การผลิตเอนไซม์โปรทีเอสโดยเชื้อรา

เกรียงไกร นาคะเกศ

เอนไซม์โปรทีเอสเป็นเอนไซม์ที่มีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น การผลิตขนมปัง การผลิตเบียร์ และการทำซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว เป็นต้น การผลิตเอนไซม์โปรทีเอสจากเชื้อราโดยทั่วไปนิยมหมักแบบ solid state การหมักแบบนี้เป็นการเลี้ยงเชื้อราโดยใช้ธัญพืช เช่น ข้าว และรำข้าว เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ข้อดีของการหมักแบบนี้คือ เครื่องมือที่ใช้มีราคาไม่แพง ลงทุนน้อย และยังยับยั้งการเจริญของบักเตรีที่ไม่ต้องการได้อีกด้วย เนื่องจากใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความชื้นต่ำ

เชื้อรา Aspergillus oryzae และ Rhizopus oligosporus ใช้ในการผลิตอาหารในประเทศแถบเอเชียมาเป็นเวลานาน และพบว่าเชื้อราทั้งสองชนิดสามารถผลิตเอนไซม์โปรทีเอสได้ในปริมาณมากด้วยวิธีการหมักแบบ solid state ดังนั้นจึงนำเชื้อราทั้งสองชนิดนี้มาทดลองผลิตเอนไซม์โปรทีเอสโดยใช้รำข้าว ซึ่งเป็นผลิตผลพลอยได้จากการสีข้าวที่มีราคาถูกและมีปริมาณมากเป็นวัตถุดิบ และศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรทีเอสที่ผลิตขึ้น

วัตถุประสงค์ของการทดลอง

1. เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรทีเอสจากข้าวได้ในปริมาณสูง
2. เพื่อศึกษาสมบัติของโปรทีเอสที่ผลิตได้จากเชื้อราที่คัดเลือกแล้ว

เชื้อราที่ใช้ในการทดลอง

Aspergillus oryzae ACM 146F และ Rhizopus oligosporus ACM 145F

วิธีทดลอง

1. การผลิตเอนไซม์ด้วยวิธีการหมักแบบ solid state

นำรำข้าว 12.5 กรัม ผสมกับสารละลายอาหาร Hortico trace element fertilizer ในน้ำกลั่น ร้อยละ 0.01 ปริมาณ 7.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร แบ่งใส่ในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 250 ลูกบาศก์เซนติเมตร 2 ใบในปริมาณเท่าๆ กัน นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที รอให้เย็นแล้วเติมสารละลายสปอร์เชื้อรา 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร นำไปเพาะเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อรา Aspergillus oryzae และ 37 องศาเซลเซียส สำหรับ Rhizopus oligosporus

สารละลายสปอร์เตรียมโดยเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 ลูกบาศก์เซนติเมตรลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อราบริสุทธิ์เจริญอยู่โปเตโตเดกซโตรสอะการ์นาน 3 วัน

2. การวิเคราะห์เอนไซม์

2.1 สารเคมี และ วิธีเตรียม

2.1.1 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 5

2.1.2 สารละลาย bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 3

2.1.3 สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก ร้อยละ 10

2.1.4 สารละลาย A : สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ร้อยละ 2 ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์

2.1.5 สารละลาย B : สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ร้อยละ 0.5

2.1.6 สารละลาย C : ผสมสารละลาย A และสารละลาย B ในอัตราส่วน 50 ต่อ 1

2.1.7 สารละลาย D : สารละลายโฟลิน ซิโอคัลทัวส ฟีนอล 0.1 นอร์มอล

2..2 การสกัดเอนไซม์

เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (2.1.1) 100 ลูกบาศก์เซนติเมตรลงในขวดแก้วรูปชมพู่ที่มีเชื้อราที่เพาะจากข้อ 1. ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย Virtis homoginizer แล้วสกัดเอนไซม์ออกโดยใช้ rotary shaker ด้วยความเร็ว 70 ถึง 80 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง นำส่วนผสมที่มีเอนไซม์อยู่ไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง แล้วแยกส่วนที่เป็นของเหลวไปวิเคราะห์ต่อไป

