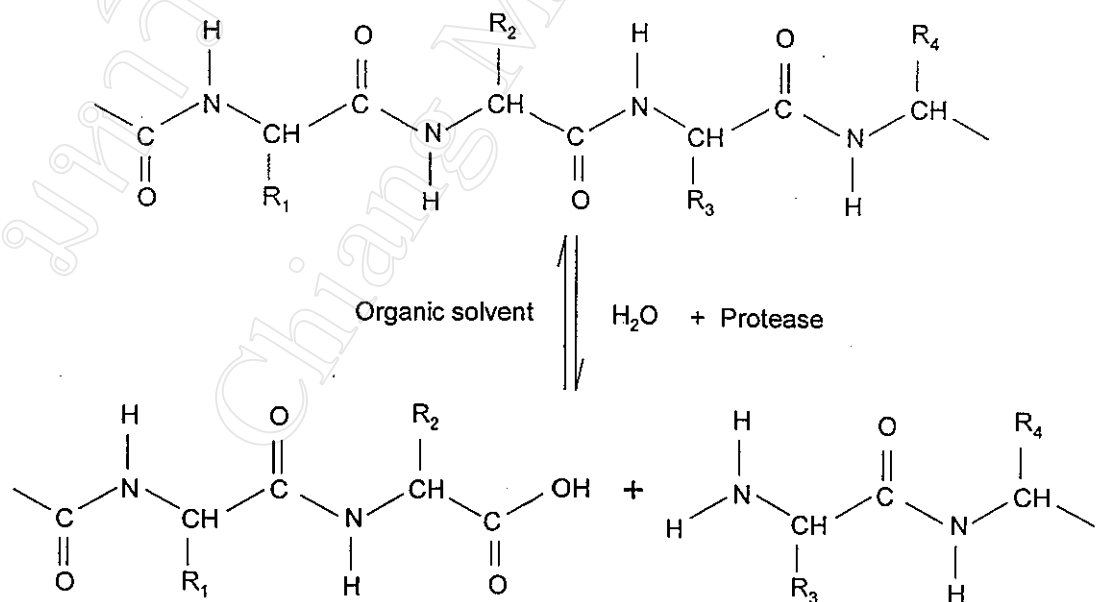


บทที่ 1

บทนำ

1.1 เอนไซม์โปรติเอสและกรรมวิธีการผลิตทางอุตสาหกรรม

เอนไซม์โปรติเอส (Protease) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ในสารละลายน้ำและเร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะเปปไทด์ในสารละลายของตัวทำละลายอินทรีย์ ดังรูป 1.1 เอนไซม์ชนิดนี้พบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โปรติเอสมีอยู่มากมายหลายชนิด มีลักษณะที่แตกต่างกันทางด้านความจำเพาะต่อสับสเตรท กลไกในการเร่งปฏิกิริยา ลำดับกรดอะมิโนในโมเลกุล น้ำหนักโมเลกุล ช่วงพีเอช และอุณหภูมิที่ใช้ในการทำงาน ดังนั้นจึงมีการจัดแบ่งกลุ่มของโปรติเอสตามเกณฑ์ต่างๆ เช่น จัดแบ่งตามแหล่งกำเนิด คือ จากพืช สัตว์ หรือ ได้จากการผลิตจากจุลินทรีย์ หรือ แบ่งตามความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาที่ช่วงพีเอชที่เป็นกรด กลาง หรือ เบส แต่การจัดแบ่งกลุ่มที่เป็นที่ยอมรับเป็นการจำแนกตามกลไกการทำงานของเอนไซม์เนื่องจากบริเวณที่เป็น active site แบ่งออกได้เป็น 4 ชนิด^(1,2) คือ



รูป 1.1 ปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในสารละลายน้ำและปฏิกิริยาการสร้างเปปไทด์ในสารละลายอินทรีย์โดยเอนไซม์โปรติเอส

ก. ไทออล โปรติเอส (Thiol protease) E.C. 3.4.22 หรือ ซิสเตอินโปรติเอส (cysteine protease) เป็นเอนไซม์โปรติเอสที่มี กรดอะมิโน ซิสเตอิน อยู่ที่ active site ซึ่งมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โปรติเอสชนิดนี้ เช่น papain, bromelain และ ficin แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้เช่น *Clostridium histolyticum* ซึ่งจะให้ clostripain ที่มีคุณสมบัติคล้ายปาเปน⁽³⁾ และ *Streptococcus faecalis* ให้เอนไซม์ส่วนใหญ่อยู่ในรูปที่ยังไม่ทำงานซึ่งจะเกิด autocatalytically cleaved เพื่อปล่อยเอนไซม์ โปรติเอส เอนไซม์กลุ่มนี้จะถูกยับยั้งด้วยสารที่เป็น oxidizing agent และ โลหะหนัก⁽⁴⁾

ข. เมทัลโลโปรติเอส (Metalloprotease) E.C. 3.4.24 เอนไซม์ในกลุ่มนี้ต้องการไอออนของโลหะสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ โลหะที่พบ เช่น สังกะสี แมกนีเซียม และ โคบอลต์ เอนไซม์ที่ศึกษากันมากเป็นเอนไซม์ที่ได้จากการผลิตของแบคทีเรีย และ เชื้อรา เช่น *Bacillus subtilis*, *B. thermoproteolyticus*, *B. megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptomyces griseus*, *Aspergillus oryzae* และ *Aeromonas proteolyticus* พบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดให้เอนไซม์ที่เป็นทั้ง neutral protease และ alkaline protease เอนไซม์กลุ่มนี้ถูกยับยั้งด้วยสารที่เป็น metalchelating agent เช่น EDTA และ O-phenanthroline⁽⁴⁾ ตัวอย่างการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมโดยบริษัท Holland Sweetener ใช้ Thermolysin ที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย *Bacillus thermoproteolyticus* นำมาใช้ในกระบวนการผลิต α -Aspartame ซึ่งเป็นสารให้ความหวานที่มีแคลอรีต่ำ จากสารตั้งต้น phenylalanine methylester กับ aspartic acid ทำงานที่พีเอช 7-7.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส⁽⁵⁾

ค. เซอรีน โปรติเอส (Serine protease) E.C. 3.4.21 เป็นเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโน histidine และ serine อยู่ที่ active site ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ trypsin, chymotrypsin หรือเรียกว่าเป็น อัลคาไลน์โปรติเอส (alkaline protease) เพราะทำงานภายใต้ภาวะที่เป็นเบสมีลักษณะการไฮโดรไลสโปรตีนเป็นแบบตัดพันธะในสาย (endopeptidase) และจุลินทรีย์ที่ผลิตพบได้ทั้งใน แบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อรา โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus spp.* เป็นส่วนใหญ่ได้แก่ *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus subtilis* ถูกยับยั้งได้ด้วย DIFP (diisopropyl fluorophosphate) และ PMSF (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride)⁽⁴⁾ อัลคาไลน์โปรติเอสสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม โดยอาศัยความแตกต่างของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบรวมทั้งคุณสมบัติทางภูมิคุ้มกันวิทยาและจุลนาศาสตร์⁽⁶⁾ ดังนี้

1) Subtilisin Carlsberg

ผลิตได้จาก *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus pumilus* เอนไซม์นี้มีลักษณะเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวประกอบด้วยกรดอะมิโน 274 ตัว ไม่มีกรดอะมิโนซิสเตอีน ดังนั้นจึงไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ เป็นเอนไซม์ที่ไม่มีความจำเพาะต่อสับสเตรทชนิดใด (broad specificity) สามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ได้เกือบทุกชนิดและสามารถย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ได้บางส่วน ตัวอย่างการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมใน บริษัท Hoffman La-Roche ใช้ Subtilisin Carlsberg ที่ได้จาก *Bacillus* sp. ในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของ (2-methylpropyl) butanedioic acid diethylether ให้ได้เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือ (2-methylpropyl) butanedioic acid 4-ethyl ester ซึ่งมีความสำคัญในการนำไปใช้รักษาโรค Osteoarthritis โดยเอนไซม์ทำงานในสภาวะที่พีเอช 8.5 อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส⁽⁵⁾

