บทที่ 1

บทนำ

โปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลส์โปรตีน โดยจะไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์ทำให้ซับสเทรตที่เป็นโพลีเปปไทด์สายยาวสั้นลง นอกจากนี้โปรตีเอสยังช่วยไฮโดรไลส์เอนไซม์อื่นที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นและอยู่ในรูปที่ยังทำงานไม่ได้ (inactive precursor form) ให้อยู่ในสภาพที่พร้อมจะทำงานได้ ถึงแม้โปรตีเอสผลิตได้ทั้งในพืช สัตว์ และ จุลชีพ แต่ในระยะแรกๆนั้นมักเตรียมโปรตีเอสจากพืชและสัตว์เป็นส่วนใหญ่ ตัวอย่างโปรตีเอสที่ผลิตจากพืช เช่น โบรมีเลนจากสับปะรด และ ปาเปนจากยางมะละกอ ส่วนโปรตีเอสที่ผลิตจากสัตว์เช่นเรนนินจากกระเพาะลูกวัว การผลิตโปรตีเอสในระดับอุตสาหกรรมจากพืชและสัตว์นั้นมักมีปัญหาและค่าใช้จ่ายสูงกว่าการผลิตจากจุลชีพ ดังนั้นโปรตีเอสที่มีบทบาทในอุตสาหกรรมมากที่สุดคือ โปรตีเอสที่ได้จากจุลชีพ (ตารางที่ 1) จุลชีพที่สามารถผลิตโปรตีเอสได้มีทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย โดยทั่วไปหลักในการเลือกชนิดของจุลชีพที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ในปริมาณมากคือ จุลชีพนั้นควรจะสามารถสร้างและหลั่งเอนไซม์ออกนอกเซลล์ได้ (extracellular enzyme) ซึ่งทำให้ไม่ต้องมีขั้นตอนในการทำลายผนังเซลล์และแยกส่วนประกอบต่างๆของเซลล์ที่ไม่ต้องการออกไปเหมือนในพวกที่เป็น intracellular enzyme นอกจากนี้จุลชีพนั้นๆต้องเป็นเชื้อที่ให้ผลผลิตสูง เพาะเลี้ยงได้ง่ายและรวดเร็ว ให้ผลผลิตอย่างสม่ำเสมอแน่นอน ควรเป็นเชื้อที่โตได้ในซับสเทรตที่มีราคาถูกและสามารถสังเคราะห์เอนไซม์ที่เราต้องการได้มากและไม่มีสารพิษ นอกจากนี้ควรจะสกัดเอาเอนไซม์ออกมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อได้ง่าย เอนไซม์โปรตีเอสที่สนใจนำมาใช้ในอุตสาหกรรมมักจะเป็นพวก endopeptidase type ที่สังเคราะห์จากจุลชีพที่สามารถหลั่งออกนอกเซลล์ได้ มีจุลชีพหลายชนิดที่สามารถผลิตโปรตีเอสชนิดต่างๆได้ แต่นำมาใช้ผลิตในทางการค้านั้นมีอยู่เพียงไม่กี่ชนิด (ตารางที่ 2)

โปรตีเอสที่ผลิตได้จากจุลชีพแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆ โดยแบ่งตามกลไกการเกิดปฏิกิริยา และความแตกต่างของสภาวะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (Hartley, 1960) คือ alkaline protease, metallo-protease, acid protease และ thiol protease นอกจากนี้ยังมีการแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยๆอีก โดยแบ่งตามสมบัติของบริเวณแร่ง (active center) ของเอนไซม์ (Morihara, 1974) การแบ่งกลุ่มของจุลชีพที่ผลิต endopeptidase โปรตีเอสชนิดต่างๆแสดงไว้ใน ตารางที่ 3

ตารางที่ 1 แสดงมูลค่าและส่วนแบ่งทางการตลาดโลกของเอนไซม์โปรตีเอสที่ได้จาก พืช สัตว์ และจุลชีพชนิดต่างๆ ในปี คศ. 1986 (Hepner & Male,1986)

ชนิดของเอนไซม์	มูลค่า (ล้านดอลล่าร์)	ส่วนแบ่งทางการตลาด (%)
bacterial protease	145	60
animal rennet	50	21
microbial rennet	12	5
papain	15	6
pancreatin	12	5
bromelain	5	2
fungal protease	3	1
รวม	242	100

