

บทที่ 2

ผลงานวิจัยและงานเขียนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

2.1 Phytic acid

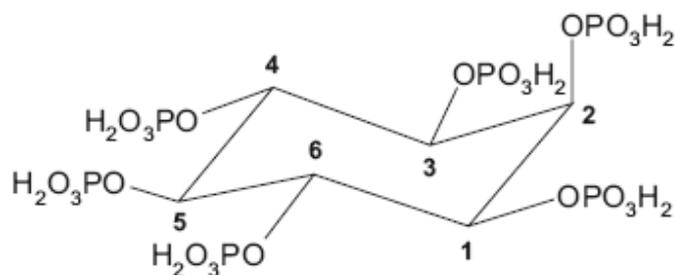
Phytic acid ได้ถูกค้นพบเป็นครั้งแรกโดย Pfeffer ในปี ค.ศ. 1872 (Dvorakova et al. 1998) โดย phytic acid เป็นชื่อที่มีการใช้โดยทั่วไปเพื่อเรียกสับสเทรตของเอนไซม์ phytase แต่ยังมีชื่ออื่นๆ ที่ใช้เรียก phytic acid อีก ได้แก่ phytate และ phytin ซึ่ง phytate คือ เกลือของ phytic acid (myo-inositol -123456-hexakisphosphate; IP₆) ส่วน phytin เป็นโครงสร้างของ phytic acid ที่มีการจับอยู่กับแร่ธาตุชนิดต่างๆ ซึ่งจะเป็นลักษณะโครงสร้างที่พบในพืชในขณะที่ phytic acid คือ โมเลกุลอิสระที่ไม่ได้จับอยู่กับแร่ธาตุใดๆ (Selle et al. 2006)

2.1.1 คุณสมบัติทางเคมีของ phytic acid

Myo-inositol (1,2,3,4,5,6) hexakisphosphate หรือที่เรียกกันทั่วไปว่า phytic acid โดยสูตรโมเลกุลของ phytic acid คือ C₆H₁₈O₂₄P₆ และมีมวลโมเลกุล เท่ากับ 660.04 gmol⁻¹ (Kumar et al. 2010) ซึ่งลักษณะโครงสร้างทางเคมีของ phytic acid แสดงได้ดังภาพที่ 2.1

ภาพที่ 2.1

โครงสร้างทางเคมีของ phytic acid โดยเลข 1-6 แทนตำแหน่งอะตอมของคาร์บอนในวงแหวน inositol ที่สร้างพันธะกับหมู่ฟอสเฟต (Haefner et al. 2005)

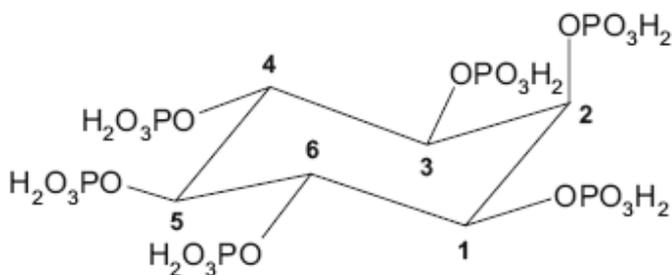


จากชื่อเต็มของ phytic acid เมื่อแยกแต่ละส่วนของชื่อจะอธิบายได้ถึงโครงสร้างแต่ละส่วน โดยในส่วนของคำว่า “myo” จะหมายถึงโครงสร้างของกลุ่มไฮดรอกซิลที่อยู่บนวงแหวน inositol และอีกส่วนหนึ่งของชื่อที่สามารถเข้าใจได้ง่ายซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับชื่อของเอนไซม์ phytase ด้วย นั่นคือ inositol phosphates โดยสารในกลุ่มนี้มีส่วนประกอบหลักได้แก่ inositol ring และหมู่ฟอสเฟตอย่างน้อย 1 กลุ่ม ซึ่งสาร myo-inositol (1,2,3,4,5,6) hexakisphosphate ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟต 6 กลุ่มที่สร้างพันธะกับวงแหวน inositol โดยใช้คำว่า “hexakis” แทนคำว่า “hexa” เนื่องจากหมู่ฟอสเฟตนี้ไม่ได้เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างของวงแหวน inositol และจัดเป็นสารที่มีความสามารถในการจับอะตอมของโลหะได้หลายตำแหน่ง (polydentate ligand) ดังนั้นชื่อ myo-inositol (1,2,3,4,5,6) hexakisphosphate สามารถเขียนแทนด้วย IP_6 , $InsP_6$ หรือ phytic acid (PA) ก็ได้ และในกรณีที่วงแหวน inositol สร้างพันธะกับหมู่ฟอสเฟตตั้งแต่ 1 ถึง 5 กลุ่ม ($InsP_1 \sim InsP_5$) เรียกว่า lower myo-inositol phosphates (Bohn et al. 2008)

ในช่วงสภาวะ pH ที่ 0.5-10.5 phytic acid จะยังคงอยู่ในรูปร่างที่มีลักษณะคล้ายเรือ คือ เป็นลักษณะของโครงสร้างที่หมู่ฟอสเฟตกลุ่มหนึ่งจะอยู่ในแกนตั้ง ในขณะที่หมู่ฟอสเฟตอีก 5 กลุ่มที่เหลือจะอยู่ในแนวนอน ดังภาพที่ 2.2 ซึ่งจะแสดงภาพโครงสร้างจำลองของ phytic acid แต่เมื่อ phytic acid อยู่ในสภาวะ pH ที่สูงกว่านั้นจะมีการเปลี่ยนโครงสร้างไปในทิศทางตรงกันข้ามจากลักษณะที่กล่าวจากข้างต้น (Bohn et al. 2008)

ภาพที่ 2.2

โครงสร้างจำลองโมเลกุล phytic acid เมื่ออยู่ในสภาวะ pH ที่ 0.5-10.5



2.1.2 แหล่งของ phytic acid

แร่ธาตุฟอสฟอรัส จัดว่าเป็นสารอาหารที่มีความสำคัญกับสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ซึ่งสะสมอยู่ในรูปของ phytic acid เป็นส่วนใหญ่ ทำให้สิ่งมีชีวิตสามารถได้รับ phytic acid ได้จากการบริโภคอาหารที่มีพืชผักเป็นส่วนประกอบ (Xiang et al. 2004) โดย phytic acid จะเริ่มมีการสะสมในช่วงการพัฒนาของเมล็ดจนกระทั่งเมล็ดมีการเจริญเติบโตเต็มที่ ซึ่งจะทำให้แร่ธาตุฟอสฟอรัสที่สะสมอยู่ในเมล็ดปริมาณถึง 60-90 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมดที่มีอยู่ในเมล็ดพืชชนิดนั้นๆ โดยเมล็ดพืชที่มีการพบ phytic acid ได้แก่ เมล็ดธัญพืช เมล็ดพืชตระกูลถั่ว และ oil seeds ซึ่งโดยส่วนใหญ่แล้วจะพบ phytic acid ในบริเวณส่วนของเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตจำพวกยูคาริโอต โดยจะอยู่ในส่วนของผนังเซลล์ในรูปของ phosphoinositides หรืออยู่ในรูปที่มีการจับอยู่กับโปรตีนหรือไอออนโลหะต่างๆ โดยแหล่งของ phytic acid ที่ได้จากพืชแสดงได้ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1

ปริมาณแร่ธาตุฟอสฟอรัสที่สะสมอยู่ในรูปของ phytates ที่สามารถพบในเมล็ดของพืชชนิดต่างๆ (Cao et al. 2007)

Sources of phytates		Total P (g/kg)	Phytate-P (g/kg)	Proportion (เปอร์เซ็นต์)
Cereals	Wheat grain	3.07	2.19	71.6
	Oat	3.60	2.10	59.0
	Corn grain	2.62	1.88	71.6
	Barley grain	3.21	1.96	61.0
	Sorghum grain	3.01	2.18	72.6
	Rye	3.05	1.95	63.9
Oilseed meals	Canola meal	9.72	6.45	66.4
	Cottonseed meal	10.02	7.72	77.1
	Corn glutton meal	4.24	2.67	63.0
	Rapeseed meal	9.60	6.34	66.0
	Soybean meal	6.49	3.88	59.9

By-products	Rice bran	17.82	14.17	79.5
	Wheat bran	10.96	8.36	76.3

2.1.3 คุณสมบัติของ phytic acid ในด้านต่างๆ

Phytic acid ซึ่งพบได้ในเมล็ดพืชมีหน้าที่ในการเก็บสะสมสารฟอสเฟตซึ่งถือเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของสิ่งมีชีวิต และจากการที่ phytic acid เป็นองค์ประกอบหลักของพืช phytic acid จึงมีหน้าที่สำคัญดังนี้ คือ (1) เป็นแหล่งพลังงานของพืช (2) สะสมแร่ธาตุชนิดต่างๆ ของเมล็ดพืช (complexation multivalent cations) (3) ควบคุมระดับของปริมาณฟอสเฟตในเซลล์พืช (Dvorakova et al. 1998) และจากที่กล่าวไปในตอนแรกว่า phytate คือ เกลือของ phytic acid ที่จับอยู่กับอะตอมของแร่ธาตุชนิดต่างๆ ซึ่ง phytate มีความสำคัญโดยจะเป็นแหล่งสะสมแร่ธาตุชนิดต่างๆ ไว้ในเมล็ดพืช โดยจะเก็บไว้ในส่วนของแวนิวโอลของที่บริเวณเยื่อหุ้มชั้นในของเมล็ด (aleurone layer) ซึ่งห่อหุ้มเอมบริโออยู่นั่นเอง โดยทั่วไปแล้วในสิ่งมีชีวิตยูคาริโอต phytic acid มีคุณสมบัติที่เด่นชัด 3 ประการซึ่งได้แสดงให้เห็นว่า phytic acid น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึม ดังนี้ (1) คุณสมบัติในการจับกับอะตอมของโลหะของหมู่ฟอสเฟตของ phytic acid ซึ่งจะมีผลต่อระบบการทำงานของเซลล์ (2) การที่สาร lower inositol phosphates (InsP1~InsP5) หรือวงแหวน inositol ที่สร้างพันธะกับหมู่ฟอสเฟต ตั้งแต่ 1 ถึง 5 กลุ่ม มีส่วนร่วมในกระบวนการส่งสัญญาณของเซลล์ (Cell signaling pathways) และ (3) phytic acid มีบทบาทสำคัญในการเป็นสารตั้งต้นสำหรับสารประกอบชนิดอื่นๆ ที่สามารถทำหน้าที่แตกต่างกันออกไป (Bohn et al. 2008)

