าย แม้จะเปลี่ยนกลับไปอยู่ในรูปสายพันธุ์เดิม

Fujiwara และคณะ (1987) ทดลองผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.* ชนิดทนต่อสภาวะด่าง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกากถั่วเหลือง และสารสกัดจากกระดูก ซึ่งเป็นวัตถุดิบราคาถูก แล้วให้โปรตีเอสแอคติวิตีดีที่สุดที่ pH 11.5 อุณหภูมิ 60 ^{o}ซ และมีปริมาณมากกว่าของ Subtilisin Carlsberg และ BPN ด้วย ในปีเดียวกัน Durham และคณะ (1987) ศึกษาสมบัติของอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.* GX 6638 (ATCC 53278) พบว่าโปรตีเอสที่แยกได้มี 2 ชนิด ชนิดแรกทนต่อสภาวะด่าง (alkali stable protease) กล่าวคือหลังจากบ่มเอนไซม์ที่ pH 12 อุณหภูมิ 25 ^{o}ซ นาน 24 ชม. ยังมีแอคติวิตีของเอนไซม์เหลือถึง 88 % ชนิดที่ 2 ทนต่ออุณหภูมิสูง (thermal stable protease) พบว่าที่ pH 9.5 เอนไซม์มีครึ่งชีวิตมากกว่า 200 นาที ที่อุณหภูมิ 50 ^{o}ซ และ 25 นาที ที่อุณหภูมิ 60 ^{o}ซ โดยที่เอนไซม์ทั้งสองทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 65 ^{o}ซ ปีถัดมาคณะทำงานชุดเดิมได้ทดลองผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.* GX6644 (ATCC 53441) โดยให้โปรตีเอสแอคติวิตีสูงกว่า Subtilisin Carlsberg BPN และ Enzeco ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในเชิงพาณิชย์ (US patent 4,764,470) อัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.* no. AH-101 ชนิดทนต่อสภาวะด่าง ให้ผลผลิตโปรตีเอสแอคติวิตีดีที่สุดที่ pH 12-13 อุณหภูมิ 80 ^{o}ซ (Takami, 1989) นอกจากนี้ เอนไซม์ดังกล่าวยังมีแอคติวิตีต่อสารจำพวกเคลาติน และอิลาสติน อีกด้วย (Takami,1990) *B. alcalophilus* subsp. halodulans KP 1239 สามารถสังเคราะห์อัลคาไลน์โปรตีเอส เมื่อเลี้ยงในอาหารอย่างง่ายที่มี 1 % กรดซิตริก และ 0.3 % สารสกัดจากยีสต์ (Takii และคณะ,1990)

เมทัลโลโปรตีเอสจาก *Bacillus spp.* มีสมบัติแตกต่างกันไปขึ้นกับแหล่งผลิต Thermolysin จาก *Bacillus spp.* ที่เจริญได้ดี ณ อุณหภูมิสูง (Thermophilic *Bacillus*) เป็นเอนไซม์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูง กล่าวคือ หลังจากบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 ^{o}ซ 30 นาที ยังมีโปรตีเอสแอคติวิตีเหลือถึง 86 % ในขณะที่โปรตีเอสจาก *B. subtilis* บางสายพันธุ์ สูญเสียแอคติวิตีไปทั้งหมดในสภาวะเดียวกัน (Keay และ Wildi,1970) นอกจากนี้ Thermolysin ยังถูกนำไปใช้ในกระบวนการผลิตสารให้ความหวานแอสพาเทม (Oyama และคณะ,1984) Delente (1974) รายงานว่า *B. stearothermophilus* 18100 ผลิต Thermolysin ให้ปริมาณมากกว่า *B. thermoproteolyticus* โปรตีเอสชนิดทนต่อ

อุณหภูมิปานกลาง (mesophile protease) นิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมผลิตเบียร์ การสกัดมอลท์ และสารยับยั้งจากข้าวบาร์เลย์ ไม่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แต่จะมีผลต่อซีรีนโปรตีเอส

Higerd และคณะ (1972) ทดลองทำกลายพันธุ์เชื้อ *B. subtilis* โดยใช้สารเคมี N/- nitro-N-nitrosoguanidine และ ethyl methane sulfonate แยกได้มิวแตนท์ 18 สายพันธุ์ ที่ให้โปรตีเอสแอคติวิตีรวมมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม 16-37 เท่า

อัลคาไลน์ และนิวทรัลโปรตีเอสจาก *Bacillus spp.* ส่วยใหญ่จะถูกสร้างในช่วงท้ายของการเจริญ เมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะการสร้างสปอร์ (Keay และคณะ,1972) Dod และ Balassa (1973) ทำกลายพันธุ์ของ *B. subtilis* Marberg ซึ่งเซลล์เข้าสู่ระยะการสร้างสปอร์ค่อนข้างช้า พบว่าให้ปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น เอนไซม์ส่วนใหญ่ที่ผลิตได้มักอยู่ในกลุ่ม subtilisin Markkanen และ Bailey (1974) พบว่าอัลคาไลน์โปรตีเอสถูกสร้างมากที่สุดในระยะการสร้างสปอร์ ส่วนนิวทรัลโปรตีเอสสร้างขึ้นในระยะต้นของการเจริญ ดังนั้นในการผลิตนิวทรัลโปรตีเอสจึงใช้เวลาไม่นานนัก ทั้งนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว นิวทรัลโปรตีเอสจะมีเสถียรภาพต่ำด้วย