2) Subtilisin BPN' (Bacterial Protease Nagarse) หรือ Subtilisin NOVO

ผลิตได้จากแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* เอนไซม์ชนิดนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 275 ตัว การเรียงตัวคล้ายกับ Subtilisin Carlsberg ถึง 85 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ มีอะลานีนอยู่ปลายด้านอะมิโนและกลูตามีนอยู่ปลายด้านคาร์บอกซิล แคลเซียมออกไซด์ช่วยให้เอนไซม์เสถียรมากขึ้นโดยเฉพาะที่อุณหภูมิสูง หรือที่พีเอชสูงหรือต่ำมากๆ เอนไซม์นี้มีความจำเพาะต่อการไฮโดรไลสพันธะเปปไทด์และเอสเทอร์แตกต่างจาก Subtilisin Carlsberg⁽⁷⁾

ง. แอซิด โปรติเอส (Acid protease) เป็นเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโน Aspartic acid หรือ glutamic acid อยู่ที่บริเวณ active site ได้แก่เอนไซม์ pepsin และ rennin ในสัตว์ ทำงานได้ดีในพีเอชที่เป็นกรด จุลชีพที่ผลิต acid protease ส่วนใหญ่เป็นพวกเชื้อรา กลุ่มที่ผลิต Rennin-like acid protease ที่ใช้ในเชิงการค้าได้แก่ *Mucor pusillus*, *Mucor miehei* และ *Endothia parasitica* ใช้ในอุตสาหกรรมทำเนยแข็ง สำหรับเชื้อรากลุ่มที่ผลิต Pepsin-like acid protease ได้แก่ *Aspergillus oryzae* และ *Aspergillus soitoi* ใช้ในการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองในอุตสาหกรรมทำซีอิ๊ว เป็นชนิด endopeptidase⁽⁸⁾

คุณสมบัติของเอนไซม์ทั้ง 4 กลุ่มที่จัดแบ่งตามกรดอะมิโนที่บริเวณ active site สารที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และตัวอย่างของเอนไซม์ในกลุ่มต่างๆ แสดงในตาราง 1.1

ตาราง 1.1 แสดงการจัดกลุ่มของเอนไซม์โปรติเอส ⁽¹⁾

Family	Inhibitors	Active sites	Examples
Serine	Phenylmethylsulfonyl fluoride, Diisopropylfluorophosphate	Asp, Ser, His	trypsin, chymo- trypsin, subtilisin
Thiol	<i>p</i> -Chloromercuribenzoate, Iodoacetamide, <i>N</i> -ethyl maleimide	Cys, His, Asp	papain, actidin
Metal	EDTA, <i>o</i> -phenanthroline, 8- hydroxyquinoline	(Zn), Glu, Tyr	carboxypeptidase, thermolysin, collagenase
Acid	Pepstatin, diazoacetyl norleu- cine methyl ester	Asp	chymosin, pepsin, rennin

การใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่ได้มาจากการผลิตจากกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ เอนไซม์ที่มีการใช้มากที่สุด เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยโปรตีน ที่ได้จากแบคทีเรีย มีปริมาณ 59 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยคาร์โบไฮเดรต มีปริมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นกลุ่มเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยโปรตีนนอกจากได้จากจุลินทรีย์แล้ว ยังมีบางส่วนที่ได้มาจากสัตว์ ได้แก่ rennin, pepsin, pancreatic protease และจากพืชคือ papain, bromelain และ ficin ⁽²⁾

1.1.1 โปรติเอสจากพืช

Papain (E.C. 3.4.22.2) ผลิตได้มาจากยางมะละกอ (*Carica papaya*) โดยปาเปนดิบ (raw papain) จะอยู่ในรูปที่เป็นเม็ดกรานูล เมื่อทำให้บริสุทธิ์จะอยู่ในรูปที่เป็นผง ใช้ในอุตสาหกรรมการทำเบียร์ การทำ tenderizing meat บริษัท Rohm GmbH (W.Germany) ทำการผลิตปาเปนใช้ชื่อทางการค้าว่า Coralase เป็นปาเปนที่อยู่ในรูปผง หรือของเหลว ทำงานได้ดีที่พีเอช 3-9 อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส มีแอกติวิตี 800-8000 Hb Units. ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม และบริษัท A.B.M.C. Food division (UK) ผลิตปาเปนที่มีชื่อทางการค้าว่า Scintillase อยู่ในรูปที่เป็นผง ทำงานได้ดีที่พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 55-70 องศาเซลเซียส มีแอกติวิตี 30-100 WG ⁽⁸⁾

Bromelain (E.C. 3.4.22.4) ในอุตสาหกรรมเตรียมได้จากส่วนที่เป็นผล และก้านของ สับปะรด (*Bromus spp.*) ในการทำงานให้ความจำเพาะ เหมือนปาเปน แต่ความเสถียรน้อยกว่า บริษัท Miles Laboratories Inc. (USA) ผลิต bromelain จากสับปะรดให้ชื่อทางการค้าว่า Takamine bromelain อยู่ในรูปที่เป็นผง ทำงานได้ดี ที่พีเอช 4-9 อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส มี แอคติวิตี 1100 BTU/g ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม อาหารสัตว์ และทางเภสัชวิทยา⁽⁸⁾

Ficin (E.C. 3.4.22.3) การเตรียมในอุตสาหกรรมได้มาจากน้ำหล่อเลี้ยงของต้นมะเดื่อ (*Ficus carica*) มีคุณสมบัติในการย่อยสลายพันธะของ aromatic amino acid ทำงานได้ดีที่พีเอช 5-8 อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และคุณสมบัติความไวต่อสารยับยั้งเหมือนปาเปน ในบางประเทศ ใช้ ficin ในการแข็งตัวของนม⁽⁸⁾

1.1.2 โปรติเอสจากสัตว์

Pancreatic proteases ทางการค้าเป็นเอนไซม์ที่ผสมระหว่าง trypsin (E.C. 3.4.21.4) และ chymotrypsin (E.C. 3.4.21.2) ได้มาจากตับอ่อนของวัวควาย แกะ และ หมู และยังมีเอนไซม์ peptidase, amylase และ lipase รวมอยู่ด้วย สำหรับ pancreatin ได้มาจากการนำตับอ่อนมาทำให้แห้งโดยวิธีดึงน้ำออก (dehydration) ได้เป็นสารตั้งต้นที่ยังทำงานไม่ได้ของ protease, trypsinogen และ chymotrypsinogen หลังจากนั้นเอนไซม์ที่ inactive ดังกล่าวจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่ทำงานได้โดย enterokinase หรือ acidic protease จาก เชื้อรา ซึ่งทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 7-8 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เอนไซม์ดังกล่าวใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร การทำ protein hydrolysate⁽⁹⁾ บริษัท Novo Industrie A/S (Denmark) ผลิต Animal protease pancreatic extract ที่ใช้ชื่อทางการค้าว่า PEM ทำงานในสภาวะที่พีเอช 7-8 อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และใช้ในการไฮโดรไลซ์ทั่วไป แต่เอนไซม์ที่ได้จาก Animal pancreatic Bovine ใช้ชื่อทางการค้าว่า Crystalline Trypsin Novo อยู่ในรูปที่เป็น freeze dried ทำงานได้ดีที่พีเอช 7.5-8.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มี แอคติวิตี 3000 K ใช้ในงานวิเคราะห์และการเพาะเลี้ยงเซลล์ทางการแพทย์⁽⁸⁾ นอกจากนั้นบริษัท Novo Nordisk ยังสามารถใช้ trypsin ที่ได้จากตับอ่อนของหมูในการย่อยสลาย Pro-insulin ที่บริเวณ Carboxylic acid amide ให้ได้เป็น human insulin-threonine-ester ซึ่งผลิตภัณฑ์นี้สามารถเปลี่ยนไปเป็น human insulin ได้จากการย่อยสลายในลำดับต่อไป⁽⁵⁾

