บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสที่ทนอุณหภูมิสูง

เมื่อทำการคัดแยกแบคทีเรียทนร้อนที่สามารถสร้างโปรติเอสจากตัวอย่างดินและน้ำ จำนวน 23 ตัวอย่าง (รายละเอียดดังตารางที่ 4.1) พบว่ามีแบคทีเรีย 42 ไอโซเลตที่สร้างโปรติเอสโดยสังเกตจากการเกิดวงใสรอบโคโลนีเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง BY ที่มี 1 % สกิมมิลค์ (ตารางที่ 4.2) ต่อมาได้คัดกรองแบคทีเรียโดยการเปรียบเทียบขนาดความกว้างของวงใสเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง BY ที่มี 1 % สกิมมิลค์ พบว่ามีเพียง 12 ไอโซเลตเท่านั้นที่มีความกว้างตั้งแต่ 0.25 ซม. ขึ้นไปดังตารางที่ 4.3 และเมื่อนำมาตรวจสอบแอคติวิตีได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.1 และคัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลต RW60-6 ซึ่งมีแอคติวิตีสูงที่สุดไปทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรติเอส และการทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์บางส่วนต่อไป

ตารางที่ 4.1 สถานที่เก็บและลักษณะของตัวอย่างที่จะนำมาทำการทดลอง

ตัวอย่างที่	สถานที่เก็บ	ลักษณะตัวอย่าง	จำนวน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	pH
1	สวนรุกขชาติรักษะวาริน อ.เมือง จ.ระนอง	น้ำ	1	65	7.4
2	สวนรุกขชาติรักษะวาริน อ.เมือง จ.ระนอง	น้ำ	1	60	7.4
3	สวนรุกขชาติรักษะวาริน อ.เมือง จ.ระนอง	น้ำ	1	56	7.2
4	สวนรุกขชาติรักษะวาริน อ.เมือง จ.ระนอง	น้ำ	1	46	7.2
5.	สวนรุกขชาติรักษะวาริน อ.เมือง จ.ระนอง	ดินห่างจากบ่อ 5 เมตร	1	-	-
6	สวนรุกขชาติรักษะวาริน อ.เมือง จ.ระนอง	ดินห่างจากบ่อ 25 เมตร	1	-	-
7	บ่อน้ำเค็มร้อน ต.ห้วยน้ำขาว อ.คลองท่อม จ.กระบี่	น้ำ	3	45	7.4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวอย่างที่	สถานที่เก็บ	ลักษณะตัวอย่าง	จำนวน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	pH
8	น้ำตกร้อน ต.คลองท่อมใต้ อ.คลองท่อม จ.กระบี่	น้ำ	2	40	7.8
9	บ่อน้ำร้อนแม่กาษา จ.ตาก	ดิน	3	-	-
10	บ่อน้ำร้อน จ.เชียงใหม่	ดิน	2	-	7.5
11	บ่อน้ำร้อน จ.เชียงใหม่	ดิน	1	-	8.0
12	บ่อน้ำร้อน จ.เชียงใหม่	ดิน	1	-	6.0
13	ดินจากโรงงานปลากรอบ จ.สมุทรสาคร	ดิน	4	-	8.0
14	บ่อน้ำร้อน จ.เชียงราย	ดิน	2	-	-

ตารางที่ 4.2 แสดงจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียที่แยกจากตัวอย่าง

ตัวอย่างที่	สถานที่เก็บ	จำนวนไอโซเลตที่แยกได้	รหัสที่ใช้กับกลุ่มของไอโซเลต
1	สวนรุกขชาติรักษะวาริน อ.เมือง จ.ระนอง	9	RW60, RW56, RS5
2	น้ำตกร้อน ต.คลองท่อมใต้ อ.คลองท่อม จ.กระบี่	2	KW40
3	บ่อน้ำร้อนแม่กาษา จ.ตาก	13	TA, TB, TC
4	บ่อน้ำร้อน จ.เชียงใหม่	6	CH1, CH2, CH3, CH4
5	ดินจากบ่อกุ้ง	2	SH
6	ดินจากโรงงานปลากรอบ จ.สมุทรสาคร	4	SS
7	บ่อน้ำร้อน จ.เชียงราย (ธีรารัตน์ นาประดิษฐ์ 2544)	6	TN
	รวม	42	

ตารางที่ 4.3 แสดงขนาดความกว้าง Clear zone ring ของแต่ละไอโซเลตบนอาหารแข็ง BY ที่มี1% สกิมมิลค์

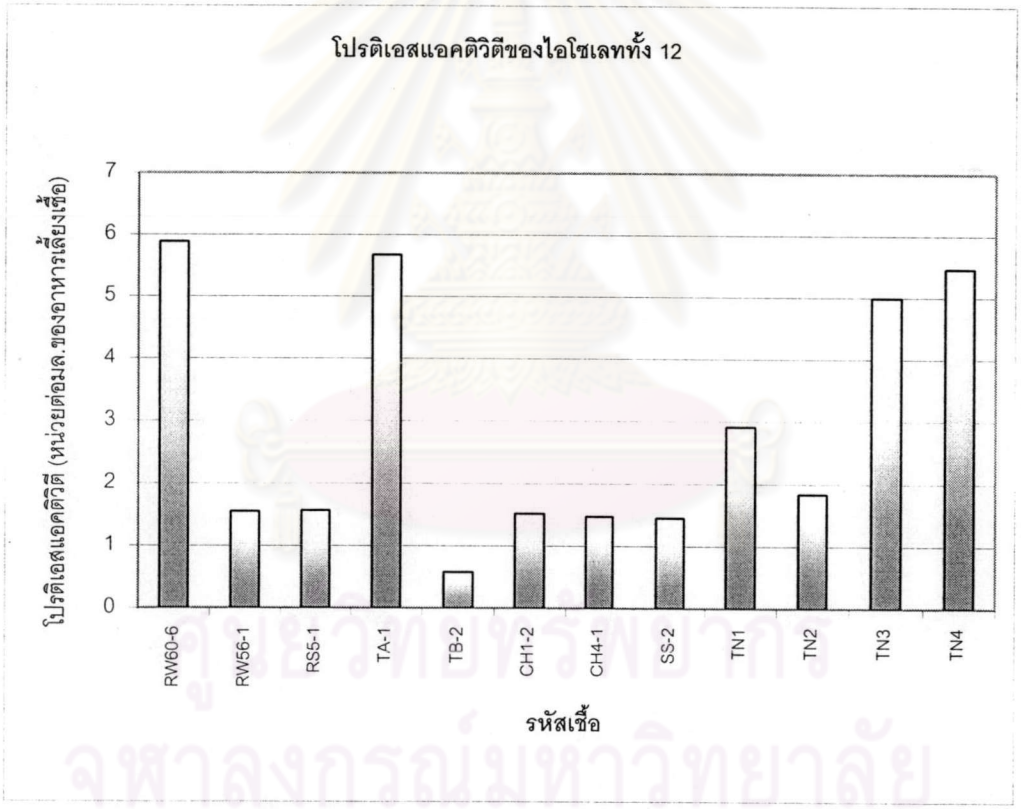
รหัสเชื้อ	ขนาดของ Clear zone ring (ซม.)
RW 60-1	0.075
RW 60-2	0.075
RW 60-3	0.225
RW 60-4	-

รหัสเชื้อ	ขนาดของ Clear zone ring (ซม.)
RW 60-5	-
RW 60-6	0.65
RW 56-1	0.25
RW 56-2	0.15
KW 40-1	-
KW 40-2	-
RS 5-1	0.25
TA-1	0.30
TA-2	-
TA-3	0.15
TA-4	-
TA-5	-
TA-6	0.15
TB-1	0.15
TB-2	0.30
TB-3	-
TC-1	0.15
TC-2	-
TC-3	0.10
TC-5	0.075
CH1-1	0.10
CH1-2	0.30
CH1-3	0.05
CH1-4	0.20
CH4-1	0.35
CH4-2	0.125
SS-1	0.20
SS-2	0.35
SS-3	0.20
SS-4	0.20
SH-1	-
SH-2	-
TN1	0.25
TN2	0.25