ส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ข้อมูลจากห้องทดลองของแหล่งผลิตเอนไซม์เพื่อการค้า แสดงให้เห็นว่า ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้ออาจประกอบด้วยสารเพียง 2-3 ชนิด ก็เพียงพอแล้ว สารที่ใส่เพิ่มส่วนมากเป็นเกลือชนิดต่างๆ เช่น เกลือของแอมโมเนียม (Aunstrup และคณะ,1971; Ajinomoto Co. Inc, 1973; Aunstrup,1980 ; Fujiwara และ Kazuhiko,1987 ; Takii และคณะ,1990) กลูโคสในอาหารถ้ามีปริมาณมากเกินจะยับยั้งการสร้างโปรตีเอส จึงมีการนำแหล่งคาร์บอนอื่นมาใช้ เช่น ข้าวบาร์เลย์ (Aunstrup, 1979) แป้ง (Keay และคณะ, 1972; Rikagaku, 1973) มอลโตส (Jensen,1972) หรือ สารที่ได้จากการไฮโดรไลส์โปรตีน เป็นต้น

B. subtilis สามารถใช้โซเดียมกลูตาเมทเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียวเพื่อสังเคราะห์โปรตีเอส (Jensen,1972) เกลือของแอมโมเนียม ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้เช่นกัน โดยที่ปริมาณมากเกินไม่ส่งผลต่อการสร้างโปรตีเอส (Markkanen และ Bailey, 1974 ; Nehete และคณะ,1985) Rikagaku (1973) วิจัยสรุปว่า การเติมคาร์บอเนต

ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลดีต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ และ pH ควรมากกว่า 7.5 ตลอดการเลี้ยง (Aunstrup,1980) ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตโปรตีเอสอีกปัจจัยหนึ่งคือ จำนวนครั้งในการถ่ายเชื้อ ใน *B. licheniformis* พบว่า ถ้ามีการถ่ายเชื้อมากกว่า 4 ครั้ง การสังเคราะห์โปรตีเอสจะลดลง (Nehete และคณะ,1985)

<u>การนำเอนไซม์โปรตีเอสไปใช้ในอุตสาหกรรม</u> (Ward,1983)

1. การไฮโดรไลส์โปรตีน (Protein hydrolysis) มีจุดประสงค์ เพื่อให้ได้โปรตีนที่มีขนาดเล็กลง สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้คุ้มค่ามากขึ้น

1.1 การไฮโดรไลส์โปรตีนจากกากถั่วเหลือง หลังการไฮโดรไลส์จะได้กรดอะมิโนออกมาเป็นจำนวนมาก นำไปใช้ผสมในอาหารสำหรับลดความอ้วน เครื่องดื่ม เป็นต้น

1.2 การหมักซอสถั่วเหลือง

1.3 การไฮโดรไลส์เจลาติน ผลิตผลจากการไฮโดรไลส์ ใช้ผสมเครื่องดื่มคาลอรี่ต่ำ เครื่องสำอาง เป็นต้น

1.4 เคซีน และโปรตีนจากหางนม ช่วยให้โปรตีนละลายน้ำได้มากขึ้น สารละลายที่ได้ใสขึ้น และมีรสชาติดีขึ้น

1.5 Meat protein recovery เช่น ทำสารสกัดจากเนื้อติดกระดูก ซึ่งคิดเป็น 5 % ของน้ำหนักกระดูก ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารกระป๋อง ซุป

1.6 การหมักน้ำปลา ช่วยลดระยะเวลาในการหมักน้ำปลา ให้คุณค่าทางโภชนาการมากขึ้น ป้องกันการเกิดรสขมในน้ำปลา และยังลดปริมาณปลาที่ใช้หมักอีกด้วย

1.7 Meat tenderization ช่วยทำให้เนื้อนุ่มขึ้น

2. อุตสาหกรรมสารซักฟอก อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ผสมในสารซักฟอก ช่วยย่อยโปรตีนที่เกาะติดเนื้อผ้า ทำให้ละลายออกมาพร้อมกับน้ำล้าง

3. อุตสาหกรรมเบียร์ โปรตีเอสจะช่วยย่อยตะกอนโปรตีนในเบียร์ ทำให้เบียร์ใส

4. การทำขนมปัง โปรตีเอสจะช่วยทำให้แป้งโด (dough) มีความยืดหยุ่น และขึ้นรูปได้ดี เมื่อกลิ้งเป็นแผ่นไม่ฉีกขาด