แต่คุณสมบัติอีกข้อหนึ่งของ phytic acid ที่ทราบโดยทั่วไป นั่นคือความสามารถในการเป็นสาร antioxidant ด้วยการจับกับอะตอมของ Fe ทำให้ Fe ไม่สามารถทำงานได้ ซึ่งจะป้องกันการเกิดไอออนของ ferric ions ที่มีส่วนร่วมในการเกิดปฏิกิริยา Fenton ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ทำให้เซลล์ตายนั่นเอง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ phytic acid สามารถเป็นตัวยับยั้งการเกิดโรคชนิดต่างๆ ในสิ่งมีชีวิตก็เป็นได้ นอกจากนี้การที่ phytic acid สามารถจับกับอะตอมของโลหะชนิดต่างๆ ได้ ทำให้คุณสมบัติข้อนี้ถูกนำมาใช้ในการรักษาสภาพของน้ำหมึก historic ink ที่สร้างจากกรด gallic โดยได้จากสาร tannins และไอออนของ Fe โดย phytic acid จะป้องกันการเกิดผลึกที่เกิดจากการปฏิกิริยาออกซิเดชันของเซลล์โลหะที่อยู่ในกระดาดานั้นเอง ทำให้เพิ่มความคงทนของข้อมูลบนกระดาดเป็นสองเท่า นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับการนำ phytic acid มาทดสอบโดย

ใช้เป็นส่วนผสมในยาสีฟันเพื่อเป็นเครื่องมือในการป้องกันการเกิดคราบหินปูนจากแบคทีเรียอีกด้วย (Bohn et al. 2008)

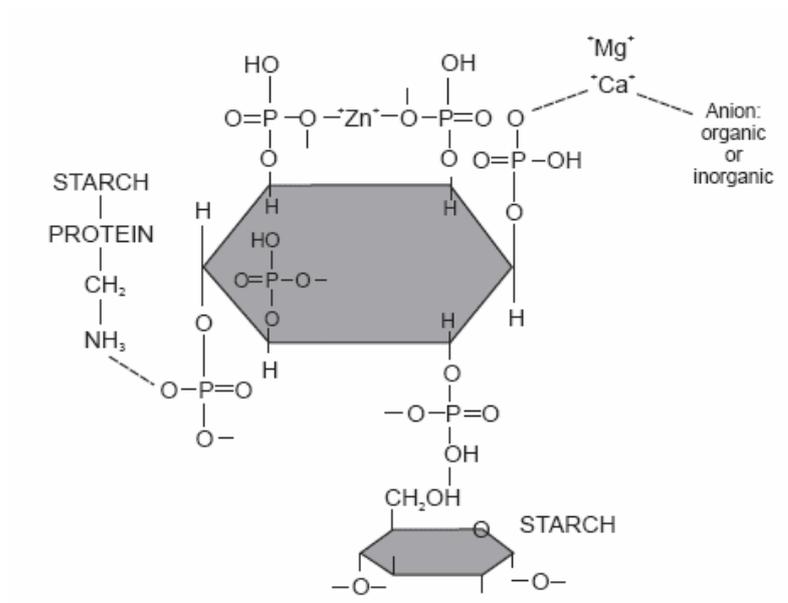
ในกลุ่มของสิ่งมีชีวิตเลี้ยงลูกด้วยนมได้มีรายงานเกี่ยวกับ phytic acid ว่ามีส่วนร่วมในกระบวนการย่อยแป้ง และมีส่วนร่วมในการยับยั้งการลอกรหัสจีโนมของไวรัส HIV-1 และในส่วนของระดับเซลล์ phytic acid ได้ถูกระบุว่ามีส่วนร่วมในกระบวนการควบคุมในระดับยีน ซึ่งเป็นควบคุมในรูปแบบของ mRNA RNA-editing และ กระบวนการซ่อมแซม DNA โดยสาร lower inositol phosphate เช่น $\text{Ins}(145)\text{P}_3$ เป็นสารตัวกลางหนึ่งในกระบวนการส่งสัญญาณของเซลล์ ร่วมกับ Ca^{2+} ซึ่งกระบวนการเริ่มต้นในการทำหน้าที่ต่างๆ ของเซลล์ในวิถีของเมตาบอลิซึมในด้านการรักษาโรค ได้มีนักวิจัยที่ศึกษาเพื่อนำ phytic acid มาใช้ในการบำบัดโรคมะเร็ง และมีความเป็นไปได้ในการที่ phytic acid จะมีความสามารถในการรักษา แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีผลการวิจัยที่ชัดเจน (Bohn et al. 2008) จากรายงานวิจัยที่ได้กล่าวมาทั้งหมดข้างต้นจะเห็นได้ว่าเป็นการวิจัยเพื่อดึงเอาประโยชน์ของ phytic acid มาใช้ในด้านต่างๆ ซึ่งจัดเป็นคุณสมบัติในด้านบวก

แต่ในทางตรงกันข้ามข้อเสียของ phytic acid ก็มีเช่นกัน โดยพบว่า phytic acid ที่อยู่ในอุจจาระเป็นตัวยับยั้งกระบวนการฟิซิวาร์ ในการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์เพื่อวิเคราะห์โรคในฟาร์มปศุสัตว์ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าหากร่างกายได้รับ phytic acid ในปริมาณที่มากจะทำให้ร่างกายขาดแคลนแร่ธาตุ และได้รับสารอาหารไม่เพียงพอ โดย phytic acid จะเป็นตัวที่ขัดขวางการได้รับสารอาหารอย่างเต็มที่ของคนและสัตว์ สาเหตุเกิดจากการที่ phytic acid ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟตซึ่งมีประจุลบที่สามารถจับกับแร่ธาตุโลหะชนิดต่างๆ ที่มีประจุบวกสองได้ เช่น Ca^{2+} Mg^{2+} Zn^{2+} Cu^{2+} Fe^{2+} และ Mn^{2+} ทำให้เกิดโมเลกุลที่อยู่ในรูปของเกลือ phytate (metal-phytate complexes) ซึ่งมีความสามารถในการละลายต่ำที่สภาวะ pH ของลำไส้เล็กทำให้ร่างกายของคนและสัตว์ไม่สามารถย่อยและดูดซึมแร่ธาตุเหล่านี้เพื่อนำไปใช้ได้และขับออกจากร่างกายไปในที่สุด (Dvorakova et al. 1998; Urbano et al. 2000; Bohn et al. 2008) นอกจากนี้ phytic acid ยังสามารถจับกับโปรตีนและโมเลกุลชีวภาพอื่นๆ ได้ในทั้งสภาวะที่เป็นกรดและเบสด้วยซึ่งจะส่งผลให้เกิดความต้านทานต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่างๆ ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการได้รับสารอาหารอื่นๆ ตามไปด้วย (Sebastian et al. 1998) โดยโครงสร้างของการจับกันระหว่าง phytic acid แร่ธาตุชนิดต่างๆ และโมเลกุลทางชีวเคมีอื่นๆ แสดงดังภาพที่ 2.3 และผลจากการจับกันของ phytic acid ในการจับกับสารอาหารต่างๆ (Kumar et al. 2010) แสดงในตารางที่ 2.2

ภาพที่ 2.3

แสดงการจับกันระหว่างระหว่าง phytic acid แร่ธาตุชนิดต่างๆ และโมเลกุลทางชีวเคมีอื่นๆ

(<http://images.google.com/imgres?imgurl=http://en.engormix.com>)



ตารางที่ 2.2

คุณสมบัติด้านลบของ phytic acid ในการจับกับโมเลกุลทางชีวภาพชนิดต่างๆ

(Kumar et al. 2010)

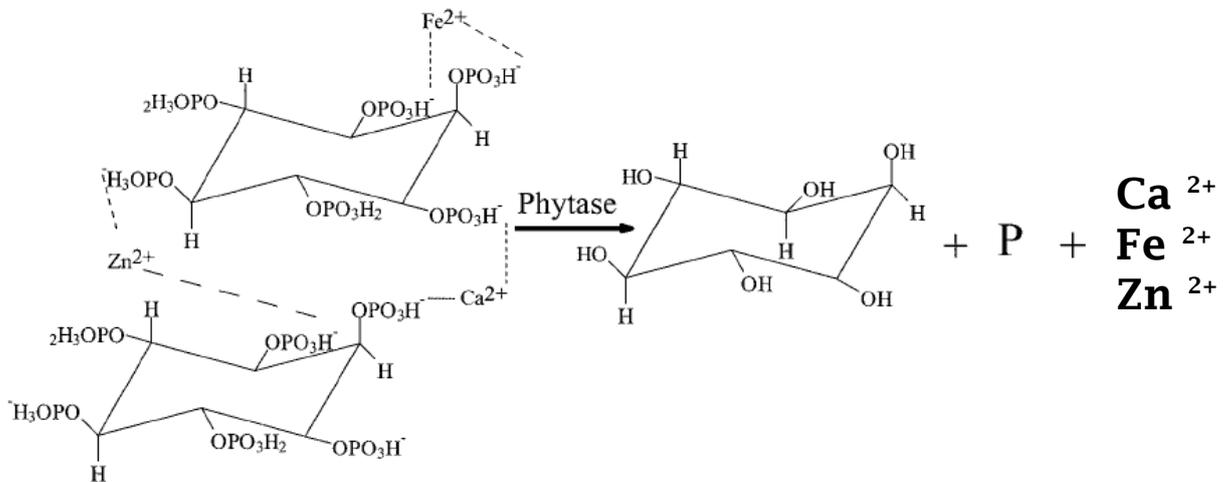
Nutrients	Mode of action	Reference
Mineral ions (zinc iron calcium magnesium manganese and copper)	Formation of insoluble phytate-mineral complexes leads to decrease in mineral availability	(Brune et al. 1992) (Iqbal et al. 1994) (Lopez et al. 2002) and (Konietzny and Greiner 2003)
Protein	Formation of non-specific phytate-protein complex not readily hydrolysed by proteolytic enzymes	(O'Dell and de Boland 1976) and (Ravindran et al. 1995)
Carbohydrate	Formation of phytate carbohydrate complexes making carbohydrate less degradable. Inhibition of amylase activity by complexing with Ca ⁺⁺ ion and decrease of carbohydrate degradation	(Rickard and Thompson 1997) and (Selle et al. 2000)
Lipid	Formation of 'lipophytin' complexes may lead to metallic soaps in gut lumen resulting in lower lipid availability	(Matyka et al. 1990) (Leeson 1993) and (Vohra and Satanarayana 2003)