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 จุลชีพที่ใช้ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสในทางการค้า

จุลชีพ	ชนิดของเอนไซม์	ผลิตภัณฑ์และชื่อทางการค้า
Bacillus subtilis	Metalloprotease, alkaline protease	Montase, Milezyme Alcalase, Maxatase
B. thermoproteolyticus	Metalloprotease	Thermoase
Streptomyces griseus	Metalloprotease, alkaline protease	Pronase
Aspergillus oryzae	Acid protease	Rhozyme A-4
A. saitoi	Acid protease	Molsin
Mucor pusillus	Acid protease	Microbial rennet

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 กลุ่มของจุลชีพพวก endopeptidase ที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสชนิดต่างๆ

		Source of Enzyme Example
alkaline protease (serine protease)	trypsin-like serine protease	*Streptomyces*
	alkaline serine protease	*Bacillus, Streptomyces, Aspergillus*
	Myxobacter α-lytic protease	*Sorangium*
	Staphylococcal protease	*Staphyllococcus aureus*
	neutral serine protease	*Bacillus pumilus*
	other serine protease	*Escherichia, Saccharomyces*
metalloprotease (neutral protease)	neutral metalloprotease	*Bacillus*
	alkaline metalloprotease	*Pseudomonas, Proteus, Serratia*
acid protease	pepsin-type acid protease	*Aspergillus, Mucor*
	rennet-like acid protease	*Bacillus, Mucor, Endothia*
thiol protease	clostripain	*Clostridium*
	streptococcal protease	*Group A Streptococci*

ที่มา : Morihara, 1974

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

alkaline protease มีชื่อเรียกอีกอย่างว่า serine protease เนื่องจากมีเซรีนเรสซิดิวส์อยู่ที่บริเวณแร่งของเอนไซม์ (active site) ถูกยับยั้งปฏิกิริยาได้ด้วยสาร diisopropyl fluorophosphate (DFP) และ phenylmethyl sulfonylfluoride (PMSF) มีช่วง pH ที่เร่งปฏิกิริยาได้ค่อนข้างกว้างคืออยู่ระหว่าง 7-11 และแคลเซียมไอออนจะช่วยให้เอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้น มีมวลโมเลกุลเป็น 25,000-30,000 ดาลตัน แบ่งออกเป็น 5 กลุ่มย่อย คือ trypsin-like protease, serine alkaline protease, *Myxobacter* α-lytic protease, Staphylococcal protease และ serine neutral protease พบได้ทั่วไปในทั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราแต่จะพบได้ในเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus spp.* เป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ *Bacillus subtilis, Bacillus licheniformis* และ *alkalophilic Bacillus* โดย alkaline protease จะถูกสร้างและปล่อยออกเป็นอิสระในน้ำเลี้ยงเชื้อ และอาจสร้างโปรตีเอสอื่นด้วยคือ neutral protease โดยการสร้างอาจสร้าง alkaline protease พร้อมๆกับ neutral protease หรืออาจสร้าง neutral protease ก่อน alkaline protease ก็ได้ (MG Halpern, 1981) โปรตีเอสในกลุ่ม alkaline protease ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุดคือ serine alkaline protease ที่เป็นที่รู้จักมากที่สุดคือ subtilisin ซึ่งสร้างจาก *Bacillus subtilis* และเชื้อที่ใกล้เคียง ในปี 1969 Keay และ Moser พบว่า serine alkaline protease ที่สร้างจากกลุ่ม *Bacillus* และสายพันธุ์ต่างๆของ *Bacillus subtilis* แบ่งออกได้เป็น 2 พวกโดยอาศัยความแตกต่างของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบ รวมทั้งคุณสมบัติทางอิมมูโนวิทยาและจลนศาสตร์ได้แก่ subtilisin Carlsberg และ subtilisin NOVO หรือ subtilisin BPN' subtilisin Carlsberg ที่สร้างได้จาก *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus pumilus* มีลักษณะเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวมีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบ 274 ตัว ไม่มีพันธะไดซัลไฟด์เนื่องจากไม่มีกรดอะมิโนซิสเทอีน หรือ ซิสตีน มีโครงสร้างเป็นรูปทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.2 นาโนเมตร บริเวณแร่งปฏิกิริยาประกอบด้วยกรดอะมิโนเซรีน, ฮีสติดีน และ แอสปาร์เตท ที่ตำแหน่ง 221, 64 และ 32 ตามลำดับ มีความจำเพาะต่อซับสเทรตกว้างนอกเหนือจากสามารถไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์ได้แล้วยังสามารถ ไฮโดรไลส์พันธะเอสเทอร์ได้บ้าง ไม่ต้องการตัวกระตุ้นในการเข้าทำปฏิกิริยาไฮโดรไลส์โปรตีน รวมทั้งไม่ต้องการแคลเซียมไอออนมาช่วยให้เอนไซม์มีความเสถียรเหมือนกับ alkaline protease อื่นๆ alkaline protease มีความเสถียรในช่วง pH ที่กว้าง แต่จะมีช่วง pH ที่เหมาะสมแก่การทำปฏิกิริยาไฮโดรไลส์โปรตีน คือ pH 8-9 และแอคติวิตีจะลดลงเมื่อมี pH ต่ำกว่า 5 หรือ สูงกว่า 11 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงประมาณ 55-60°ซ แต่จะถูกทำลายได้อย่างรวดเร็วเมื่อมีสารไฮเปอร์คลอไรท์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Aunstrup, 1979) ส่วนเอนไซม์ในพวก subtilisin NOVO นั้นสร้างจากเชื้อ *B. amyloliquefaciens* ลักษณะเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวประกอบด้วยกรดอะมิโน 275 ตัว เมื่อเปรียบเทียบกับ subtilisin Carlsberg จะพบว่ามีกรดอะมิโนส่วนใหญ่เหมือนกัน แตกต่างกันเพียง 58 ตัวเท่านั้น ไม่มีกรดอะมิโนซิสเทอีนเช่นเดียวกัน บริเวณแร่ง