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

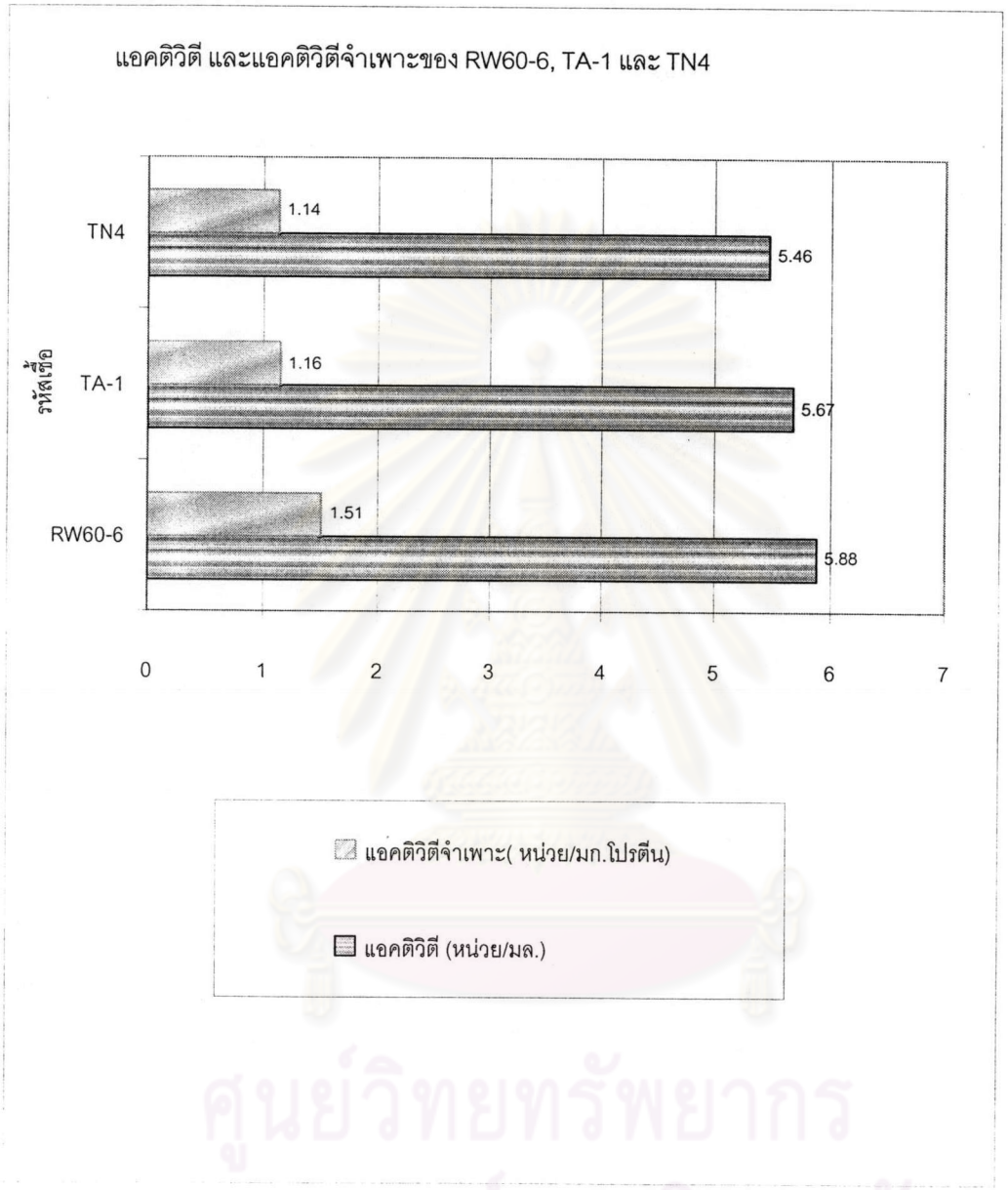
รหัสเชื้อ	ขนาดของ Clear zone ring (ซม.)
TN3	0.70
TN4	0.70
TN5	0.20
TN6	0.20

ไอโซเลตที่มีขนาดความกว้างของ clear zone ring ตั้งแต่ 0.25 ซม.ขึ้นไปคือ RW60-6, RW56-1, RS5-1, TA-1, TB-2, CH1-2, CH4-1, SS-2, TN1, TN2, TN3 และ TN4 เมื่อนำมาตรวจสอบแอคติวิตีของโปรติเอสโดยวิธี casein digestion (Millet, 1970) ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงแอคติวิตีของแบคทีเรียที่สร้าง clear zone ring ขนาดกว้างตั้งแต่ 0.25 ซม.

จากรูปที่ 4.1 ไอโซเลตที่มีแอคติวิตีสูงที่สุด คือ RW60-6, TA-1 และ TN4 ซึ่ง RW60-6 มีแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุดดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงโปรติเอสแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะของ RW60-6, TA-1 และ TN4

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การศึกษาลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่คัดได้

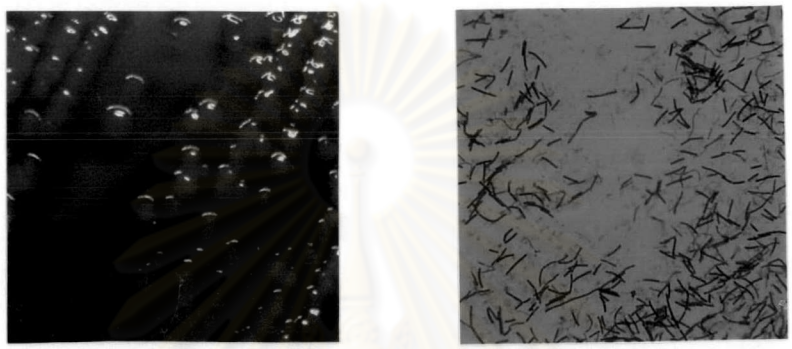
4.2.1 นำเชื้อที่คัดเลือกจากข้อ 4.1 มาตรวจดูรูปร่างลักษณะของเชื้อ

ตารางที่ 4.4 ลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียไอโซเลตRW60-6,TA-1 และ TN4

รหัสเชื้อ	RW60-6	TA-1	TN4
ลักษณะของโคโลนีบนอาหารแข็ง BY ที่มี 1%สกิมมิลค์	สีขาวหรือสีน้ำตาลอ่อน โคโลนีรูปร่างกลม ขอบหยัก มีก้อนนูนตรงกลาง (umbonate) เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0-5.0 มม.	สีขาว โคโลนีรูปร่างกลม ขอบหยัก มีรอยบุ๋ม ตรงกลาง (crateriform) เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0-5.0 มม.	สีน้ำตาลอ่อน, โคโลนีรูปร่างกลม ขอบหยัก แบนราบ (flat) เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.0-5.0 มม.
รูปร่างเซลล์	แท่ง	แท่ง	แท่ง
การติดสีGram	+	+	+
ขนาด (micrometre)	0.5-0.75 x 4-7	0.75 x 3-5	1 x 3-5
เอนโดสปอร์	มีทางด้านปลายเซลล์	มีทางด้านปลายเซลล์	มีทางด้านปลายเซลล์
การเคลื่อนที่	เคลื่อนที่ได้	เคลื่อนที่ได้	เคลื่อนที่ได้

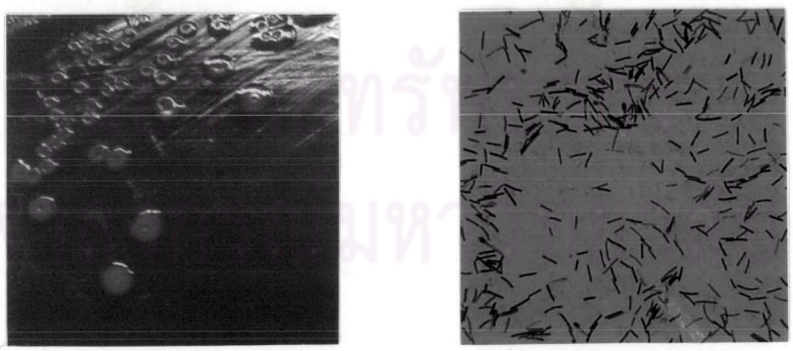
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง BY ที่มี 1%สกิมมิลค์ และการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียตัวอย่าง RW60-6, TA-1 และ TN4 แสดงดังรูปที่ 4.3, 4.4 และ 4.5 ตามลำดับ



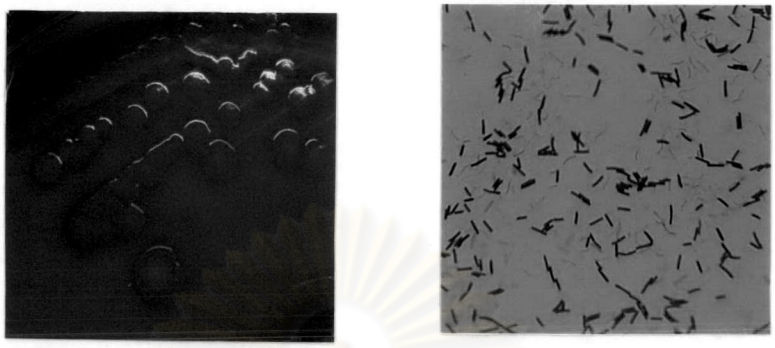
(ก) (ข)

รูปที่ 4.3 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง (ก) และการติดสีแกรมบวกของไอโซเลต RW60-6 (ข)



(ก) (ข)

รูปที่ 4.4 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง (ก) และการติดสีแกรมบวกของไอโซเลต TA-1 (ข)



(ก) (ข)

รูปที่ 4.5 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง (ก) และการติดสีแกรมบวกของไอโซเลต TN4 (ข)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้น

ตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของไอโซเลตทั้งสามได้ผลดังตาราง

ตารางที่ 4.5 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้น ของแบคทีเรีย RW60-6, TA-1 และ TN4

ลักษณะที่ทดสอบ	RW60-6*	TA-1*	TN4*	*Bacillus sp.***
เอนโดสปอร์	+	+	+	+
การเคลื่อนที่	+	+	+	+
Strict aerobes	-	-	-	D
Facultative	+	+	+	D
Strict anaerobes	-	-	-	-
แคตาเลส	+	+	+	+
ออกซิเดส	+	+	+	D
การผลิตแก๊สจากกลูโคส	+	+	+	+
การทดสอบไนเตรต	-	+	-	D

* + = ให้ผลบวก, - = ให้ผลลบ

** ผลการทดสอบจาก Bergey's manual of Determinative Bacteriology (9th edttion) (1994)

+ = ให้ผลบวก มากกว่า 90% ของจำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดที่ค้นพบ,

- = ให้ผลลบ มากกว่า 90% ของจำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดที่ค้นพบ,