ในสัตว์จำพวกสัตว์เคี้ยวเอื้องเช่น วัว และควาย นั้นสามารถย่อย phytate ได้เนื่องจากในกระเพาะส่วนรูเมนของสัตว์เหล่านี้จะมีเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายชนิดซึ่งในจำนวนนั้นสามารถผลิตเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่สามารถย่อย phytate ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ได้แก่เอนไซม์ phytase ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะไม่พบในระบบย่อยอาหารของสัตว์กระเพาะเดี่ยวเช่น หมู หรือสัตว์ปีก ทำให้สัตว์เหล่านี้ไม่สามารถที่จะย่อยโมเลกุล phytate ได้ (Schroder et al. 1996) ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้สัตว์จำพวกสัตว์กระเพาะเดี่ยวไม่สามารถนำสารอาหารไปใช้ประโยชน์ได้และมีผลต่อการเจริญเติบโตโดยตรง ดังนั้นในอุตสาหกรรมอาหารของสุกรและไก่จึงได้มีการนำสาร inorganic phosphate ซึ่งมีส่วนประกอบของสาร dicalcium phosphate และ defluorinated phosphate มาผสมลงในอาหารสัตว์เหล่านี้เพื่อให้สัตว์ได้รับแร่ธาตุฟอสฟอรัสอย่างเพียงพอ (Bohn et al. 2008) และมีการเจริญเติบโตอย่างมีประสิทธิภาพ แต่จากวิธีนี้ได้ทำให้เกิดปัญหามลภาวะทางสิ่งแวดล้อมตามมา โดยทำให้พวกสาหร่ายชนิดต่างๆ มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว เนื่องจากได้รับแร่ธาตุฟอสฟอรัสจากสาร phytic acid และ สาร inorganic phosphates ที่ปะปนมากับมูลสัตว์ซึ่งถูกปล่อยออกมาพร้อมสิ่งปฏิกูลต่างๆ สู่ม่าน้ำลำคลอง โดยพวกสาหร่ายจะเติบโตแพร่ขยายปกคลุมผิวน้ำทำให้ปลาและสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในน้ำได้รับก๊าซออกซิเจนลดลงและตายในที่สุด ดังนั้นจึงได้เริ่มมีการค้นหาเอนไซม์ที่สามารถย่อย phytate ได้ ซึ่งในเวลาต่อมาได้พบว่าเอนไซม์ phytases เป็นเอนไซม์ที่สามารถตัดหมู่ phosphate จากโมเลกุล phytate ได้ด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ที่โมเลกุล phytate ทำให้สัตว์สามารถดูดซึมแร่ธาตุฟอสฟอรัสและแร่ธาตุอื่นๆ ไปใช้ได้ (Yano et. al 1999) โดยการทำงานของเอนไซม์ phytase ในการย่อยโมเลกุลของ phytases แสดงได้ดังภาพที่ 2.4

ดังนั้นเอนไซม์ phytase จึงถูกนำมาผสมลงในอาหารสัตว์จำพวกสัตว์กระเพาะเดี่ยวเพื่อช่วยในการย่อย phytate ทำให้ได้ธาตุฟอสฟอรัสและแร่ธาตุอื่นๆ ที่จับอยู่กับโมเลกุล phytate ออกมาซึ่งทำให้สัตว์สามารถดูดซึมธาตุฟอสฟอรัสและแร่ธาตุต่างๆ เหล่านั้นไปใช้ในการเติบโตได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้ยังเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการเติมสาร inorganic phosphorus ลงในอาหารสัตว์โดยไม่จำเป็นอีกทางหนึ่ง รวมทั้งยังช่วยลดปัญหาทางมลภาวะดังที่กล่าวไว้ข้างต้นอีกด้วย

ภาพที่ 2.4

การทำงานของเอนไซม์ phytase ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสทำให้พันธะที่เชื่อมระหว่าง phytates 2 โมเลกุลและแร่ธาตุต่างๆ ถูกทำลายทำให้ได้ phytate โมเลกุลเดี่ยว และฟอสฟอรัสแคลเซียมเหล็ก และสังกะสี(Lei et al.2003)



2.2. Phytase

Phytase เป็นชื่อที่มีการใช้โดยทั่วไป เพื่อเรียกเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เพื่อสลายพันธะฟอสโฟโมโนเอสเทอร์ กับ phytic acid ซึ่งเป็นสับสเตรตที่ดีของเอนไซม์ phytase ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ทำให้ได้สาร inorganic phosphates ออกมาโดยชื่ออย่างเป็นทางการของเอนไซม์ phytase คือ *myo*-inositol (1,2,3,4,5,6) hexakisphosphate phosphohydrolase ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์จำพวก phosphatases โดยสามารถทำปฏิกิริยากับ phytic acid และได้ผลิตภัณฑ์เป็นหมู่ฟอสเฟตอย่างน้อยหนึ่งกลุ่ม และอะตอมของโลหะต่างๆ ที่จับอยู่กับ phytic acid (Mullaney et al. 2003)

เอนไซม์ phytase ได้มีการกล่าวถึงเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1907 จากรายงานวิจัยของ Suzuki ซึ่งกล่าวว่าใน rice bran นั้นมีการทำงานของเอนไซม์ phytase ซึ่งต่อมาพบว่าเอนไซม์ phytases สามารถพบได้ทั่วไปในพืช โดยจะพบในพืชหลายสายพันธุ์ เช่น ข้าวสาลี ข้าวไรย์ ข้าวบาร์เลย์ พืชตระกูลถั่ว ข้าวโพด ข้าว white mustard มันฝรั่ง หัวไชเท้า lettuce ผักขม กัญชา ละอองเกสรของ

ดอกลิลลี่ ฯลฯ โดยจะพบว่าในระหว่างการงอกของเมล็ดจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ phytases เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ดังนั้นจึงมีการยอมรับว่าในระหว่างการงอกของเมล็ด phytate จะถูกนำไปใช้ในรูปของฟอสเฟต inositol และ โดย เอนไซม์ phytases นอกจากนี้ยังมีบางงานวิจัยลงความเห็นว่า activity ของ เอนไซม์ phytases จะเพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการงอกของเมล็ดพืช ในขณะที่บางงานวิจัยได้ให้เหตุผลว่าอัตราของ activity ของเอนไซม์ phytases ที่มีการเพิ่มขึ้น เกิดจาก เอนไซม์ phytases ที่มีในเซลล์ตั้งแต่ต้นแล้วแต่อย่างไรก็ตาม ข้อสรุปในที่สุดก็คือ ในเมล็ดพืชจะประกอบเอนไซม์ phytases ที่มีอยู่แล้วในเซลล์ กับ เอนไซม์ phytases ที่มีการผลิตขึ้นระหว่างการงอกของเมล็ดพืช (Dvorakova et al. 1998)

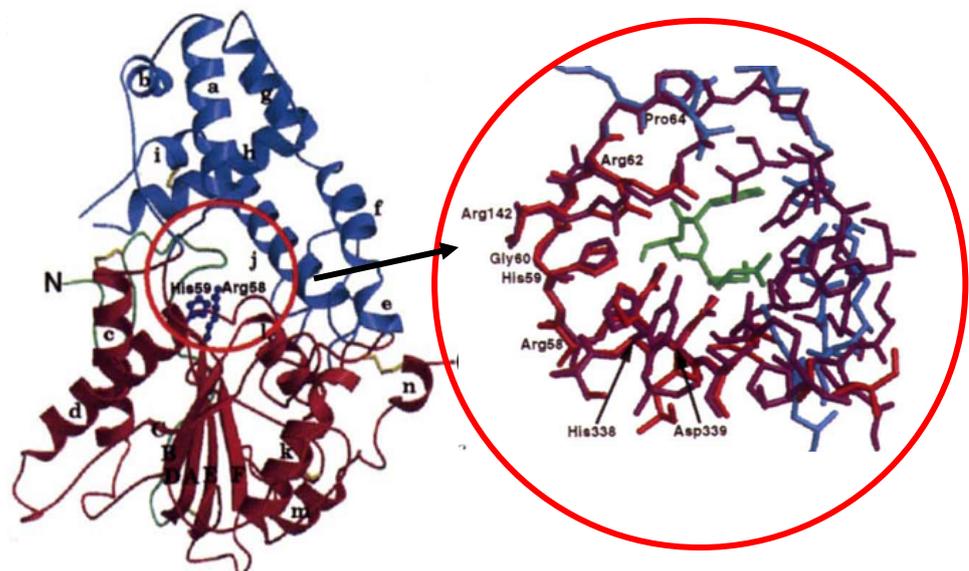
และในปี ค.ศ. 1908 คณะวิจัยของ McCollum และ Hart พบว่ามีการทำงานของเอนไซม์ phytase ในเลือดของปลาฉลามเป็นครั้งแรก และยังมีรายงานวิจัยที่กล่าวถึงเอนไซม์ phytases ซึ่งพบในตับและเลือดของลูกวัว อย่างไรก็ตามในเวลาต่อมาการค้นหาเอนไซม์ phytases ในเลือดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมยังไม่ประสบความสำเร็จ ซึ่งรายงานว่าพบเอนไซม์ phytases ในเลือดของสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำเท่านั้น เช่น นก สัตว์เลื้อยคลาน ปลา batrachians และ เต่าทะเล เป็นต้น และจากการที่ phytate ที่อยู่ในธัญพืชชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักของอาหารสัตว์รวมถึงอาหารของมนุษย์ ทำให้นักวิจัยได้พยายามตรวจสอบหาเอนไซม์ phytases ในบริเวณส่วนของกระเพาะไปจนถึงลำไส้เล็กของสัตว์หลากหลายชนิด จากนั้นได้มีรายงานครั้งแรกเกี่ยวกับปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส phytate ในลำไส้เล็กของหนู โดยนักวิจัยบางคนได้ลงความเห็นว่าการทำงานของเอนไซม์ phytases ในลำไส้เล็กของหนูมีลักษณะไม่เหมือนกับเอนไซม์ในกลุ่มของ alkaline phosphatases ในลำไส้เล็ก (Dvorakova et al. 1998) อย่างไรก็ตาม ในปี 1972 Bitar และ Reinhold ได้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ phytases จากลำไส้เล็กของ หนู ลูกวัว และ คน แตกต่างจากเอนไซม์ในกลุ่มของ alkaline phosphatase และได้มีการสนับสนุนข้อคิดเห็นที่ว่าเอนไซม์ phytases จากลำไส้เล็กของหนูต่างจากเอนไซม์ในกลุ่ม phosphatase โดย Rao และ Ramakrishnan ในปี 1985 และดูเหมือนว่าเอนไซม์ phytases ในส่วนของลำไส้เล็กจะไม่ได้มีบทบาทที่สำคัญในการนำ phytate ไปใช้ประโยชน์ในร่างกาย แต่อาจจะเป็นไปได้ว่า phytate จะถูกนำไปใช้โดยการทำงานของเอนไซม์ phytases ที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในกระเพาะอาหารส่วน rumen ซึ่งเป็นเชื้อราและแบคทีเรียชนิด anaerobic ดังนั้นการได้รับฟอสเฟตจาก phytate ของสัตว์เคี้ยวเอื้องมาจากการทำงานของเอนไซม์ phytases ที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบย่อยอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้องนั่นเอง (Frolich et al. 1990)