2.3 วิธีวิเคราะห์

หาปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาการย่อยโปรตีนของเอนไซม์โปรทีเอส โปรตีนที่ใช้ คือ สารละลาย bovine serum albumin (BSA) (2.1.2) เติมสารละลาย BSA 0.265 ลูกบาศก์เซนติเมตร และสารละลายเอนไซม์ (ที่สกัดได้จากข้อ 2.2) 0.2 ลูกบาศก์เซนติเมตร ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก นำไปแช่ในอ่างน้ำที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (2.1.3) ลงไป 0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร เพื่อยุติปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรทีเอส แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง แยกเอาส่วนของเหลวใสที่มีไทโรซีนละลายอยู่ไปวิเคราะห์ต่อด้วยปฏิกิริยาโฟลิน

ปฏิกิริยาโฟลินทำโดยนำของเหลวใสที่ได้ 0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตรมาเติมน้ำกลั่นปริมาตรเท่ากันลงในหลอดทดลองขนาด 10 ลูกบาศก์เซนติเมตร เติมสารละลาย C 3 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เติมสารละลาย D 0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้อีก 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ แล้วนำไปเทียบกับการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นเดียวกันของสารละลายมาตรฐานไทโรซีนที่มีความเข้มข้น 0 ถึง 0.184 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

2.4 การคำนวณ

นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณปริมาณไทโรซีนโดยเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน แล้วนำมาคำนวณเป็นหน่วยโปรทีเอสแอกทิวิตี (PU) 1(PU) เท่ากับ 1 นาโนโมลของไทโรซีนที่ผลิตขึ้นมาภายในเวลา 45 นาที ตามวิธีในข้อ 2.3

3. ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ

ทำการวิเคราะห์ดังในข้อ 2.2 ส่วนโปรตีนใช้สารละลาย BSA ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 ตามลำดับและสารละลาย BSA ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0

4. ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ทำการวิเคราะห์ ดังในรูปข้อ 2.2 แต่อุณหภูมิที่ใช้เปลี่ยนเป็น 30 40 50 60 และ 70 องศาเซลเซียส

ผลการทดลอง

การผลิตเอนไซม์โปรทีเอสโดยการหมักแบบ solid state

จากการทดลองพบว่า Aspergillus oryzae ACM 146F ผลิตเอนไซม์โปรทีเอสจากรำข้าวได้มากกว่า Rhizopus oligosporus ACM 145F หลังจากการหมักผ่านไป 24 ชั่วโมง ดังแสดงในรูปที่ 1 นอกจากนี้ Aspergillus oryzae ยังผลิตเอนไซม์โปรทีเอสจากรำข้าวได้สูงสุดเท่ากับ 4.9 x 10^5 PU ต่อรำข้าว 1 กรัม หลังจากการหมักผ่านไป 168 ชั่วโมง ในขณะที่ Rhizopus oligosporus ผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเท่ากับ 2.0 x 10^5 PU ต่อรำข้าว 1 กรัม เมื่อการหมักผ่านไป 72 ชั่วโมง

หลังการหมัก 72 ชั่วโมง Rhizopus oligosporus ผลิตเอนไซม์โปรทีเอสในปริมาณที่ลดลงในขณะที่ Aspergillus oryzae ผลิตเอนไซม์ได้เพิ่มขึ้นเล็กน้อย การผลิตเอนไซม์ของ Rhizopus oligosporus มีความคล้ายคลึงกับการผลิตเอนไซม์โดยเชื้อราที่ศึกษาโดย Wang และคณะ (1974) Padmanabhan และคณะ (1993) และ Ikasari และ Mitchell (1994) คือ เอนไซม์จะผลิตได้มากที่สุดเมื่อการหมักผ่านไป 72 ชั่วโมง แล้วหลังจากนั้นการผลิตก็จะลดลงไปเรื่อย ๆ ทั้งนี้อาจเรื่องมาจาก หลังจากหมักรำข้าวไปได้ 72 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่างของรำข้าวจะเปลี่ยนแปลงไปซึ่งอาจจะไม่เหมาะสมต่อการผลิตโปรทีเอสโดย Rhizopus oligosporus จึงทำให้การผลิตเอนไซม์ลดลง ในทางตรงกันข้ามการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างนี้อาจมีผลกระทบต่อเชื้อรา Aspergillus oryzae น้อย การผลิตเอนไซม์จึงยังคงดำเนินต่อไปหลังจากการหมักผ่านไป 72 ชั่วโมง