D = มีความแตกต่างในแต่ละสายพันธุ์

จาก Bergey's manual of Determinative Bacteriology (9th edttion) (1994)สามารถจำแนกไอโซเลตทั้งสามได้ ซึ่งอยู่ใน Genus *Bacillus*

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

นำไอโซเลตทั้งสามมาตรวจสอบลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีเพิ่มเติมตาม Practical handbook of Microbiology (1989) และ Bergey's manual of Systematic Bacteriology (1986) ซึ่งอาจสามารถจำแนกไอโซเลตทั้งสามเป็น *Bacillus stearothermophilus* โดยอาศัยลักษณะสมบัติดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรีย RW60-6, TA-1 และ TN4

ลักษณะที่ทดสอบ	RW60-6*	TA-1*	TN4*	*B. stearothermophilus***
เซลล์เป็นแท่ง				
กว้าง,μm.	0.5-0.75	0.75	1	0.6-1.0
ยาว,μm.	4-7	3-5	3-5	2-3.5
การติดสีแกรม	+	+	+	v
สปอร์				
Ellipsoidal	+	+	+	+
Central or paracentral	-	-	-	-
Subterminal or terminal	+	+	+	+
Sweling the sporangium	+	+	+	+
การเคลื่อนที่	+	+	+	+
แคตะเลส	+	+	+	a
การเจริญในภาวะไร้อากาศ	-	-	-	-
การทดสอบV-P	-	-	-	-
pH ในอาหารเหลว V-P	5.4	5.1	5.3	4.8-5.8
การเจริญที่อุณหภูมิ, °C				
30	-	-	-	-
40	+	+	-	+
45	+	+	+	+
50	+	+	+	+
55	+	+	+	+
60	+	+	+	+
65	+	+	+	+
การเจริญใน				
อาหารที่มี pH 5.7	-	-	-	-
5% NaCl	-	+	-	b
10% NaCl	-	-	-	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลักษณะที่ทดสอบ	RW60-6*	TA-1*	TN4*	*B. stearothermophilus***
การเกิดกรดจาก				
กลูโคส	+	+	+	+
อาราบิโนส	-	-	-	b
ไซโลส	+	+	-	a
แมนนิทอล	-	-	+	b
การเกิดแก๊สจาก การหมักน้ำตาล	-	-	-	-
การย่อยแป้ง	+	+	+	+
การใช้ซิเตรต	-	-	-	-
การทดสอบไนเตรต	-	+	+	a
การผลิตอินโดล	-	-	-	-
การย่อยเคซีน	+	+	+	a

* + = ให้ผลบวก, - = ให้ผลลบ

** ผลการทดสอบจาก Practical handbook of Microbiology (1989)

+ = ให้ผลบวก ตั้งแต่ 85-100% ของจำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดที่ค้นพบ,

- = ให้ผลบวก ตั้งแต่ 0-14 % ของจำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดที่ค้นพบ,

a = ให้ผลบวก ตั้งแต่ 50-84% ของจำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดที่ค้นพบ,

b = ให้ผลบวก ตั้งแต่ 15-49% ของจำนวนสายพันธุ์ทั้งหมดที่ค้นพบ,

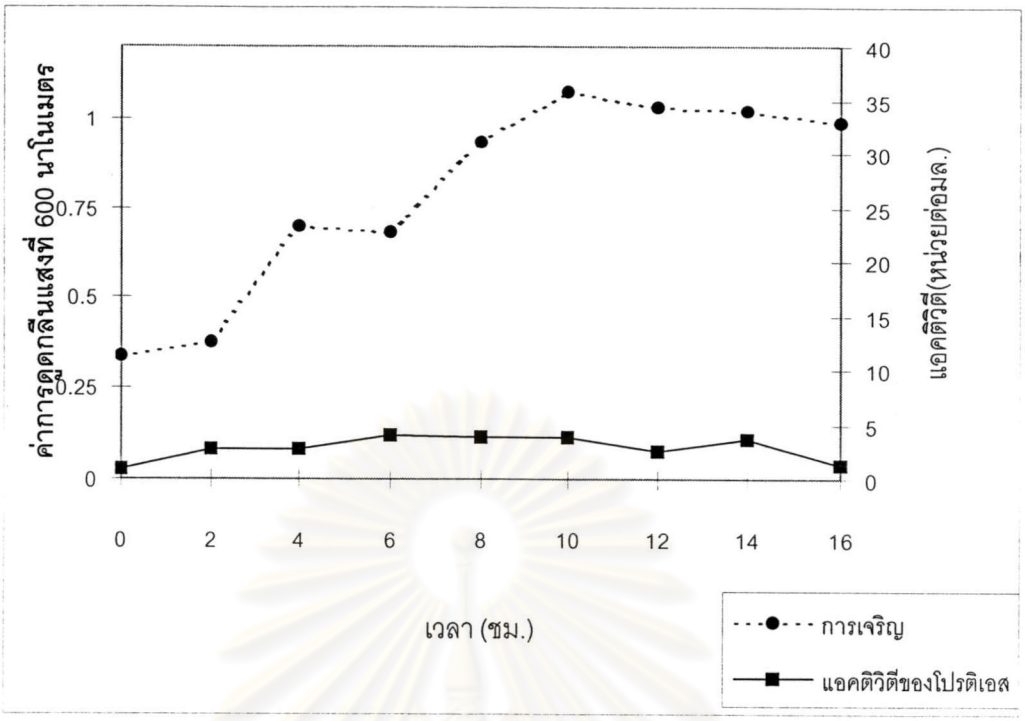
v = มีความแตกต่างในแต่ละสายพันธุ์

4.3 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรติเอส

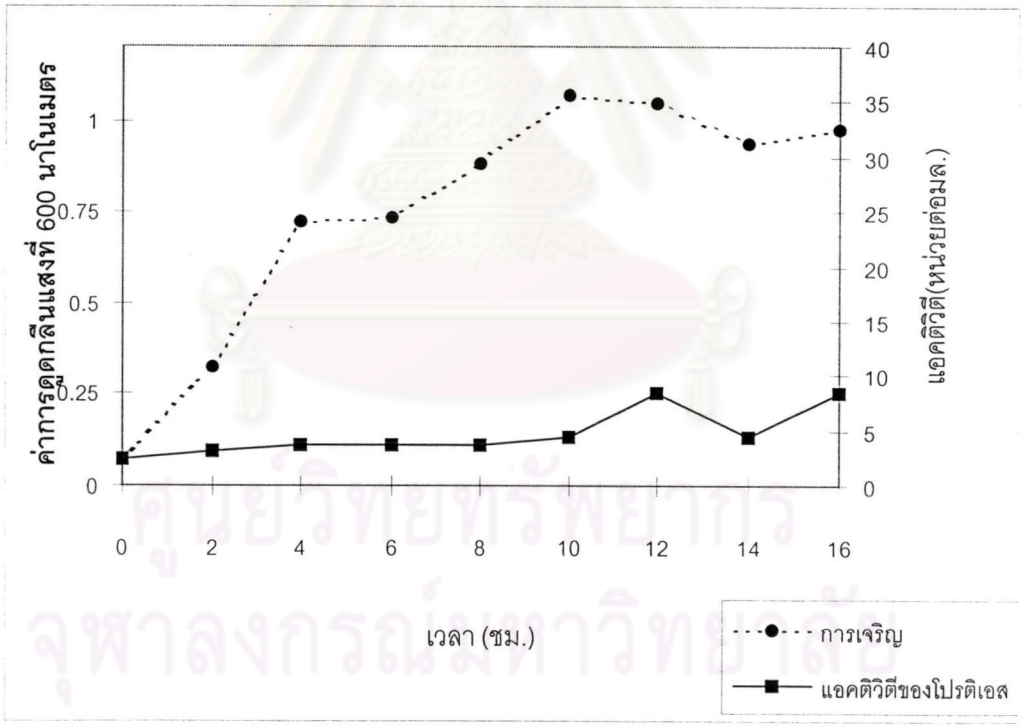
ในการทดลองนี้ได้คัดเลือกเชื้อที่มีแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดคือRW60-6มาทดลองเพียงเชื้อเดียว

4.3.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตโปรติเอส

เลี้ยงเชื้อ RW60-6 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระบุข้อ 3.1.1 ที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส โดยกำหนดให้ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 และใช้เซลล์เริ่มต้นที่มีอายุและปริมาณที่เท่ากัน ตรวจสอบการเจริญโดยวัดความขุ่นของเซลล์ด้วยความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของโปรติเอส ทุกๆ 2 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.6 และ 4.7