จากรายงานวิจัยต่างๆ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ phytase เป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตที่หลายชนิด ซึ่งในเวลาต่อมานักวิจัยกลุ่มต่างๆ ก็ได้ค้นพบเอนไซม์ phytase จากหลายแหล่ง ได้แก่แบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อราหลากหลายชนิด โดยเหตุผลหลักในการค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์ phytase นั้นก็เนื่องมาจากการขาดเอนไซม์ที่สามารถย่อย phytic acid ที่อยู่ในระบบย่อยอาหารของสัตว์กระเพาะเดี่ยวได้ ซึ่งรวมถึงในมนุษย์ที่ต้องอาศัยเอนไซม์จากแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้และอาศัยสภาวะความเป็นกรดในระบบลำไส้เป็นตัวช่วยในการย่อย phytic acid เท่านั้น ดังนั้นในช่วงเวลาหลายปีที่ผ่านมาจึงมีรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์ phytase ออกมาเป็นจำนวนมากโดยกล่าวถึงคุณสมบัติในการทำงานของเอนไซม์เป็นส่วนใหญ่ (Bohn et al. 2008)

จากที่กล่าวในตอนต้น เอนไซม์ phytases (IP_6 phosphohydrolase) จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ phosphatases ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ในโมเลกุล phytate ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์คือ (1) myo-inositol และ/หรือ (2) 1- 2- 3- 4- และ/หรือ 5-phosphates (IP_5 - IP_1) และ (3) inorganic phosphate (Wyss et al. 1999) โดยโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytase แสดงบริเวณ active site ของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนเป็นบริเวณเร่งปฏิกิริยา (catalytic center) (R58 H59 R62 R142 H338 และ D339) (Kostrewa et al. 1997) และกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่จับกับสารตั้งต้น (substrate binding site) (K91 K94 E228 D262 K300 และ K301) (Mullaney et al. 2002) แสดงในภาพที่ 2.5

ภาพที่ 2.5

โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytases โดยบริเวณในวงกลมเป็นส่วน active site ของเอนไซม์ ซึ่งประกอบด้วยส่วนของ (catalytic center) (R58 H59 R62 R142 H338 และ D339) (Kostrewa et al. 1997) และส่วน สัมผัสเทรต specificity site (K91 K94 E228 D262 K300 และ K301) (Mullaney et al. 2002)



2.2.1. การจัดกลุ่มเอนไซม์ phytase

ในปัจจุบันเอนไซม์ phytase แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม โดยสถาบัน IUPAC-IUBMB (the International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) โดยใช้หลักเกณฑ์คือ แบ่งกลุ่มตามตำแหน่งเริ่มต้นของอะตอมคาร์บอนในวงแหวน inositol ที่มีการตัดพันธะฟอสโฟโมโนเอสเทอร์ (dephosphorylation) ทำให้ได้สาร inorganic phosphates และ lower inositol phosphates ออกมา ซึ่งตำแหน่งอะตอมคาร์บอนที่เกิดปฏิกิริยาก็จะมีความแตกต่างกันไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยจะพบว่าเอนไซม์ phytase ในแต่ละกลุ่มจะมีโครงสร้างที่แตกต่างกัน นอกจากนี้เอนไซม์ที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันอาจจะมีกลไกในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสต่อสับสเตรต phytic acid ได้แตกต่างกันด้วย (Bohn et al. 2008)

นอกจากนี้เอนไซม์ phytase ยังสามารถจัดกลุ่มตามสภาวะความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมกับการทำงานได้อีกด้วย ซึ่งก็จะแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ (1) acidic phosphatases (2) alkaline phosphatases (3) neutral phosphatases และเนื่องจากในปัจจุบันงานวิจัยส่วนใหญ่มุ่งศึกษาเกี่ยวกับการทำงานของเอนไซม์ phytase ในบริเวณระบบทางเดินอาหารของสัตว์กระเพาะเดี่ยวเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพให้สูงขึ้น ดังนั้นข้อมูลงานวิจัยต่างๆ จึงกล่าวถึงเอนไซม์ acidic phosphatases เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งเอนไซม์ acidic phosphatases สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 3 กลุ่ม คือ (1) histidine acid phosphatases (HAP) (2) β -propeller phytase (BPP) และ (3) purple acid phosphatases (PAP) (Mullaney et al. 2003) โดยรายละเอียดของเอนไซม์ phytase แต่ละกลุ่มจะกล่าวในหัวข้อถัดไป

2.2.1.1. EC 3.1.3.8: the 3-phytases

จัดเป็นกลุ่มของเอนไซม์ phytase ที่มีขนาดใหญ่ที่สุดโดยจะพบได้ทั่วไปใน เชื้อราและแบคทีเรีย โดยลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ทั้งหมดจะมีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน คือ มีลักษณะเป็นแบบ β -propeller phosphatase (BPP) หรือแบบ histidine acid phosphatases (HAP) โดยโครงสร้างแบบ BPP จะมีการสร้างพันธะที่แข็งแรงกับไอออนของ Ca^{2+} ได้ถึง 3 ไอออน และต้องมีหมู่ฟอสเฟตสองหมู่ เพื่อสร้างพันธะในบริเวณ cleavage site และ affinity site ก่อนที่

จะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการเกิดปฏิกิริยายังไม่สามารถระบุได้ชัดเจน อาจจะเป็น inositol-triphosphate หรือ Ins(1,3,5)P3 หรือ Ins(2,4,6)P3 (Kerovuo et al. 2000; Shin et al. 2001) แต่เมื่อเร็วๆ นี้ได้มีข้อมูลที่ชัดเจนว่าอาจจะเป็น Ins(2,4,6)P3 ที่เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของปฏิกิริยา(Bohn et al. 2008)

เอนไซม์ phytases ที่ได้จากแบคทีเรีย เชื้อรา และ พืช ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มลักษณะโครงสร้าง HAPs ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยได้อีก 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกจะเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นที่หลากหลาย (broad substrate specificity) แต่เอนไซม์อีกกลุ่มจะมีความจำเพาะต่อชนิดของสับสเตรตได้น้อยกว่า โดยเอนไซม์ phytase ที่จัดอยู่ในกลุ่มของ HAPs จะมีบริเวณ active site 2 บริเวณที่มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันได้แก่ RHGX RXP และ HD โดยตัวอักษร X หมายถึง กรดอะมิโนชนิดอื่นๆ ซึ่งขึ้นอยู่กับสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด และสามารถเร่งปฏิกิริยา hydrolysi กับโมเลกุล metal-free phytate ในสภาวะ pH ที่เป็นกรดได้ แต่อย่างไรก็ตามลำดับอะมิโนบริเวณอื่นๆ ของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ไม่มีความคล้ายคลึงกันมากนัก (Bohn et al. 2008)

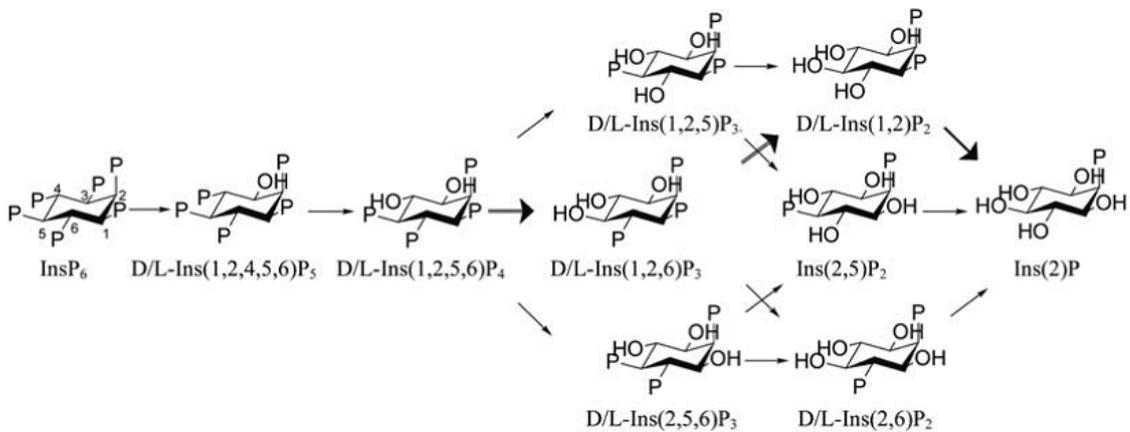
เอนไซม์ในกลุ่มของ HAPs นี้จะสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับโมเลกุล phytic acid ที่บริเวณตำแหน่ง C3 หรือ C6 ของวงแหวน inositol เป็นตำแหน่งแรกและให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายออกมาเป็น myo-inositol monophosphate ในบางกรณีอาจจะเป็น InsP₂ (Greiner and Carlsson 2006; Mullaney and Ullah 2003; Oh et al. 2006) ซึ่งกลไกของการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ phytase ในกลุ่ม HAPs ถูกเสนอโดย Xiang ในปี 2004 ซึ่งอธิบายการทำงานของเอนไซม์ HAP phytase จากเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* ไว้ดังนี้ โดยกรดอะมิโน Histidine ในบริเวณ conserved motif จะถูกทำให้เป็น nucleophilic ซึ่งจะเข้าไปทำลายพันธะที่บริเวณอะตอมคาร์บอนเป้าหมาย จากนั้นกรดอะมิโน Aspartic acid ที่ C-terminal ของเอนไซม์ จะทำให้หมู่ฟอสเฟตมีเสถียรภาพ โดยการทำหน้าที่เป็นตัวให้โปรตอนและโมเลกุลของน้ำจะถูกใช้เป็นตัวกลางในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส แต่โครงสร้างจากการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่ฟอสเฟตกับกรดอะมิโน Histidine จะมีความเสถียรเพียงพอในการเกิดผลึกระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรตจะต้องมีการใช้ความร้อนในการทำปฏิกิริยาด้วย

เอนไซม์ phytase ในกลุ่มของ 3-phytases จากแหล่งของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ได้ถูกนำมาใช้เป็นตัวอย่างของการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ phytase โดยเอนไซม์ที่ผลิตได้จะเป็น extracellular enzyme ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้ผลิตเอนไซม์ phytase โดยการเติมสาร InsP₆ ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งจะใช้เป็นแหล่งฟอสฟอรัสเพียงแหล่งเดียวในการ

เจริญเติบโต และในงานวิจัยต่อมาก็ได้พัฒนาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ phytase จากยีสต์ชนิดนี้โดยใช้เซลล์เจ้าบ้านชนิดอื่นในการผลิตทำให้ได้เอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการทนร้อนได้ดี กลไกการเกิด dephosphorylation กับสับสเตรต phytic acid ด้วยเอนไซม์ *S. cerevisiae* phytase แสดงได้ดังรูปที่ 2.6 (Andlid et al. 2004; Greiner and Alming 2001)

ภาพที่ 2.6

การทำงานของเอนไซม์ 3-phytase จากยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*



โดยการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับโมเลกุล phytic acid โดยเข้าทำปฏิกิริยาที่อะตอมคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 ของวงแหวน inositol เป็นตำแหน่งแรก ทำให้ได้หมู่ฟอสเฟตออกมา โดยเครื่องหมายลูกศรหนาแสดงถึงกลไกหลักของการทำปฏิกิริยา และเครื่องหมายลูกศรบางจะแสดงถึงกลไกการทำปฏิกิริยาที่มีความเป็นไปได้แต่ยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจน ซึ่งผลิตภัณฑ์สุดท้ายของปฏิกิริยาได้แก่ InsP_2 จากในรูป P แทน inorganic phosphate (ปรับปรุงจาก Greiner et al. 2001).