ปฏิกิริยาของเอนไซม์ประกอบด้วยเรสซิดิวส์ของกรดอะมิโนเซรีน 221 ฮีสติดีน 54 และแอสปาร์เตท 32 แคลเซียมไอออนจะช่วยทำให้เอนไซม์มีความเสถียรขึ้นโดยเฉพาะที่อุณหภูมิสูง หรือ pH ที่ต่ำหรือสูงมาก มีความจำเพาะต่อการไฮโดรไลส์เปปไทด์และเอสเทอร์แตกต่างจาก subtilisin Carlsberg เอนไซม์ในกลุ่ม alkaline protease นี้จะใช้มากในอุตสาหกรรมสารซักฟอก รองลงมาคือ อุตสาหกรรมการฟอกหนัง และอุตสาหกรรมอาหาร

เอนไซม์ในกลุ่ม metalloprotease จะมีความสำคัญในทางการค้าน้อยกว่ากลุ่มของ alkaline และ acid protease ทั้งนี้เนื่องจากการที่มีความเสถียรน้อยกว่า เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า neutral protease เป็นเอนไซม์ที่มีอะตอมของโลหะซึ่งมักจะเป็นสังกะสี (zinc) อยู่ในโครงสร้าง สามารถถูกยับยั้งปฏิกิริยาได้ด้วยสารจำพวก chelating agent เช่น ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) (Ward,1983) มีความสามารถสูงสุดในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนที่สภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ประมาณ 7 แต่มีความเสถียรในช่วง pH 5-10 เอนไซม์จะเสถียรขึ้นเมื่อมีแคลเซียมไอออน มีมวลโมเลกุล 35,000-45,000 เอนไซม์กลุ่มนี้สร้างจากจุลชีพหลายๆกลุ่ม เช่น เชื้อรา และ แบคทีเรีย เชื้อที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรม คือ *Aspergillus, Bacillus* และ *Streptomyces* ตัวอย่างของ metalloprotease ที่สำคัญได้แก่ Thermolysin ซึ่งผลิตได้จาก *Bacillus thermoproteolyticus* ถึงแม้การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ในกลุ่มนี้มีจำกัดเนื่องจากการที่มีความเสถียรต่ำ อย่างไรก็ตามจะใช้ประโยชน์ได้ในทางอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น การผลิตเบียร์ การทำขนมอบ อุตสาหกรรมฟอกหนังและอุตสาหกรรมอาหารอื่นๆ