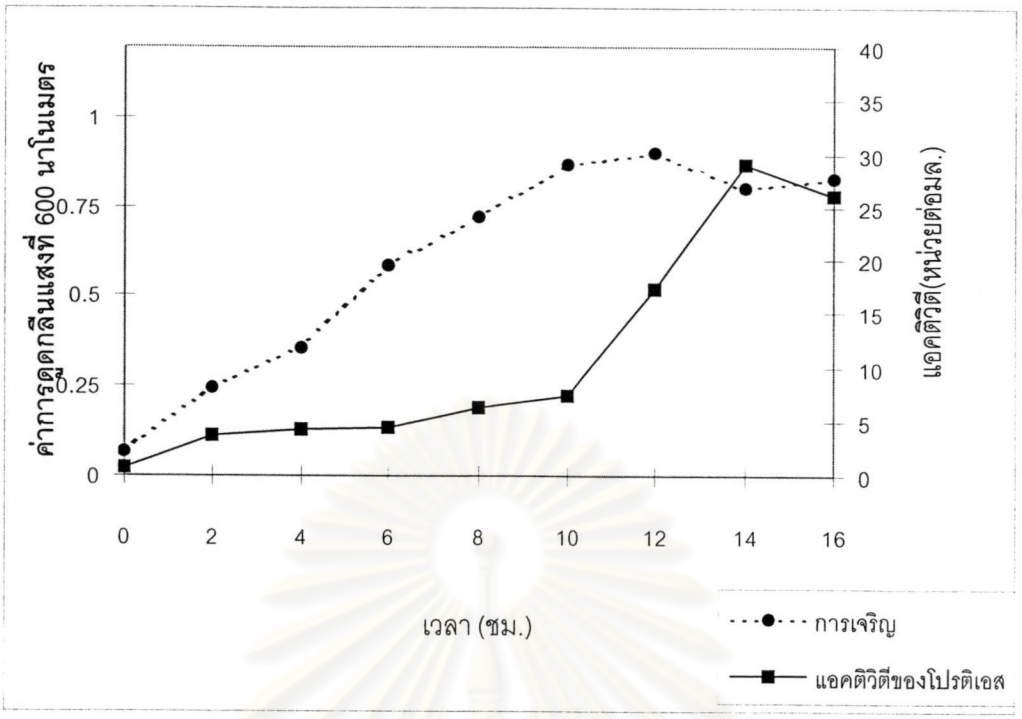


(ก)

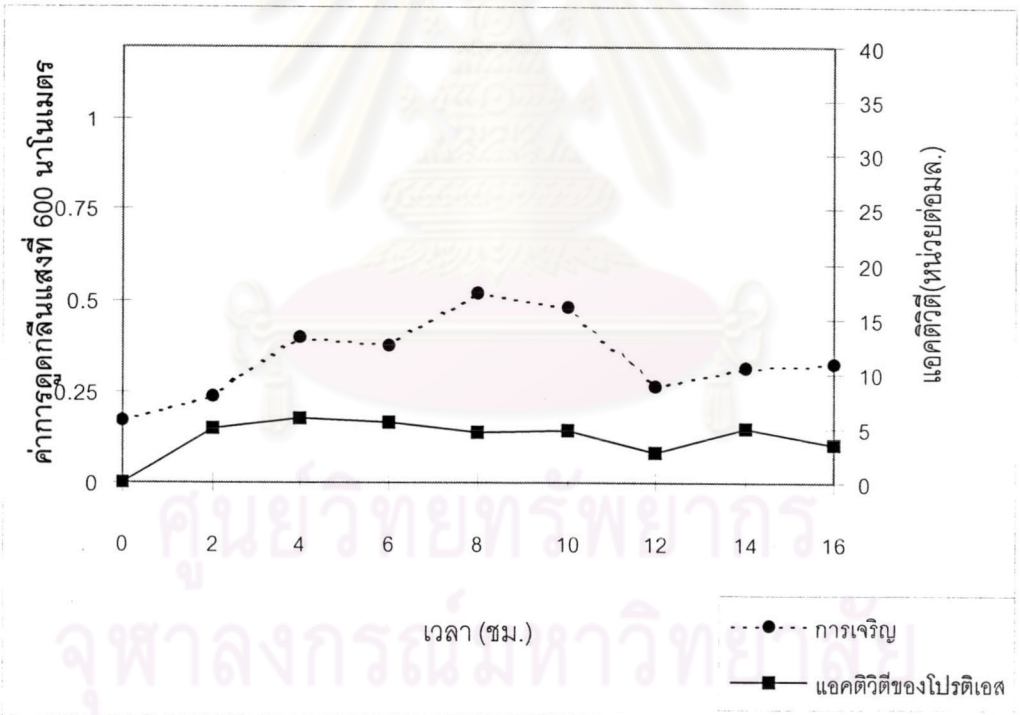


(ข)

รูปที่ 4.6 กราฟแสดงการเจริญและแอคติวิตีของ RW60-6 ณ เวลาต่างๆ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (ก) และ 60 องศาเซลเซียส (ข)



(ก)



(ข)

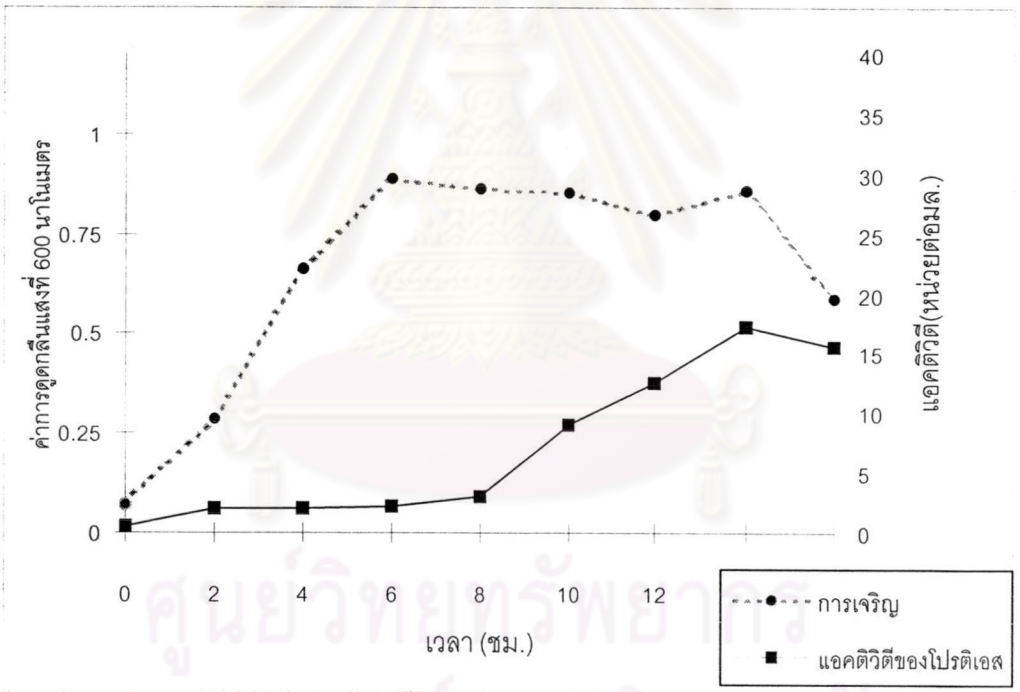
รูปที่ 4.7 กราฟแสดงการเจริญและแอคติวิตีของ RW60-6 ณ เวลาต่างๆ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส (ก) และ 70 องศาเซลเซียส (ข)

จากการทดลองพบว่า เชื้อ RW60-6 ผลิตโปรติเอสได้ดีที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 14 ชม. จึงใช้สภาวะเลี้ยงนี้ในการทดลองขั้นต่อไป

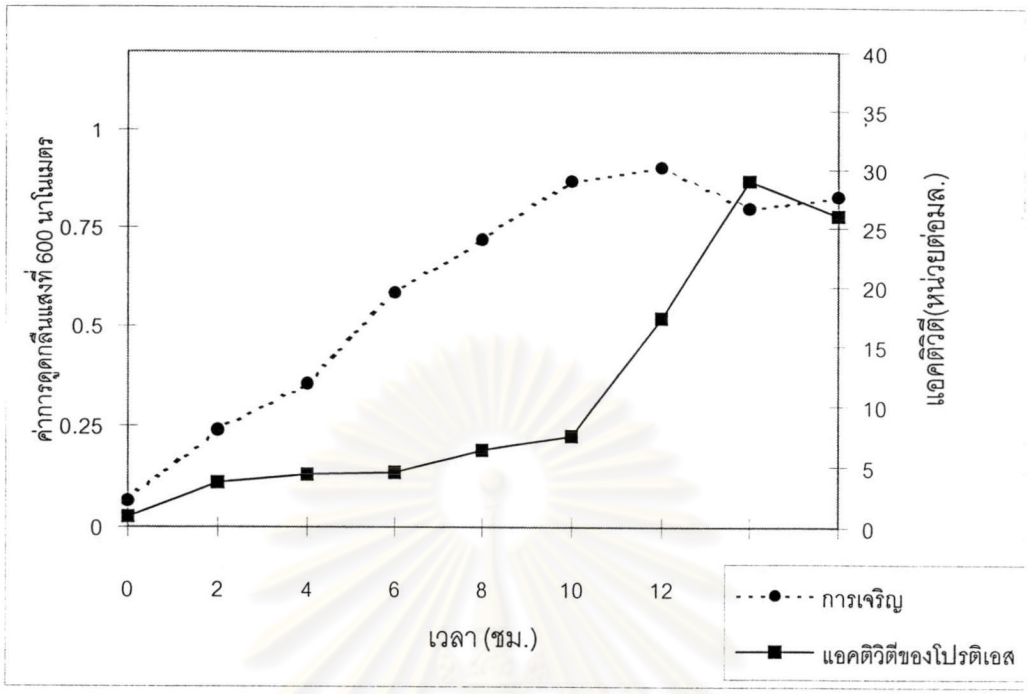
4.3.2 pH ที่เหมาะสมในการผลิตโปรติเอส

นำเชื้อ RW60-6 มาเพาะเลี้ยงโดยกำหนดให้อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเป็น 65 องศาเซลเซียสและใช้เซลล์เริ่มต้นที่มีอายุและปริมาณที่เท่ากัน แปร pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.0, 7.0 และ 8.0 ตรวจสอบการเจริญโดยวัดความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของโปรติเอสทุกๆ 2 ชม. ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.8 และ 4.9