5. อุตสาหกรรมนม ทำให้นมจับกันเป็นก้อน ในกระบวนการผลิตเนยแข็ง

6. อุตสาหกรรมฟอกหนัง มี 2 ขั้นตอนในกระบวนการฟอกหนังที่นำโปรตีเอสไปใช้

- Dehairing ขั้นตอนนี้หนังสัตว์จะถูกแช่ในน้ำปูนขาว อัลคาไลน์โปรตีเอสจะช่วยลดปริมาณปูนขาวที่ใช้ได้ถึง 50 % ลดระยะเวลาการแช่น้ำปูนขาว และลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำเสีย

- Bating เป็นขั้นตอนที่ทำให้หนังสัตว์นุ่ม และยืดหยุ่น โดยโปรตีเอสจากพืชจะย่อยสารพวกคอลลาเจน และอิลาสติน ส่วนโปรตีเอสจากจุลชีพจะย่อยโปรตีนในกล้ามเนื้อ หนังสัตว์ที่ถูกแช่ด้วยปูนขาวจะไวต่อการย่อยด้วยโปรตีเอสมากกว่าหนังที่แช่ในกรด

7. ประโยชน์อื่น

- ปาเปน โบรมีเลน และโปรตีเอสจากจุลชีพ เมื่อใช้กับอาหารสัตว์ ทำให้อาหารเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ

- ปาเปน และนิวทรัลโปรตีเอส ใช้ในกระบวนการผลิตสารสกัดจากยีสต์ และโปรตีนเซลเดียว

- เปปซิน ทริปซิน และปาเปน ใช้ในกระบวนการผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลชีพ

- ทริปซิน อัลคาไลน์โปรตีเอส ใช้ในกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ (animal cell culture)

- นิวทรัล และอัลคาไลน์โปรตีเอส ใช้ในการทำความสะอาดเยื่อหุ้มผ่านในเครื่องมือต่างๆ

จะเห็นได้ว่าเอนไซม์โปรตีเอสมีประโยชน์มากมาย และการนำเอนไซม์มาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาต่างๆจะลดระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยาได้มาก การศึกษาวิธีการในการผลิต และสมบัติของเอนไซม์โปรตีเอส จึงน่าที่จะมีประโยชน์ และเป็นแนวทางในการปรับปรุงวิธีการผลิตและสมบัติของเอนไซม์โปรตีเอสเพื่อสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จริงในอนาคต

ตาราง ก. สมบัติของ Subtilisin Carlsberg และ Subtilisin BPN

คุณสมบัติ	Carlsberg	BPN
จำนวนสายเปปไทด์	1	1
จำนวนกรดอะมิโน	274	275
จำนวนกรดอะมิโนที่เหมือนกัน	217	217
จำนวนซีสเตอีน	0	0
ค่าไอโซอิเลคตริก	9.4	9.1
ผลของอิออนแคลเซียมต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ และ pH สูง	น้อย	มาก
pH ที่ให้แอคติวิตีสูงสุด	8-9	8-9
% แอคติวิตีสูงสุดที่ pH 7	40-70	20
สารยับยั้งการทำงาน	DFP, PMSF, สารยับยั้งในธัญพืช และพืชตระกูลถั่ว, ออกาโนฟอสฟอรัส	สารยับยั้งในธัญญพืช และพืชตระกูลถั่ว
แอคติวิตีสัมพัทธ์ต่อ BTEE[1]	3-4	1
จำนวนพันธะในอินซูลินที่ถูกไฮโดรไลส์	7	7

BTEE = Benzoyl Tyrosine Ethyl Ester (Ward, 1983)

ตาราง ข. สมบัติของ Thiol protease จากพืชที่ใช้ในอุตสาหกรรม

เอนไซม์	Papain	Bromelain	Ficin
แหล่ง	*Carica papaya*	*Bromeliaceae spp.*	*Ficus carica*
pH ที่เหมาะสมต่อการทำงาน	4.5-7	5.0-8.0	5.0-8.0
อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน	60-75 ^{o}ซ	50 ^{o}ซ	60 ^{o}ซ
ความจำเพาะต่อกรดอะมิโน	กว้าง	อะโรมาติค	อะโรมาติค
สารยับยั้ง	ทั้งสามชนิดถูกยับยั้งด้วยสารออกซิไดซ์ ซัลไฟดริล และ โลหะหนัก		
สารกระตุ้น	สารรีดิวซ์, สารประกอบไทออล และ EDTA		
ความสำคัญในอุตสาหกรรม	มาก	ปานกลาง	น้อย
การนำไปใช้ในอุตสาหกรรม	เบียร์ ทำให้เนื้อนุ่ม หมักน้ำปลา เครื่องหนัง อาหารสัตว์ ยา เบเกอรี่ การไฮโดรไลส์โปรตีน		

แหล่งข้อมูล (Ward, 1983)

วัตถุประสงค์ และขอบเขตการวิจัยโดยสังเขปมีดังนี้

1. คัดเลือกแบคทีเรียชนิดเจริญได้ดีในสภาวะด่างและสามารถสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอส

2. ศึกษาส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชักนำให้จุลชีพสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอสได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งเพียงพอต่อการนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป โดยใช้วัตถุดิบหาง่าย และราคาถูก

3. ศึกษาวิธีการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ

4. ศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรตีเอสที่ได้