Pepsin (E.C. 3.4.4.1) ได้มาจากกระเพาะวัวหรือกระเพาะสัตว์ ในการใช้ร่วมกับ rennin เพื่อการผลิตชีส และในกระบวนการย่อย ทำงานได้ดีที่พีเอช 2-4 มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงสุด และสามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส บริษัท Dairyland Food Laboratories Inc (USA) ทำการผลิต Acid protease จาก Hog Stomach โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า DFL pepsin อยู่ในรูปของของเหลวที่ทำงานได้ในสภาวะที่พีเอช 2.0⁽⁸⁾

Rennin (E.C. 3.4.4.3) หรือ chymosin เป็นรูปของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์จากเรนเนต (rennet) โดยเรนเนตสกัดได้มาจากกระเพาะส่วนที่สี่ของลูกวัว เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะมาก โดยทำการย่อยน้ำนมวัวให้เปปไทด์ขนาดใหญ่ที่ละลายน้ำได้คือ K-casein การแข็งตัวและการจับกลุ่มของ para-k-casein ทำให้เกิด solid casein jelly หรือ rennet curd ใช้มากในอุตสาหกรรมการทำชีส⁽⁹⁾ บริษัท Miles Laboratories Inc (USA) ได้ทำการผลิต protease จาก Calf stomach ที่ใช้ชื่อทางการค้าว่า Animal rennet อยู่ในรูปที่เป็นของเหลวที่ทำงานได้ดีที่พีเอช 6.4-6.6 อุณหภูมิ 28-37 องศาเซลเซียส มีแอกติวิตี 1-1500 clotting ratio ใช้ในอุตสาหกรรมนม และยังสามารถผลิต rennet จากเชื้อรา *Mucor miehei* โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า Marzyme ทำงานที่สภาวะเดียวกันแต่มีแอกติวิตี 1-45 clotting ratio⁽⁸⁾

1.1.3 โปรติเอสจากจุลินทรีย์ ในระดับอุตสาหกรรม เอนไซม์โปรติเอสจากจุลินทรีย์ เป็นแหล่งของเอนไซม์ที่มีราคาถูก โดยสามารถผลิตได้ในปริมาณสูง ในอุตสาหกรรมสามารถเตรียมได้จากทั้งแบคทีเรีย เชื้อราและยีสต์ โดยเอนไซม์เหล่านี้จะทำงานต่างกัน ที่พีเอชและอุณหภูมิ และยังต่างกันในด้านความคงตัว ความไวต่อสารยับยั้ง เอนไซม์เหล่านี้มีความจำเพาะต่ำ

Bacterial protease^(1,4) ที่ใช้ในทางการค้าที่สำคัญมี 2 แบบ ต่างกันที่พีเอชในการทำงาน ความเสถียร และโครงสร้างของ active site ได้แก่

Alkaline bacterial protease (E.C. 3.4.21.14) เช่น subtilisin ทำงานที่พีเอช 9-11 อุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส มี serine residue อยู่ที่ active site ทางการค้าบางครั้งเรียกว่าเป็น detergent enzyme เช่นเอนไซม์ที่ได้จาก *Bacillus licheniformis* และ *B. Subtilis* บริษัท Gist Brocades NV (Holland) ผลิต Bacterial alkaline protease จาก *Bacillus subtilis* โดยใช้ชื่อว่า Maxatase M ทำงานได้ในสภาวะที่พีเอช 9-10 อุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส ใช้ในงานในอุตสาหกรรมซักล้าง⁽⁸⁾

Neutral bacterial protease (E.C. 3.4.24.4) เป็น metalloenzyme ทำงานที่พีเอช 6-9 เอนไซม์ที่ได้จาก *Bacillus subtilis*, *B. thermoproteolyticus* และ *Streptomyces griseus* การเตรียมทางการค้าอยู่ในรูปที่เป็นผง ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง การผลิตเครื่องดื่ม และการผลิต protein hydrolysate บริษัท Novo Industrie A/S (Denmark) ผลิต bacterial neutral protease จาก *Bacillus subtilis* ที่ใช้ชื่อว่า Neutrase อยู่ในรูปที่เป็นผง เม็ดกรานูล และ ของเหลว ทำงานที่พีเอช 5.5-6.5 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มีแอกติวิตี 0.5-1.5 AU/g⁽⁸⁾

Fungal protease (E.C. 3.4.23) เป็นเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากเชื้อราสามารถจำแนกได้เป็น acidic, neutral หรือ alkaline protease ขึ้นอยู่กับพีเอชที่ใช้ในการทำงาน คุณสมบัติของเอนไซม์บางชนิดแสดงในตาราง 1.2 โดย acidic และ neutral protease จาก *Aspergillus* ใช้ในการผลิตเครื่องดื่ม การทำขนมปัง สำหรับ alkaline protease ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง บริษัท Miles-Chemie GmbH (W.Germany) ผลิต acid fungal protease จาก *Aspergillus oryzae* var. ใช้ชื่อทางการค้าว่า MKC Acid Fungal Protease P อยู่ในรูปที่เป็นผง ทำงานในสภาวะที่พีเอช 2.5-3.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ใช้ในงานอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมอาหารและ protein hydrolysis และบริษัท Corning Biosystems (USA) ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus flavus* ใช้ชื่อทางการค้าว่า Rhozyme P-11 อยู่ในรูปที่เป็นผงทำงานได้ดีที่พีเอช 5.5-8.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แอกติวิตี 10,000 EE ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร⁽⁸⁾

ตาราง 1.2 แสดงคุณสมบัติของโปรติเอสจาก เชื้อรา ⁽⁹⁾

Organism	pH range for		Opimal pH for stability	Inhibitors*
	Hemoglobin	Casein		
<i>Aspergillus saitoi</i>	3.0-4.5	2.5-3.0	2.0-5.0	NBS
<i>Aspergillus oryzae</i> (acidic protease)	3.0-4.0	2.5-3.0	5.0	
<i>Aspergillus oryzae</i> (neutral protease)	5.5-7.5		7.0	EDTA
<i>Aspergillus oryzae</i> (alkaline protease)	6.0-9.5	6.5-10.0	7.0-8.0	DIFP
<i>Paecilomyces varioti</i>	3.5-5.5	3.0	3.0-5.0	
<i>Rhizopus chinensis</i>	5.0	2.9-3.3	3.8-6.5	
<i>Mucor pusillus</i>	3.5-4.5	5.6	3.0-6.0	

* NBS = N-bromosuccinimide; EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid; DIFP = diisopropylfluorophosphate.

Yeast protease เป็นเอนไซม์ที่ผลิตได้จากยีสต์ มักใช้ในอุตสาหกรรมการทำเครื่องดื่มเบียร์ มีคุณสมบัติเหมือน acid protease ที่ได้จากพืช ตัวอย่างยีสต์ที่ใช้ได้แก่ *Saccharomyces uvarum* (carlsbergensis), *Candida olea* และ *Torulopsis magnoliae*.

โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมหลายชนิดปริมาณเอนไซม์ที่ใช้กันมากในปัจจุบันเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีการขายประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ของการขายเอนไซม์ต่างๆ ทั้งหมด⁽⁷⁾ ประโยชน์ของเอนไซม์โปรติเอสในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสามารถจำแนกได้ ดังตาราง 3.1

ตาราง 1.3 แสดงเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมและการประยุกต์ใช้⁽¹⁰⁾

Name of enzymes	Source	Applications	Commercial Importance
Trypsin	Animal pancreas	Medical uses, Meat tenderizers, Beer haze removal.	+++
Pepsin	Animal stomach	Digestive aid, Meat tenderizer.	+++
α -Chymotrypsin	Animal stomach	Medical uses.	
Rennet	Calf stomach	Cheese manufacture.	+++
Pancreas protease	Animal pancreas	Digestive aid, Cleaning, Leather bating, Dehairing, Feed improvement.	++
Papain	Papaya	Digestive aid, Medical uses, Beer haze removal, Meat tenderizer.	+++
Bromelain,	Pineapple,	Same as for papain.	++
Ficin	<i>Ficus carida</i>		
Protease	<i>A. oryzae</i>	Flavoring of sake, Haze removal in sake.	+
Protease	<i>A.niger</i>	Feed, Digestive aid.	++
Protease	<i>B.subtilis</i>	Removal of gelatin from film (recovery of silver), Fish soluble, Meat tenderizer.	++
Protease	<i>Streptomyces griseus</i>	Removal of gelatin from film (recovery of silver), Fish soluble, Meat tenderization.	++

จากที่กล่าวมาทั้งหมดจะเห็นว่าเอนไซม์โปรติเอสมีความสำคัญมากในระดับอุตสาหกรรมสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย จึงทำให้มีความต้องการใช้เอนไซม์เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ในแต่ละปี ปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้าเอนไซม์แต่ละชนิดมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆเป็นจำนวนมาก⁽¹¹⁾ แสดงดังตาราง 1.4

ตาราง 1.4 ข้อมูลการนำเข้าของเอนไซม์ทุกชนิดของประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534-2540

ปี พ.ศ.	มูลค่าการนำเข้า	
	ปริมาณ (ล้านตัน)	จำนวนเงิน (ล้านบาท)
2534	1.27	136
2535	1.28	204
2536	1.60	250
2537	2.18	275
2538	2.12	334
2539	2.11	367
2540	1.64	296

แหล่งที่มา กรมศุลกากร ประเทศไทย
ปี 2540 : เก็บข้อมูลตั้งแต่ ม.ค.-ก.ย. 2540

จากข้อมูลการนำเข้าเอนไซม์ของประเทศไทยมีแนวโน้มสูงขึ้น ซึ่งแสดงว่าความต้องการของการใช้เอนไซม์มีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ทำให้ประเทศไทยต้องสูญเสียเงินเป็นจำนวนมากในการสั่งซื้อเอนไซม์มาใช้ในระดับอุตสาหกรรมเพราะประเทศเรายังไม่มีการพัฒนาอุตสาหกรรมเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์มากนัก เพื่อเป็นการลดต้นทุนการนำเข้าและสนองต่อการใช้เอนไซม์ที่มีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ ดังนั้นจึงต้องมีการค้นคว้าพัฒนาการผลิตเอนไซม์ ให้มีปริมาณมากพอต่อความต้องการภายในประเทศ ซึ่งมีทั้งการปรับปรุงสายพันธุ์ วิธีการผลิต รวมทั้งพัฒนาคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอส เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์โปรติเอสให้สูงขึ้น การทำการกลายพันธุ์การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม และมีอีกวิธีหนึ่งที่สามารถเพิ่มผลผลิตเอนไซม์โปรติเอสให้มี

ปริมาณมากก็คือ การหมัก โดยกระบวนการหมักในอุตสาหกรรม (Industrial Fermentation Process)⁽¹¹⁾ ซึ่งต้นทุนในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมส่วนใหญ่มาจากราคาของวัตถุดิบ ดังนั้น การศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสให้มีปริมาณสูงขึ้นโดยใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ก่อนที่จะนำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรมจึงมีความสำคัญมาก

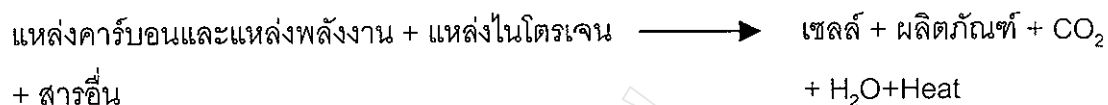
1.2 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก^(12,13)

ในการเจริญของจุลินทรีย์ทุกชนิดต้องการ น้ำ แหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุ จุลินทรีย์บางชนิดอาจต้องการสารเสริมการเจริญเช่น วิตามิน หรือกรดอะมิโน ในการศึกษาในห้องปฏิบัติการอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยสารเคมีบริสุทธิ์ชนิดต่างๆ จะสามารถทำให้จุลินทรีย์ที่ศึกษาเจริญได้ดี แต่อาหารเลี้ยงเชื่อนี้จะไม่เหมาะที่จะใช้ในการผลิตในอุตสาหกรรมเนื่องจากมีราคาแพง ในการผลิตในอุตสาหกรรมจะต้องใช้สารอาหารราคาถูกนำมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในอุตสาหกรรมควรมีสมบัติดังนี้

1. ให้ผลผลิตหรือชีวมวล (biomass) มากที่สุดต่อหน่วยน้ำหนักของอาหารที่ใช้
2. ให้ผลผลิตหรือชีวมวลที่มีความเข้มข้นสูง
3. อัตราเร็วในการเกิดผลผลิตสูง
4. มีสารที่ไม่ต้องการเกิดขึ้นน้อยที่สุด
5. มีราคาถูก มีสมบัติคงที่ และหาซื้อได้ง่ายตลอดปี
6. ทำให้เกิดปัญหาในการผลิตน้อยที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการให้อากาศ การกวน การสกัดและทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ รวมทั้งการกำจัดน้ำเสีย

1.2.1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Medium formulation)

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในอุตสาหกรรมหมักจะต้องมีปริมาณมากและราคาถูก เช่นของเหลือใช้จากอุตสาหกรรมอื่น ซึ่งประกอบไปด้วยสารอาหารต่างๆที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ในการเจริญและให้ผลผลิตได้เป็นอย่างดี เช่นกากถั่วเหลือง กากเมล็ดทานตะวัน แป้งมันสำปะหลัง ดังนั้น การค้นคว้าหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องมีแร่ธาตุต่างๆครบ เพื่อการผลิตชีวมวลหรือเมตาบอไลต์ และมีแหล่งพลังงานเพื่อใช้ในการสร้างเซลล์และการมีชีวิตของเซลล์ ในการพิจารณาหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ จะเริ่มโดยการพิจารณาสมการเคมีเพื่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ ดังนี้



จากการพิจารณาส่วนประกอบของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆในตาราง 1.5 พบว่าธาตุที่เป็นส่วนประกอบส่วนใหญ่ของเซลล์แบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา คือ คาร์บอน (40-63 %ของน้ำหนักแห้ง) รองลงมาคือไนโตรเจน (7-15% ของน้ำหนักแห้ง) และไฮโดรเจน (7%ของน้ำหนักแห้ง) ดังนั้นในการเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อจึงต้องวิเคราะห์หาปริมาณคาร์บอน และไนโตรเจนว่าเพียงพอ สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์หรือไม่ สำหรับปริมาณฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ และธาตุอื่นๆที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์ในปริมาณน้อย มักพบว่ามีความเพียงพอในอาหารชนิดต่างๆจึงไม่ต้องใส่เพิ่มเติม นอกจากในการผลิตสารบางชนิดที่มีธาตุเหล่านั้นเป็นส่วนประกอบ เช่น ในการผลิตวิตามินบี 12 (cyanocobalamin) ต้องเติมโคบอลต์ เพราะโคบอลต์เป็นส่วนประกอบของวิตามินบี 12

ตาราง 1.5 แสดงปริมาณธาตุที่เป็นส่วนประกอบของจุลินทรีย์ (% ของน้ำหนักแห้ง)^(13,14,15,16)

Element	Bacteria	Yeast	Fungi
Carbon	50-53	45-50	40-63
Hydrogen	7	7	-
Nitrogen	12-15	7.5-11	7-10
Phosphorus	2.0-3.0	0.8-2.6	0.4-4.5
Sulphur	0.2-1.0	0.01-0.24	0.1-0.5
Potassium	1.0-4.5	1.0-4.0	0.2-2.5
Sodium	0.5-1.0	0.01-0.1	0.02-0.5
Calcium	0.01-1.1	0.1-0.3	0.1-1.4
Magnesium	0.1-0.5	0.1-0.5	0.1-0.5
Chloride	0.5	-	-
Iron	0.02-0.2	0.01-0.5	0.1-0.2

ดังนั้นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในกระบวนการหมักจะพิจารณาถึงสิ่งต่างๆ ซึ่งจะกล่าวต่อไปนี้

1) น้ำ (Water)

ในอุตสาหกรรมหมักต้องใช้น้ำเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ การผ่านไอน้ำเพื่อฆ่าเชื้อ น้ำเย็นในการระบายความร้อนจากถังหมักและใช้ในกิจกรรมอื่นๆ คุณสมบัติของน้ำที่จะต้องพิจารณาคือ พีเอช ปริมาณตะกอนที่แขวนลอยและการปนเปื้อน

2) แหล่งพลังงาน (Energy sources)

จุลินทรีย์ต่างๆ ต้องการพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตซึ่งได้มาจากการเกิดออกซิเดชันในส่วนประกอบของอาหาร จุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เป็นพวก chemo-organotroph ดังนั้นแหล่งพลังงานจึงเป็นแหล่งของคาร์บอนด้วยได้แก่ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน จุลินทรีย์บางชนิดสามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งพลังงานได้

3) แหล่งคาร์บอน (Carbon sources)

แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในอุตสาหกรรมหมักจะเป็นคาร์โบไฮเดรต เช่น แป้งจากข้าวชนิดต่างๆ ข้าวโพด มันฝรั่ง มันสำปะหลัง กากน้ำตาลจากอ้อย น้ำตาลแลคโตสจากนมจะมีส่วนที่หลุดจากการทำเนยแข็งที่เรียกว่าเวย์ (whey) น้ำมันพืชจากข้าวโพด เมล็ดฝ้าย ถั่วเหลือง และน้ำมันพืชอื่นๆ เพราะน้ำมันให้พลังงานมากกว่ากลูโคสประมาณ 2.4 เท่า นอกจากนี้กลูโคสยังเป็นแหล่งคาร์บอนที่สามารถนำไปใช้ได้ง่าย กลูโคสในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยให้เซลล์มีการเจริญเติบโตที่เหมาะสม การสร้างเอนไซม์ของเชื้อก็จะดำเนินไปตามปกติ แต่เมื่อปริมาณกลูโคสที่มากเกินไปจะทำให้เกิด catabolite repression โดยกลูโคส เช่นการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Aeromonas sorbia* จะลดลงเมื่อปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อมากเกินไป ⁽¹⁷⁾ ส่วน Fujiwara และ Yamamoto ⁽¹⁸⁾ ได้ใช้วัตถุดิบราคาถูกหลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าการเลี้ยง *Bacillus spp.* B21-2 โดยใช้แป้งและกลูโคสพบว่าแอคติวิตีของอัลคาไลน์โปรติเอสมีค่าสูงขึ้นเมื่อเทียบกับการใช้แลคโตส กลูโคส และกลีเซอรินเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับ การทดลองของอนา ⁽¹¹⁾ ใช้ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสได้ในปริมาณสูงโดยใช้อาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลังและกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวัน แต่ในการทดลองของ Mabrouk และคณะ ⁽¹⁹⁾ พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เป็นแลคโตส ให้แอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสสูงกว่าอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น กลูโคส ซูโครส แป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวโพด

4) แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen sources)

สารประกอบไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ส่วนต่างๆภายในเซลล์เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก และส่วนประกอบของผนังเซลล์ จุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมจะใช้นิโตรเจนในรูป สารประกอบอนินทรีย์ (inorganic nitrogen) หรือสารประกอบอินทรีย์ (organic nitrogen) สารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจนใช้ในรูปแก๊สแอมโมเนีย แกลือแอมโมเนียมไนเตรต สารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนอาจใช้ในรูปกรดอะมิโน โปรตีน หรือยูเรีย เชื้อส่วนใหญ่เมื่อใช้อินทรีย์ไนโตรเจน จะเจริญได้เร็วกว่าการใช้อินทรีย์ไนโตรเจน และจุลินทรีย์บางพวกต้องการกรดอะมิโนในการเจริญ กรดอะมิโนบริสุทธิ์มีราคาแพงจึงจะไม่ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อถ้าสามารถหาแหล่งอื่นทดแทนได้ เช่น ในการผลิต lysine เชื้อที่ใช้ในการผลิตต้องการกรดอะมิโน methionine และ threonine จึงใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ถั่วเหลืองเพราะมีกรดอะมิโนดังกล่าว การผลิตเอนไซม์โปรติเอสจะขึ้นกับปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ การสร้างโปรตีนจะถูกกด (repress) เมื่อมีกรดอะมิโนหรือเปปไทด์ในอาหารมากเกินไป โดยที่กรดอะมิโนแต่ละชนิดมีความสามารถในการกดการสร้างเอนไซม์ได้ต่างกันทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของเชื้อด้วย ใน *Bacillus spp.* กรดอะมิโนชนิดเดียวกันจะมีผลต่อการกดการสร้างเอนไซม์ได้ต่างกัน⁽²⁰⁾ กรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อการเจริญของ *Bacillus mesophilic* no.58 คือ Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, His และ Lys⁽²¹⁾ นอกจากนี้ Fujiwara และ Yamamoto⁽¹⁸⁾ ได้ศึกษาผลของวัตถุดิบราคาถูกที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus spp.* B21-2 พบว่า bonito extract และกากถั่วเหลือง สามารถเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์โปรติเอสได้เมื่อเทียบกับการใช้วัตถุดิบชนิดอื่นๆ รวมทั้งในการทดลองของ Umerie และคณะ⁽²²⁾ ในการผลิต Lysine โดยเชื้อ *Bacillus laterosporus* พบว่า แหล่งไนโตรเจนที่เป็น Soybean meal ทำให้ปริมาณการผลิต lysine มากกว่าสารอนินทรีย์ที่เป็น แอมโมเนียมซัลเฟต จากการทดลองของ Mabrouk และคณะ⁽¹⁹⁾ ได้ทำการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยใช้เชื้อ *Bacillus licheniformis* ATCC 21415 ที่ใช้แหล่งวัตถุดิบราคาถูกเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า alkaline-extracted soybean และ ammonium phosphate สามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุดเมื่อเทียบกับวัตถุดิบอื่นๆ

5) แร่ธาตุ (Minerals)

อาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่จะมีธาตุต่างๆเหล่านี้เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วยคือ แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ซัลเฟอร์ แคลเซียม และคลอรีน ถ้าในสารอาหารที่นำมาใช้มีธาตุต่างๆ เหล่านี้ไม่เพียงพอก็ต้องเติมธาตุเหล่านี้ลงไปเป็นรูปสารประกอบ ส่วนใหญ่ใช้ในรูปแบบของเกลือต่างๆ สำหรับธาตุอื่นๆ เช่น โคบอลท์ คอปเปอร์ เหล็ก แมงกานีส และสังกะสี ก็เป็นส่วนประกอบที่จำเป็น

ของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ในปริมาณที่น้อย ซึ่งปกติธาตุต่างๆเหล่านี้มักมีปะปนอยู่ในสารประกอบอื่นๆอย่างเพียงพอแล้ว ยกเว้นการหมักที่ต้องการธาตุใดธาตุหนึ่งโดยเฉพาะ

1.2.2 วัตถุดิบที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

วัตถุดิบในที่นี้หมายถึงผลผลิตการเกษตรและวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมการเกษตร เช่น กากน้ำตาล (molasses) กากถั่วเหลือง (soybean meal) กากถั่วลิสง (peanut meal) กากมัสตาร์ด (mustard meal) corn steep liquor และ sulfite waste liquor วัตถุดิบเหล่านี้ประกอบด้วยสารอาหารเกือบครบทุกชนิด คือมีสารอาหารที่เป็นแหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ และแหล่งสารเสริมการเจริญ (กรดอะมิโน และ วิตามิน) การใช้วัตถุดิบเหล่านี้ อาจมีความจำเป็นต้องเพิ่มสารประกอบบางชนิด ถ้ามีสารชนิดนั้นน้อยเกินไป สำหรับวัสดุเหลือใช้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด จะได้ส่วนที่เป็นทั้งกากมัสตาร์ด (mustard meal) และ ของเหลวมัสตาร์ดที่มีทั้งปริมาณโปรตีนและปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูง ในที่นี้จะกล่าวถึงที่มาและคุณสมบัติของวัตถุดิบเหล่านี้บางตัวรวมทั้งกากมัสตาร์ดที่จะใช้ในการทดลองครั้งนี้ด้วย

1.2.2.1 กากน้ำตาล (Molasses)

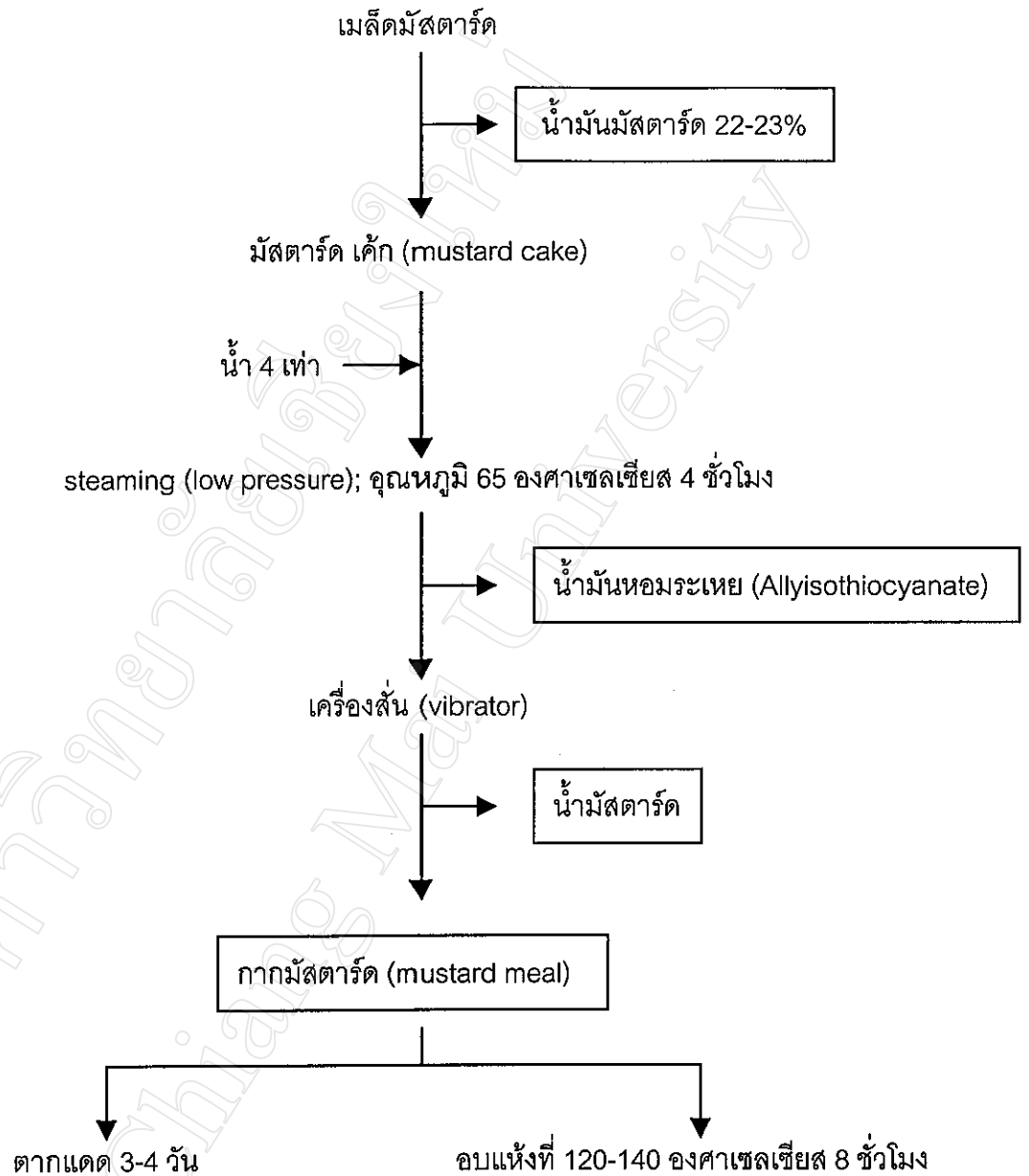
กากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำตาลทราย กากน้ำตาลเป็นของเหลวข้นที่ไม่นำมาตกผลึกอีก มีส่วนประกอบที่เป็นน้ำตาลอยู่ประมาณ 52 เปอร์เซ็นต์ และมีสารประกอบไนโตรเจนซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดอะมิโน และวิตามินที่ทนความร้อนและด่างได้ เช่น niacin, biotin, pantothenic acid และ riboflavin กากน้ำตาลจากหัวบีทมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับกากน้ำตาลจากอ้อย แต่มีปริมาณน้ำตาลมากกว่าเล็กน้อยและไม่มี biotin ซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญของยีสต์

1.2.2.2 กากถั่วเหลือง (Soybean meal)

กากถั่วเหลืองคือถั่วเหลืองที่ได้ผ่านกระบวนการสกัดเอาน้ำมันออกแล้ว กากถั่วเหลืองมีลักษณะเป็นผงหยาบสามารถนำไปใช้ผสมอาหารเลี้ยงสัตว์ ใช้ทำปุ๋ยหรือส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ กากถั่วเหลืองประกอบด้วยไนโตรเจน 8 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ไนโตรเจนในกากถั่วเหลืองใช้ได้ยากกว่าไนโตรเจนใน corn steep liquor

1.2.2.3 กากมัสตาร์ด (Mustard meal)

มัสตาร์ด (Mustard) จัดเป็นพืชในตระกูล บราสสิก้า (Genus *Brassica*) วงศ์ Cruciferae (Family *Cruciferae*) มีหลายสปีชีส์ ที่พบมากคือ White mustard (*B. hirta*) สำหรับ Black mustard และ Indian หรือ Leaf mustard มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *B. niger* และ *B. juncea* เป็นพืชในตระกูลเดียวกับเรปซีด (Rape seed ; *B. napus* หรือ *B. campestris*) เป็นพืชที่เมล็ดให้น้ำมัน หรือเรียกว่าเมล็ดน้ำมัน (Oilseeds) มีน้ำมัน 30-40 เปอร์เซ็นต์ทั่วโลกมีการผลิตน้ำมันมัสตาร์ดมากเป็นอันดับ 3 รองจากน้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันปาล์ม ขณะนี้ประเทศไทยมีการผลิตน้ำมันหอมระเหยจากมัสตาร์ดเพื่อการส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศ โดยมีโรงงานที่กำลังการผลิตสูงอยู่ที่นิคมอุตสาหกรรมลำพูน โรงงานได้ส่งเมล็ดมัสตาร์ดซึ่งเป็นตระกูลเดียวกับเรปซีดจากประเทศแคนาดาและออสเตรเลียเข้ามาปีละประมาณ > 7,000 ตัน เมล็ดมัสตาร์ดนี้มีน้ำมันประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ สามารถนำมาสกัดน้ำมันออกได้ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ โดยในส่วนของน้ำมันมัสตาร์ดสามารถนำไปใช้ในอาหารสัตว์ร่วมกับหรือทดแทนน้ำมันปาล์มได้ กากที่เหลือซึ่งมีถึง 5,600 ตันต่อปี จะถูกนำไปสกัดน้ำมันหอมระเหย (essential oil) และสารให้ความเผ็ดด้วยการอบไอน้ำ (steaming) ประมาณ 4 ชั่วโมง สารที่ถูกสกัดออกไปในขั้นตอนนี้มีเพียง 1 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น จึงเหลือกากที่คาดว่าจะมีโภชนะสูงอีกเป็นจำนวนมาก ในระหว่างกระบวนการสกัดมัสตาร์ดนี้ มีการใช้น้ำเข้าไปผสมเป็นจำนวนมาก (ประมาณ 4 เท่าของปริมาตรเมล็ด) ทำให้กากมีน้ำอยู่สูง โรงงานได้ติดตั้งเครื่องสั่น (Vibrator) เพื่อแยกเอาน้ำออก น้ำส่วนนี้จะมีแฉะละลายอยู่ค่อนข้างเข้มข้น และส่วนที่เหลือซึ่งเป็นส่วนของเปลือกเมล็ดและเนื้อในบางส่วน ขั้นตอนการผลิตน้ำมันหอมระเหยแสดงไว้ดังรูป 1.2 และจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในกากมัสตาร์ดหลังผลิตน้ำมันหอมระเหย พบว่า มีปริมาณโปรตีน ไขมัน และเส้นใย เท่ากับ 23, 20 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ดังนั้นในส่วนของทั้งน้ำมันมัสตาร์ดและกากมัสตาร์ดเหมาะที่จะนำไปประยุกต์เพื่อเตรียมเป็นอาหารสำหรับการเจริญของจุลชีพได้ นอกเหนือจากการนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ ซึ่งจุดอ่อนในการนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ คือ มีเส้นใยสูง ทำให้ย่อยยาก นอกจากนี้ยังมีสารพิษบางชนิด เช่น กลูโคซิโนเลต และกรดอิรูซิติก (erucic acid) เป็นต้น ซึ่งมีรายงานว่าเมื่อผลทำให้เกิดคอกพอก และสมรรถภาพในการขยายพันธุ์เพื่อเพิ่มจำนวนน้อยลง ถ้าไม่ผ่านกรรมวิธีในการกำจัดพิษนี้เสียก่อน เรปซีดบางสายพันธุ์ได้ถูกปรับปรุงพันธุ์ในประเทศแคนาดาเพื่อแก้ปัญหาข้อด้อยเหล่านี้ ได้พืชชนิดใหม่ชื่อว่า คาโนล่า (canola) ซึ่งอาจเป็นสายพันธุ์ที่เรียกว่า double zero หรือ triple zero คือมีสารพิษทั้งสองชนิด และเส้นใยในระดับต่ำ จึงทำให้สามารถนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ดียิ่งขึ้น⁽²³⁾

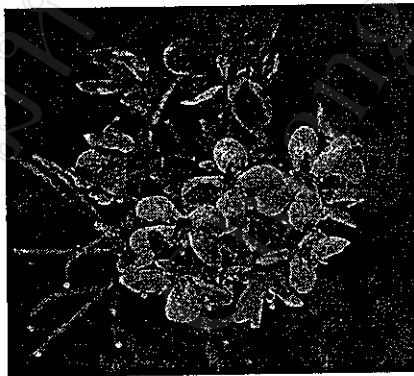


รูป 1.2 แผนผังกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหย

1) ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

มัสตาร์ดจัดเป็นพืชใบเลี้ยงคู่ มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่เลวร้าย เช่น ที่หนาวเย็น และแห้งแล้ง ดังนั้นจึงนิยมปลูกในแถบอบอุ่น เช่นเดียวกับเรปซิดหรือ คาโนล่า ลักษณะช่อดอกมีสีเหลืองเป็นแบบ racemose ดังรูป 1.3 และ 1.4 ดอกแรกที่จะบานเริ่มจากดอกต่ำสุดของช่อหลัก โดยจะบาน 3-5 ดอกหรือมากกว่านั้นต่อวัน และจะบานต่อเนื่องจนถึงดอกยอด และลักษณะแผ่นใบ จะไม่ชิดกับลำต้น

เมล็ดมัสตาร์ดมี endosperm ขนาดใหญ่กว่าเมล็ดธัญพืชอื่นๆ แต่ใกล้เคียงกับเมล็ดเรปซิด ผนังหุ้มเมล็ด (seed coat) ประกอบด้วยผนังชั้นนอก (outer epidermis) ชั้น palisade ซึ่งเป็นเซลล์รูปร่างแบบ columnar ผนังหนา และชั้น parenchyma อัดแน่น ในส่วนของ endosperm จะเป็นเซลล์ aleurone แถวเดียว และจะมีชั้น parenchyma อัดแน่นแยกออกจาก embryo สีของเมล็ดเมื่ออ่อนจะมีสีเขียว เมื่อแก่จะมีสีเหลืองหรือน้ำตาล แล้วแต่สายพันธุ์ ในสายพันธุ์เมล็ดสีเหลืองจะมีปริมาณน้ำมันและโปรตีนสูงกว่า แต่มีเส้นใยต่ำกว่าสายพันธุ์เมล็ดสีน้ำตาล ส่วนขนาดของเมล็ดมัสตาร์ด เมื่อเปรียบเทียบกับเมล็ดเรปซิด มีขนาดน้ำหนักต่ำกว่าเมล็ดเรปซิดเล็กน้อย (ตาราง 1.6) การเพาะปลูกเมล็ดมัสตาร์ด ในเขตอบอุ่น จะปลูกเฉพาะฤดูร้อน ส่วนในเอเชียใต้ เช่น ประเทศอินเดียนิยมปลูกประมาณเดือนตุลาคมหรือธันวาคม แล้วไปเก็บเกี่ยวช่วงเดือนมีนาคมหรือเมษายนของปีถัดไป



รูป 1.3



รูป 1.4

รูป 1.3 และ 1.4 แสดงลักษณะดอกมัสตาร์ด

ตาราง 1.6 Normal ranges in seed size of *Brassica* oilseeds by species and form ⁽²³⁾

Species and Form	g/1000 seeds
<i>B. napus</i> , winter	4.5-5.5
<i>B. campestris</i> , winter	3.0-4.0
<i>B. napus</i> , summer	3.5-4.5
<i>B. campestris</i> , summer	2.5-3.0
<i>B. juncea</i> , summer	2.8-3.5
<i>B. campestris</i> , October-April	4.0-4.5

ในทวีปยุโรปและอเมริกาจะปลูกแบบหยอดหลุมเป็นแถว โดยใช้เมล็ดพันธุ์ในอัตราส่วน 5-8 กก./เฮกแตร์ (ha) ในประเทศอินเดีย และปากีสถาน จะใช้วิธีหว่านเมล็ดและไถกลบ ส่วนประเทศจีนและญี่ปุ่น เพาะเมล็ดก่อน จากนั้นย้ายไปปลูกในแปลงข้าวหลังจากเก็บเกี่ยวข้าวเสร็จแล้ว ในแคนาดาจะได้ผลผลิตเมล็ดมัสตาร์ดประมาณ 1,320 กก./ha ส่วนที่ปากีสถานจะได้ผลผลิตประมาณ 400-600 กก./ha ประโยชน์ที่ได้รับจากการปลูกมัสตาร์ด นอกจากจะได้ผลผลิตในรูปของเมล็ดที่เป็นแหล่งอาหารโปรตีน และน้ำมัน ซึ่งเป็นอาหารพลังงานแล้ว ยังใช้เป็นพืชคลุมดิน เมล็ดมีน้ำมัน 30-40 เปอร์เซ็นต์ ในการสกัดจะใช้วิธี cold pressing เพื่อมิให้เอนไซม์ myrosinase ทำปฏิกิริยากับ glucoside เกิดเป็นสารหอมระเหย น้ำมันที่ได้จากมัสตาร์ดนี้ จะนำไปใช้สำหรับผลิต mustard plaster ใช้บรรเทาอาการปวดข้อบางชนิดได้ ส่วนกากที่เหลือจากการบีบน้ำมันนำไปใช้เลี้ยงสัตว์ หรืออาจนำไปสกัดน้ำมันหอมระเหยซึ่งใช้เป็นส่วนประกอบของกลิ่นในอุตสาหกรรมยาและอาหาร หรือในบางประเทศในทวีปเอเชีย เช่น จีนจะนำกากมัสตาร์ดเคี้ยวที่ได้จากการสกัดน้ำมันไปใช้เป็นปุ๋ย

2) องค์ประกอบทางเคมีของกากมัสตาร์ด

จากคุณสมบัติของมัสตาร์ดที่แสดงในตาราง 1.7 เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีระหว่างกากมัสตาร์ดกับกากถั่วเหลืองพบว่ามัสตาร์ดมีองค์ประกอบทางเคมีใกล้เคียงกัน ซึ่งในกระบวนการหมักเพื่อผลิตสารหรือเอนไซม์มีการนำกากถั่วเหลืองไปใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในกระบวนการผลิต เช่น ในการทดลองของ Fujiwara และ Yamamoto ⁽¹⁸⁾ ได้ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ในปี 1999 Mabrouck และคณะ ⁽¹⁹⁾ ก็ใช้ alkaline extracted soybean ในการเตรียมเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส และ Umerie

และคณะ⁽²²⁾ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิต Lysine จากเชื้อ *Bacillus laterosporus*. ดังนั้นจากคุณสมบัติของกากมัสตาร์ดและแป้งมัสตาร์ดที่คล้ายกับกากถั่วเหลืองจึงน่าจะเหมาะสมในการนำมาเตรียมเป็นแหล่งอาหารเพื่อการผลิตสารหรือเอนไซม์เช่นกัน

ตาราง 1.7 Chemical composition and essential amino acids content (%DM basis) of mustard seed, mustard meal and soybean meal^(24,25,26)

	Mustard			Mustard	Soybean
	Seed	Oil cake	Oil meal	Meal	Meal
Moisture	8.3	10.2	12.0	11.8	11.0
Crude protein	32.4	38.5	26.0	47.8	49.4
Ether extract	46.7	10.7	2.3	2.3	0.9
Crude fiber	8.6	3.5	18.2	7.8	7.9
Ash	5.1	9.9	7.6	6.5	n.a.
NFE	16.2	37.4	45.9	35.6	n.a.
Essential amino acids					
Lysine	n.a.	n.a.	n.a.	2.22	3.02
Methionine	n.a.	n.a.	n.a.	0.95	0.70
Cystine	n.a.	n.a.	n.a.	1.26	0.74
Tryptophan	n.a.	n.a.	n.a.	0.44	0.83
Threonine	n.a.	n.a.	n.a.	1.72	1.93
Leucine	n.a.	n.a.	n.a.	2.90	3.81
Isoleucine	n.a.	n.a.	n.a.	1.39	2.20
Valine	n.a.	n.a.	n.a.	1.55	2.32
Histidine	n.a.	n.a.	n.a.	1.64	1.31
Phenylalanine+Tyrosine	n.a.	n.a.	n.a.	3.85	4.58

n.a. = No data available

1.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้กากมัสตาร์ดเป็นแหล่งอาหารในกระบวนการหมัก

Krishnan และ Chandra ⁽²⁷⁾ ได้ศึกษาผลของ เค้กจากเมล็ดให้น้ำมันต่างๆ (Oilseed cake) ได้แก่ groundnut, coconut, linseed, mustard, cotton, madhuca และ sesame ต่อการผลิตเอนไซม์ อะไมเลส โดยเชื้อ *Bacillus licheniformis* CUMC305 พบว่าการผลิตเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้ mustard cake ที่ความเข้มข้น 3 % และพบว่าสามารถใช้ groundnut หรือ mustard cake แทนอาหารดั้งเดิม peptone-beef extract medium ในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดย *Bacillus licheniformis* ได้อย่างสมบูรณ์

Yeoman และ Edwards ⁽²⁸⁾ ได้ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียทนความร้อน (thermophilic bacteria) ในอาหารที่ได้จากกากเรป (rapemeal) ซึ่งเป็นเมล็ดให้น้ำมันในตระกูลเดียวกับ มัสตาร์ด พบว่าสามารถนำกากเรปมาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโปรตีนสูงและเพียงพอต่อการเจริญของแบคทีเรียทนความร้อนรวมทั้ง *Bacillus*, *Streptomyces* และ เชื้อรา นอกจากนั้นยังพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้

ต่อมาในปี 1994 Yeoman และ Edwards ⁽²⁹⁾ ได้ศึกษาต่อในด้านการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Streptomyces thermovulgaris* โดยใช้อาหารที่เตรียมได้จากกากเรป โดยแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์โปรติเอสขึ้นกับปริมาณโปรตีนในกากเรป ซึ่งผลิตโปรติเอสออกมาในระยะที่ 2 ของการเจริญ

Gangurde และ Shethna ⁽³⁰⁾ ใช้กากมัสตาร์ดเป็นอาหารในการเจริญ ผลิตสปอร์และสารพิษ (toxin) ของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* โดยโปรตีนที่พบมากในกากมัสตาร์ดเป็นกรดอะมิโน glutamic acid และ arginine เมื่อใช้กากมัสตาร์ดที่ความเข้มข้น 4% พบว่า *B. sphaericus* สามารถสร้างสปอร์และให้สารพิษที่มีความแรงเทียบได้กับ international reference standards.

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ากากมัสตาร์ดมีแนวโน้มที่จะสามารถนำมาเตรียมเป็นอาหารเพื่อการเลี้ยงเชื้อรวมทั้งเป็นแหล่งอาหารในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ เพราะมีทั้งปริมาณโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตอยู่ในปริมาณสูง และมีราคาถูก ถ้าได้มีการศึกษาการใช้ประโยชน์จากมัสตาร์ดให้สามารถใช้เป็นแหล่งอาหารในการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมได้จะเป็นการเพิ่มมูลค่าของของเหลือใช้จากอุตสาหกรรม และเกิดประโยชน์อย่างมาก

1.5 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญมากที่สุดในอุตสาหกรรม ตั้งแต่ อุตสาหกรรมอาหาร การผลิตเบียร์ เนยแข็ง อุตสาหกรรมฟอกหนัง ใช้ในสารซักล้าง ประโยชน์ทาง การแพทย์และเภสัชวิทยาและยังมีการประยุกต์ใช้ในการ recovery silver ในการล้าง gelatin ออก จากฟิล์ม และการสังเคราะห์เปปไทด์ โดยต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ส่วนใหญ่มาจากวัตถุดิบที่ใช้ ในกระบวนการหมัก ดังนั้นของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด ซึ่งมีอยู่ มากในโรงงานจังหวัดลำพูนจึงควรมีการนำมาศึกษาเพื่อเป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ได้นำของเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ดทั้ง กาก มัสตาร์ดและแป้งมัสตาร์ดมาประยุกต์เตรียมเป็นอาหารเพื่อการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ และเพื่อผลิต เอนไซม์โปรติเอส โดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสซึ่งแยกได้จากแหล่งที่มีการ ทิ้งกากมัสตาร์ด นอกจากนี้ยังได้นำโปรติเอสที่ผลิตได้มาศึกษาคุณสมบัติทั่วไปและสมบัติทาง จลนศาสตร์