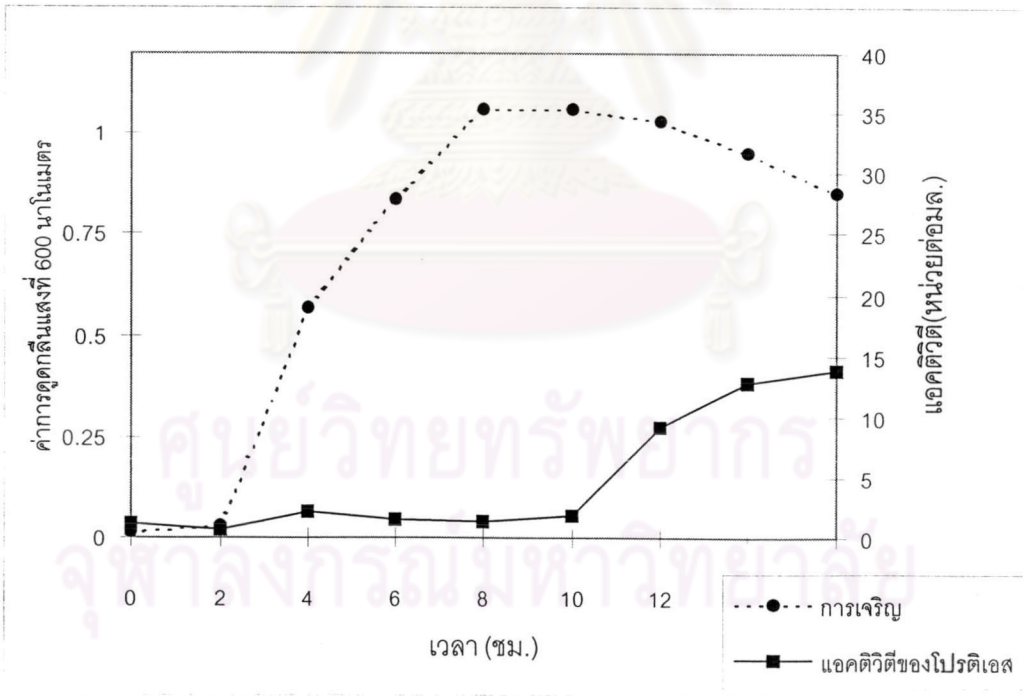
จากการทดลองพบว่า สภาวะที่เชื้อ RW60-6 ผลิตโปรติเอสได้ดีที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส pHเริ่มต้นของอาหาร 7.0 ใช้เวลา 14 ชม. จึงใช้สภาวะเลี้ยงนี้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 4.8 กราฟแสดงการเจริญและแอคติวิตีของ RW60-6 ณ เวลาต่างๆ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้น 6.0



(ก)



(ข)

รูปที่ 4.9 กราฟแสดงการเจริญและแอคติวิตีของ RW60-6 ณ เวลาต่างๆ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้น 7.0 (ก) และ 8.0 (ข)

4.4 การทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์บางส่วน

4.4.1 การตกตะกอนโปรติเอสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

<u>การหาช่วงความเข้มข้นอิ่มตัวที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรติเอสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต</u>

นำ crude เอนไซม์ที่เตรียมได้มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียด เพิ่มความเข้มข้นอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมใน crudeเอนไซม์เป็นลำดับส่วนตั้งแต่ 0-80 % แต่ละลำดับส่วน ปล่อยให้แอมโมเนียมซัลเฟตละลายใน crudeเอนไซม์ ประมาณ 2-3 ชม. แล้วนำไปปั่นแยกตะกอน และละลายตะกอนโปรตีนของแต่ละส่วนด้วย 0.05 M ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ pH 7.0 นำตะกอนที่ละลายแล้วไปวัดแอคติวีตีของโปรติเอส เพื่อหาช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เอนไซม์ตกตะกอนแล้ว ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 การหาความเข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรติเอส (Scopes, 1994)

ลำดับส่วนของแอมโมเนียมซัลเฟต (%)	แอคติวิตีของโปรติเอส		ปริมาณโปรตีน		แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมก.โปรตีน)
	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	% แอคติวิตี	โปรตีนทั้งหมด (มก.)	% โปรตีน	
Crude เอนไซม์	1873	100	371.43	100	5.04
0-20	6.26	0.33	1.98	0.53	3.17
20-40	336.25	17.95	39.57	10.65	8.50
40-60	2.04	0.11	61.24	16.49	0.033
60-80	2.53	0.13	37.65	9.97	0.068

จากตารางพบว่าเอนไซม์ส่วนใหญ่ตกตะกอนในช่วงความเข้มข้นอิ่มตัว 20-40 % ของแอมโมเนียมซัลเฟต และมีแอคติวิตีจำเพาะ 8.50 หน่วยต่อมก.โปรตีน

<u>การตกตะกอนโปรติเอสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต</u>

นำ crude เอนไซม์มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัว 20-40 % แล้วนำไปไดอะไลซิส เพื่อกำจัดเกลือแอมโมเนียมออก

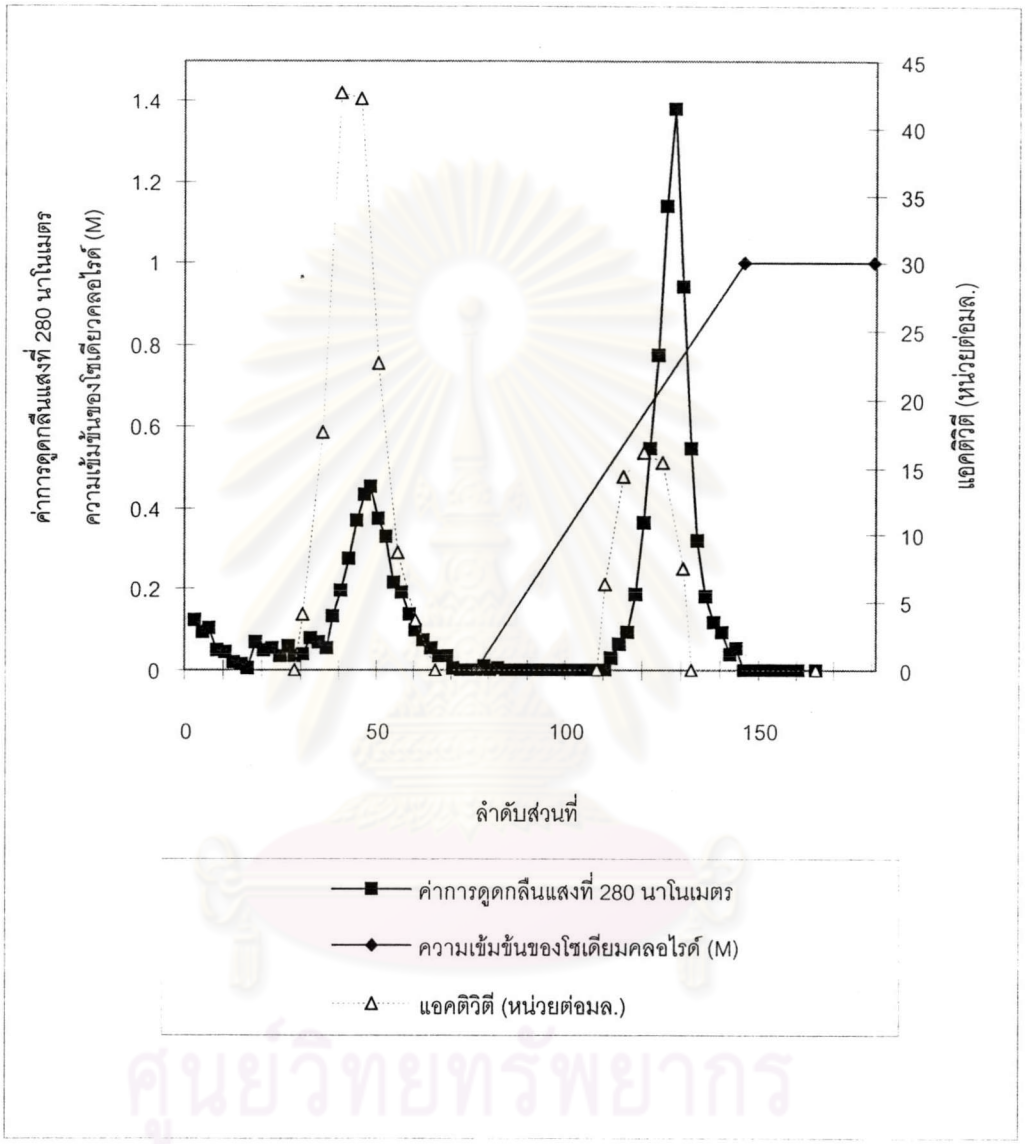
จากการเลี้ยงเชื้อ RW60-6 นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออก เอา crude เอนไซม์มา 100 มล. ซึ่งมีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 581 มก. ได้แอคติวิตีรวม 1937 หน่วย คิดเป็นค่าแอคติวิตี

จำเพาะ 12.94 หน่วยต่อมก.โปรตีน เมื่อนำเอนไซม์มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 20-40 % พบว่ามีค่าแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 4.96 เท่า เมื่อเทียบกับแอคติวิตีจำเพาะใน crude เอนไซม์ และยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 20.20 % นำเอนไซม์ที่ได้นี้ไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี

4.4.2 การทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟี

นำเอนไซม์มาจากการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัว 20-40 % ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 30.24 มก. ละลายอยู่ใน 0.5 M ทริสไฮโดรคลอริค บัฟเฟอร์ pH 7.0 มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีบนดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุลบ (Anion Exchanger)ตามวิธีที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 3.4.3 พบว่าสามารถแยกเอนไซม์ได้เป็นสองชนิดดังรูปที่ 4.12 โดยชนิดที่หนึ่งโปรติเอสส่วนใหญ่ที่ไม่จับกับตัวกลางชนิดนี้ (unbound) จะออกมาจากคอลัมน์ก่อนในลำดับส่วนที่ 30-60 เมื่อรวมลำดับส่วนเข้าด้วยกันและทำให้เข้มข้นขึ้น สามารถวัดปริมาตรรวมได้ 6.1 มล. มีแอคติวิตีทั้งหมด 206.85 หน่วย มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 4.71 มก. แอคติวิตีจำเพาะ 43.96 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 13.16 เท่า และยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 10.68 % เมื่อเปรียบเทียบกับ crude เอนไซม์ ในการทดลองขั้นต่อไปจะเรียกโปรติเอสชนิดนี้ว่า "โปรติเอส U" ส่วนโปรติเอสอีกชนิดหนึ่งนั้นจะจับกับตัวกลาง (bound) ซึ่งสามารถชะออกมาจากคอลัมน์โดยใช้เกรเดียนท์ของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0-1.0 M พบว่าโปรติเอสชนิดนี้จะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ในลำดับส่วนที่ 109-132 ซึ่งมีความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0.45-0.75 M เมื่อรวมลำดับส่วนเข้าด้วยกันและทำให้เข้มข้นขึ้น สามารถวัดปริมาตรรวมได้ 7.5 มล. มีแอคติวิตีทั้งหมด 160.31 หน่วย มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 10.07 มก. แอคติวิตีจำเพาะ 15.92 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4.77 เท่า และยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 8.28 % เมื่อเปรียบเทียบกับ crude เอนไซม์ ในการทดลองขั้นต่อไปจะเรียกโปรติเอสชนิดนี้ว่า "โปรติเอส B"

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.10 การทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

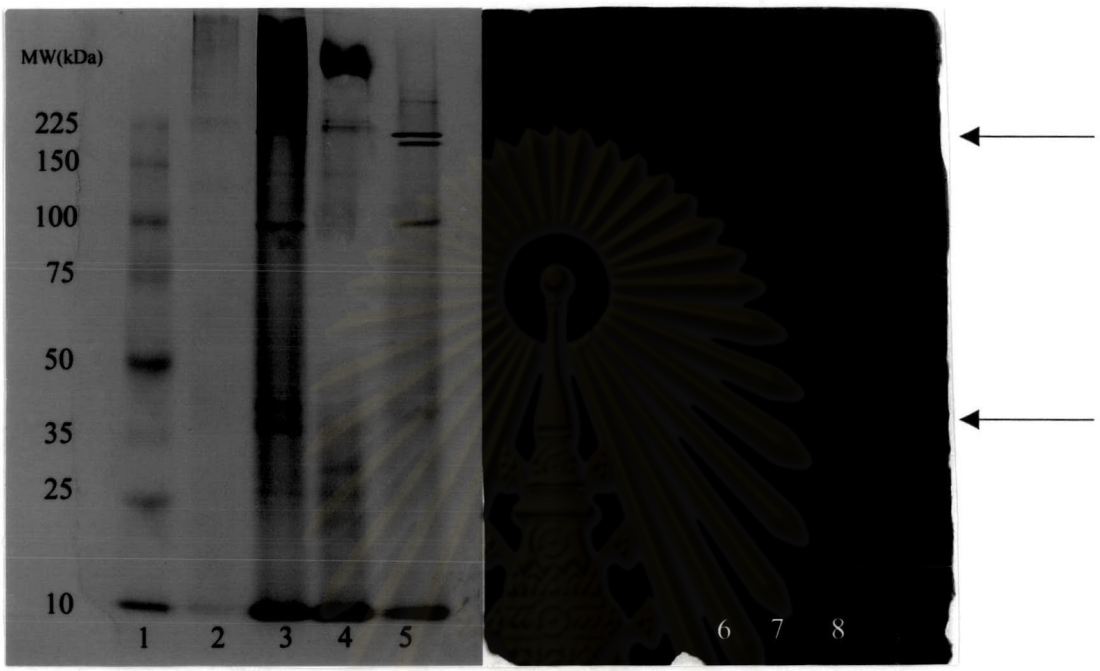
ตารางที่ 4.8 ขั้นตอนการทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์บางส่วน

ลำดับขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มล.)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	โปรตีนทั้งหมด (มก.)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อ มก. โปรตีน)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	ร้อยละของโปรติเอสที่ตรวจพบ
สารสกัดเอนไซม์	100.0	1937.00	581.00	3.33	1.00	100.00
ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้นอิ่มตัว 20-40 %	2.0	391.24	30.24	12.94	3.87	20.20
ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ,โปรติเอส U (unbound)	6.1	206.85	4.71	43.96	13.16	10.68
ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ,โปรติเอส B (bound)	7.5	160.31	10.07	15.92	4.77	8.28

4.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ และการหาน้ำหนักมวลโมเลกุลของโปรติเอส

นำโปรติเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่างๆมาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำ SDS-PAGE (อีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล) และ ย้อมแอคติวิตี นำมาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ได้ผลการทดลองดังรูป 4.11 พบว่าการใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีสามารถกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการออกได้บางส่วน และได้แถบโปรติเอสแอคติวิตี 2 ช่วงและตรงกับแถบโปรตีนหลัก แบ่งโปรติเอสออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง และชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยอาศัยกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล กับระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่บนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิสดังรูปที่ 4.12 ได้ผลว่า โปรติเอสจากแถบโปรตีนหลักด้านบน(ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง) มีน้ำหนักโมเลกุลมีค่าประมาณ 200,000 ดาลตัน (โปรติเอส U) และ 197,000 ดาลตัน (โปรติเอส B) ส่วนโปรติเอสจากแถบโปรตีนหลักด้านล่าง

(ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ) มีค่าน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 33,000 ดาลตัน (โปรติเอส U) และ 35,000 ดาลตัน (โปรติเอส B)



รูปที่ 4.11 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรติเอสโดยการทำ SDS-PAGE และการย้อมแอคติวิตี

SDS-PAGE (รูปซ้าย)

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 crude enzyme

แถวที่ 3 โปรติเอสที่ผ่านขั้นตอนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตช่วง 20-40 %

แถวที่ 4 โปรติเอส U (โปรติเอสที่ไม่จับกับตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุในคอลัมน์โครมาโทกราฟี ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ)

แถวที่ 5 โปรติเอส B (โปรติเอสที่จับกับตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุในคอลัมน์โครมาโทกราฟี ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ)

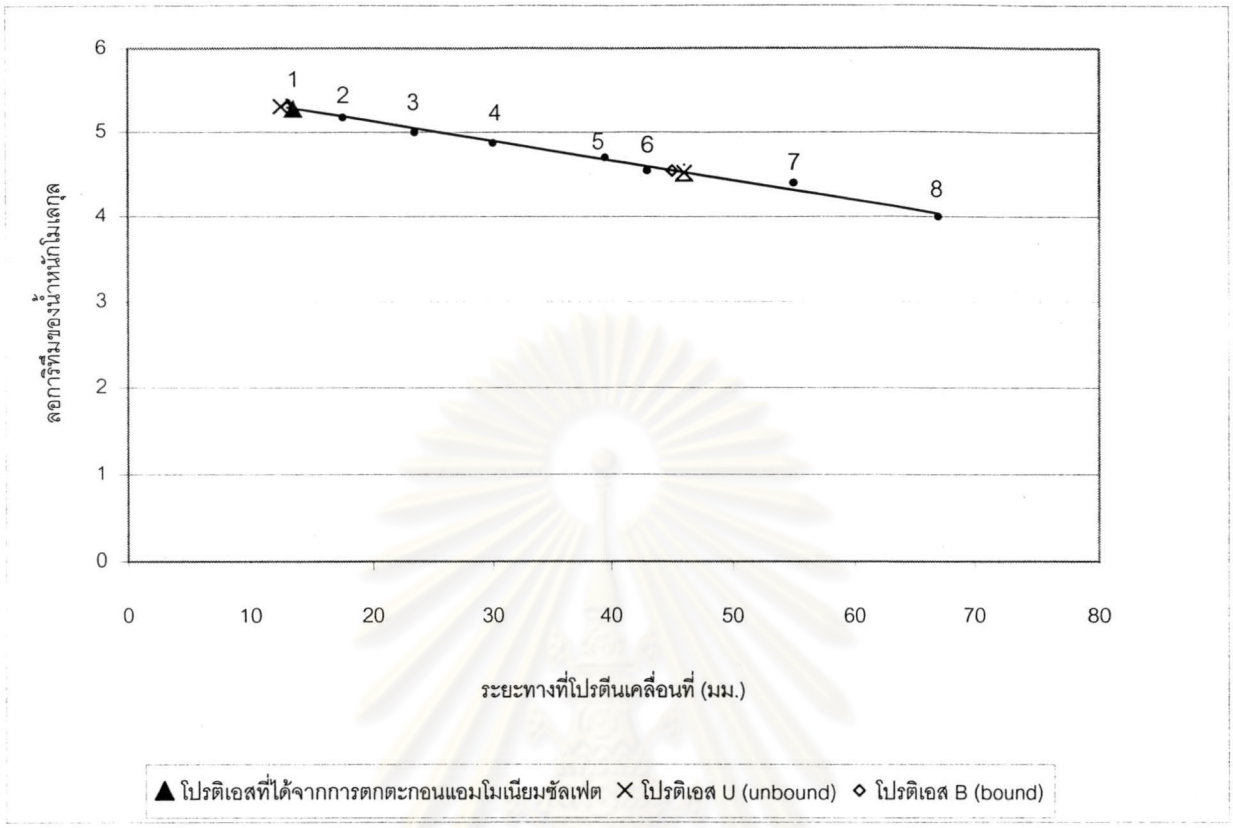
การย้อมแอคติวิตี (รูปขวา)