เอนไซม์ในกลุ่ม acid protease มีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมอาหาร จุลชีพที่ผลิตเอนไซม์นี้ส่วนใหญ่เป็นจำพวกรา และ ยีสต์ มีแบคทีเรียบางชนิดที่ผลิตได้ ตัวอย่างจุลชีพที่ผลิตเอนไซม์นี้ได้แก่ เชื้อรา *Aspergillus spp., Penicillium spp., Rhizopus spp., Mucor spp.* และ *Edothia spp.* เอนไซม์มี optimum pH อยู่ในช่วง pH 3-4 ลักษณะโครงสร้างคล้ายกับเอนไซม์เปปซิน เรนนิน แบ่งออกได้เป็น 2 พวกจากคุณสมบัติทางกายภาพ คือ pepsin-like acid protease และ rennin-like protease acid protease จะถูกยับยั้งการทำงานได้โดยสารจำพวก diazoketone (Mizobe,1973) แต่ไม่ถูกยับยั้งโดยสาร EDTA และ DFP มีมวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 30,000-40,000 สามารถทำปฏิกิริยาจำเพาะกับกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นวง (aromatic amino acid) เอนไซม์กลุ่มนี้มักนำมาใช้ในการหมักถั่วเหลือง, ข้าว และธัญญพืช เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมขนมอบ และเนยแข็ง

Thiol protease เป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในช่วง pH ที่เป็นกลาง ถูกยับยั้งปฏิกิริยาด้วย sulfhydryl reagent เช่น p-chloromercuribenzoate ส่วนสาร DFP จะมีผลต่อการยับยั้งปฏิกิริยาเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ปฏิกิริยาถูกเร่งได้ดีเมื่อมีสารรีดิวซ์ ได้แก่ HCN หรือกรดอะมิโนซีสเทอีน มีมวลโมเลกุล

อยู่ระหว่าง 30,000-50,000 เชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์นี้ ได้แก่ *Clostridium spp.* และ *Streptococcus spp.*

จากตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าโปรตีเอสที่มีบทบาทสำคัญมากที่สุดคือ โปรตีเอสที่ได้จากจุลชีพ ซึ่งจุลชีพที่สำคัญที่สุดในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสคือ แบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* จากการศึกษาถึงการสร้างโปรตีเอสของเชื้อ *Bacillus spp.* พบว่าการสร้างจะเกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อ โดยเอนไซม์จะถูกสร้างขึ้นในช่วงปลายของการเจริญแบบทวีคูณ (late Exponential or logarithmic phase) หรือในช่วงระยะแรกของการเจริญแบบคงที่ (early Stationary phase) เมื่อเจริญ *Bacillus spp.*ใน complex media (Millet และคณะ, 1969) การสังเคราะห์เอนไซม์จะถูกจำกัดโดยปริมาณกรดนิวคลีอิกในเซลล์ ขณะที่เซลล์มีการเจริญในระยะ log phase เซลล์จะนำเอากรดนิวคลีอิกจำนวนมากไปใช้ในการสังเคราะห์ rRNA จากนั้นนำไปสังเคราะห์ต่อเป็น ribosome จึงเป็นเหตุให้ปริมาณกรดนิวคลีอิกในเซลล์ลดต่ำลง ดังนั้นในระยะ log phase จึงมีการสังเคราะห์โปรตีเอสน้อย เมื่อเซลล์ชลอการเจริญลงการสร้างไรโบโซมจะลดลง จึงทำให้มีการสร้างเอนไซม์ในปริมาณสูงในช่วง stationary phase (Coleman, 1967)

โปรตีเอสที่สังเคราะห์ขึ้นในตอนแรกจะมีด้านปลายอะมิโน ประกอบไปด้วยกรดอะมิโน ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น signal sequence ทำให้โปรตีเอสที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นนี้สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ออกมาภายนอกได้ จากนั้นส่วน signal sequence นี้จะถูกตัดออกได้โปรตีเอสที่อยู่ในรูปที่เสถียรภายนอกเซลล์แบคทีเรีย (Ward, 1983)