การทำงานของเอนไซม์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ

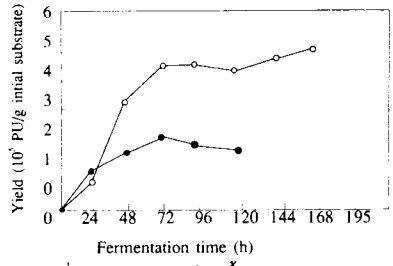
เอนไซม์โปรทีเอสที่ผลิตโดยเชื้อราทั้งสองชนิดทำงานได้ดีที่สุดเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 2.0 (รูปที่2) ผลการทดลองนี้คล้ายกับการศึกษาของ Wang และ Hesseltine (1970) ซึ่งพบว่า เอนไซม์โปรทีเอสที่ผลิตโดยเชื้อรา Rhizopus oligosporus ทำงานน้ำได้ดีที่สุดเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ระหว่าง 2.5 ถึง 3.0 สำหรับ Rhizopus rhizopodiformis, Rhizopus SMC และ Aspergillus niger F2078 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมคือ 3.0 3.5 และ 3.7 ตามลำดับ [Wang และ Hesseltine 1970 Schindler และคณะ (1983) Ramamurthy และคณะ (1991)] และ Singh และคณะ (1994) แสดงให้เห็นว่าโปรทีเอสที่ผลิตโดยเชื้อราหลายชนิดเหมาะสำหรับนำมาใช้ที่สภาวะเป็นกรด

การทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

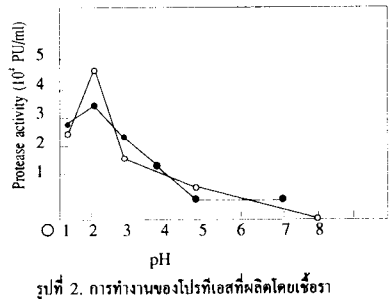
โปรทีเอสที่ผลิตโดยเชื้อราทั้งสองทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเหมือนกันดังแสดงในรูปที่ 3 การทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ [Wang และ Hesseltine (1970) Schindler และคณะ (1983) Ramamurthy และคณะ (1991) และ Singh และคณะ (1994)] ได้กล่าวว่า อุณหภูมิที่โปรทีเอสซึ่งผลิตโดย Rhizopus oligosporus, Rhizopus rhizopodiformis, Rhizopus SMC และ Aspergillus niger F2078 ทำงานได้ดีที่สุด คือ 60 องศาเซลเซียส แสดงว่าโปรทีเอสที่ผลิตโดยเชื้อราอาจนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ เนื่องจากอุตสาหกรรมอาหารหลายชนิดนิยมฆ่าจุลินทรีย์ที่อาจปนมากับผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า

สรุป

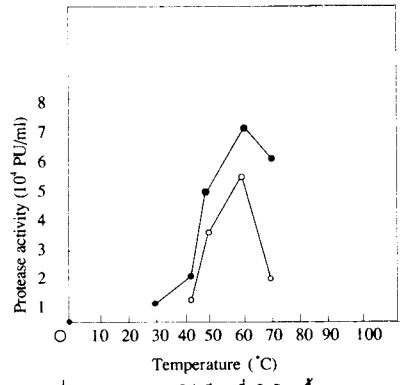
Aspergillus oryzae ACM 146F ผลิตเอนไซม์โปรทีเอสจากรำข้าวได้ในปริมาณที่มากกว่า Rhizopus oligosporus ACM 145F แต่ใช้เวลาในการหมักนานกว่า ในขณะที่ Rhizopus oligosporus ใช้เวลาสั้นกว่า โปรทีเอสที่ผลิตโดยเชื้อราทั้งสองชนิดนี้มีสมบัติเหมือนกันคือ เป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีที่สภาวะเป็นกรดและอุณหภูมิสูง



รูปที่ 1. การผลิตเอนไซม์โดยเชื้อรา Aspergillus oryzae [O] และ Rhizopus oligosporus [●]



รูปที่ 2. การทำงานของโปรทีเอสที่ผลิตโดยเชื้อรา Aspergillus oryzae[O] และ Rhizopus oligosporus [●] ที่สภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่าง ๆ



รูปที่ 3. การทำงานของโปรทีเอสที่ผลิตโดยเชื้อรา Aspergillus oryzae[O] และ Rhizopus oligosporus [●] ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

Aspergillus oryzae ACM 146F มีแนวโน้มที่จะนำมาผลิตเอนไซม์โปรทีเอสจากรำข้าวในระดับอุตสาหกรรมได้ เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมากพอควร แต่ยังต้องมีการศึกษา

สมบัติต่าง ๆ อีกหลายอย่างเพื่อให้แน่ใจว่าโปรทีเอสที่ผลิตปลอดภัยเหมาะกับการใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร นอกจากนี้เชื้อรา Rhizopus oligosporus ก็สมควรแก่การนำมาผลิตเอนไซม์ เนื่องจากพบว่าราชนิดนี้ไม่สร้างสารพิษ ถึงแม้ว่าผลผลิตที่ได้จะน้อยกว่า แต่ถ้าศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างโปรทีเอสก็เป็นไปได้ที่จะผลิตในระดับอุตสาหกรรม

เอกสารอ้างอิง

Ikasari, L.and Mitchell, DA. Protease Production by Rhizopus Oligosporus in solid state fermentation. World Journal Microbiology Biotechnology. 1994, Vol. 10, no. 8, p.320-324.