แถวที่ 6 โปรติเอสที่ผ่านขั้นตอนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตช่วง 20-40 %

แถวที่ 7 โปรติเอส U (โปรติเอสที่ไม่จับกับตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุในคอลัมน์โครมาโทกราฟี ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ)

แถวที่ 8 โปรติเอส B (โปรติเอสที่จับกับตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุในคอลัมน์โครมาโทกราฟี ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.12 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล กับระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่บนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส

หมายเลข 1 มีน้ำหนักโมเลกุล 225 กิโลดาลตัน
หมายเลข 2 มีน้ำหนักโมเลกุล 150 กิโลดาลตัน
หมายเลข 3 มีน้ำหนักโมเลกุล 100 กิโลดาลตัน
หมายเลข 4 มีน้ำหนักโมเลกุล 75 กิโลดาลตัน
หมายเลข 5 มีน้ำหนักโมเลกุล 50 กิโลดาลตัน
หมายเลข 6 มีน้ำหนักโมเลกุล 35 กิโลดาลตัน
หมายเลข 7 มีน้ำหนักโมเลกุล 25 กิโลดาลตัน
หมายเลข 8 มีน้ำหนักโมเลกุล 10 กิโลดาลตัน

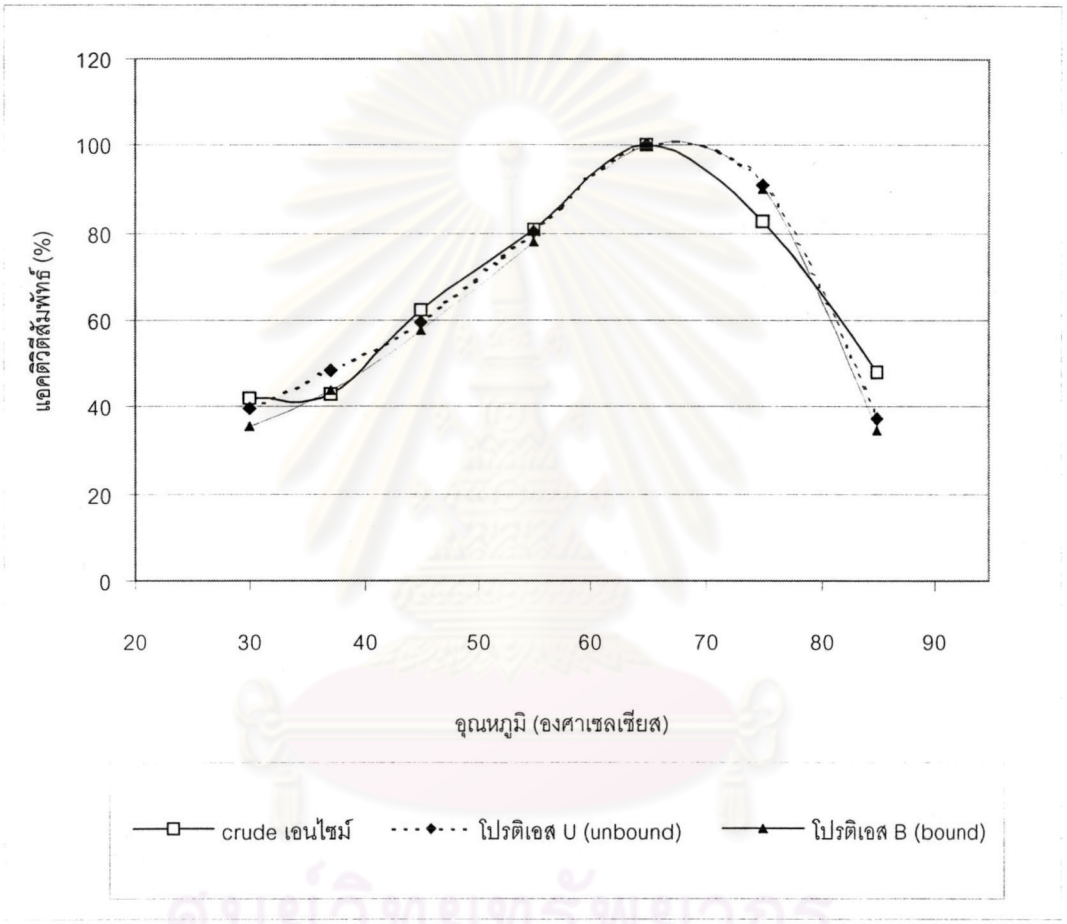
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6 ลักษณะสมบัติบางประการของโปรติเอส

นำโปรติเอสที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน มาศึกษาสมบัติต่างๆดังต่อไปนี้

4.6.1 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการทำงานของโปรติเอส

จากรูปที่ 4.13 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของโปรติเอสทั้งสาม คือ 65 องศาเซลเซียส

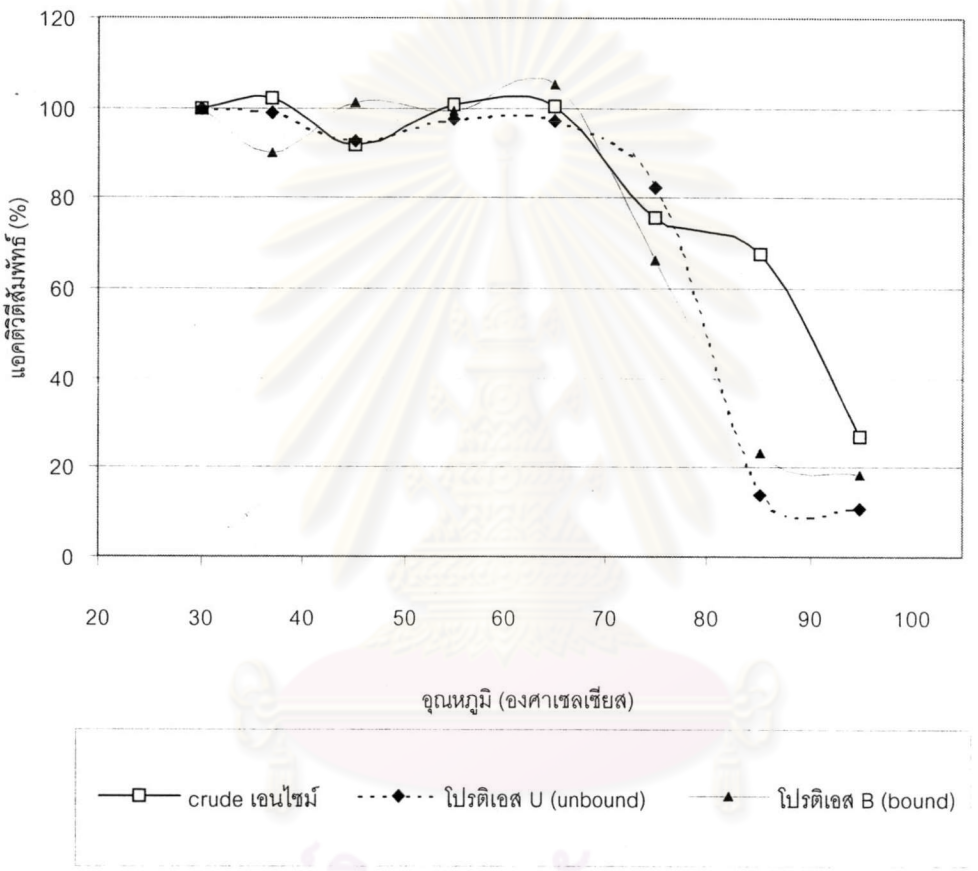


รูปที่ 4.13 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของโปรติเอส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6.2 ความเสถียรของโปรติเอสต่ออุณหภูมิ

จากการนำโปรติเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้วมาบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ โดยแปรอุณหภูมิในช่วง 30- 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที พบว่า โปรติเอสทั้งสามมีความเสถียรต่ออุณหภูมิได้ถึง 65 องศาเซลเซียส และจะสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 70 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูป 4.14