การสร้างโปรตีเอสในเชื้อ *Bacillus spp.* เกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์ Dancer และ Mandelstam (1975) พบว่า *B. subtilis* 168 ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอสได้ 2 ชนิด คือ alkaline protase และ neutral protease เมื่อนำมาทำการผ่าเหล่าแล้วพบว่า *Bacillus subtilis* ผ่าเหล่าที่ไม่สร้าง neutral protease สามารถสร้างสปอร์ได้ ในขณะที่เชื้อผ่าเหล่าที่ไม่สามารถสร้าง alkaline protease จะไม่สามารถสร้างสปอร์ได้ และจากการยับยั้งการสร้างสปอร์ในระยะต่างๆ พบว่าการสร้าง alkaline protease จะลดลงในขณะที่ neutral protease ยังมีปริมาณคงที่แสดงให้เห็นว่าการสร้าง alkaline protease มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์ โดยการสร้างเอนไซม์จะเกิดในระยะแรกของการสร้างสปอร์ซึ่งเป็นช่วงปลายของการเจริญแบบทวีคูณ ในขณะเดียวกันยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ที่ถูกกดการทำงาน (repressed) ไว้โดยปริมาณของกลูโคสที่มาก เมื่อเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อก็จะถูก derepressed เนื่องจากปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงหรือหมดไปในช่วงของการสร้างสปอร์ การ derepressed ยีนมีผลให้เกิดการสังเคราะห์ alkaline protease เพิ่มขึ้น (Doi, 1973)

นอกจากการสร้างโปรตีเอสจะเกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อแล้ว การสร้างเอนไซม์ยังขึ้นกับส่วนประกอบของซับสเทรตในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน กรดอะมิโน ฟอสเฟต และ ไอออน

โลหะอีกด้วย แหล่งคาร์บอนโดยเฉพาะกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ง่าย กลูโคสในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยให้เซลล์มีการเจริญที่พอเหมาะไม่มากเกินไป การสร้างเอนไซม์ของเชื้อก็จะดำเนินไปตามปกติ (สุพจน์, 2530) แต่เมื่อแหล่งอาหารหรือพลังงานเริ่มลดน้อยลง การสร้างสปอร์ของเชื้อก็จะเกิดขึ้นพร้อมๆกับการสร้างเอนไซม์ เมื่อมีปริมาณของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อมากเกินไปก็จะทำให้เกิด catabolic repression โดยกลูโคส (Doi, 1973) กดการทำงานของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์โดยกลูโคสทำให้สร้างเอนไซม์ได้น้อยลงหรือไม่มีการสร้างเลย (Bernlohr, 1964) ส่วนอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนนั้นพบว่าการสร้างเอนไซม์จะถูกกดดัน (repressed) โดยกรดอะมิโนหรือเปปไทด์ในอาหาร ซึ่งกรดอะมิโนแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการกดดันการสร้างเอนไซม์ต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อด้วย กรดอะมิโนหรือเปปไทด์หลายชนิดเมื่ออยู่ร่วมกันจะมีผลกดดันการสร้างเอนไซม์ได้มากกว่ากรดอะมิโนชนิดเดียว (Jaroslav และคณะ, 1987) นอกจากจะมีบทบาทในการกดดันการสร้างเอนไซม์แล้วยังพบว่ากรดอะมิโนมีส่วนในการกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีเอสได้ด้วยเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ไม่มีกลูโคส (Doi, 1973) ฟอสเฟตมีผลต่อการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสได้เช่นกัน โดยฟอสเฟตอาจจะช่วยเพิ่มความเสถียรของ mRNA ด้วยการยับยั้งเอนไซม์ RNase หรืออาจช่วยให้เอนไซม์โปรตีเอสที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ปล่อยออกนอกเซลล์ได้ดีขึ้น แต่ถ้าปริมาณของฟอสเฟตมีมากเกินไปในการเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อ จะมีผลยับยั้งการเจริญและกดดันการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสด้วย (Seung-Hyeon Moon, 1990) สำหรับบทบาทของไอออนโลหะในการสร้างโปรตีเอสของเชื้อ *Bacillus* นั้น พบว่าแมกนีเซียมไอออนมีความสำคัญและจำเป็นต่อการเจริญ การแบ่งตัว และยังมีผลต่อ ขนาด และ รูปร่างของเซลล์ นอกจากอิทธิพลของส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วพบว่าสภาวะแวดล้อมในระหว่างการเลี้ยงเชื้อไม่ว่าจะเป็น pH อุณหภูมิ และปริมาณออกซิเจน ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส

เนื่องจากโปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่มีประโยชน์มากในทางอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมสารซักฟอก ฟอกหนัง อาหาร ยา เส้นใยทอผ้า กระดาษ และการผลิตน้ำยางพาราที่มีคุณภาพดี โดยเฉพาะอุตสาหกรรมผลิตสารซักฟอกซึ่งมีปริมาณการใช้เอนไซม์โปรตีเอสและคิดเป็นมูลค่ามากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอุตสาหกรรมอื่นๆ (ตารางที่ 4) การใช้ประโยชน์จากโปรตีเอสในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ มีลักษณะการใช้งานและแหล่งของเอนไซม์ที่ใช้แตกต่างกันไปมากมาย (ตารางที่ 5) ดังได้กล่าวไปแล้วว่ากลุ่มที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุดคือ alkaline protease ซึ่งเอนไซม์ในกลุ่มนี้ที่เป็นที่รู้จักและใช้กันมากคือ subtilisin ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 พวก คือ subtilisin Carlsberg และ subtilisin NOVO หรือ BPN' โดยมีปริมาณการใช้ subtilisin มากถึง 40% ของโปรตีเอสทั้งหมด (Ward, 1983) จากการนำโปรตีเอสไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในอุตสาหกรรมด้านต่างๆได้มากมายนั้น จึงได้มีการศึกษาถึงการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตให้สูงขึ้นเพื่อลดต้นทุนในการผลิต ซึ่งการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตสามารถทำได้หลายวิธี

ตารางที่ 4 แสดงมูลค่าและส่วนแบ่งทางการตลาดโลกของเอนไซม์โปรตีเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ในปี คศ. 1986

อุตสาหกรรม	มูลค่า (ล้านดอลล่าร์)	ส่วนแบ่งทางการตลาด (%)
Detergents	140	89.2
Microbial rennets	12	7.6
Baking protease	3	1.9
Leather	1	0.6
Miscellaneous	1	0.7
รวม	157	100

ที่มา : Hepner & Male, 1986

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์โปรตีเอสในทางอุตสาหกรรม

ประเภทของอุตสาหกรรม	กระบวนการที่ใช้	แหล่งของเอนไซม์
Baking and Milling	Bread baking	Fungal
Brewing	Chillproofing	Fungal, bacterial, plant, animal
Cereals	Condiments	Fungal, bacterial, plant, animal
Dairy	Milk prevention of oxidized flavor	Animal
	Milk protein hydrolysate	Fungal, bacterial, plant, animal
	Evaporate milk, stabilization	Fungal, plant, animal
Animal feeds	Pig starter ration	Bacterial, fungal, animal
	Poultry ration, cattle ration	Bacterial, fungal
Meat, fish	Meat tenderizing	Plant
	Tenderizing casings, condensed fish soluble	Fungal, bacterial
Phamaceutical	Digestive aids	Fungal, bacterial, plant, animal
Clinical	Wound debridement	Bacterial, animal
	Treatment of bruises, inflammation etc.	Plant

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 (ต่อ) การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์โปรตีเอสในทางอุตสาหกรรม

ประเภทของอุตสาหกรรม	กระบวนการที่ใช้	แหล่งของเอนไซม์
Leather	Bating	Bacterial, animal, fungal
	Unhairing	Bacterial, fungal, plant
Laundry	Spot removal	Bacterial, animal, fungal
	cold-soluble	
	laundry starch	
Photographic	Recovery of silver	Bacterial
	from used film	
Textile	Desizing fabrics	Bacterial, fungal, animal