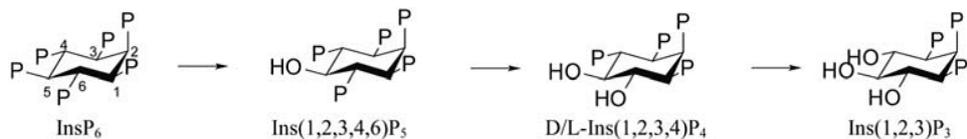
2.2.1.2. EC 3.1.3.72: the 5-phytases

เอนไซม์ในกลุ่มนี้จัดเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเป็น alkaline phytase โดยเอนไซม์ phytase จากละอองเกสรของดอกลิลลี่เป็นตัวอย่างเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ โดยเอนไซม์ phytase จากละอองเกสรจะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดที่ pH 8.0 ณ อุณหภูมิ 55 องศา

เซลล์ และเริ่มต้นเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยการเข้าทำปฏิกิริยากับหมู่ฟอสเฟตตำแหน่งที่ 5 โดยภาพจำลองการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์กับ phytic acid แสดงได้ดังภาพที่ 2.7

ภาพที่ 2.7

การทำงานของเอนไซม์ 5-phytase จากละอองเกสรของดอกกลิลลี่



โดยการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับโมเลกุล phytic acid โดยเข้าทำปฏิกิริยาที่อะตอมคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ของวงแหวน inositol เป็นตำแหน่งแรก ทำให้ได้หมู่ฟอสเฟตออกมา ซึ่งผลิตภัณฑ์สุดท้ายของปฏิกิริยาได้แก่ Ins(1,2,3)P₃ จากในรูป P แทน inorganic phosphate (ปรับปรุงจาก Barrientos et al. 1994)

2.2.1.3. EC 3.1.3.26: the 4/6-phytases

เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมีการเข้าทำปฏิกิริยากับ phytic acid ที่ตำแหน่งอะตอมคาร์บอนที่อยู่ถัดจากคาร์บอนอะตอมที่ 5 ของวงแหวน inositol ดังนั้นชื่อที่ถูกต้องของเอนไซม์ phytase กลุ่มนี้คือ 4-phytase แต่ชื่อที่มีการเรียกกันโดยทั่วไปจะเป็น 6-phytase โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมีโครงสร้างที่มีความหลากหลาย ได้แก่ โครงสร้างแบบ purple acid phosphatase (PAP) ADP phosphoglycerate phosphatase (มีความเกี่ยวข้องกับกับเอนไซม์ในกลุ่ม EC 3.1.3.28) ซึ่งก่อนหน้านี้เอนไซม์ในกลุ่ม HAP ถูกจัดอยู่ในเอนไซม์กลุ่มนี้มาก่อน รวมทั้งเอนไซม์ในกลุ่ม acid phosphatase (มีความเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ในกลุ่ม EC 3.1.3.2) เอนไซม์ phytase ที่ได้จากพืชจะถูกจัดอยู่ในกลุ่มนี้ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยาอย่างจำเพาะที่อะตอมคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 โดยทั่วไปเอนไซม์ 4/6-phytases จะทำงานได้ดีที่สภาวะความเป็นกรดต่ำ (pH 4 ถึง 6) โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วง 40-60 องศาเซลเซียส (Bohn et al. 2008)

2.2.2. การจัดกลุ่มของเอนไซม์ phytase ตามคุณสมบัติทางชีวเคมี

จากที่กล่าวไว้ว่า นอกจากจัดกลุ่มของเอนไซม์ phytase โดยสถาบัน IUPAC-IUBMB ซึ่งใช้หลักเกณฑ์การแบ่งกลุ่มตามตำแหน่งเริ่มต้นของอะตอมคาร์บอนในวงแหวน inositol ที่มีการตัดพันธะฟอสโฟโมโนเอสเทอร์ (dephosphorylation) แล้วเอนไซม์ phytase ยังสามารถจัดกลุ่มตามสภาวะความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมกับการทำงานได้อีกด้วย โดยสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ (1) acidic phosphatases (2) alkaline phosphatases (3) neutral phosphatases แต่เนื่องจากในปัจจุบันงานวิจัยส่วนใหญ่มุ่งศึกษาเกี่ยวกับการทำงานของเอนไซม์ phytase ในบริเวณระบบทางเดินอาหารของสัตว์กระเพาะเดี่ยวเพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพให้สูงขึ้น ดังนั้นข้อมูลงานวิจัยส่วนมาก จึงกล่าวถึงเอนไซม์ acidic phosphatases เป็นส่วนใหญ่และข้อมูลในส่วน neutral phosphatases จึงไม่ได้นำมากล่าวถึงในที่นี้

เอนไซม์ acidic phosphatases สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยได้ 3 กลุ่ม คือ (1) histidine acid phosphatases (HAP) (2) β -propeller phytase (BPP) และ (3) purpleacid phosphatases (PAP) โดยตัวอย่างของเอนไซม์ในกลุ่ม acidic phosphatases แสดงได้ดังตารางที่ 2.3 (Mullaney et al. 2003)

ตารางที่ 2.3

ตัวอย่างของเอนไซม์ในกลุ่ม acidic phosphatases (Mullaney et al. 2003)

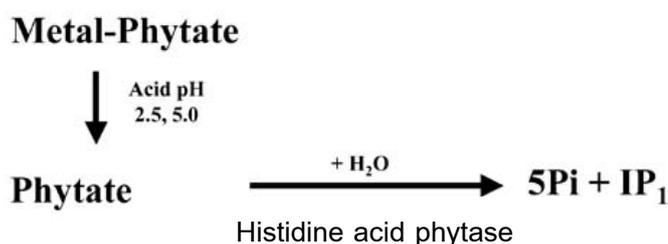
Classes of phytases			
Enzyme class	Examples	Molecular mass of monomer (kDa)	NCBI structure No.
HAP	PhyA	85 ^a	1IHP
	PhyB	68 ^a	1QFX
	AppA	45 ^b	1DKP
BPP	TS-Phy	44 ^b	1H6L
	PhyC	43 ^b	—
PAP	GmPhy	72 ^a	—

^a Glycosylated.
^b Nonglycosylated.

โดยเอนไซม์ในกลุ่ม histidine acid phytase (HAP; EC 3.1.3.8) พบได้ใน แบคทีเรีย เชื้อรา และพืช ซึ่งเอนไซม์กลุ่มนี้จะมีค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วง 4.5 ถึง 5.5 โดยเอนไซม์ phytase ในกลุ่มของ histidine acid phytase จะสามารถเข้าทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับ สับสเตรตได้หลากหลายได้แก่ phytates และ โมเลกุล phosphate esters ชนิดต่างๆ และในสภาวะที่เป็นกรดนั้นโมเลกุล phytates จะอยู่ในรูปที่เป็น free-metal phytate คือไม่สามารถจับกับแร่ธาตุโลหะใดๆ ได้ ซึ่งโครงสร้างโมเลกุลในลักษณะนี้จะเหมาะในการเข้าทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ phytase ในกลุ่ม HAP ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น myo-inositol monophosphate โดยการเข้าทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ในกลุ่ม histidine acid phytase (Oh et al. 2004) แสดงได้ดังรูปภาพที่ 2.8

ภาพที่ 2.8

ปฏิกิริยา ไฮโดรไลซิส ของเอนไซม์ในกลุ่ม histidine acid phytases



เอนไซม์ phytase ในกลุ่มของ histidine acid phytases นั้นมีบริเวณลำดับกรดอะมิโนที่เป็น consensus ได้แก่บริเวณ RHGX RXP ซึ่งจะอยู่ในส่วนของ phosphate-binding domain ซึ่งประกอบด้วย C-terminal HD โมทีฟ ซึ่งเป็นโมทีฟที่เป็นส่วน active site ของเอนไซม์ โดยบริเวณนี้จะเป็นบริเวณที่มีการจับกับหมู่ phosphate ของโมเลกุลสับสเตรต เช่น phytates (Liu et al. 1998)

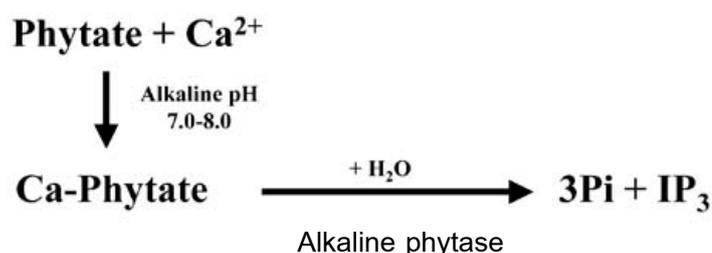
จากตัวอย่างของเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของ acidic phosphatases ในตารางที่ 2.3 จะพบว่าเอนไซม์ phytase มีคุณสมบัติแตกต่างกันไป เช่น เอนไซม์ phytase ชนิด PhyA PhyB และ PhyC จะมีค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงาน และตำแหน่งอะตอมคาร์บอนที่จับกับหมู่ฟอสเฟตในวงแหวน inositol ของโมเลกุล phytate ตำแหน่งแรกที่เอนไซม์ phytases เข้าทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแตกต่างกัน โดย PhyA และ PhyB จะมีตำแหน่งแรกของการเข้าทำปฏิกิริยาที่ตำแหน่งเดียวกันคือ ตำแหน่งที่ 3 ดังนั้นจะมีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า (myo-inositol hexaphosphate 3-

phosphohydrolase EC 3.1.3.8) แต่ PhyA และ PhyB จะมีค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานที่แตกต่างกันโดย PhyA จะมีค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงาน 2 ค่า คือ 2.5 และ 5 ในขณะที่ PhyB จะมีค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานเพียงค่าเดียวคือ 2.5 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ทั้งสองกลุ่มนี้จะต้องมีบริเวณ active site ที่มีความแตกต่างกัน (Ullah et al. 1998) โดยเอนไซม์ทั้งสองกลุ่มนี้สามารถแยกได้จากเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายชนิดเช่น *Aspergillus niger* (Piddington et al. 1993) *A. fumigatus* (Pasamontes et al. 1997) *Saccharomyces cerevisiae* (Bajwa et al. 1984) และ *Schizosaccharomyces pombe* (Elliott et al. 1986) ในทางตรงกันข้ามเอนไซม์ phytase ในกลุ่ม PhyC นั้นจะมีการเข้าทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับโมเลกุล phytate ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 6 ซึ่งจับอยู่กับหมู่ phosphate และมีค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานเพียงค่าเดียวคือ 5 ถึง 6 ดังนั้นจึงเรียกเอนไซม์ในกลุ่มนี้ว่า 6-phytase (myo-inositol hexakisphosphate 6-phosphohydrolases; 3.1.3.26) ซึ่งเอนไซม์ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะพบได้ในพืช ซึ่งเป็นแบบเดียวกับเอนไซม์ในกลุ่ม 4/6-phytases จากหัวข้อ 2.2.1.3