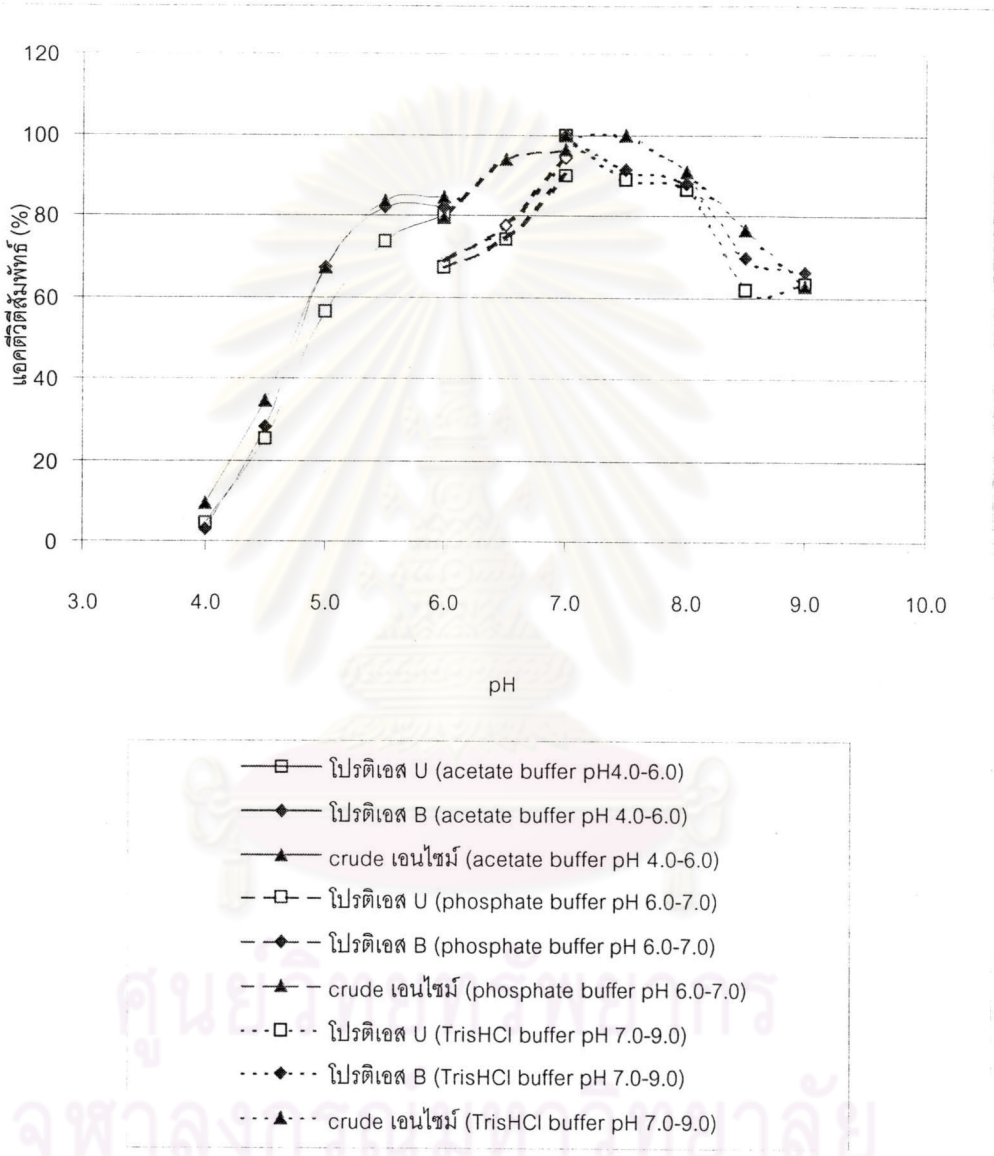


รูปที่ 4.14 ความเสถียรของโปรติเอสต่ออุณหภูมิ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.6.3 อิทธิพลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของโปรติเอส

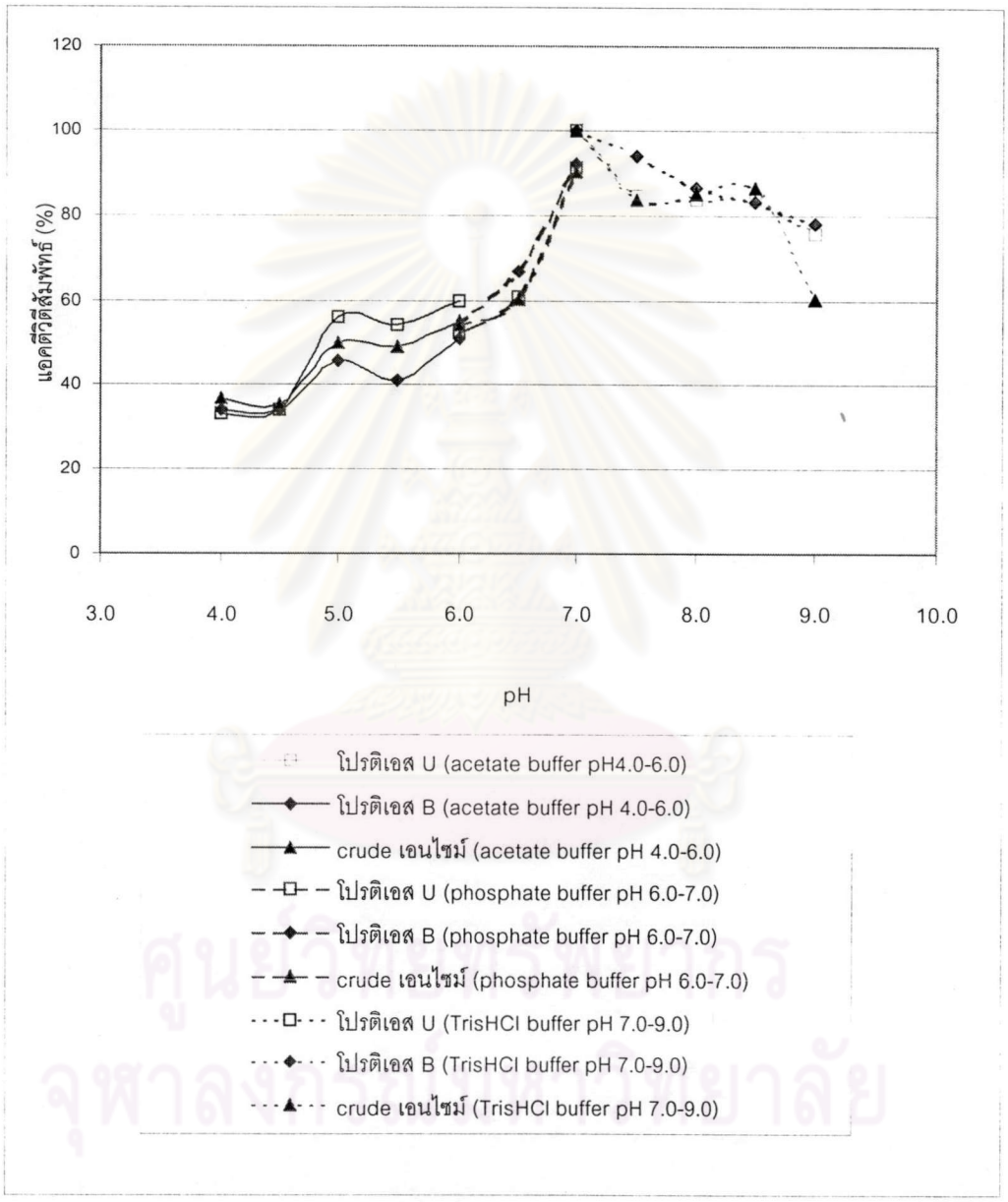
จากผลการทดลองที่แสดงในรูป 4.15 พบว่า โปรติเอสทั้งสามทำงานได้ดีในช่วง pH 7.0-7.5 โดยทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 7.0 อาจจะสรุปได้ว่า โปรติเอสที่ได้นี้ เป็น นิวทรัลโปรติเอส



รูปที่ 4.15 อิทธิพลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของโปรติเอส

4.6.4 ความเสถียรของโปรติเอสต่อค่าความเป็นกรดด่าง

เมื่อบ่มโปรติเอสทั้งสามในบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที พบว่า ในช่วงpH 7.0-8.5 โดยยังคงมีแอคติวิตีเหลือมากกว่า 80 % โปรติเอสมีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่าง และที่ pH ต่ำกว่า 7.0 โปรติเอสจะสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็ว ดังรูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 ความเสถียรของโปรติเอสต่อค่าความเป็นกรดด่าง

4.6.5 อิทธิพลของสารยับยั้งและไอออนโลหะต่อการทำงานของโปรติเอส U

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.9 แสดงให้เห็นว่า EDTA มีผลในการยับยั้งการทำงานของโปรติเอส U โดยทำให้แอคติวิตีลดลง ส่วน PMSF ซึ่งเป็นตัวยับยั้งของซีรีนโปรติเอสนั้นไม่มีผลในการยับยั้งโปรติเอส U ที่ได้จากไอโซเลต RW60-6 แสดงว่าโปรติเอส U นี้น่าจะเป็นโปรติเอสชนิด เมทัลโลโปรติเอส

ส่วนผลของไอออนโลหะพบว่า ไอออนของโคบอลท์, คอปเปอร์, แมงกานีส, นิเกิล และแบเรียม มีผลทำให้แอคติวิตีของโปรติเอสลดลงเมื่อเทียบกับโปรติเอส U ที่ไม่เติมไอออน และไม่พบไอออนที่สามารถช่วยให้โปรติเอส U มีแอคติวิตีสูงขึ้น

ตารางที่ 4.9 ผลของตัวยับยั้งต่อการทำงานของโปรติเอส U

สารยับยั้งหรือไอออนโลหะ	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)
None	-	100
EDTA	1	55.58
	10	14.90
PMSF	10	100
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	10	91.29
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	10	51.47
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	10	50.70
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	10	96.31
$MgCl_2 \cdot 2H_2O$	10	91.67
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	10	63.82
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	10	74.81
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	10	94.69
$AgNO_3$	10	98.92
$BaCl_2 \cdot 2H_2O$	10	73.93