ที่มา : Miller and Litsky, 1976

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แต่วิธีการหนึ่งซึ่งมีศักยภาพสูงและเป็นที่นิยมทำกันในปัจจุบันคือการโคลนยีน และให้มีการแสดงออกของยีนเพิ่มมากขึ้น (gene cloning and overexpression) เพื่อพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ ให้มีประสิทธิภาพในการผลิตสูงและทำให้เหมาะสมกับสภาพการใช้งานในอุตสาหกรรมบางประเภท สามารถทำโดยใช้ความรู้ทางด้านพันธุวิศวกรรมทำการตัดต่อเฉพาะยีนของ alkaline protease ในเชื้อ *Bacillus amyloliquifaciens* (David, 1988) หรือการทำให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์บนเอนไซม์ subtilisin E ที่ได้จาก *Bacillus subtilis* ซึ่งจะทำให้ subtilisin E สามารถทนต่ออุณหภูมิสูง (Hiroshi, 1990) หรือการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่กรดอะมิโนบางตัวใน subtilisin มีผลทำให้เอนไซม์ใหม่ที่ได้ทนต่ออุณหภูมิสูงและทนต่อสาร sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการผลิตสารซักฟอก (Linda, 1991) ในการศึกษาถึงการโคลนยีนโครงสร้างของโปรตีเอส (Protease structural gene) นั้นได้มีการศึกษาอย่างมากมาย โดยเฉพาะการโคลนยีนที่สร้างโปรตีเอสจากแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* เนื่องจากเชื้อในกลุ่มนี้มีหลายชนิดที่สามารถสร้างโปรตีเอสหลายชนิดได้ในเซลล์ และยังมีคุณสมบัติในการหลั่งเอนไซม์ดังกล่าวออกนอกเซลล์ได้ จึงมีประโยชน์และสะดวกในการสกัดเอาเอนไซม์จากน้ำเลี้ยงเชื้อหรือการหาแอคติวิตีของเอนไซม์จากน้ำเลี้ยงเชื้อนั้น ตัวอย่างสายพันธุ์ของเชื้อ *Bacillus* ในต่างประเทศที่มีการศึกษาทำการแยกยีนโปรตีเอสออกมาได้เช่น *Bacillus subtilis* IFO3013 (Koide, 1986), *Bacillus stearothermophilus* MK232 (Kubo, 1988), *Bacillus subtilis* DB104 (Kaneko, 1989), *Bacillus alcalophilus* PB92 (van der Laan, 1991) และ *Bacillus* SP.221 (Takami, 1992) เป็นต้น ยีนโปรตีเอสที่แยกออกมานั้นได้ถูกนำมาศึกษาถึงลักษณะของยีนเพื่อนำข้อมูลไปใช้ในการพัฒนาปรับปรุงประสิทธิภาพในการผลิตโปรตีเอสต่อไป

การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสนั้นนอกจากการใช้วิธีการโคลนยีน โดยเลือกใช้ดีเอ็นเอพาหะที่มี copy number สูงแล้วอีกวิธีหนึ่งที่ใช้คือการเพิ่ม gene copy number ในเชื้อ *Bacillus* โดยการทำ chromosomal integration ซึ่งวิธีนี้จะไม่พบปัญหาพลาสมิดไม่เสถียรเหมือนวิธีแรก ในปี คศ. 1991 Van der Laan และคณะ ได้ทำการโคลนยีนแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus alcalophilus* PB92 ลงบนดีเอ็นเอพาหะ pUB110 แล้วส่งดีเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าเรือน *Bacillus subtilis* 1-A40 ซึ่งมีแอคติวิตีของโปรตีเอสต่ำ ทำให้มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสสูงขึ้นกว่าเดิมถึง 60 เท่า จากนั้นได้นำดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้มาทรานสฟอร์มเข้าสู่ *Bacillus alcalophilus* PB92 ทำให้เกิด homologous recombination ระหว่างยีนโปรตีเอสที่อยู่ในดีเอ็นเอลูกผสมกับยีนโปรตีเอสที่อยู่บนโครโมโซมัลดีเอ็นเอของเซลล์เจ้าเรือน พบว่าแบคทีเรียที่สร้างขึ้นสามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้มากขึ้นและพลาสมิดมีความเสถียรมากขึ้น จึงสามารถนำไปใช้ในการผลิตเอนไซม์จำนวนมากในระดับ large scale ต่อไป