นอกจากเอนไซม์ในกลุ่ม acidic phosphatases ที่มีการกล่าวถึงเป็นจำนวนมากแล้ว เอนไซม์ในกลุ่ม alkaline phosphatases ก็ได้รับการกล่าวถึงพอสมควร ซึ่งเอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติเช่นกัน มีค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ที่ 7 ถึง 8 เอนไซม์ในกลุ่ม alkaline phosphatases จะมีความจำเพาะต่อสับสเตรตเพียงชนิดเดียวคือ phytate โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะสามารถทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับโมเลกุล calcium-phytate complex ได้ โดยจะให้ myo-inositol triphosphate เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ดังนั้นเอนไซม์ phytases ที่จัดอยู่ในกลุ่มของ alkaline phytases จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการช่วยในการเร่งปฏิกิริยา โดยการเข้าทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ในกลุ่ม alkaline phytases (Oh et al. 2004) แสดงได้ดังรูปภาพที่ 2.9

ภาพที่ 2.9

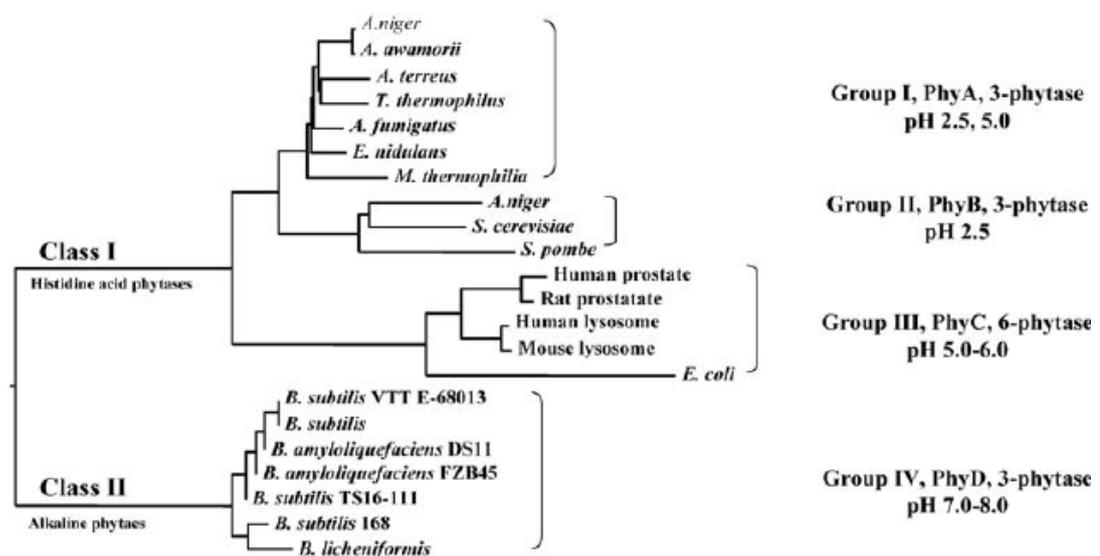
ปฏิกิริยา ไฮโดรไลซิส สับสเตรตของเอนไซม์ในกลุ่ม alkaline phytases (Oh et al. 2004)



จากข้อมูลที่กำลังมาจะเห็นว่าเอนไซม์ phytases ในกลุ่ม alkaline phytase นั้นต่างจากเอนไซม์ในกลุ่มของ HAP ในด้านของค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ความจำเพาะเจาะจงต่อสับสเตรต โครงสร้างตติยภูมิ และความจำเป็นของ Ca^{2+} ในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยตัวอย่างของเอนไซม์ในกลุ่ม alkaline phytases เช่น เอนไซม์ phytase ชนิด PhyD โดยสามารถสกัดได้จากพืชบางชนิด และ แบคทีเรียจำพวก *Bacillus* เช่น *Bacillus amyloliquefaciens* และ *B. licheniformis* (Idriss et al. 2002; Tye et al. 2002) และมีค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วง 7 ถึง 8 และได้มีการวิเคราะห์ความหลากหลายของเอนไซม์ phytases ในกลุ่มของ histidine acid phytases และ alkaline phytases โดยการทำให้ phylogenetic ผลการวิเคราะห์แสดงได้ดังภาพที่ 2.10

ภาพที่ 2.10

การทำการวิเคราะห์ความหลากหลายของเอนไซม์ phytases (Oh et al. 2004)



โดยแบ่งออกเป็นกลุ่มของ histidine acid phytases และ alkaline phytases ด้วยการทำให้ phylogenetic โดยใช้โปรแกรม MagAlign ของบริษัท Lasergene ซึ่งผลการวิเคราะห์จะแสดงให้เห็นถึงภาพรวมของการแบ่งกลุ่มที่ชัดเจนของเอนไซม์ phytase จากสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยความยาวของเส้นที่มีการเชื่อมกันระหว่างสิ่งมีชีวิตจะแปรผันตรงกับความเกี่ยวข้องกันของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด

2.2.3. แหล่งของเอนไซม์ phytase จากเชื้อจุลินทรีย์

เอนไซม์ phytases สามารถพบได้ในพืช จุลินทรีย์ และสัตว์บางชนิด โดยแหล่งของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถพบเอนไซม์ได้มากที่สุดได้แก่ จุลินทรีย์จำพวกเชื้อรา โดยมีนักวิจัยกลุ่มหนึ่งได้คัดแยกจุลินทรีย์มากกว่า 2000 ชนิดจากดินที่สามารถผลิตเอนไซม์ phytases ได้ ซึ่งพบว่ามีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต extracellular phytases เพียง 30 ไอโซเลท โดยทั้งหมดเป็นจุลินทรีย์จำพวกเชื้อรา filamentous fungi ซึ่งจัดอยู่ใน genus *Aspergillus* จำนวน 28 ไอโซเลท และอีก 2 ไอโซเลทจัดอยู่ใน *Penicillium* และ *Mucor* โดยเอนไซม์ phytase จากเชื้อราในกลุ่มของ *A. niger* จะสามารถผลิตเอนไซม์ phytase ที่เป็น extracellular enzyme ที่ทำงานได้ดีที่สุด ส่วนในไอโซเลทที่เหลือจะผลิต intracellular phytases ส่วนในจำพวกแบคทีเรียจะพบว่าจะมีการผลิตเฉพาะ intracellular enzyme เท่านั้น จะมีเพียง *Bacillus subtilis* และ *B. subtilis* var. natto ที่สามารถผลิต extracellular phytase ได้ (Dvorakova et al. 1998) นอกจากนี้นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาวิจัยชนิดอื่นๆ ที่สามารถผลิต เอนไซม์ phytases ได้นอกจาก *S. cerevisiae* ได้แก่ *Candida tropicalis* *Torulopsis candida* *Debaryomyces castellii* *Kluyveromyces fragilis* and *Schwanniomyces castellii* (Lamb-rechts et al. 1992) โดยแหล่งของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต เอนไซม์ phytases แสดงได้ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4

ตารางแหล่งของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิต เอนไซม์ phytase (Heafner et al. 2005)

Phytase source	Production strain ^a	Phytase activity (U ml ⁻¹) ^b	Reference
Bacteria			
<i>Bacillus</i> sp.		<1	Choi et al. (1999)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	2	Kim et al. (1999ab)
<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	28	Tye et al. (2002)
<i>Bacillus subtilis</i>		<1	Powar and Jagannathan (1982)
<i>Bacillus subtilis</i>		35	Tye et al. (2002)
<i>Citrobacter braakii</i>		1	Kim et al. (2003)
<i>Escherichia coli</i>		105	Miksch et al. (2002)
<i>Escherichia coli</i>		650	Golovan et al. (2000)
<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptomyces lividans</i>	950	Stahl et al. (2003)
<i>Escherichia coli</i>	<i>Pichia pastoris</i>	114	Rodriguez et al. (1999)

<i>Escherichia coli</i>	<i>Pichia pastoris</i>	117	Stahl et al. (2003)
<i>Escherichia coli</i>	<i>Pichia pastoris</i>	4946	Chen et al. (2004)
<i>Klebsiella</i> sp.		<1	Shah and Parekh (1990)
<i>Klebsiella</i> sp.		2	Hwang (1999)
<i>Lactobacillus amylovorus</i>		146	Sreeramulu et al. (1996)
<i>Lactobacillus fructivorans</i>		<1	De Angelis et al. (2003)
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>		<1	De Angelis et al. (2003)
<i>Megasphaera elsdenii</i>		<1	Yanke et al. (1998)
<i>Mitsuokella jalaludinii</i>		13	Lan et al. (2002)
<i>Prevotella ruminicola</i>		<1	Yanke et al. (1998)
<i>Pseudomonas mendocina</i>		<1	Richardson and Hadobas (1997)
<i>Pseudomonas putida</i>		<1	Richardson and Hadobas (1997)
<i>Selenomonas ruminatum</i>		<1	Yanke et al. (1998)

<i>Weissella confuse</i>		<1	De Angelis et al. (<u>2003</u>)
Fungi			
<i>Aspergillus</i> sp.		17	Kim et al. (<u>1999ab</u>)
<i>Aspergillus awamori</i>		200	Martin et al. (<u>2003</u>)
<i>Aspergillus ficuum</i>		15 ^c	Bogar et al. (<u>2003a</u>)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Pichia pastoris</i>	55	Rodriguez et al. (<u>2000ab</u>)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus awamori</i>	62	Martin et al. (<u>2003</u>)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Hansenula polymorpha</i>		Mayer et al. (<u>1999</u>)
<i>Aspergillus niger</i>		7	Hong et al. (<u>2001</u>)
<i>Aspergillus niger</i>		8	van Hartingsveldt et al. (<u>1993</u>)
<i>Aspergillus niger</i>		108 ^c	Mandviwala and Khire (<u>2000</u>)
<i>Aspergillus niger</i>		1008 ^c	Krishna and Nokes (<u>2001</u>)

<i>Aspergillus niger</i>	<i>Escherichia coli</i>		Phillippy and Mullaney (1997)
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	Han et al. (1999)
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Pichia pastoris</i>	39	Xiong et al. (2004)
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Pichia pastoris</i>	64	Han and Lei (1999)
<i>Aspergillus oryzae</i>		<1	Shimizu (1993)
<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Hansenula polymorpha</i>		Mayer et al. (1999)
<i>Mucor hiemalis</i>		12 ^c	Bogar et al. (2003b)
<i>Mucor racemosus</i>		26 ^c	Bogar et al. (2003b)
<i>Rhizopus microsporus</i>		1 ^c	Bogar et al. (2003b)
<i>Rhizopus oligosporus</i>		5 ^c	Bogar et al. (2003b)
<i>Rhizopus oligosporus</i>		14 ^d	Sabu et al. (2002)
<i>Rhizopus oryzae</i>		6 ^c	Bogar et al. (2003b)
<i>Rhizopus thailandensis</i>		3 ^c	Bogar et al.

			(<u>2003b</u>)
Consensus ^d	<i>Hansenula polymorpha</i>		Mayer et al. (<u>1999</u>)
Yeasts			
<i>Arxula adininivorans</i>		3	Sano et al. (<u>1999</u>)
<i>Fellomyces fuzhouensis</i>		<1	Sano et al. (<u>1999</u>)
<i>Pichia anomala</i>		3	Vohra and Satyanarayana (<u>2004</u>)
<i>Pichia farinose</i>		<1	Sano et al. (<u>1999</u>)
<i>Rhodotorula gracilis</i>		<1	Bindu et al. (<u>1998</u>)
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>		<1	Lambrechts et al. (<u>1993</u>)
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>		<1	Sano et al. (<u>1999</u>)
<i>Sporidiobolus johnsonii</i>		<1	Sano et al. (<u>1999</u>)
<i>Sporobolimyces</i> sp.		<1	Sano et al. (<u>1999</u>)
<i>Sterigmatosporus polymorphum</i>		<1	Sano et al. (<u>1999</u>)

^aIn cases where no production strain is listed phytase source and production system are identical

^bOne Unit is the amount of phytase required to liberate 1 μmol of inorganic phosphate per minute from phytate

^cCases where solid state cultivations were performed and hence data are expressed as U g^{-1} and $\text{U kg}^{-1} \text{h}^{-1}$ respectively

^dConsensus phytase

ในการผลิต extracellular phytase จากเชื้อราจะต้องมีการจำกัดความเข้มข้นของฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเหมาะสม เนื่องจากความเข้มข้นของฟอสเฟตที่มากเกินไปจะไปยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ phytases (Shieh and Ware 1968) ซึ่งในการควบคุมสภาวะในการผลิตเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *Aspergillus niger* var. *ficuum* NRRL 3135 (ต่อมาเรียกว่า *A. niger* NRRL 3135) ได้ถูกรายงานเป็นครั้งแรกโดย Shieh และคณะ ในปี 1969 ต่อมาจึงได้มีการปรับปรุงสภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ phytases (Han and Gallagher 1987; Kujawski and Zyla 1992) นอกจากนี้ยังพบว่า *A. niger* spp. จะมีความเกี่ยวข้องกันระหว่างการผลิต citric acid ด้วยวิธี solid surface และการผลิต intracellular phytases กับ acid phosphatase จากการผลิต extracellular phytases ในเชื้อจุลินทรีย์จำพวกเชื้อราที่ได้กล่าวมานั้นจะมีความแตกต่างจากการผลิต extracellular phytases จากเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ซึ่งจะมีการเหนี่ยวนำให้ผลิต extracellular phytases ด้วย phytates ซึ่งจะสามารถทำงานได้เมื่อมีไอออนของ Ca^{2+} (Powar et al. 1982) เช่นเดียวกับ เอนไซม์ phytases ที่ผลิตได้จาก *Klebsiella terrigena* ที่สามารถผลิตได้ในอาหารที่มี phytates ภายใต้สภาวะที่มีการจำกัดปริมาณคาร์บอนให้มีความเหมาะสม ในส่วนของเอนไซม์ phytases ที่สามารถผลิตได้จาก *E. coli* จะเป็น intracellular phytases ซึ่งในการผลิตของเซลล์จะมีอัตราการผลิตสูงขึ้นในระยะ stationary phase ของการเจริญเติบโตของเซลล์ ภายใต้สภาวะ anaerobic (Dvorakova et al. 1998)

2.2.4. การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์ phytases ในทางอุตสาหกรรม

จากคุณสมบัติของเอนไซม์ phytases ที่สามารถย่อย phytates ได้ และได้มีการนำเอนไซม์ phytases มาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ โดยได้มีการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ phytases มากมาย ซึ่งมุ่งความสนใจไปที่คุณลักษณะต่างๆ ของเอนไซม์ phytases ที่สามารถผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์หลากหลายชนิดโดยเฉพาะ เชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในกลุ่มเชื้อราที่เป็นเส้นใย เช่น *A. ficuum* (Gibson et al. 1987) *A. fumigatus* (Pasamontes et al. 1997) และ *Rhizopus oligosporus* (Liu et al. 1998) เป็นต้น โดยเอนไซม์ phytase ที่ผลิตได้จากเชื้อรา *A. niger* var. *ficuum* NRRL 3135 ได้มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ออกทางมาในทางการค้าโดยใช้ชื่อว่า Natuphos และต่อมาได้มีผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์ phytases ที่ผลิตออกมาในทางการค้าซึ่งผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ อีกหลายชนิด โดยจนถึงขณะนี้ผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์ phytases ในทางการค้าที่ใช้เดิมในอาหารสัตว์ส่วนใหญ่มาจากผู้ผลิตในสหภาพยุโรป ซึ่งผลิตภัณฑ์นั้นจะเป็นลักษณะของรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยใช้เชื้อราเป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิต (Haefner et al. 2005) ดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5

ผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์ phytases ในทางการค้าที่มีลิขสิทธิ์อยู่ใน
ในสหภาพยุโรป (Haefner et al 2005)

Company	Trademark	Phytase source	Production strain
BASF	Natuphos	<i>Aspergillus niger</i> var <i>ficuum</i> .	<i>Aspergillus niger</i>
AB Enzymes (former RÖhm)	Finase	<i>Aspergillus awamori</i>	<i>Trichoderma reesei</i>
Novozymes	Bio-Feed Phytase	<i>Peniophora lycii</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>

ในกระบวนการผลิตอาหารสัตว์โดยมีการเติมเอนไซม์ phytase ลงไปด้วยนั้นจะมีการผสมอาหารและเอนไซม์ก่อนจากนั้นจึงนำไปอบด้วยความร้อนก่อนนำเข้าสู่เครื่องอัดเม็ดเพื่อทำการอัดเป็นเม็ดอาหารสัตว์ออกมาโดยอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการนี้จะอยู่ในช่วง 60-95°C

โดยในทางปฏิบัตินั้นในการผลิตทางการค้าโดยทั่วไปเอนไซม์ phytase จะถูกปกป้องจากอุณหภูมิสูงๆ ในกระบวนการผลิตอาหารสัตว์ด้วยการผสมเอนไซม์กับตัว stabilizers ก่อนเข้าสู่กระบวนการอัดเม็ด ซึ่งด้วยเทคนิคนี้เอนไซม์จึงไม่ได้รับผลกระทบจากกระบวนการอัดเม็ดมากเกินไป ดังนั้นเอนไซม์ที่เติมลงในอาหารสัตว์จำเป็นจะต้องมีคุณลักษณะที่ดี ได้แก่ มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่สูง มีความคงทนในระหว่างการเก็บรักษาและมีความทนต่อความร้อนได้สูงด้วย จากงานวิจัยต่างๆ พบว่ามีงานวิจัยหนึ่งได้ผลิตเอนไซม์ phytase จาก *A. fumigatus* ที่มีคุณลักษณะในการทนต่อความร้อนได้สูงอย่างมากโดยเอนไซม์ phytase นั้นมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์คงอยู่ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ หลังจากที่มีการผ่านความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (Pasamontes et al. 1997) แต่ต่อมาคณะวิจัยของ Ullah ไม่สามารถยืนยันผลการทดลองนี้ได้ (Heafner et al. 2005) โดยส่วนใหญ่เอนไซม์ phytases ที่สกัดได้จากเชื้อราอื่นๆ รวมทั้งจาก *A. niger* (รวมถึง *natuphos*) และแบคทีเรีย จะมีความสามารถในการทนร้อนได้ต่ำกว่า 70 องศาเซลเซียส และมีค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานต่ำด้วยเช่นกัน แสดงได้ดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6

คุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ phytases จาก
สิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ (Oh et al. 2004)

Source	Origin	Molecular Mass (kDa)	Optimum		Heat inactivation (°C)
			Temperature (°C)	pH	
Fungi	<i>Aspergillus niger</i> (PhyA)	85	58	2.5-5.0	60
	<i>A. niger</i> (PhyB)	85-100	60	2.5	60
	<i>A. fumigatus</i>	85-100	58	5.0	60
	<i>A. terreus</i>	214	70	4.5	60
	<i>A. oryzae</i>	120-140	50	5.5	60
	<i>A. nidulans</i>	77.8	55	5.5	60
Yeast	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	45	4.6	40

	<i>Schwanniomyces castellii</i>	490	77	4.4	65
Bacteria	<i>Bacillus subtilis</i>	37	60	7.5	-
	<i>B. subtilis (natto)</i>	38	60	6.0–6.5	-
	<i>B. subtilis</i>	42	55	7.0–7.5	60
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	44	70	7.0–7.5	80
	<i>Escherichia coli</i>	42	55	4.5	60
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	40	55	5.0–6.0	50
	<i>K. terrigena</i>	40	58	5.0	50
	<i>Pseudomonas sp.</i>	-	-	5.0	-
Plant	Canola seed	-	50	5.2	-
	<i>Cucurbita maxima</i>	66.5	48	4.8	-
	<i>Lilium longiflorum</i>	36 88	55–60	8.0	-
	Legume seeds	-	-	8.0	-
	Maize	76	55	4.8	-
	Mung beans	158	57	7.5	-
	Soybean seeds	119	60	4.5–4.8	-
	Spelt	60	55	6.0	-
	<i>Typha latifolia L.</i>	-	-	8.0	-
	Wheat brane	-	47	5.0	-

นอกจากคุณลักษณะที่เอนไซม์ต้องทนต่ออุณหภูมิได้สูงแล้ว อีกลักษณะหนึ่งที่เอนไซม์ที่ดีควรมี คือ สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่อยู่ในระบบย่อยอาหารของสัตว์ซึ่งมี ค่า pH อยู่ที่ 3.5 ดังนั้น เอนไซม์ควรจะทำงานได้ดีในสภาวะที่มีค่า pH ตั้งแต่ 2 ถึง 5 ส่วนลักษณะอื่นๆ ที่เอนไซม์ phytase ที่จะผสมในอาหารสัตว์ควรมีคือ ความสามารถในการทนทานต่อเอนไซม์ในกลุ่ม proteolytic enzymes ซึ่งพบอยู่ในระบบย่อยอาหารของสัตว์ และควรมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงในสภาวะอุณหภูมิ และ pH ของสัตว์ร่างกายสัตว์ โดยเอนไซม์ phytase จากเชื้อราและแบคทีเรียชนิดต่างๆ นั้นก็จะมีคุณสมบัติในการต้านทานต่อ proteolytic enzymes ที่แตกต่างกัน

ออกไป (Kerovuo et al. 1998) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเอนไซม์ที่มีความสมบูรณ์แบบเหมาะสมในการนำไปใช้ในกระบวนการผลิตอาหารสัตว์นั้นต้องมีคุณลักษณะที่สำคัญ 3 ข้อคือ

1. มีประสิทธิภาพในการปลดปล่อยหมู่ phosphates ออกจากโมเลกุลของ phytates ในระบบย่อยอาหารของสัตว์สามารถทำงานได้ดีในสภาวะของระบบทางเดินอาหารของสัตว์
2. มีความทนต่อความร้อนในกระบวนการผลิตอาหารสัตว์และระหว่างการเก็บรักษา
3. มีราคาถูก

ซึ่งในคุณสมบัติทั้ง 3 ข้อที่กล่าวมานั้นข้อที่สำคัญมากที่สุดคือข้อที่ 1 (Lei et.al 2001) โดยสามารถพิจารณาได้จากคุณลักษณะต่างๆ ของเอนไซม์ดังต่อไปนี้ คือ

1. คุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยา (Catalytic efficiency)
2. ความจำเพาะในการทำปฏิกิริยากับสับสเตรต(สับสเตรต specificity)
3. ค่าอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมในการทำงาน
4. ค่าความต้านทานต่อเอนไซม์จำพวก proteolysis ในระบบย่อยอาหารของสัตว์ (Resistance to proteolysis)

และถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะมีการค้นพบเอนไซม์ phytases ที่มีคุณสมบัติที่หลากหลาย แต่ก็ยังไม่มีเอนไซม์ phytases จากแหล่งผลิตแหล่งใดที่มีคุณลักษณะของเอนไซม์ที่สมบูรณ์แบบที่สุดดังนั้นจึงมีวิธี 2 วิธีที่ใช้ในการพัฒนาประสิทธิภาพของเอนไซม์ phytases ให้มีความสมบูรณ์แบบที่สุดคือ (Lei et.al 2001)

1. การคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ หรือพืชชนิดอื่นๆ ที่สามารถผลิตเอนไซม์ phytases ที่มีความสมบูรณ์แบบได้
2. การนำพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการปรับปรุงลักษณะทางพันธุกรรมของยีนที่ผลิตเอนไซม์ phytases ให้สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีความสมบูรณ์แบบได้

โดยทางห้องปฏิบัติการเอนไซม์ในศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ได้ทำการคัดเลือกหาเชื้อราที่สร้าง phytase จาก BIOTEC Culture Collection (BCC) เพื่อหาเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติทนร้อนและสามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด โดยพบว่าเชื้อราที่มีศักยภาพ 2 สายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ phytases ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวซึ่งนับว่าเป็นเอนไซม์ที่สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมอาหารสัตว์ได้เป็นอย่างดี ได้แก่ *A. japonicus* TR86 และ *A. niger* TR170 โดยได้แยกยีนที่มีขนาด 1404 คู่เบส ที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ phytase และนำไปแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้าน *Pichia pastoris* ซึ่งยีสต์เจ้าบ้านสามารถผลิต recombinant phytases ทั้ง 2 ชนิดได้แก่ r-PhyA86 และ r-PhyA170 ออกนอกเซลล์ โดยเกิดการ glycosylation ของโปรตีนด้วย และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตได้มีค่าอยู่ที่ 140 U/ml และ 100 U/ml ตามลำดับ จากการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์พบว่า recombinant phytases ทั้ง 2 มีความสามารถในการจับกับสับสเตรต phytic acid อย่างจำเพาะ และทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในสภาวะ pH 5.5 จากการศึกษาในงานวิจัยนี้พบว่า การเกิด glycosylation มีผลต่อความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูงของเอนไซม์ โดยพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่อยู่ในรูป deglycosylated protein จะลดลงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ หลังจากให้นำเอนไซม์ไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นอกจากนี้ recombinant phytases ยังทนได้ในสภาวะ pH ที่กว้าง ตั้งแต่ 2 ถึง 8 จากการทำ *in vitro* digestibility test พบว่า recombinant phytases r-PhyA86 และ r-PhyA170 มีประสิทธิภาพในการปลดปล่อยฟอสฟอรัสได้ดีเทียบเท่ากับเอนไซม์ phytases ทางการค้า ดังนั้น recombinant phytases ที่ได้จากงานวิจัยนี้จึงมีศักยภาพที่จะใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งของเอนไซม์ phytases สำหรับอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ โดยคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ phytases จากเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์แสดงได้ดังตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7

คุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ phytases จากเชื้อรา *Aspergillus japonicus* TR86 และ *Aspergillus niger* TR170 (Promdonkoy et al. 2008)

Biochemical Properties	<i>Aspergillus niger</i> TR170 phytase	<i>Aspergillus japonicus</i> TR86 phytase
Temperature optimum (°C)	50	50
pH optimum	3-5.5	3-5.5
Molecular weight	66 kDa	66 kDa
Retention of heating at 100°C for 10 min	More than 50% activity	More than 50% activity
Broad pH stability	2.5-7	2.0-8.0 (with higher enzyme activity)

แต่อย่างไรก็ตาม ปัญหาหนึ่งที่พบคือเอนไซม์ phytases ที่ได้จากเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์นี้ ยังมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ต่ำในการทำปฏิกิริยาต่อสับสเตรตชนิดอื่นๆ เช่น สารประกอบของน้ำตาลที่มีหมู่ phosphate เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นในงานวิจัยจึงต้องการปรับปรุงกิจกรรมของเอนไซม์ จากเชื้อรา *Aspergillus niger* TR170 ซึ่งจากการศึกษาข้อมูลงานวิจัยที่ผ่านมาได้พบว่า มีงานวิจัยหนึ่งได้ทำ site-directed mutagenesis เอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. fumigatus* เพื่อเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Glutamine ตำแหน่งที่ 27 ซึ่งเป็นกรดอะมิโนในบริเวณ active site ของเอนไซม์ phytase เป็น Leucine โดยผลจากการเปลี่ยนแปลงพบว่าเอนไซม์ phytase ที่มีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 27 จาก Glutamine เป็น Leucine มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับ wild-type แต่ก็ยังคงรักษาคุณสมบัติของความหลากหลายต่อสับสเตรตที่ดีไว้อยู่ จากผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 27 น่าจะมีความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ phytase อย่างมาก เช่น คุณสมบัติของกิจกรรมของเอนไซม์ ความจำเพาะต่อค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ และความหลากหลายต่อสับสเตรต (Tomschy et al. 2000)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงนำลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. fumigatus* phytase มาเปรียบเทียบกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A.*

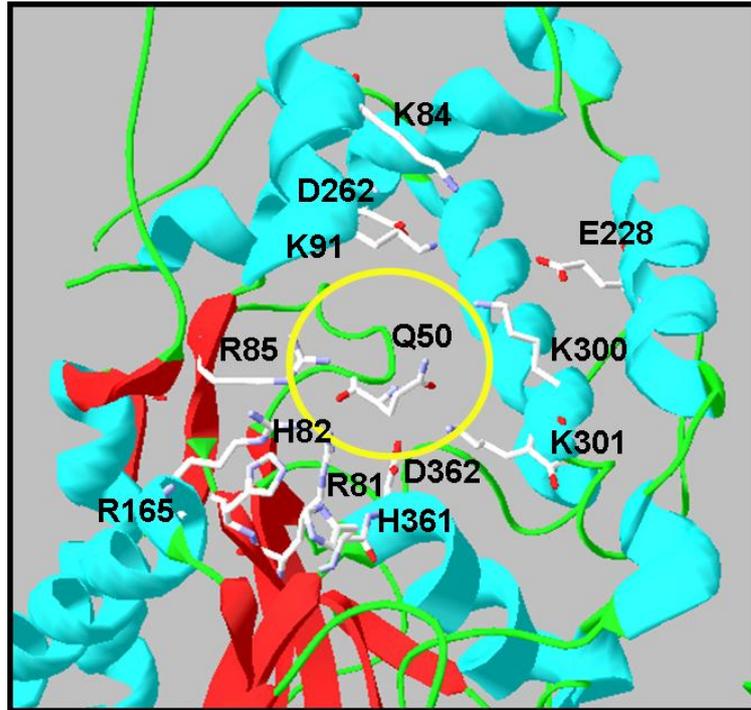
niger NRRL 3135 (มีการศึกษาโครงสร้างสามมิติแล้ว) *A. niger* TR170 และ *A. japonicus* TR86 ซึ่งคัดแยกได้จากประเทศไทยโดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL 2.0.8 จากเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> เพื่อเปรียบเทียบว่าในเอนไซม์ phytase ที่เราต้องการศึกษาสายพันธุ์ TR170 นั้นมีกรดอะมิโน Glutamine ในตำแหน่งที่ 50 เหมือนกับ *A. fumigatus* หรือไม่ จากนั้นจึงจะทำ site-directed mutagenesis เพื่อเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในตำแหน่ง Glutamine ที่ 50 เป็นกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ และศึกษาคุณสมบัติด้านต่างๆ ของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 เพื่อการปรับปรุงอัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ phytases ในการทำปฏิกิริยากับสับสเตรตให้สูงขึ้นและสามารถนำเอนไซม์ phytases ที่ได้รับการปรับปรุงแล้วไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

2.2.5. โครงสร้างแบบจำลองของเอนไซม์ phytase

จากการค้นหาข้อมูลโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytase พบว่าได้มีการศึกษาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytase อย่างหลากหลาย โดยในจำนวนนั้นพบว่าเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* NRRL 3135 ได้มีการศึกษาโครงสร้างสามมิติแล้ว ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้นำเอาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* NRRL 3135 มาเป็นต้นแบบในการจำลองโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytase ที่ได้จากเชื้อรา *A. niger* TR170 เนื่องจากมีลำดับกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึงกันมาก โดยใช้โปรแกรม Swiss-Model ซึ่งเป็นโปรแกรมที่ให้บริการจากเว็บไซต์ <http://www.expasy.org/spdbv/> ทำให้ได้โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytase จากเชื้อรา *A. niger* TR170 หรือ PhyA170 ซึ่งนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป โดยภาพจำลองโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytase TR170 แสดงได้ดังภาพที่ 2.11

ภาพที่ 2.11

แบบจำลองโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ phytase
จากเชื้อรา *A. niger* TR170 หรือ PhyA170



โดยกรดอะมิโนที่อยู่ในวงกลมคือ กรดอะมิโน Q50 ซึ่งจะอยู่ใกล้ชิดกับกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณเร่งปฏิกิริยา (catalytic site) ได้แก่ R81 H82 R85 R165 H361 และ D362 (Kostrewa et al. 1997) รวมทั้งอยู่ใกล้กับบริเวณจับกับสารตั้งต้น (substrate binding site) ได้แก่ K91 K94 E228 D262 K300 และ K301อีกด้วย (Mullaney et al. 2002)