Padmanabhan, S., Murthy, MVR. and Lonsane, BK. Potential of Aspergillus oryzae CFTRI 1480 for producing protrinase in high titres by solid state fermentation. Applied Microbiology Biotechnology, 1944, vol. 40, p. 499-503

Ramamurthy, V., Upadhyay, CM. and Kothari, RM. An optimized protocol for the preparation and application of acid protease. Journal Biotechnology, 1991, vol. 21, p. 187-196.

Schindler, J, Lehmann, R., Pfeiffer, H. and Schmid, R. Extracellular acid protease of Rhizopus rhizopodiformis, by RM Lafferty. Berlin : Spinger-Verlag, 1983. p. 69-77.

Singh, A., Ghosh, VK. and Ghosh, P. Production of thermostable acid protease by Aspergillus niger. Lettere in Applied Microbiology, 1994, vol. 18, P. 177-180

Wang., HL. & Hesseltine, CW. Multiple forms of Rhizopus oligosporus Protease. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1970, Vol. 140, p. 459-463.

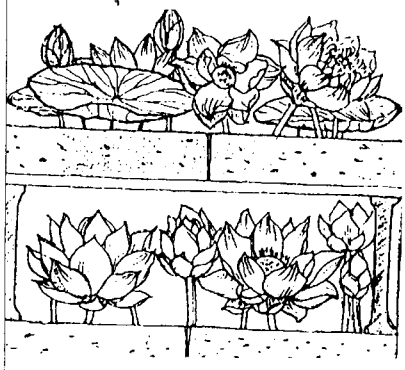
Wang., HL., Vespa, JB. and Hesseltine, CW. Acid protease production by fungi used in soybean food fermentation. Applied Microbiology, 1974, vol. 27, no. 5, p. 906-911.

การเผาสีบนเคลือบ

(ต่อจากหน้า 5)

- เผาที่อุณหภูมิ 930 °ซ. ระยะเวลาเผาประมาณ $5\frac{1}{2}$ ชั่วโมง
- เผาที่อุณหภูมิ 800 °ซ. ระยะเวลาเผาประมาณ 5 ชั่วโมง

ในการจัดวางผลิตภัณฑ์เพื่อเผาสีให้จัดวางแบบเดียวกับการจัดเพื่อเผาเคลือบ ใช้อุปกรณ์สำหรับรองรับชิ้นงาน ใบและก้านใช้ลวดทนไฟปักบนอิฐทนไฟรองรับแบบสามมุม



การจัดวางผลิตภัณฑ์สำหรับเผา

ในการตกแต่งสีบนเคลือบที่มีอุณหภูมิต่างกันให้ตกแต่งสีที่มีอุณหภูมิสูงกว่าก่อนเผาแล้วจึงนำมาตกแต่งสีอุณหภูมิต่ำกว่าอีกครั้ง จึงจะได้สีสวยงามตามที่ต้องการ

ผลงานสำเร็จ

การประกอบชิ้นส่วน

เมื่อชิ้นส่วนของดอกบัวหลวงสำเร็จเรียบร้อยดีแล้ว จึงเป็นขั้นตอนการประกอบดอก นำชิ้นส่วนของดอก ฝักและใบมาติดประกอบกับก้านด้วยกาวที่มีสมบัติที่แห้งเร็วและเนื้อกาวที่ยึดแน่นเพื่อเชื่อมส่วนที่มีช่องว่างเล็กน้อยของดอกและก้าน

ข้อเสนอแนะ

ในการจัดดอกบัวหลวงเซรามิกประดับแจกัน หรืออ่างบัว ควรเลือกแจกันและอ่างบัวที่มีน้ำหนักรับแรงถ่วงของดอกบัวเซรามิกได้ โดยเฉพาะในแจกันและรังผึ้ง ต้องใช้ดินน้ำมันอัดเอาไว้เพื่อกันก้านดอกบัวโอนเอนจากน้ำหนักของดอกและใบ