อย่างไรก็ตามในการโคลนยีนโปรตีเอสเพื่อแยกยีนดังกล่าวมาทำการศึกษาโดยเลือกใช้เซลล์เจ้าเรือนเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* นั้นมีข้อควรคำนึงถึงคือ แบคทีเรียพวกนี้ส่วนมากจะมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้อยู่แล้วไม่มากก็น้อย นั่นคือเซลล์ดังกล่าวมียีนโปรตีเอสอยู่ ในการส่งดีเอ็นเอลูกผสมที่มียีนโปรตีเอสเข้าไปอาจทำให้เกิด homologous recombination ขึ้นคืออาจมีการ integrate ของยีนโปรตีเอสบนดีเอ็นเอพาหะกับยีนโปรตีเอสในดีเอ็นเอของโครโมโซมในเซลล์เจ้าเรือน ถึงแม้ว่าจะทำให้เซลล์เจ้าเรือนมีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสมากขึ้นแต่จะไม่สามารถนำยีนดังกล่าวมาศึกษาได้ ดังนั้นในการเลือกเซลล์เจ้าเรือนนั้นจะต้องพิจารณาถึงวัตถุประสงค์ของการวิจัย เพราะถ้ามีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ของเชื้อ *Bacillus* ที่มีการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสในปริมาณต่ำให้มีการผลิตสูงขึ้นก็จะใช้วิธีที่กล่าวมาข้างต้น แต่หากต้องการที่จะนำยีนโปรตีเอสที่ได้จากการโคลนนั้นมาศึกษาต่อก็ไม่ควรให้มี chromosome integretion เกิดขึ้น ซึ่งทำได้โดยเลือกใช้เซลล์เจ้าเรือนพวก *Escherichia coli* ซึ่งมีหลายสายพันธุ์ที่ไม่สามารถผลิตโปรตีเอสได้ ในปี ค.ศ. 1989 Kaneko และคณะ จากมหาวิทยาลัยโตเกียว ประเทศญี่ปุ่น ได้ทำการโคลนยีนที่สร้างเอนไซม์ alkaline elastase YaB จาก alkalophilic *Bacillus* strain YaB เอนไซม์นี้เป็น extracellular serine protease ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อย elastin ในการโคลนได้ใช้ *E. coli* JM109 เป็นเซลล์เจ้าเรือนเพื่อรับดีเอ็นเอลูกผสมที่ใช้ pUC18 เป็นพาหะดีเอ็นเอ หลังทำการทรานสฟอร์มได้คัดทรานสฟอร์แมนท์ที่มียีนโปรตีเอสซึ่งจะให้วงใสรอบๆโคโลนี (clear zone) บนจานอาหารที่มีนมพร่องไขมัน (skim milk plate) ออกมา และได้มีการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนดังกล่าวเปรียบเทียบกับยีนโปรตีเอส

เนื่องจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 เป็นเชื้อที่แยกได้จากดินในประเทศไทย สามารถสังเคราะห์ได้ทั้ง neutral protease และ alkaline protease โดย neutral protease นั้นมีขนาดโมเลกุล 37000 ดาลตัน มีลักษณะเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบ 480 ตัว ยีนที่สร้างเอนไซม์นี้มีขนาดประมาณ 1.4 กิโลเบส (อุดมลักษณ์, 2533) ส่วน alkaline protease มีขนาดโมเลกุล 27000 ดาลตัน มีลักษณะเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบ 350 ตัว ยีนที่สร้างเอนไซม์นี้มีขนาดประมาณ 1 กิโลเบส จากการศึกษาสมบัติและการทำให้บริสุทธิ์ของ alkaline protease จากเชื้อนี้ เปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน *Bacillus licheniformis* ATCC21415 พบว่าเชื้อทั้งสองนี้สามารถสร้าง alkaline protease ได้ไม่แตกต่างกันนัก และเมื่อทำการศึกษาสมบัติในด้าน กายภาพ เคมี จลนศาสตร์ ความจำเพาะในการไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์ของเอนไซม์ที่ได้จาก *B. subtilis* TISTR 25 เปรียบเทียบกับ subtilisin Carlsberg และ subtilisin BPN' พบว่ามีสมบัติเหมือนกับเอนไซม์ทั้งสองชนิด (ร.อ.ปกรณ์, 2532) ดังนั้นจึงน่าจะมีการโคลนยีนโปรตีเอสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เพื่อศึกษาถึงยีนโปรตีเอสของเชื้อนี้ต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ โคลนยีนที่สร้างเอนไซม์โปรตีเอสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ลงบนดีเอ็นเอพาหะคือ pUC18 ที่ตำแหน่ง *Bam*HI แล้วส่งดีเอ็นเอลูกผสมที่ได้นี้เข้าสู่เซลล์เจ้าเรือน *E. coli* JM109 และหลังการคัดทรานสฟอร์แมนท์ที่ผลิตโปรตีเอสได้แล้ว ก็จะนำดีเอ็นเอลูกผสมในทรานสฟอร์แมนท์นั้นมาศึกษาแผนที่เรสทริกชัน เพื่อเป็นพื้นฐานนำไปสู่การศึกษาตำแหน่งโปรตีเอสต่อไป อีกทั้งข้อมูลที่ได้นี้อาจนำไปเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงและพัฒนาประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสโดยใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมซึ่งจะมีประโยชน์มากในการผลิตเอนไซม์ทางอุตสาหกรรม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย