



บทที่ 4

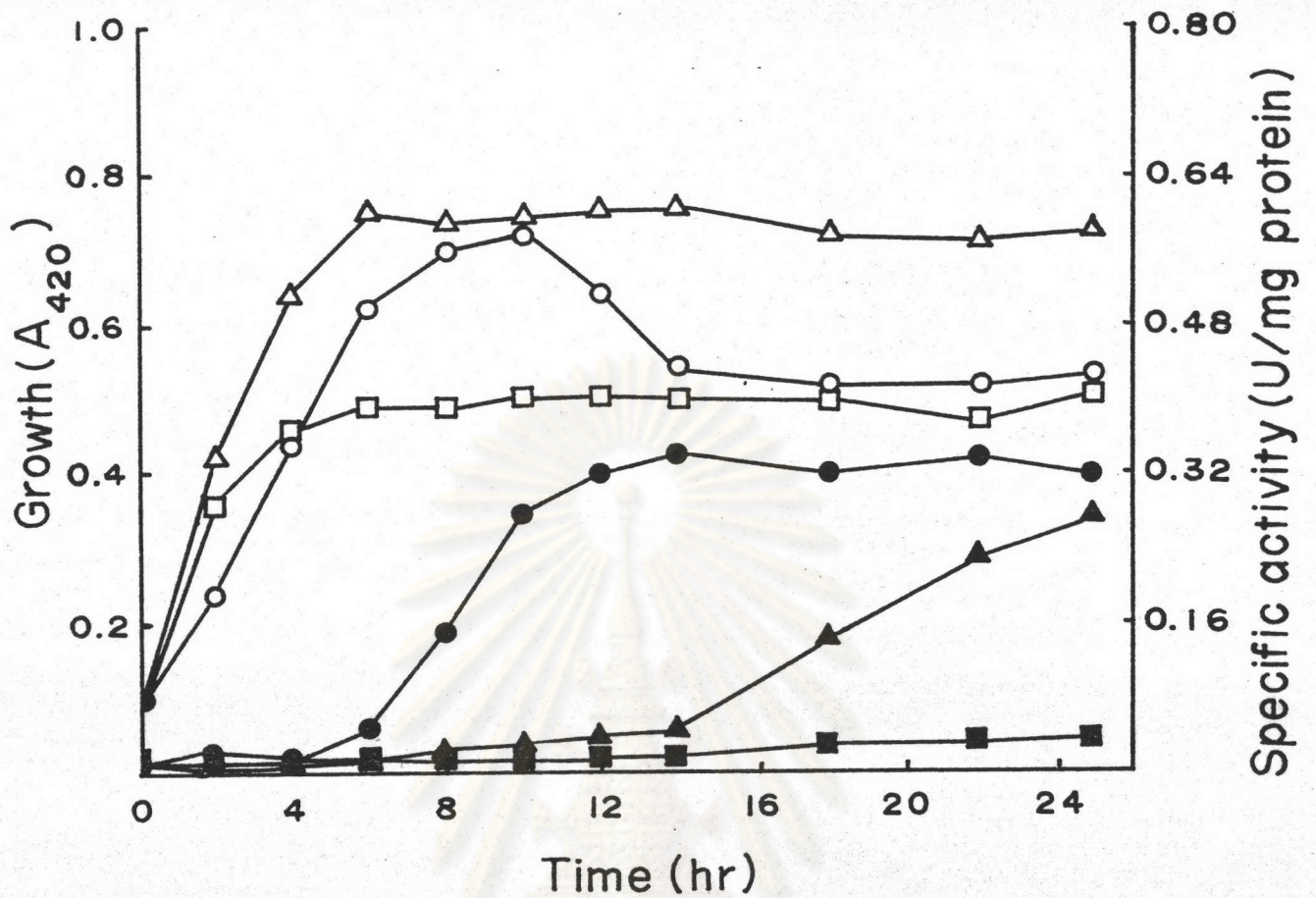
ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อ บาซิลลัส

4.1.1 สารอาหารต้นตอที่เหมาะสมทำให้เกิดการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

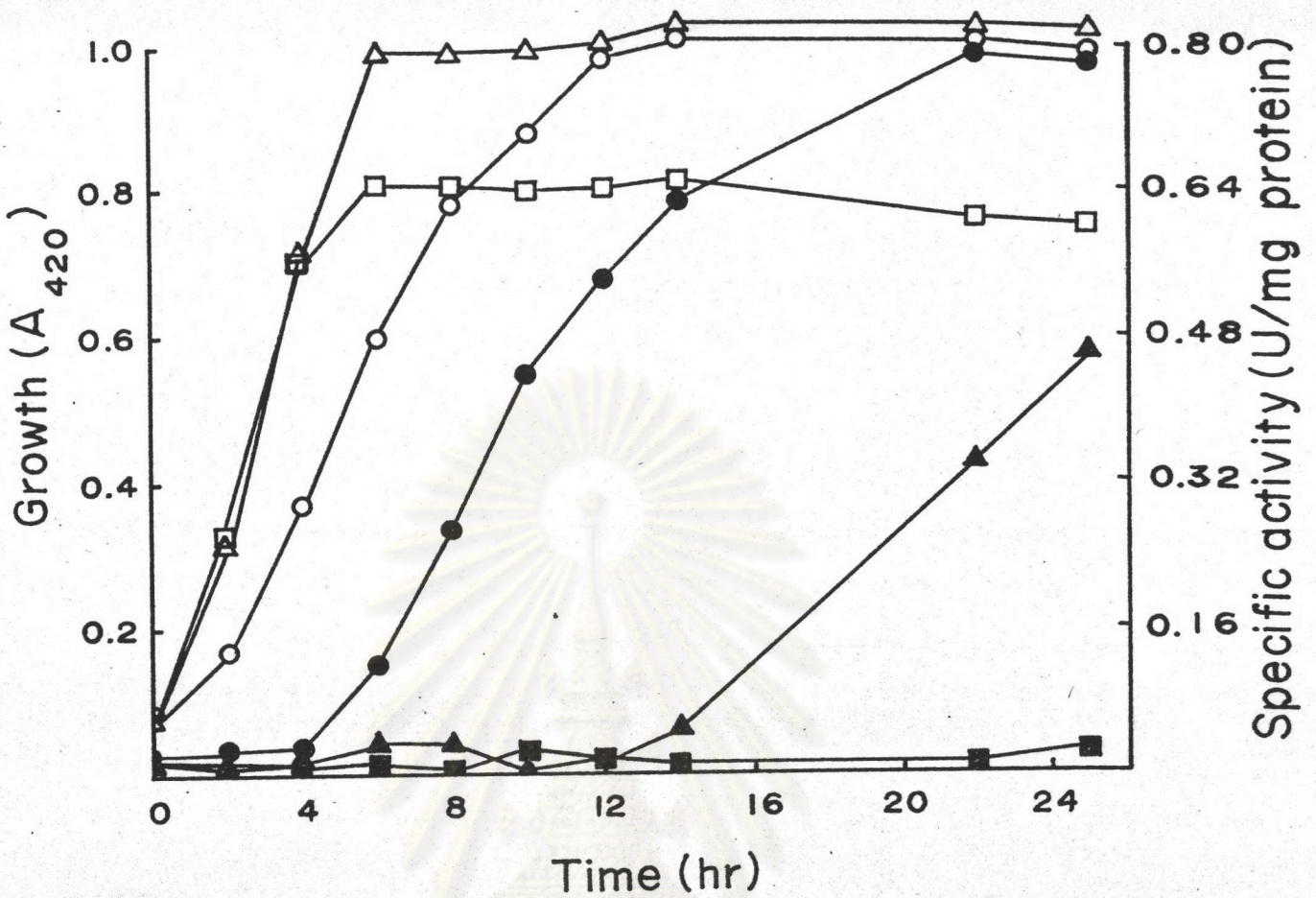
ผลการเติมกลูโคส กลูโคสกับกลูตาเมต และกลูตาเมต ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำที่มี NH_4Cl pH 6.0 และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C ตามวิธีในข้อ 3.9.1 แสดงไว้ในรูปที่ 2 จากการทดลองพบว่า Bacillus subtilis TISTR 25 เจริญได้ดีในอาหารที่มีกลูโคสกับกลูตาเมต แต่สังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอสได้สูงสุดในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีกลูตาเมตเป็นอาหารเสริมเพียงอย่างเดียว (แอกติวิตีจำเพาะ ที่ 24 ชม. = 0.32 U/mg protein) เมื่อใช้สภาวะเดียวกันในการเลี้ยง B. licheniformis ATCC 21415 พบว่าสายพันธุ์ ATCC มีรูปแบบการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอสในอาหารเสริมทั้ง 3 ชนิดเหมือนสายพันธุ์ท้องถิ่น แต่สายพันธุ์ ATCC สังเคราะห์โปรตีเอสได้สูงกว่า(รูปที่ 3)

จากผลการทดลองศึกษาผลกระทบของกลูโคสต่อการสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอสของ B. subtilis TISTR 25 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 5 มิลลิโมล/ลิตร ที่ pH 6.0 อุณหภูมิ 37 °C ดังแสดงในรูปที่ 4 จะเห็นว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารต้นตอกลูโคสกับกลูตาเมต ปริมาณกลูโคสลดลงตามลำดับเมื่อเวลาในการเลี้ยงเชื้อมากขึ้นจนถึงที่เวลา 10 ชั่วโมง เหลือกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำมาก (มีปริมาณต่ำกว่า 0.1 มิลลิโมล/ลิตร) ในขณะที่เชื้อจะเริ่มสร้างเอนไซม์ที่เวลา 18 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารต้นตอกลูตาเมตอย่างเดียวเชื้อจะสร้างเอนไซม์ได้เร็วคือเริ่มสร้างที่เวลา 8 ชั่วโมง และปริมาณเอนไซม์สูงสุดที่เวลา 14-24 ชั่วโมง ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองเปลี่ยนแปลงไม่มากนักคืออยู่ในช่วง pH 5.9-6.5



รูปที่ 2 การเจริญและแอกติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี NH_4Cl และเสริมด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ของกลูโคส กลูโคสกับกลูตาเมต หรือ กลูตาเมต ที่ pH 6.0 อุณหภูมิ 37 °C

สารอาหารต้นต่อ	การเจริญ	โปรตีเอสแอกติวิตี
กลูโคส	□—□	■—■
กลูโคสกับกลูตาเมต	△—△	▲—▲
กลูตาเมต	○—○	●—●



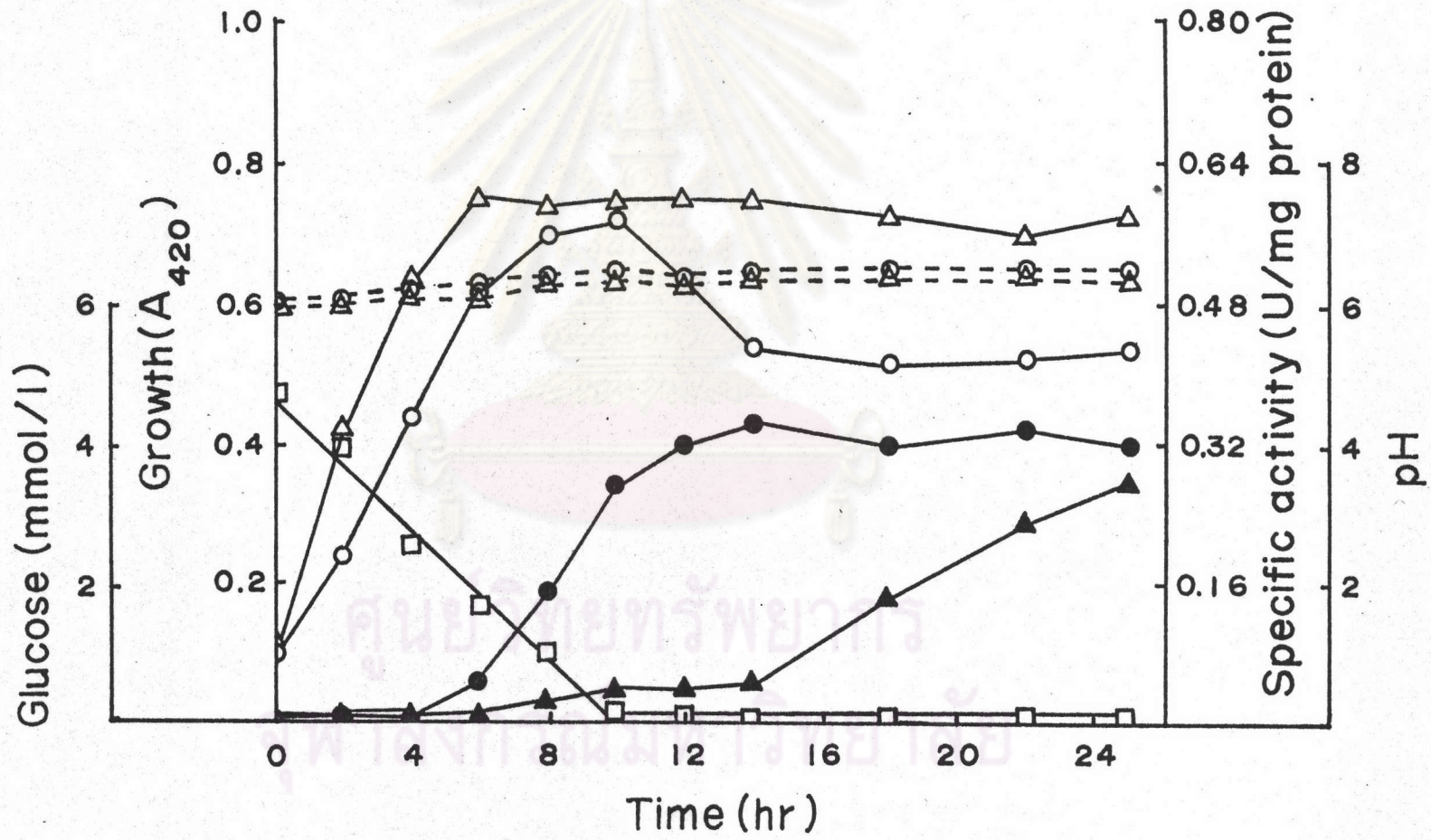
รูปที่ 3 การเจริญและแอกติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสของ *Bacillus licheniformis* ATCC 21415 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี NH_4Cl และเสริมด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ของ กลูโคส กลูโคสกับกลูตาเมต หรือ กลูตาเมต ที่ pH 6.0 อุณหภูมิ 37 °ซ

สารอาหารต้นต่อ	การเจริญ	โปรตีเอสแอกติวิตี
กลูโคส	□ — □	■ — ■
กลูโคสกับกลูตาเมต	△ — △	▲ — ▲
กลูตาเมต	○ — ○	● — ●

รูปที่ 4 แสดงแอกติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส การเจริญ การเปลี่ยนแปลง pH และปริมาณน้ำตาลกลูโคส เมื่อเลี้ยง *B. subtilis* TISTR 25 ในอาหารที่มี NH_4Cl เสริมด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ของกลูตาเมต หรือ กลูตาเมตกับกลูโคส และมี pH เริ่มต้น 6.0 ที่อุณหภูมิ 37 °C

สารอาหารต้นตอ	การเจริญ	โปรตีเอสแอกติวิตี	pH	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส
กลูตาเมต	○ — ○	● — ●	○ — — ○	-
กลูตาเมตกับกลูโคส	△ — △	▲ — ▲	△ — — △	□ — □

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



4.1.2 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอส

ผลการทดลอง(รูปที่ 5) พบว่า B. subtilis TISTR 25 เจริญได้ใกล้เคียงกันที่อุณหภูมิ 37 และ 30 °ซ (เจริญสูงสุดใช้เวลา 10 และ 14 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 และ 30 °ซ ตามลำดับ) และบราซิลีสสายพันธุ์นี้สามารถสร้างเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 °ซ ได้มากกว่าที่อุณหภูมิ 37 °ซ (ที่ 30 °ซ ค่าแอกติวิตีจำเพาะ สูงสุดที่เวลา 22 ชม. = 0.44 U/mg protein) แต่ B. licheniformis ATCC 21415 เจริญและสร้างเอนไซม์ได้มากกว่าที่อุณหภูมิ 37 °ซ ขณะที่การเจริญและการสร้างเอนไซม์จะต่ำลงมากที่อุณหภูมิ 30 °ซ

4.1.3 ผลของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอส

ผลการเลี้ยง B. subtilis TISTR 25 และ B. licheniformis ATCC 21415 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำเสริมด้วยกลูตาเมทที่มีและไม่มี 0.1 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมคลอไรด์ ที่อุณหภูมิ 30 °ซ พบว่าทั้งการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสไม่แตกต่างกันดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 6

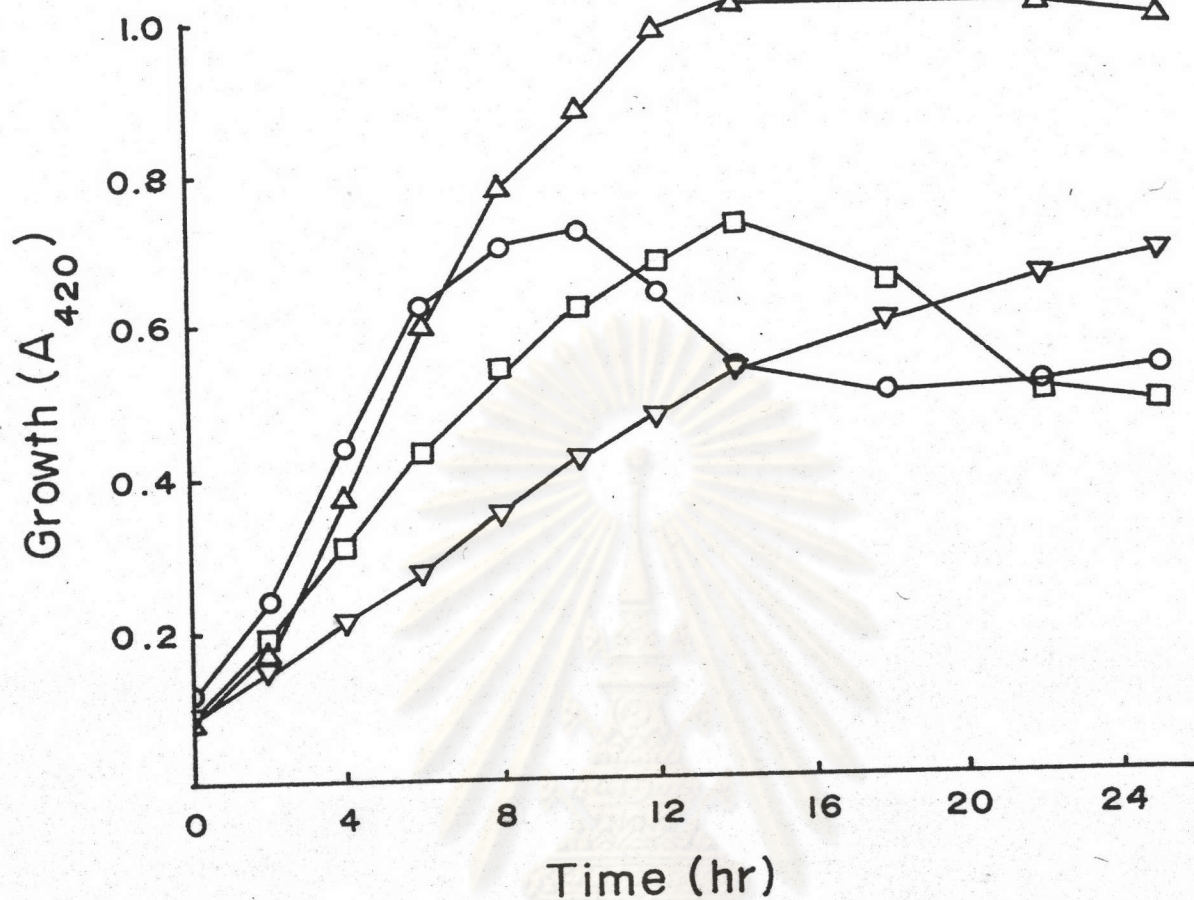
4.2 ผลการศึกษาโปรตีเอสในลักษณะ crude enzyme

4.2.1 ความเสถียรของ crude enzyme

รูปที่ 7 แสดงความเสถียรของ crude enzyme ที่เตรียมจาก B. subtilis TISTR 25 และ B. licheniformis ATCC 21415 เมื่อเก็บไว้ในสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ pH 6.0 ที่อุณหภูมิ -20 และ 4 องศาเซลเซียส ในเวลาต่างๆกัน จะเห็นได้ว่าสามารถเก็บเอนไซม์จากบราซิลีสทั้งสองสายพันธุ์ไว้ที่อุณหภูมิ -20 และ 4 องศาเซลเซียสได้อย่างน้อย เป็นเวลา 2 เดือนโดยเอนไซม์ไม่สูญเสียแอกติวิตี

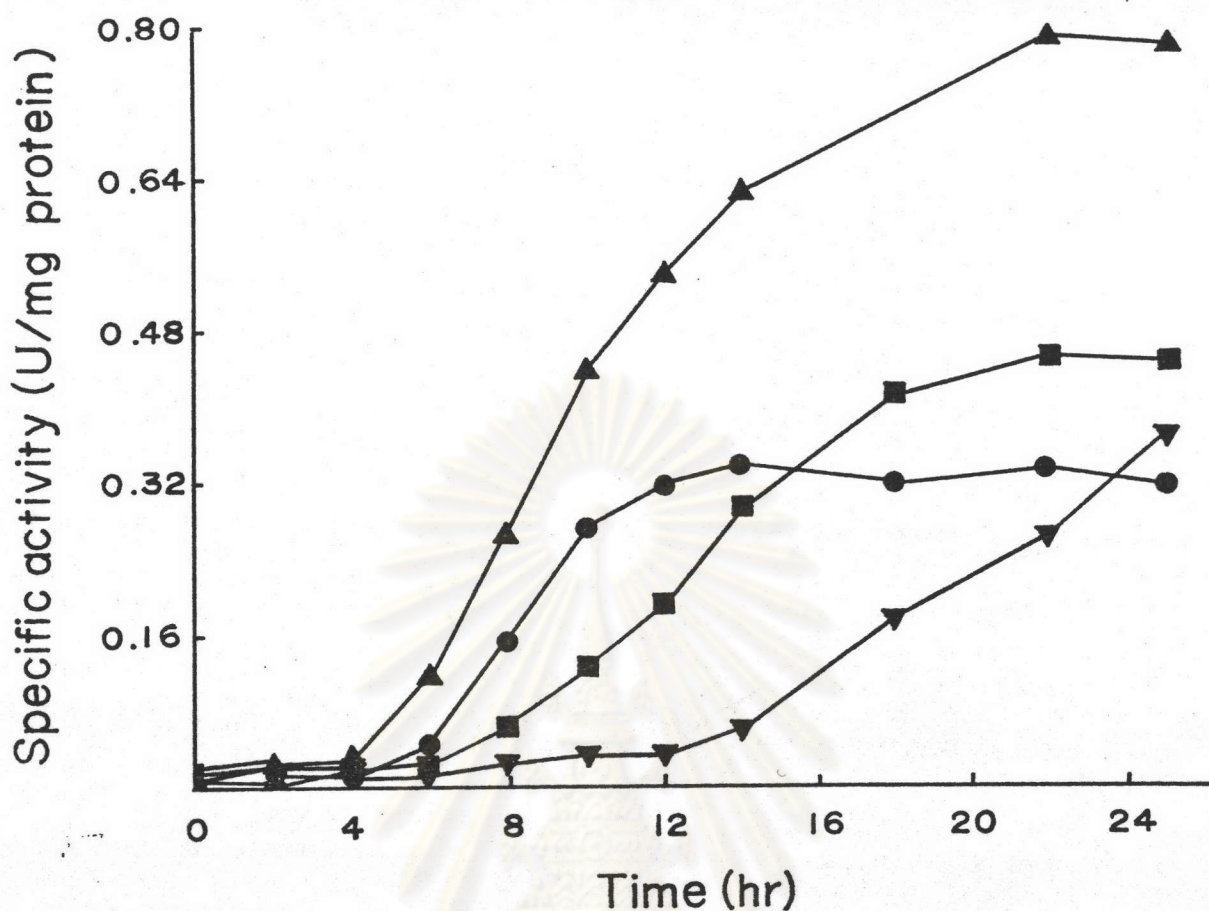
4.2.2 ผลของสารยับยั้งต่อ crude enzyme

การศึกษาอิทธิพลของสารยับยั้งต่อ crude enzyme ที่เตรียมจาก B. subtilis TISTR 25 และ B. licheniformis ATCC 21415 เพื่อทราบชนิดของโปรตีเอส โดยใช้สารยับยั้งนิวทรัลโปรตีเอสคือ ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) และสารยับยั้งแอลคาไลน์โปรตีเอสคือ phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) พบว่า PMSF ยับยั้งโปรตีเอสจากสายพันธุ์ TISTR 25 ได้น้อยกว่าการยับยั้งโปรตีเอสของสายพันธุ์ ATCC



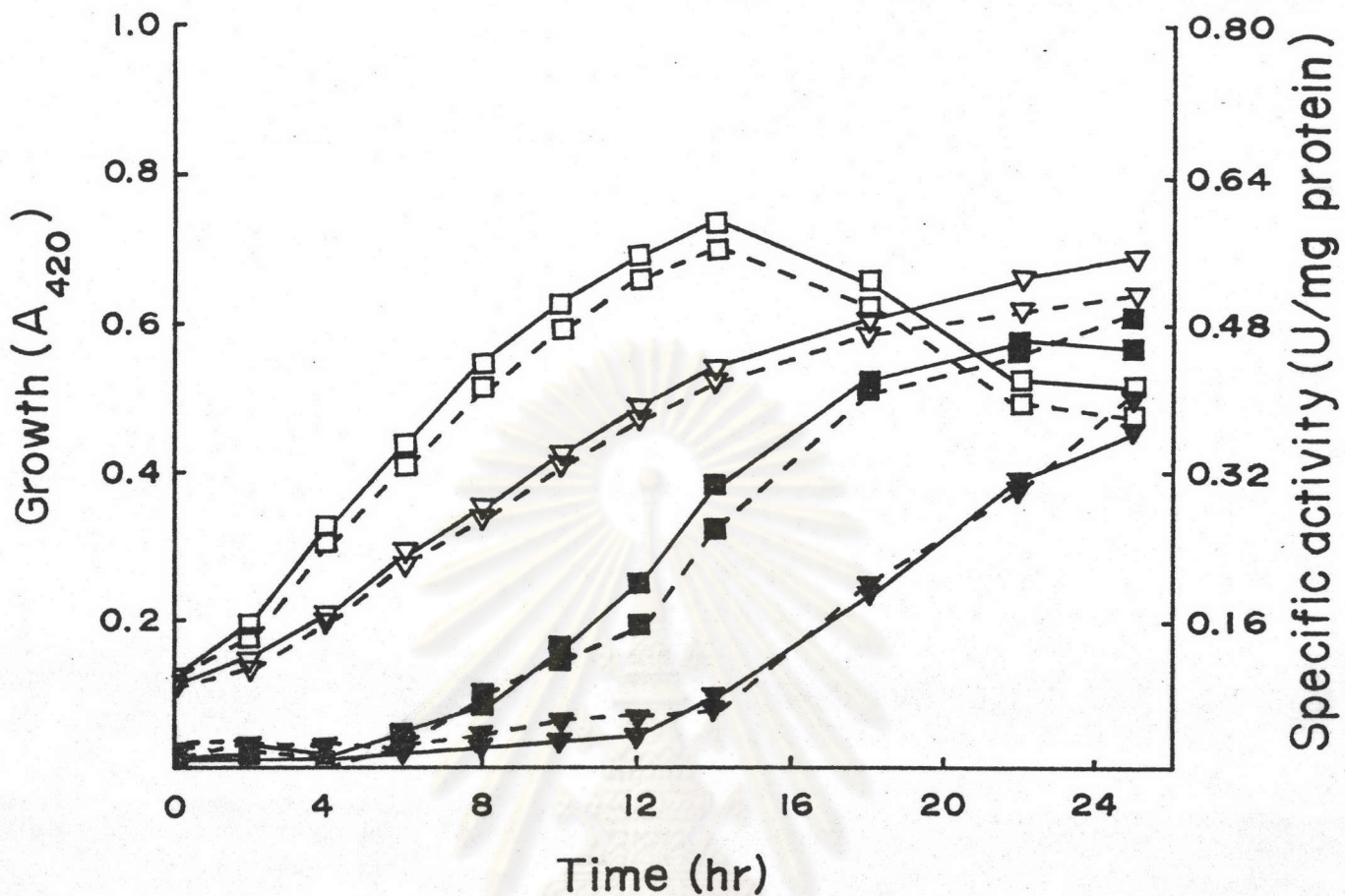
รูปที่ 5ก การเจริญของ *B. subtilis* TISTR 25 และ *B. licheniformis* ATCC 21415 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี NH_4Cl และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ กลูตาเมท ที่อุณหภูมิ 30 °ซ และ 37 °ซ

จุลินทรีย์	อุณหภูมิ (°ซ)	การเจริญ
<i>B. subtilis</i>	30	□—□
TISTR 25	37	○—○
<i>B. licheniformis</i>	30	▽—▽
ATCC 21415	37	△—△



รูปที่ 5๗ เปรียบเทียบแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์โปรตีเอสจากเชื้อที่เลี้ยง
ในรูปที่ 5ก

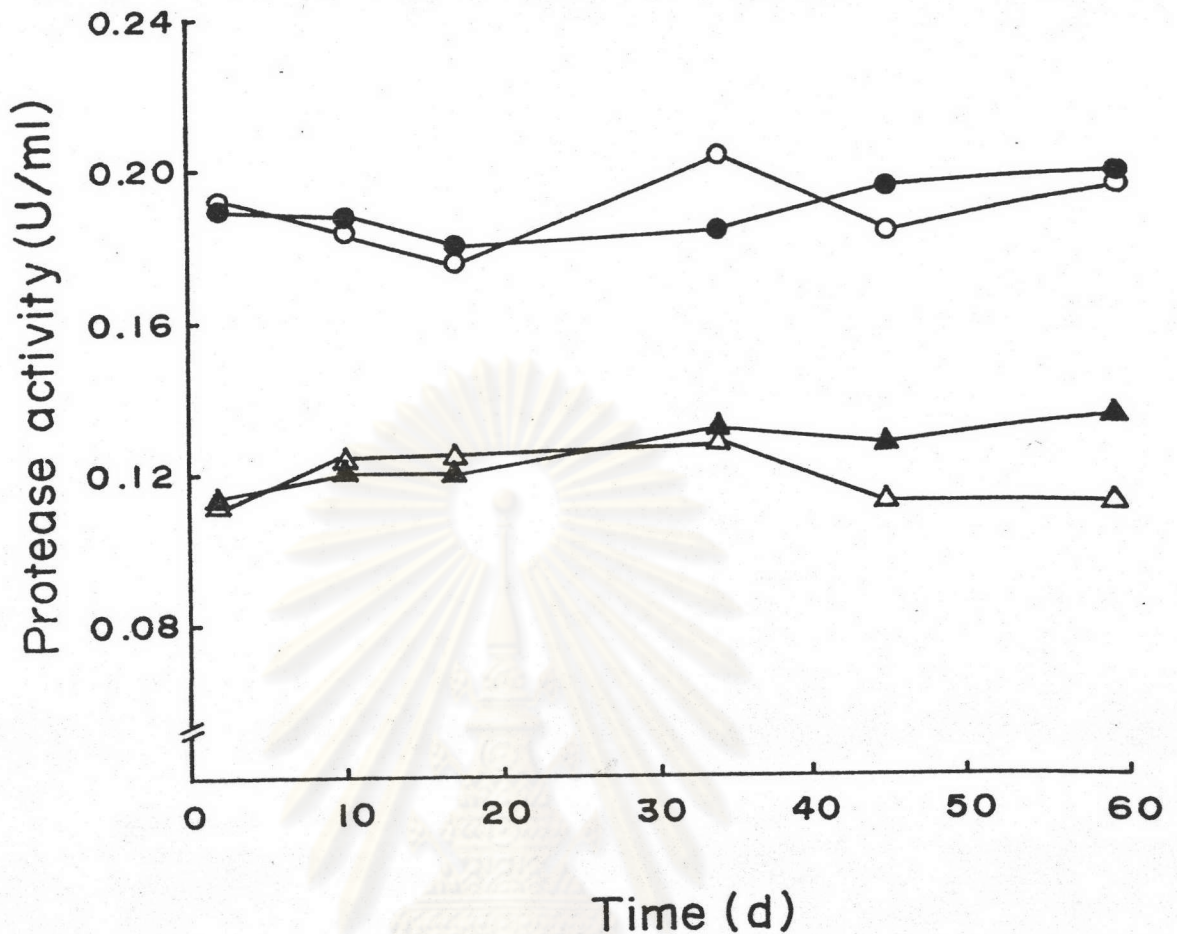
จุลินทรีย์	อุณหภูมิ (°C)	โปรตีเอสแอกติวิตี
<i>B. subtilis</i>	30	■ — ■
TISTR 25	37	● — ●
<i>B. licheniformis</i>	30	▼ — ▼
ATCC 21415	37	▲ — ▲



รูปที่ 6 เปรียบเทียบการเจริญและแอกติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสของ B. subtilis TISTR 25 และ B. licheniformis ATCC 21415 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เมื่อมีและไม่มี NH₄Cl ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์ กลูตาเมต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุลินทรีย์	NH ₄ Cl	การเจริญ	โปรตีเอสแอกติวิตี
<u>B. subtilis</u>	+	□ — □	■ — ■
TISTR 25	-	□ - - □	■ - - ■
<u>B. licheniformis</u>	+	▽ — ▽	▼ — ▼
ATCC 21415	-	▽ - - ▽	▼ - - ▼



รูปที่ 7 แสดงความเสถียรของ crude enzyme เตรียมจาก *B. subtilis* TISTR 25 (0.19 หน่วย/มล.) และ *B. licheniformis* ATCC 21415 (0.11 หน่วย/มล.) เมื่อเก็บในสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ pH 6.0 ในช่วงเวลาต่างๆกัน ที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส

จุลินทรีย์	อุณหภูมิที่เก็บ (°C)	โปรตีนเอสเอดติวิตี
<i>B. subtilis</i>	4	○—○
TISTR 25	-20	●—●
<i>B. licheniformis</i>	4	△—△
ATCC 21415	-20	▲—▲

21415 (รูปที่ 8ก) ขณะที่ผลการยับยั้งของ EDTA กลับกัน (รูปที่ 8ข) แสดงว่าโปรตีนเอสที่แยกได้ เป็นส่วนผสมของแอลคาไลน์และนิวทรัลโปรตีนเอส อัตราส่วนของแอลคาไลน์ต่อนิวทรัลโปรตีนเอส ใน B. subtilis TISTR 25 ต่ำกว่าใน B. licheniformis ATCC 21415 และมีแอลคาไลน์มากกว่านิวทรัลโปรตีนเอสในทั้งสองสายพันธุ์

4.3 ผลการเตรียมเอนไซม์โปรตีนเอสเพื่อนำไปทำให้บริสุทธิ์

เมื่อเลี้ยง B. subtilis TISTR 25 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตรที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับค่าที่เสริมด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์กลูตาเมต 500 มล. ที่ pH 6.0 อุณหภูมิ 30 °C ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 9 จะเห็นได้ว่าการเจริญของ B. subtilis TISTR 25 สูงสุดที่เวลา 16 ชั่วโมง และสร้างเอนไซม์จะมีปริมาณสูงสุดในช่วงเวลา 16-28 ชั่วโมง และตลอดเวลา 28 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อพบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อมีการเปลี่ยนแปลง pH อยู่ในช่วง 6.0-6.5 เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองในรูปที่ 9 นี้กับรูปที่ 6 จะเห็นได้ว่ารูปแบบของการเจริญและการสังเคราะห์โปรตีนเอสของสายพันธุ์ TISTR 25 ไม่ต่างจากเมื่อเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเพียง 100 มล. มากนัก นอกจากนี้ค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เมื่อเลี้ยงในทั้งสองสภาวะไม่แตกต่างกัน(ตารางที่ 3) ดังนั้นในการทดลองที่ต้องเตรียมเอนไซม์ปริมาณมากๆ จึงเลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตรจำนวน 4 ขวด เก็บเอนไซม์ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากเลี้ยงเชื้อ จะเตรียมสารละลาย crude enzyme ได้ประมาณ 2 ลิตร สารละลายนี้มีแอกติวิตีของโปรตีนเอส 0.48 หน่วย/มล. และปริมาณโปรตีน 0.38 มก./มล. (วิธีของ Lowry's) แต่ถ้าใช้วิธีของ Bradford's หาปริมาณโปรตีนได้ 0.02 มก./มล. ดังสรุปไว้ในตารางที่ 3

4.4 ผลการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

crude enzyme จากข้อ 4.3 หลังจากปรับ pH ให้เป็น 7.5 ด้วย 2.5 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านขั้นตอนต่างๆ ได้ผลดังนี้

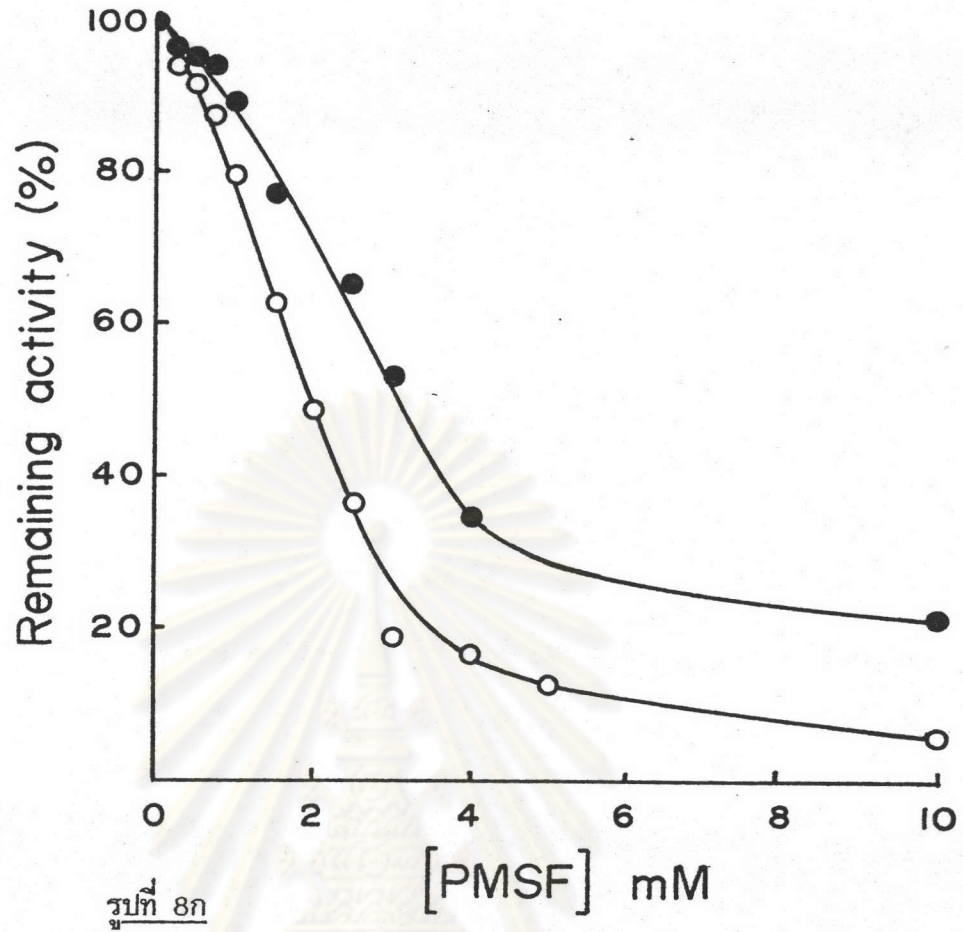
4.4.1 ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ตกตะกอนโปรตีนด้วยผงแอมโมเนียมซัลเฟตบดละเอียด

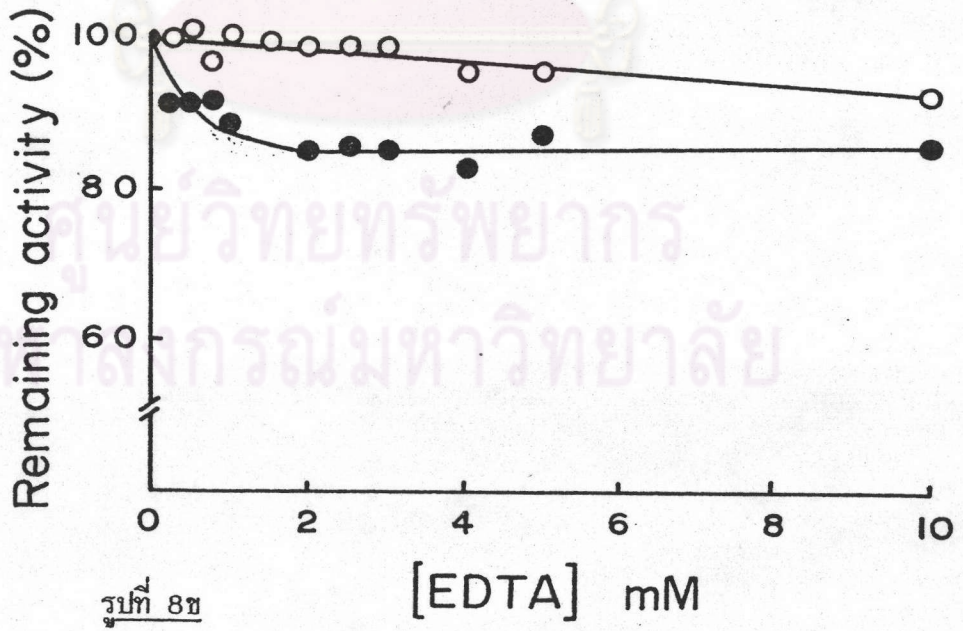
โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต

รูปที่ 8ก ผลของ phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ต่อโปรตีนเอสเอนคิตี
วิติน crude enzyme จาก B. subtilis TISTR 25 (●—●)
(ปริมาณเอนไซม์ = 0.02 หน่วย/มล.) และ B. licheniformis ATCC
21415 (○—○) (ปริมาณเอนไซม์ = 0.03 หน่วย/มล.)

รูปที่ 8ข ผลของ EDTA ต่อโปรตีนเอสเอนคิตีวิติน crude enzyme จาก B.
subtilis TISTR 25 (●—●) (ปริมาณเอนไซม์ = 0.03
หน่วย/มล.) และ B. licheniformis ATCC 21415 (○—○)
(ปริมาณเอนไซม์ = 0.03 หน่วย/มล.)



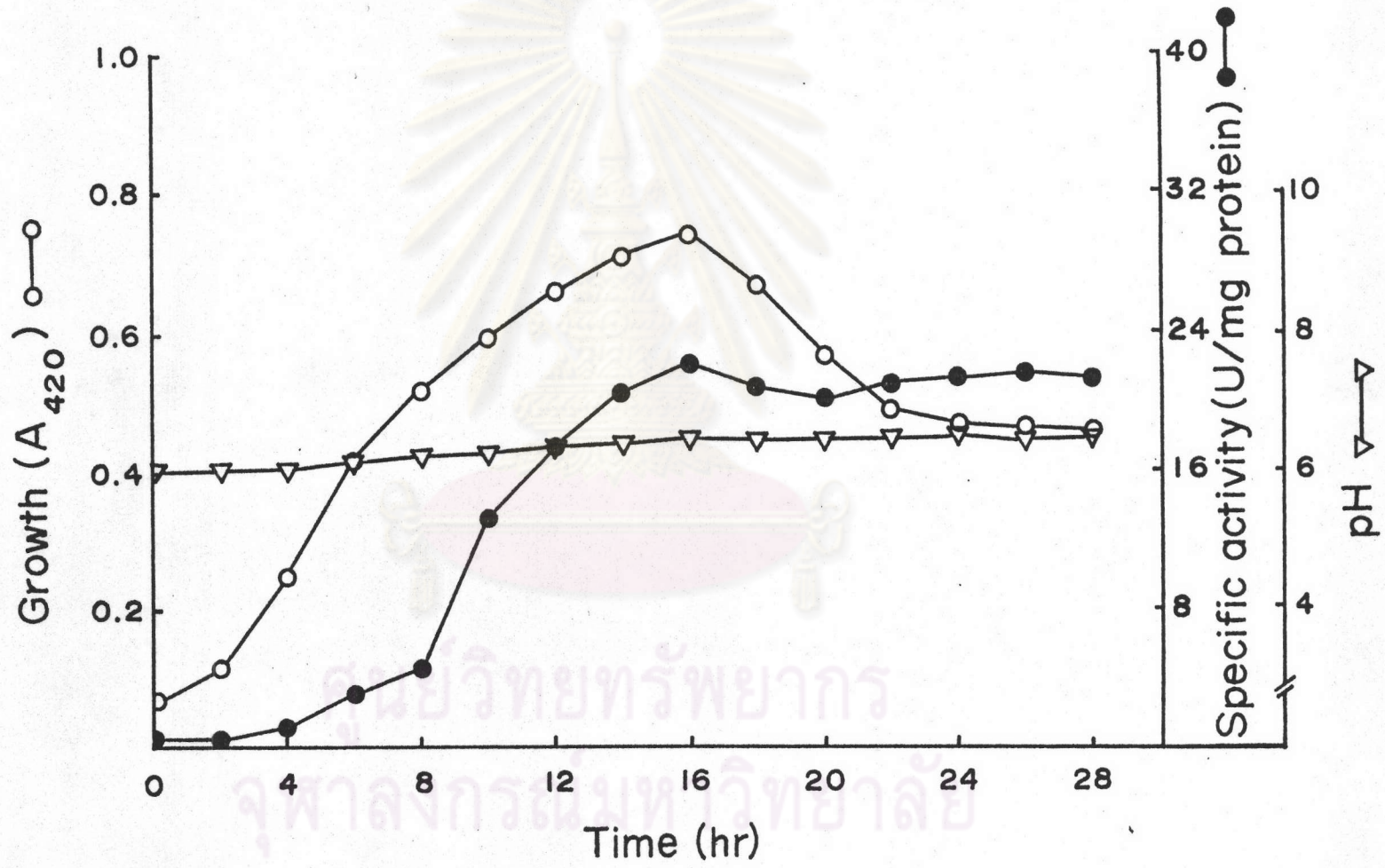
รูปที่ 8ก



รูปที่ 8ข

รูปที่ 9 แสดงการเจริญ แอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์โปรตีเอส และ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยง B. subtilis TISTR 25 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วย 0.1 เปอร์เซ็นต์กลูตาเมต pH 6.0 ปริมาตร 500 มล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °ซ (ผลการทดลองรูปนี้ หาโปรตีนโดยวิธี Bradford)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 3 การผลิตโปรตีนเอสของ *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในปริมาณต่างกัน

Culture volume (ml)	Activity (U/ml)	Lowry's *		Bradford's **	
		Protein (mg/ml)	Specific activity (U/mg protein)	Protein (mg/ml)	Specific activity (U/mg protein)
100	0.35	0.34	1.03	0.02	17.5
500	0.48	0.38	1.26	0.02	24.0

* ตรวจโปรตีนด้วยวิธี Lowry's

** ตรวจโปรตีนด้วยวิธี Bradford's

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อิมิตัว 0-60 , 60-70 และ 70-80 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเอนไซม์ (% yield) ที่ได้มีค่า 29.8, 14.9 และ 4.5 ตามลำดับ(ตารางที่ 4) จึงเลือกตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิมิตัว 70 เปอร์เซ็นต์ พบว่าทำให้เอนไซม์โปรตีเอสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.0 เท่า จากนั้นละลายเอนไซม์ที่ได้ แล้วไดอะไลส์เพื่อกำจัดแอมโมเนียมซัลเฟต นำไปผ่านคอลัมน์ CM-cellulose เพื่อแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น

4.4.2 ผลการทำเอนไซม์โปรตีเอสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ CM-cellulose

เพื่อที่จะทำให้เอนไซม์โปรตีเอสชนิดแอลคาไลน์บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นจึงได้นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 4.4.1 ไปผ่านคอลัมน์ CM-cellulose(1.7 X 25 ซม.) จากผลการทดลองในรูปที่ 10 ปรากฏว่าโปรตีนพีคแรกที่ไม่ยึดจับกับเรซิน ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย equilibrating buffer pH 6.5 เป็นโปรตีนที่ไม่มีแอกติวิตีของโปรตีเอสปะปนอยู่ แต่ส่วนที่ออกมาหลังชะด้วย salt gradient มีโปรตีน 2 พีคที่มีแอกติวิตีของโปรตีเอส ส่วนแรกหรือ peak A ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย 0.04 โมล/ลิตร NaCl และส่วนที่สองหรือ peak B ซึ่งมีโปรตีนสูงกว่า peak A ประมาณ 3 เท่า ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย 0.07 โมล/ลิตร NaCl จึงทำการเก็บรวมแฟรคชันของโปรตีเอสทั้งสองพีคไว้แยกกัน จากการทดสอบชนิดของโปรตีเอสโดยใช้ PMSF และ EDTA พบว่า peak A เป็นนิวทรัลโปรตีเอส และ peak B เป็นแอลคาไลน์โปรตีเอส (ผลการทดลอง ข้อ 4.5)

ผลการทำเอนไซม์โปรตีเอสให้บริสุทธิ์สรุปไว้ในตารางที่ 5 จะเห็นได้ว่า จากสารละลาย crude enzyme เริ่มต้น เมื่อนำมาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ สามารถแยกเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสออกจากเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสได้เป็นผลสำเร็จ และพบว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.3 เท่า และได้ yield 21.4 %

4.5 ผลการตรวจสอบชนิดของโปรตีเอส

ได้ตรวจสอบแฟรคชันใน peak A และ B ที่แยกได้จากคอลัมน์ CM-cellulose โดยการใช้สารยับยั้ง PMSF และ EDTA ที่มีความเข้มข้น 2.5 และ 5 มิลลิโมล/ลิตร ตามลำดับ (ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้ ได้จากผลการทดลองรูป 8ก และ 8ข) ผลการทดลองดังในตารางที่ 6 แสดงว่าแฟรคชันที่ 57, 59 และ 61 ซึ่งประกอบอยู่ใน peak A (รูปที่ 10)

ตารางที่ 4 ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอัตรา 0-80 เปอร์เซ็นต์ โดยการเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตทีละ 10 เปอร์เซ็นต์จาก แพรคชันแรก

Fraction	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg protein)	% Yield
crude enzyme	500	10.25	213.6	20.8	100
0-60 %	13.5	1.18	63.6	53.8	29.8
60-70 %	17.3	0.71	32.0	45.1	14.9
70-80 %	8.6	0.26	9.6	36.9	4.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

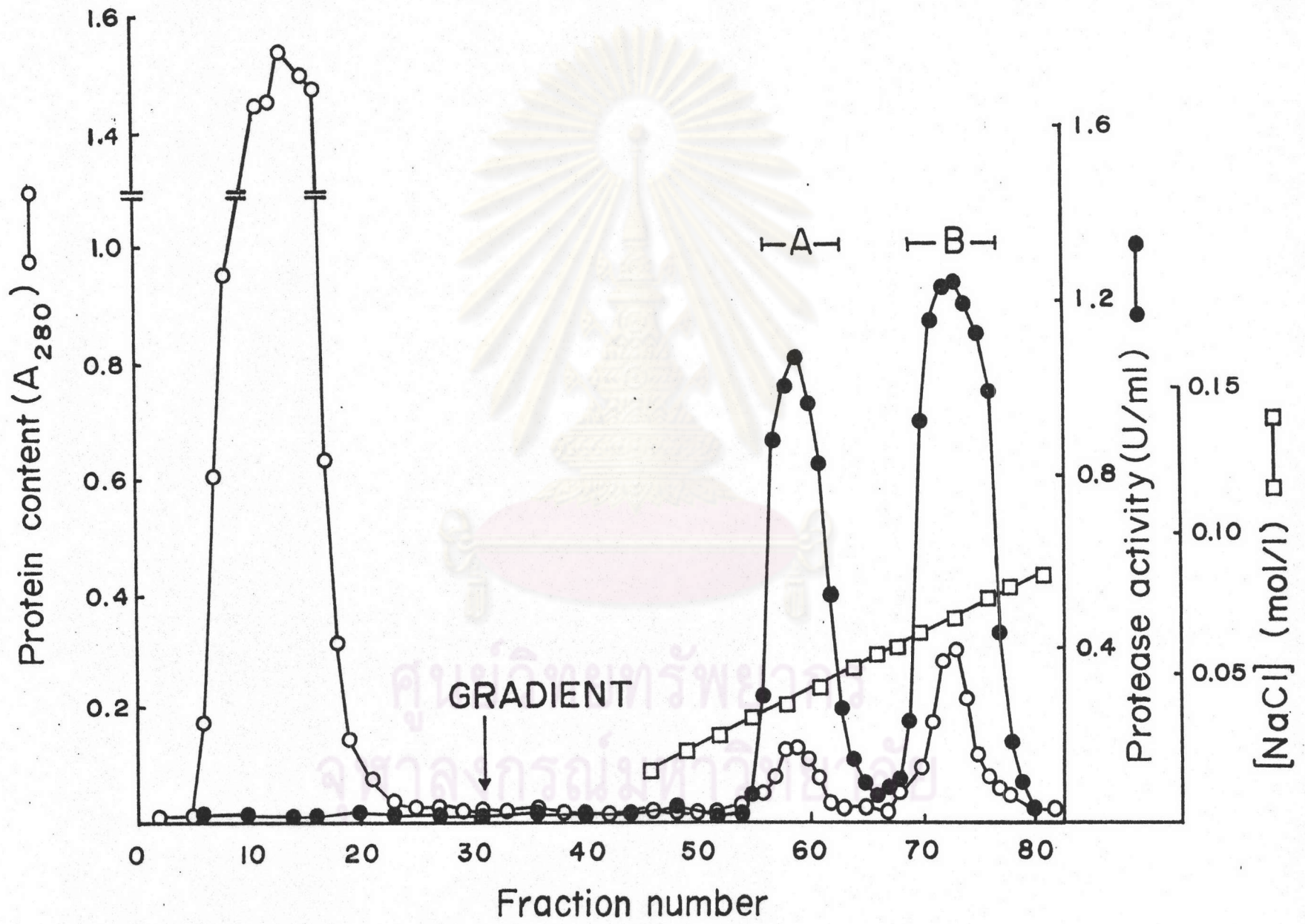
รูปที่ 10 รูปแบบการแยกและทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ CM-cellulose

บรรจุโปรตีนจาก 70 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต แพรคชันที่ละลายอยู่ใน 55 มล. อิมิดาโซลีนเฟอ์ pH 6.5 ลงในคอลัมน์ CM-cellulose ขนาด 1.7 X 25 ซม. ชะด้วยอิมิดาโซลีนเฟอ์ประมาณ 160 มล. แล้วตามด้วย linear salt gradient (250 มล. อิมิดาโซลีนเฟอ์ pH 6.5 และ 250 มล. ของอิมิดาโซลีนเฟอ์ pH 6.5 ที่มี 0.2 โมล/ลิตร โซเดียมคลอไรด์) อัตราการไหล 15 มล./ชม. เก็บแยกส่วนหลอดละ 5 มล. (วิธีทดลองข้อ 3.10.3)

— A — รวมแฟรคชันของนิวทริลโปรตีน

— B — รวมแฟรคชันของแอลคาไลน์โปรตีน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 5 สรุปผลการทำให้เอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสเฟสบริสุทธิ์

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (units)	Specific activity (units/mg protein)	Yield (percent)	Purification fold
crude enzyme	1500	32.25	707.2	21.9	100	1
ตกตะกอนโปรตีนด้วยแอม โมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 70%	55	6.77	303.9	44.9	43.0	2.0
CM-cellulose(ชะด้วย NaCl gradient)						
peak A	40	1.08	66.3	61.4	9.4	2.8
peak B	45	2.97	151.6	51.1	21.4	2.3

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบชนิดของโปรตีนในแฟรคชันต่างๆจากการแยกด้วย
คอลัมน์ CM-cellulose โดยการใช้สารยับยั้ง EDTA และ PMSF

Fraction number	Remaining activity (%)		
	5 mM EDTA	2.5 mM PMSF in 1 % ethanol	1 % ethanol
57	3.8	89.6	87.3
59	2.8	94.4	93.8
61	3.1	85.6	83.8
71	72.7	23.1	102.2
73	67.5	28.3	100.8
75	60.8	11.9	100.9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เป็นเฟรคชันของนิวทริลโปรตีเอสเพราะถูกยับยั้งเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ด้วย 5 mM EDTA ขณะที่เฟรคชันที่ 71, 73 และ 75 ซึ่งประกอบอยู่ใน peak B (รูปที่ 10) เป็นเฟรคชันของแอลคาไลน์โปรตีเอส เนื่องจากมีความไวต่อการถูกยับยั้งด้วย PMSF

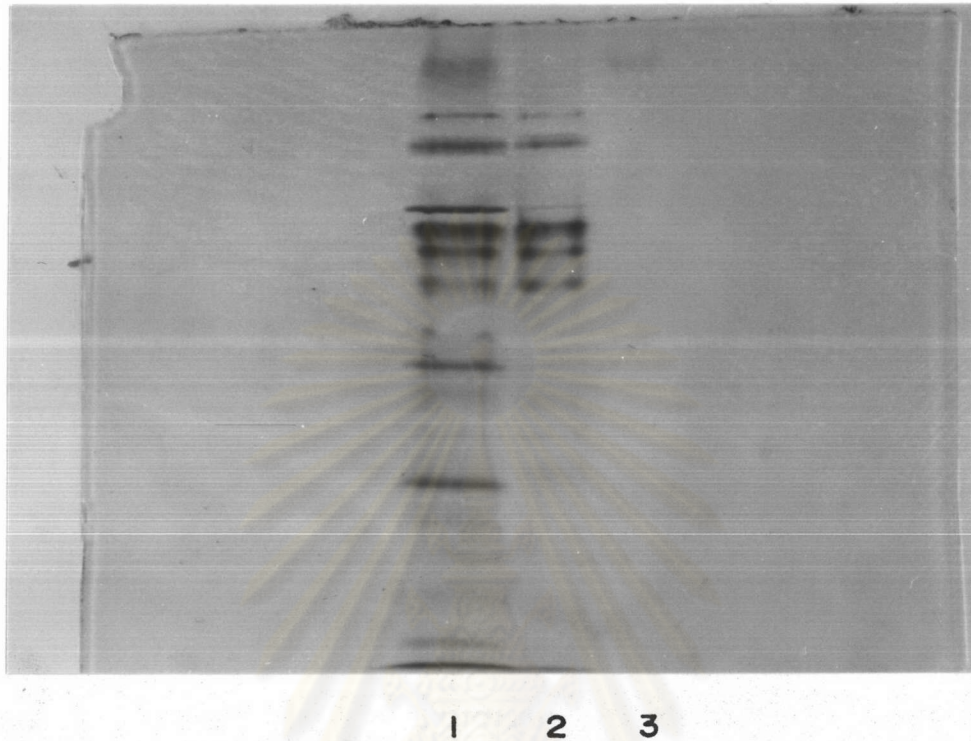
4.6 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยเทคนิคโพลีอะคริลลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส

นำสารละลาย crude enzyme สารละลายเอนไซม์หลังการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการแยกด้วยคอลัมน์ CM-cellulose (peak B) มาทำอีเลคโตรโฟรีซิสตามวิธีในข้อ 3.11 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 11ก ซึ่งจะเห็นว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส (แถบแรกใกล้ซ้าย) เป็นแถบค่อนข้างกว้างและไม่ชัดเจนเมื่อเทียบกับแถบโปรตีนอื่นใน crude enzyme แต่หลังจากตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต จะพบว่าแถบโปรตีนอื่นโดยเฉพาะพวกที่มีประจุลบมากหายไปเป็นบางส่วน และแถบของเอนไซม์ลดลงเล็กน้อย และเมื่อผ่านคอลัมน์ CM-cellulose จะพบว่าเหลือแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว แต่เมื่อเพิ่มปริมาณโปรตีน จะเห็นว่า นอกจากโปรตีนแถบเข็ม 1 แถบ ยังมีแถบจางอีก 1 แถบ (รูปที่ 11ข)

4.7 ผลการศึกษาสมบัติของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่บริสุทธิ์บางส่วน

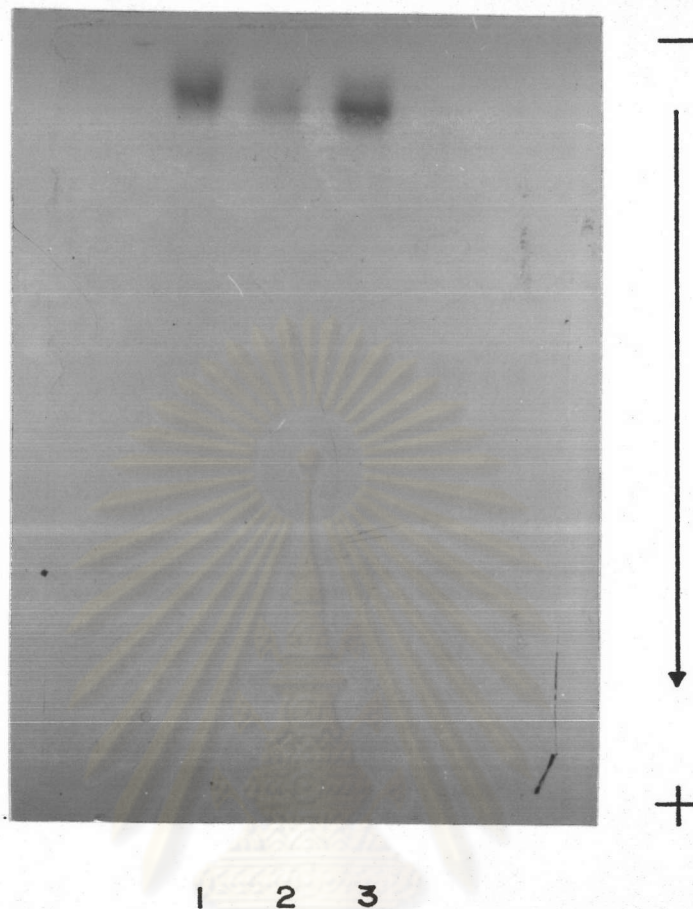
4.7.1 ผลการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลโดยการใช้คอลัมน์ เซฟาเดกซ์ จี-75

ผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐาน และสารละลายเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสลงในคอลัมน์ เซฟาเดกซ์ จี-75 และชะด้วยอิมิดาโซลบัฟเฟอร์ดังรายละเอียดในข้อ 3.13.1. ผลการทดลอง (รูปที่ 12) แสดงให้เห็นว่าโปรตีนมาตรฐาน BSA, Ovalbumin, Subtilisin Carlsberg และ Lysozyme จะถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย elution volume 95, 111, 133 และ 162 มล. ตามลำดับ ในขณะที่เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจาก TISTR 25 จะออกจากคอลัมน์หลังโปรตีนมาตรฐาน Subtilisin เล็กน้อย คือมีค่า elution volume 134 มล. เมื่อนำมาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ K_{av} แล้วเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 13) พบว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 26,800 ดาลตัน



รูปที่ 11ก รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆในการทำเอนไซม์แอลคาไลน์
โปรตีเอสให้บริสุทธิ์ แยกโดยโพลีอะคริลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟริซิส
pH 8.3 รายละเอียดของการทดลองตามวิธีในข้อ 3.11

1. crude enzyme แพรคชัน (180 ไมโครกรัมโปรตีน)
2. 70% แอมโมเนียมซัลเฟตแพรคชัน(100 ไมโครกรัมโปรตีน)
3. แอลคาไลน์โปรตีเอส(peak B)จากคอลัมน์ CM-cellulose
(20 ไมโครกรัมโปรตีน)



รูปที่ 11ข รูปแบบของแอลคาไลน์โปรตีนเอส(peak B) ในปริมาณต่างๆ จากคอลัมน์

CM-cellulose ที่มี 2 mM PMSF (การทดลองเหมือนในรูปที่ 11ก)

1. โปรตีน 86 ไมโครกรัม

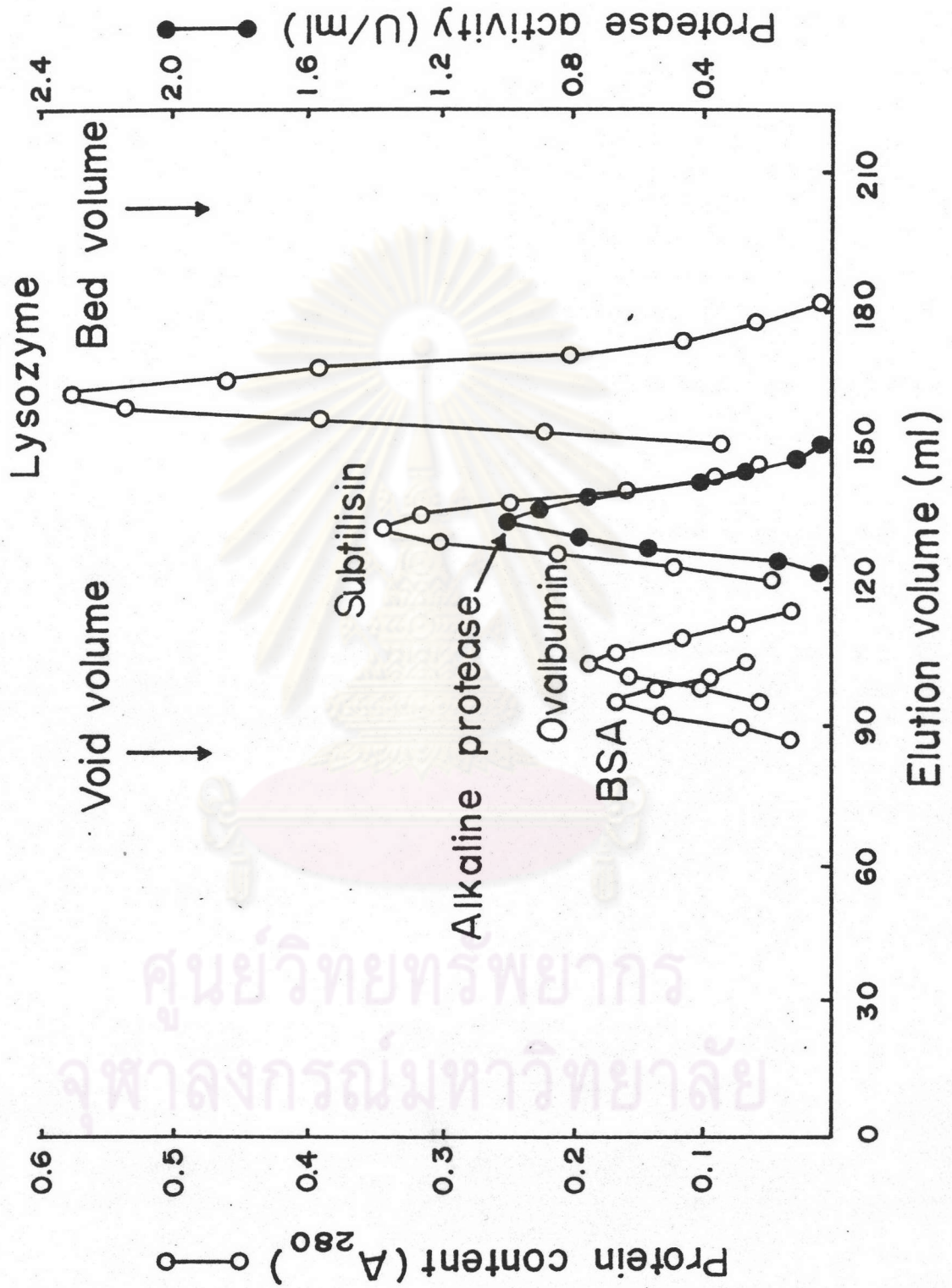
2. โปรตีน 20 ไมโครกรัม

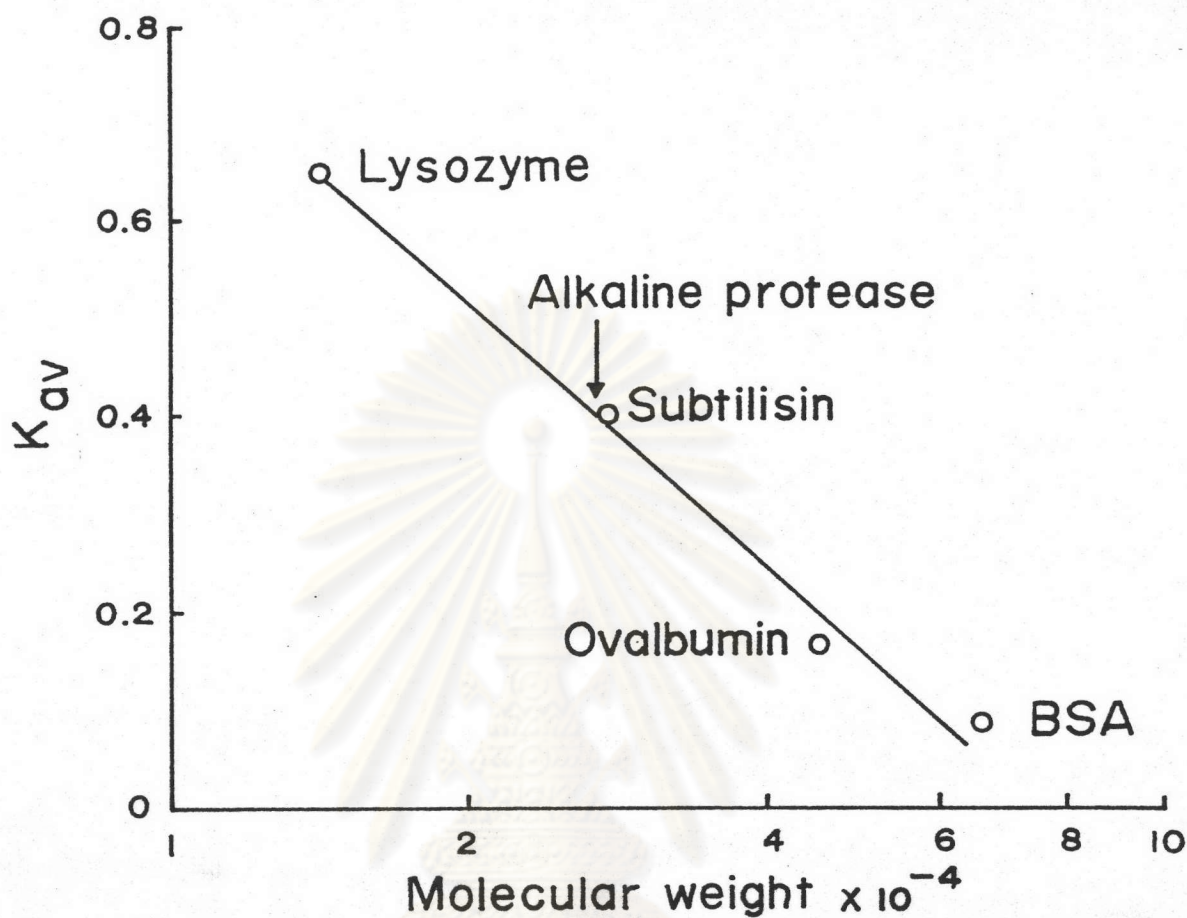
3. โปรตีน 60 ไมโครกรัม

รูปที่ 12 รูปแบบการแยกโปรตีนในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75

การหา elution volume ของโปรตีนมาตรฐาน และเอนไซม์แอลคาไลน์ฟอสเฟสเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75 (ขนาด 1.7 X 90 ซม.) ตามวิธีทดลองในข้อ 3.13.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง K_{av} และ \log ของน้ำหนักโมเลกุล
 ของโปรตีนมาตรฐานในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แอลคาไลน์
 โปรตีเอสโดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75 (ขนาด 1.7 X 90 ซม.) (วิธี
 ทดลองข้อ 3.13.1)

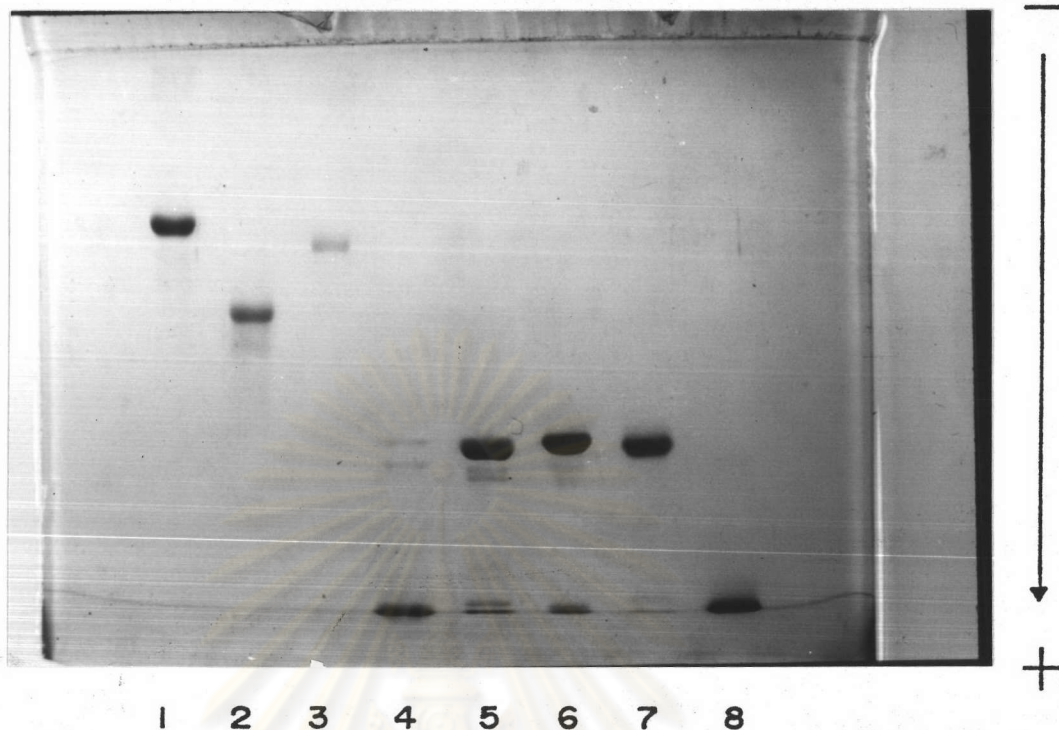
4.7.2 ผลการศึกษาหน่วยย่อยและน้ำหนักโมเลกุลโดยการใช้อิเล็กโตรโฟรีซิส

นำสารละลายเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ทำให้เข้มข้นแล้วจากข้อ 3.11.2 มาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยวิธีเอสดีเอส ผลการทดลอง(รูปที่ 14) พบว่า นอกจากจะมีแถบโปรตีนสีเข้มขนาดใหญ่แล้ว ยังมีแถบสีจางๆที่ระดับต่ำลงมาซึ่งคาดว่าเป็นโปรตีนที่เกิดจากการย่อยตัวเอง (autolysis) ของเอนไซม์หรืออาจเป็นโปรตีนชนิดอื่นที่เจือปนอยู่(ช่องที่ 4) ผลเปรียบเทียบระหว่างการใส่ PMSF และไม่มีใส่(ช่อง 4 และ 3) ยืนยันได้ว่าเอนไซม์ที่มีอัตราการย่อยตัวเองสูงในสภาวะการทดลองนี้ จากการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสควบคู่ไปกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่าโปรตีนมาตรฐาน BSA , Ovalbumin , Chymotrypsinogen A , Subtilisin Carlsberg และ Cytochrome C จะมีการเคลื่อนที่ในแผ่นเอสดีเอส-โพลีอะครีลาไมด์ เจล ซึ่งแสดงโดยค่า relative mobility เรียงลำดับดังนี้คือ 0.33, 0.49, 0.72 , 0.72 และ 1.0 ส่วนเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส มีค่า relative mobility 0.71 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน รูปที่ 15 สามารถหาค่าน้ำหนักโมเลกุลได้เท่ากับ 27,000 ดาลตัน และจากผลที่ได้นี้แสดงว่าแอลคาไลน์โปรตีเอสเป็นโปรตีนสายเดี่ยวที่ไม่มีหน่วยย่อย

4.7.3 ผลการศึกษา pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

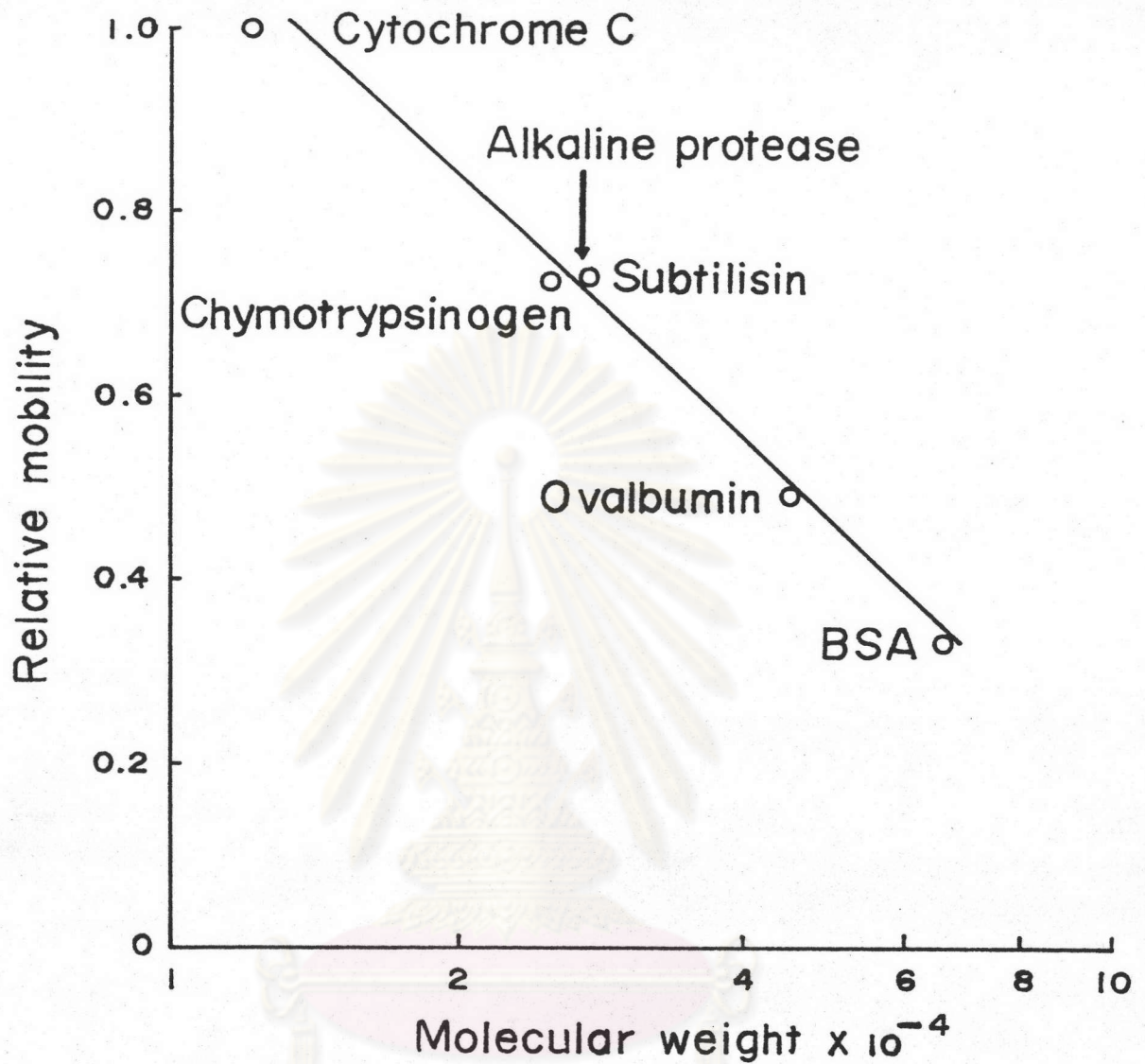
เมื่อวัดแอกติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ทำให้บริสุทธิ์จาก *B. subtilis* TISTR 25 และแอลคาไลน์โปรตีเอสชนิด Subtilisin Carlsberg ที่ pH ต่างๆในช่วง 4.5-11.3 ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 16 จะเห็นว่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากสายพันธุ์ TISTR 25 และ Subtilisin ต่างกันคือ อยู่ในช่วง pH 8.0-9.0 และ 9.7 ตามลำดับ และการใช้บัฟเฟอร์ต่างชนิด ไม่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

ในการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20-75 องศาเซลเซียส(รูปที่ 17) พบว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจากสายพันธุ์ TISTR 25 มีแอกติวิตีที่สูงสุดที่อุณหภูมิ 55 °ซ และแอกติวิตีเริ่มลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงเกิน 60 °ซ และเกือบจะไม่มีแอกติวิตีเลยที่อุณหภูมิตั้งแต่ 70 °ซ ขึ้นไป ส่วน Subtilisin Carlsberg มีอุณหภูมิที่เหมาะสม 60 °ซ และแอกติวิตีเริ่มลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงเกิน 65 °ซ

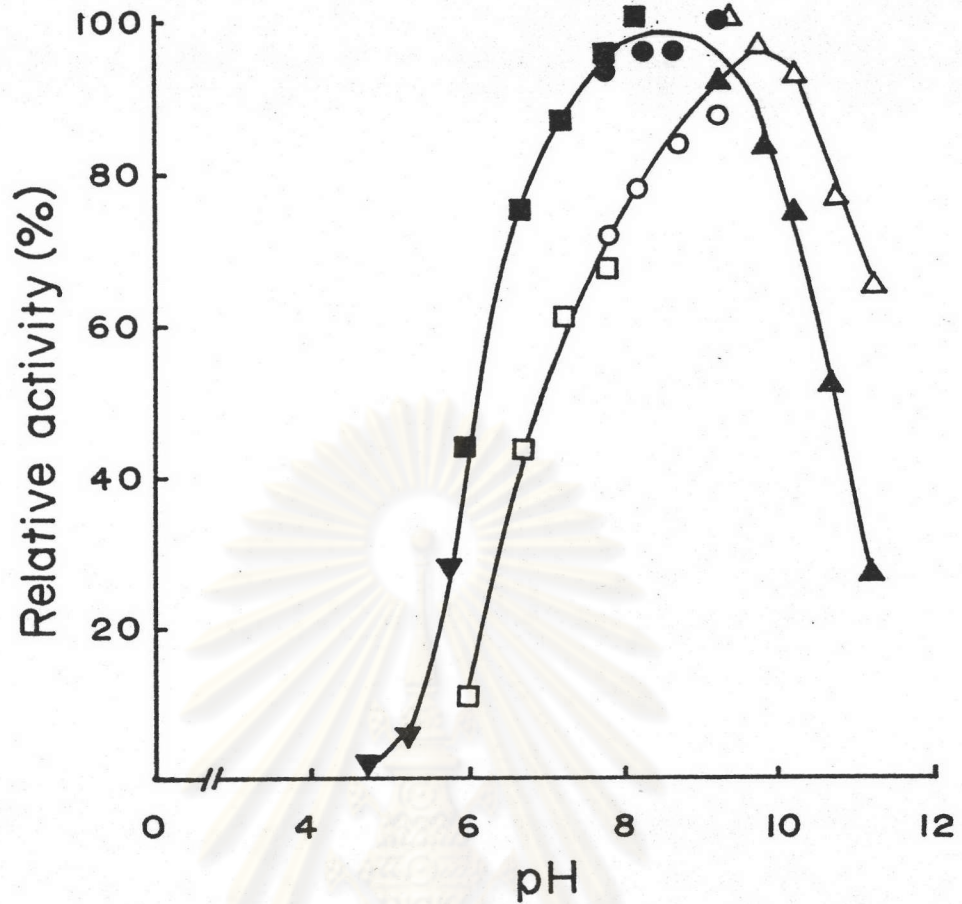


รูปที่ 14 รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสแยกโดย
เอสดีเอส-โพลีอะครีลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส (วิธีทดลองข้อ 3.13)

1. BSA (14 ไมโครกรัมโปรตีน)
2. Ovalbumin (13 ไมโครกรัมโปรตีน)
3. Amylase (27 ไมโครกรัมโปรตีน)
4. Alkaline protease ที่ไม่มี PMSF (10 ไมโครกรัมโปรตีน)
5. Alkaline protease มี 2 mM PMSF (10 ไมโครกรัมโปรตีน)
6. Subtilisin Carlsberg (13 ไมโครกรัมโปรตีน)
7. Chymotrypsinogen (13 ไมโครกรัมโปรตีน)
8. Cytochrome C (14 ไมโครกรัมโปรตีน)

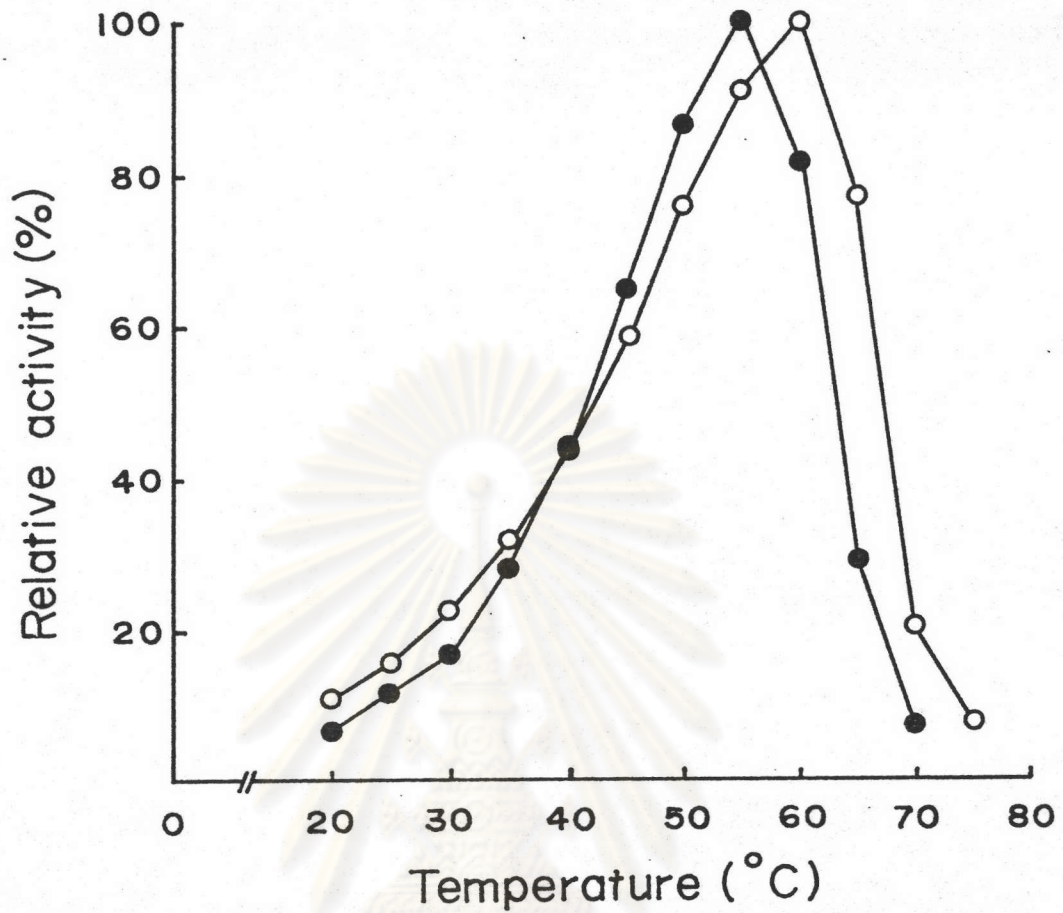


รูปที่ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Relative mobility และ \log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสโดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟริซิส (วิธีทดลองข้อ 3.13)



รูปที่ 16 ผลของ pH ต่อแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *B. subtilis* TISTR 25 เปรียบเทียบกับเอนไซม์มาตรฐาน Subtilisin วัดแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 45 °C ในสารละลายบัฟเฟอร์ (0.2 โมล/ลิตร) pH ต่างๆ ตามวิธีในข้อ 3.13.2

ชนิดของบัฟเฟอร์	เอนไซม์จาก TISTR 25	Subtilisin
อะซีเตต	▼—▼	—
อิมิดาโซล	■—■	□—□
ทริส-ไฮโดรคลอริก	●—●	○—○
คาร์บอเนต	▲—▲	△—△



รูปที่ 17 ผลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของโปรตีเอสจาก *B. subtilis* TISTR

25 (●—●) เปรียบเทียบกับเอนไซม์มาตรฐาน Subtilisin

Carlsberg (○—○) วัดแอกติวิตีที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 20-75 °C

และที่ pH 7.6 ตามวิธีทดลองในข้อ 3.13.4

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าแอลคาไลน์โปรตีเอสจากสายพันธุ์ TISTR 25 มีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสม ต่างจาก Subtilisin Carlsberg ในสภาวะที่ทำการทดลอง

4.7.4 ผลของ pH และอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์

อินคิวเบตเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ต่างชนิดที่ pH 4.7, 6.5 และ 8.3 ที่อุณหภูมิคงที่ 45 °C แล้ววัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือในช่วงเวลาต่างๆ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 18 จะเห็นว่าที่ pH 6.5 และ 8.3 เอนไซม์จะมีความเสถียรสูง ในขณะที่ pH 4.7 เอนไซม์จะมีความเสถียรต่ำลง ถ้าพิจารณาอัตราเร็วของการเสียสภาพที่ pH 4.7 พบว่าเป็นแบบ first-order kinetics แอกติวิตีของเอนไซม์ลดลง 50 % ที่เวลา 75 นาที

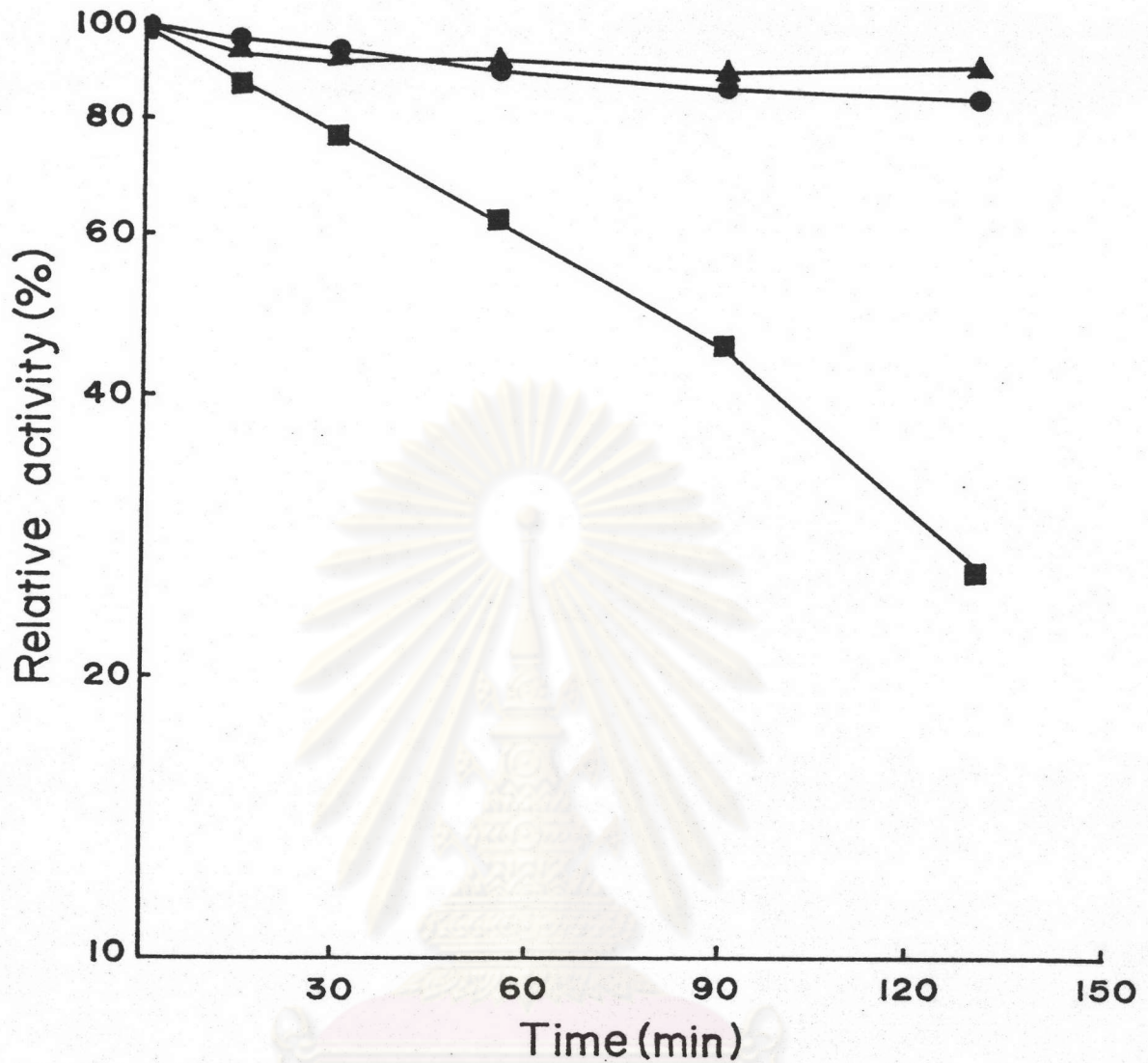
ในการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ พบว่าภายในช่วงเวลา 30 นาทีของการอินคิวเบตที่อุณหภูมิ 20-45 องศาเซลเซียส เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสไม่สูญเสียแอกติวิตี แต่มีแอกติวิตีลดลงประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ถ้าอินคิวเบตที่ 55 °C และเกือบไม่มีแอกติวิตีเหลือที่อุณหภูมิ 62 °C (รูปที่ 19)

4.7.5 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บเอนไซม์

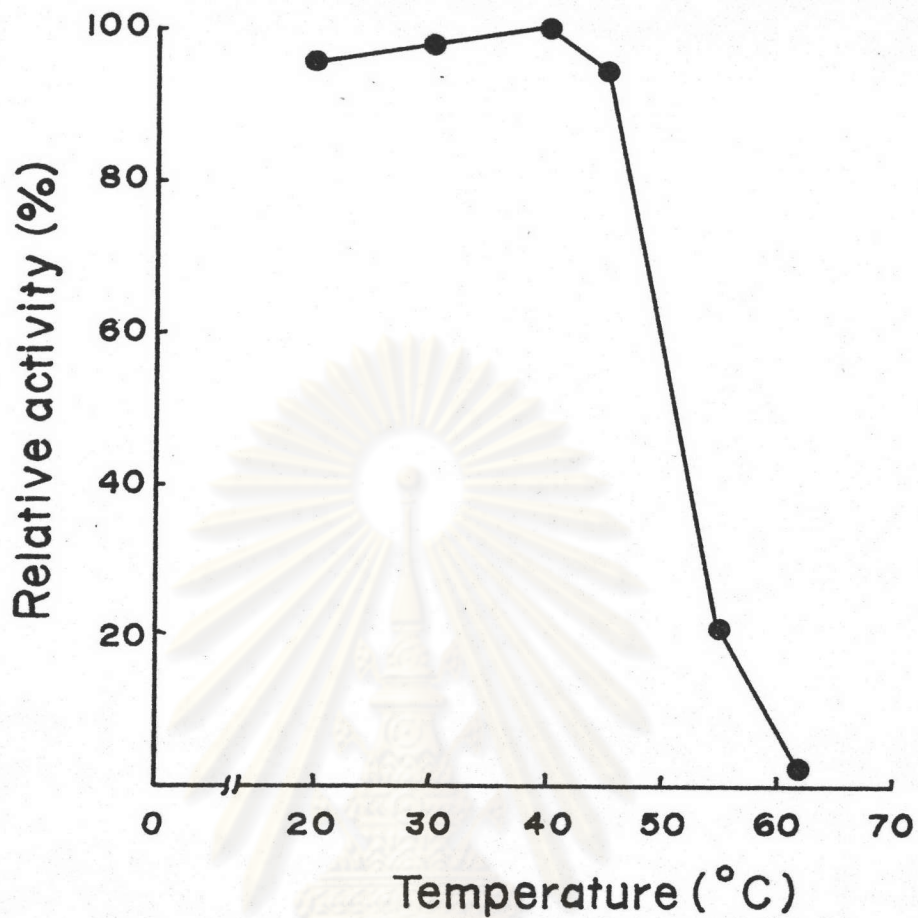
การศึกษานอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บเอนไซม์ในระยะยาวได้ผลดังรูปที่ 20 จะเห็นได้ว่าสามารถเก็บเอนไซม์ในอิมิตาโซลบัฟเฟอร์ 10 mM pH 6.5 ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลา 1 เดือนโดยไม่สูญเสียแอกติวิตี และถ้าเก็บไว้ 2 เดือน จะเสียแอกติวิตีเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การเก็บที่ 4 °C เป็นเวลา 1 และ 2 เดือนทำให้เอนไซม์สูญเสียแอกติวิตี 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

4.7.6 ผลการศึกษากิจกรรมการไฮโดรไลสส์สับสเตรตธรรมชาติ

ในการศึกษาความสามารถในการไฮโดรไลสส์สับสเตรตธรรมชาติของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ทำให้บริสุทธิ์จากสายพันธุ์ TISTR 25 เทียบกับเอนไซม์มาตรฐาน Subtilisin Carlsberg ใช้สับสเตรต casein, azocasein, azocoll และ hemoglobin นำผลที่ได้มาพลอตและคำนวณหาค่า K_m และ V_{max} โดยวิธี Lineweaver-Burk ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 21 - 24, และสรุปไว้ในตารางที่ 7 พบว่าค่า K_m ของ casein และ azocasein สำหรับ Subtilisin (0.01 มิลลิโมล/ลิตร และ 0.67 มก./มล.) ต่ำกว่าค่าของเอนไซม์จาก TISTR 25 (0.02 มิลลิโมล/ลิตร และ 3.03 มก./มล.) ตามลำดับ แสดงให้

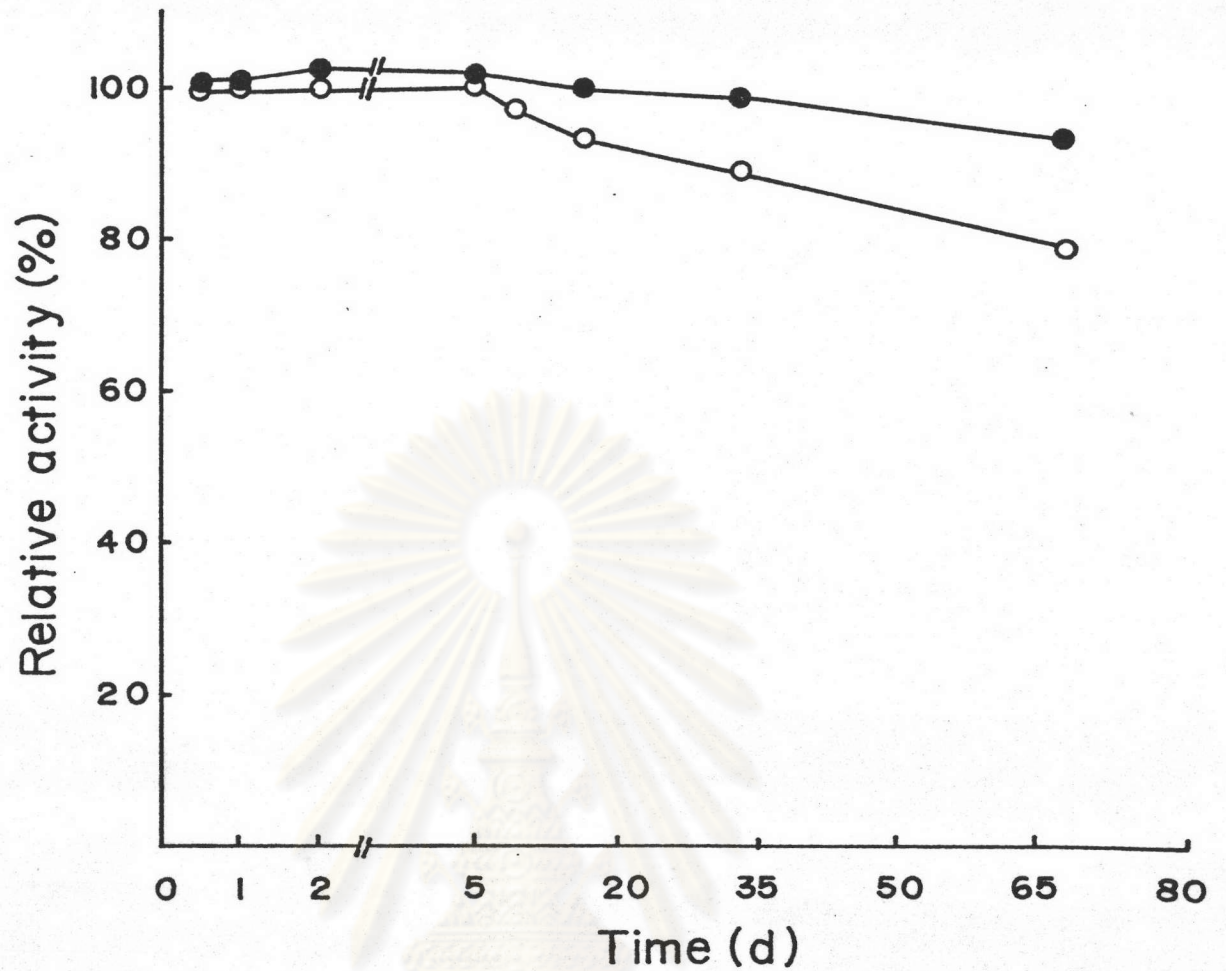


รูปที่ 18 ผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *B. subtilis* TISTR 25 เมื่ออินคิวเบตเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 45 °C ในอะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4.7 (■—■) (ปริมาณเอนไซม์ = 0.44 หน่วย/มล.), อิมิตาโซลบัฟเฟอร์ pH 6.5 (▲—▲) (ปริมาณเอนไซม์ = 0.75 หน่วย/มล.) และทริส-กรดไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ pH 8.3 (●—●) (ปริมาณเอนไซม์ = 0.64 หน่วย/มล.) ที่เวลาต่างๆตามวิธีในข้อ 3.13.3



รูปที่ 19 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *B. subtilis* TISTR 25 โดยอินคิวเบตเอนไซม์ (0.07 หน่วย /มล.) ในทริส-ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ pH 8.5 ที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 30 นาที วัดแอกติวิตีที่ 55°ซ ตามวิธีทดลองในข้อ 3.13.5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 20 ความเสถียรของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส (2.6 หน่วย/มล.)

จาก *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อเก็บในสารละลาย 10 มิลลิโมล

/ลิตร อิมิตาโซลีนัฟเฟอร์ pH 6.5 ในช่วงเวลาต่างๆกัน ที่อุณหภูมิ 4 °ซ

(○ — ○) และ -20 °ซ (● — ●)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 21 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส

(● — ●) เปรียบเทียบกับ Subtilisin Carlsberg

(○ — ○) เมื่อใช้ casein เป็นสับสเตรต ทำการวัดแอกติวิตี

ที่อุณหภูมิ 55 °ซ pH 8.5 ตามวิธีในข้อ 3.4.1

รูปที่ 22 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส

(● — ●) เปรียบเทียบกับ Subtilisin Carlsberg

(○ — ○) เมื่อใช้ azocasein เป็นสับสเตรต ทำการวัด

แอกติวิตีที่อุณหภูมิ 55 °ซ pH 8.5 ตามวิธีในข้อ 3.4.1 แต่เปลี่ยน

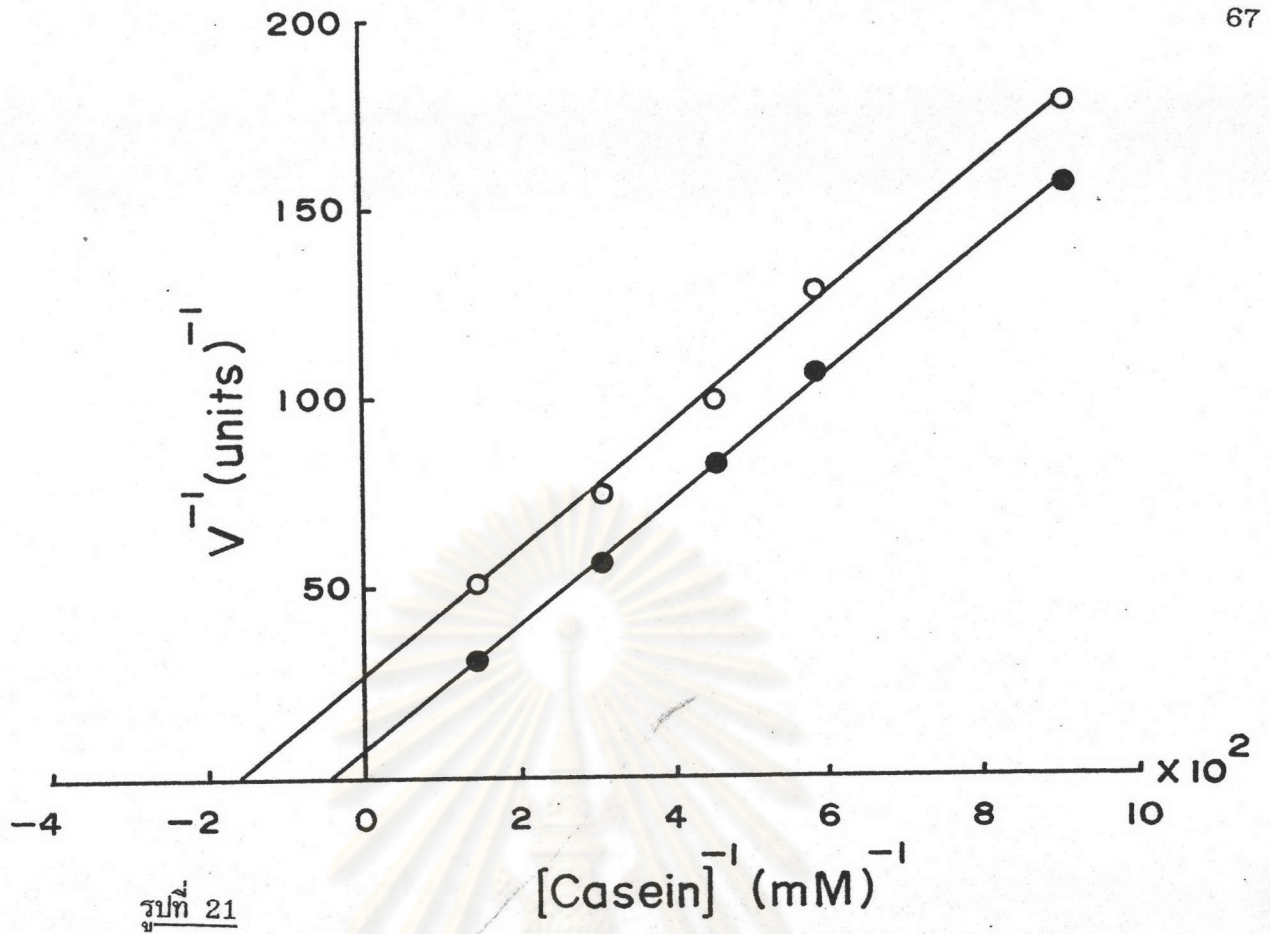
ช่วงท้ายของการวัดแอกติวิตี คือ นำ 0.8 มล. ของส่วนน้ำใสหลัง

การปั่นตกตะกอนด้วย 10 เปอร์เซ็นต์กรดไตรคลอโรอะซิติก มาเติม

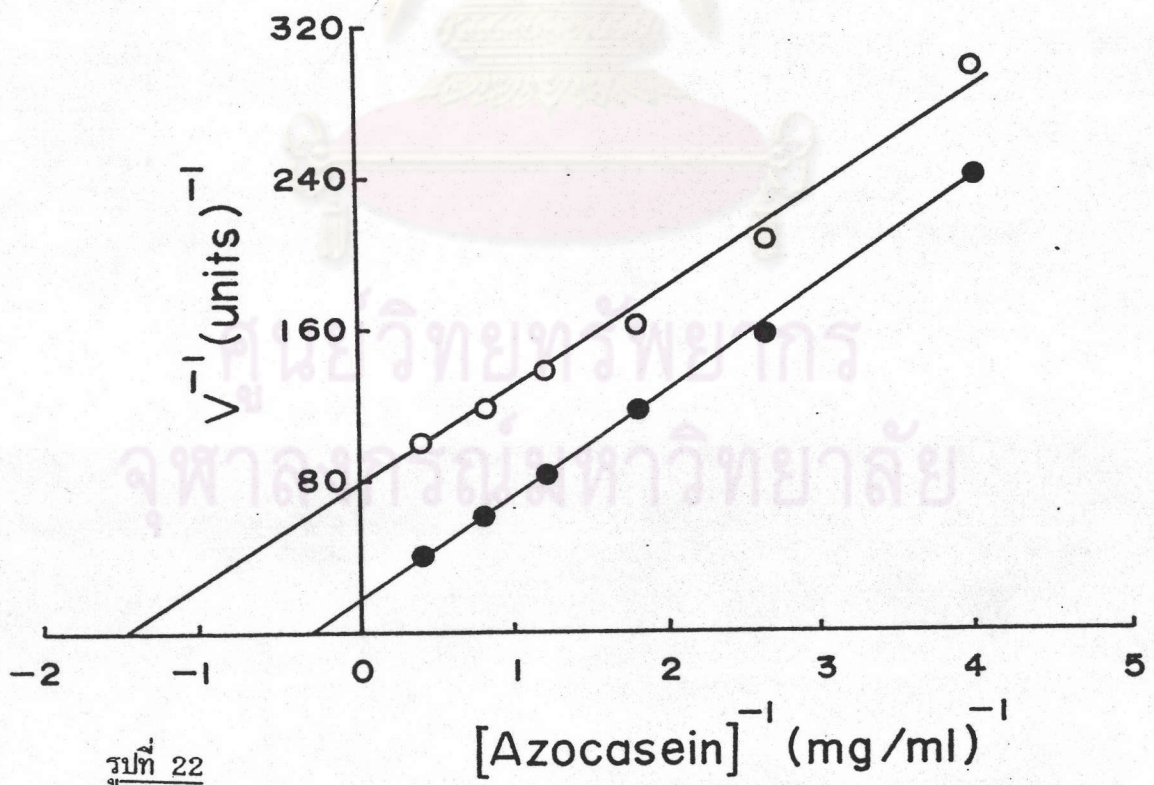
1.8 N NaOH ปริมาตร 0.2 มล. วัดสีที่เกิดขึ้นที่ A_{420}

กำหนด 1 หน่วยของเอนไซม์คือปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่า A_{420} เพิ่มขึ้น

เท่ากับ 1.0 ในเวลา 1 นาที



รูปที่ 21



รูปที่ 22

รูปที่ 23 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส

(●—●) เปรียบเทียบกับ Subtilisin Carlsberg

(○—○) เมื่อใช้ azocoll เป็นสับสเตรต ทำการวัดแอกติวิตี

ที่อุณหภูมิ 55 °C pH 8.5 ตามวิธีในข้อ 3.4.1 ทุกประการ ยกเว้น

หยุดปฏิกิริยาโดยนำไนเซ่น้ำแข็งแทนการเติม 10 เปอร์เซ็นต์กรด

ไตรคลอโรอะซิติก วัดสีในส่วนน้ำใสที่ A_{520}

กำหนด 1 หน่วยของเอนไซม์คือปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่า A_{520} เพิ่มขึ้น

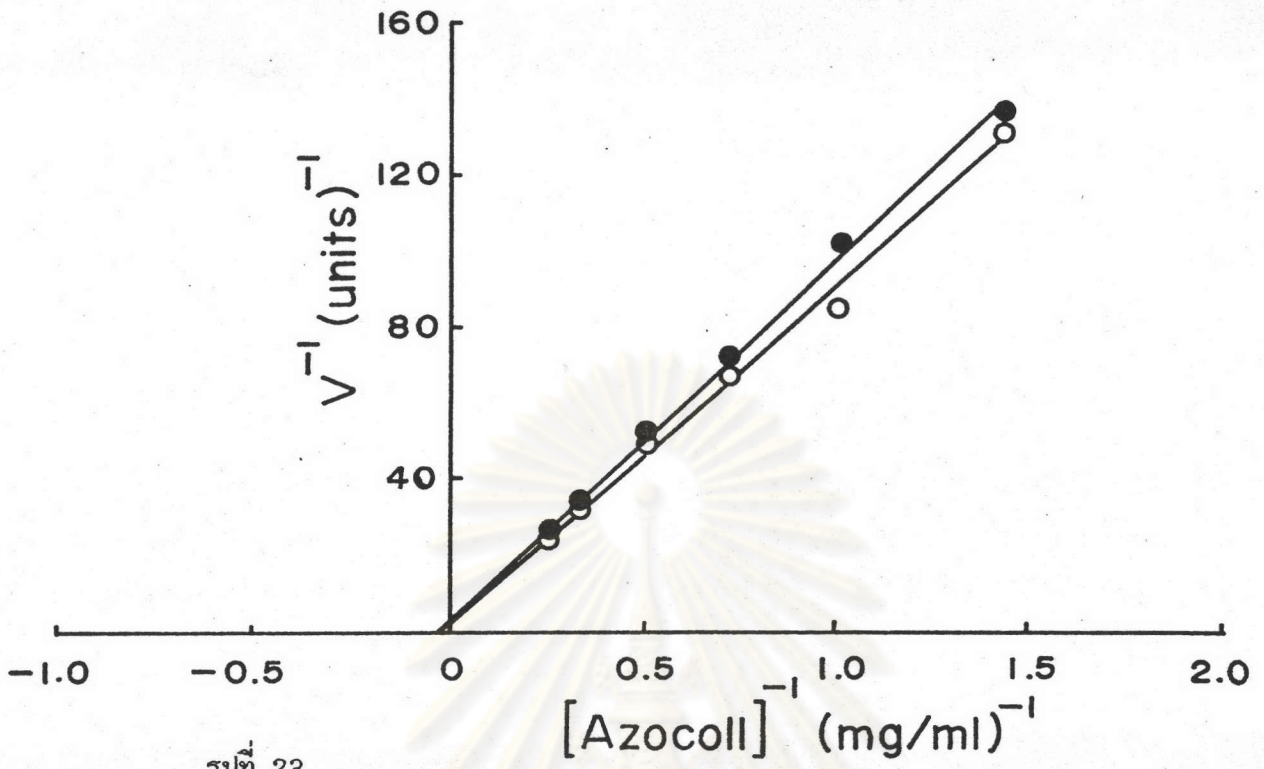
เท่ากับ 1.0 ในเวลา 1 นาที

รูปที่ 24 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส

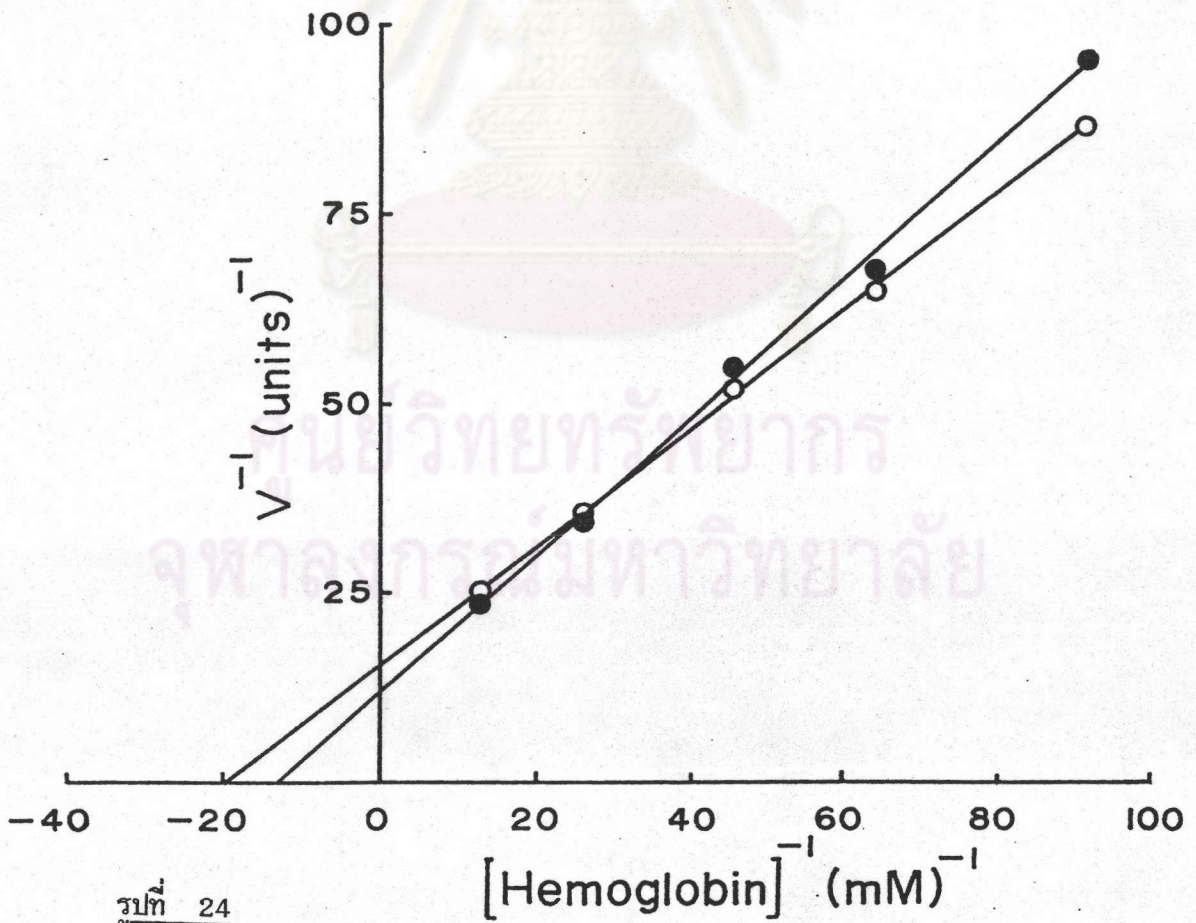
(●—●) เปรียบเทียบกับ Subtilisin Carlsberg

(○—○) เมื่อใช้ hemoglobin เป็นสับสเตรต ทำการวัด

แอกติวิตีที่อุณหภูมิ 55 °C pH 8.5 ตามวิธีในข้อ 3.4.1



รูปที่ 23



รูปที่ 24

เห็นว่า Subtilisin มีความสามารถในการยึดจับ casein และ azocasein ดีกว่า โปรตีเอสของ TISTR 25 ส่วนความสามารถในการยึดจับ hemoglobin และ azocoll ของเอนไซม์ทั้งสองชนิดไม่ต่างกัน และเมื่อเปรียบเทียบความเร็วสูงสุดในการเร่งปฏิกิริยา (V_{max}) ของเอนไซม์ทั้งสองชนิดพบว่าโปรตีเอสจาก TISTR 25 เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลส์ casein และ azocasein ได้ดีกว่าเอนไซม์ Subtilisin อย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่อัตราเร็วในการไฮโดรไลส์ hemoglobin และ azocoll ไม่ต่างกัน

4.7.7 ผลการศึกษาปฏิกิริยาเร่งการไฮโดรไลส์พันธะเอสเทอร์

จากผลการทดลองตามวิธีในข้อ 3.13.7 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส จาก TISTR 25 กับ Subtilisin Carlsberg มีความจำเพาะต่อสับสเตรตเอสเทอร์ benzoyl tyrosine ethyl ester (BTEE) โดยเมื่อนำไปหาแอกติวิตีที่ความเข้มข้นต่างๆ และนำผลไปพลอตโดยวิธี Lineweaver-Burk (รูปที่ 25) พบว่าค่า K_m ของ BTEE สำหรับเอนไซม์ Subtilisin และเอนไซม์จาก TISTR 25 มีค่า 1.1 และ 8.0 มิลลิโมล/ลิตร ขณะที่ V_{max} = 0.02 และ 0.3 หน่วยตามลำดับ (ตารางที่ 7) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ Subtilisin มีความสามารถยึดจับ BTEE ได้ดีกว่า แต่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลส์พันธะเอสเทอร์ช้ากว่าแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก TISTR 25

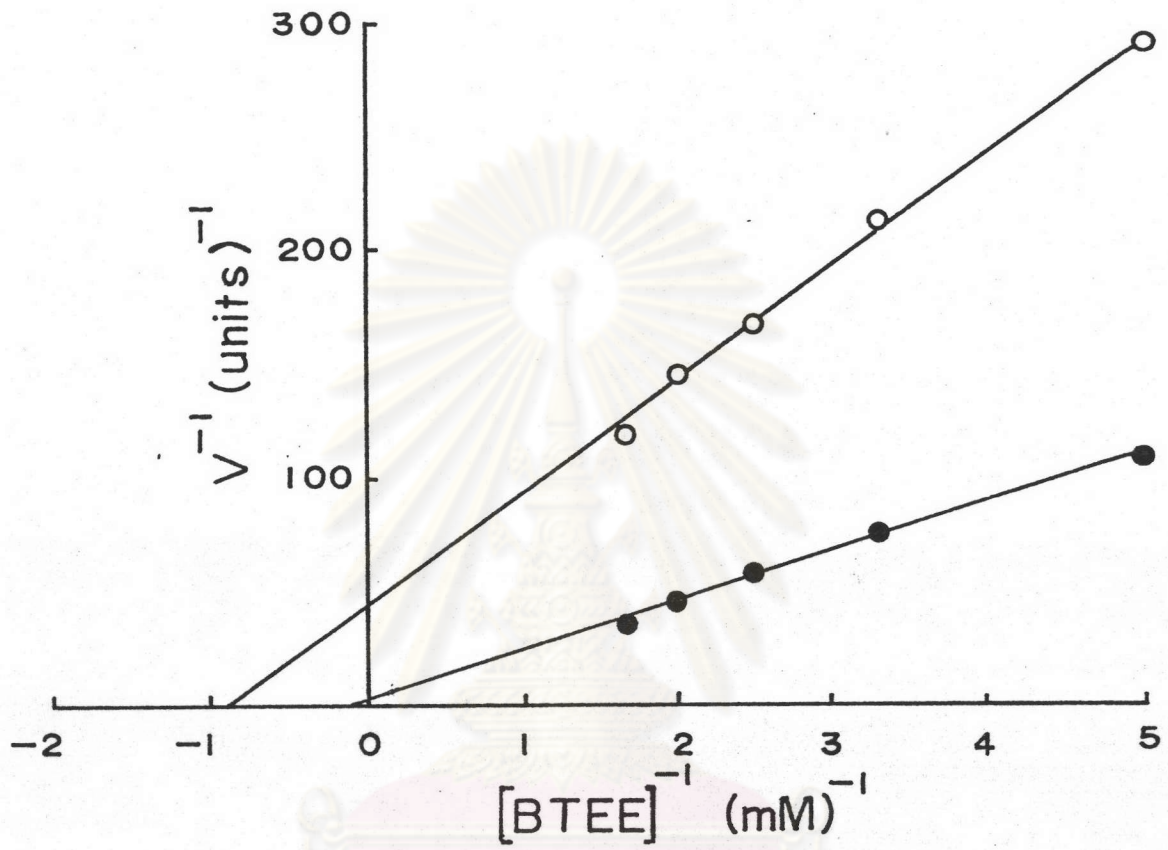
4.7.8 ผลการศึกษากิจกรรมของไอออนของโลหะและตัวยับยั้งต่อโปรตีเอสแอกติวิตี

เมื่อศึกษาผลของไอออนของโลหะ (ตามวิธีในข้อ 3.13.8) ต่อแอกติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากสายพันธุ์ TISTR 25 พบว่าไอออนของโลหะทุกตัวที่ความเข้มข้นและสภาวะของการทดลองไม่มีผลต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ (ตารางที่ 8)

เมื่อศึกษาผลของสารที่มีฤทธิ์ในการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนชนิดต่างๆ (ตารางที่ 9) พบว่า PMSF ปริมาณ 10 มิลลิโมล/ลิตร สามารถยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ได้ 98.0 เปอร์เซ็นต์ โดยที่สารตัวอื่นๆไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์ในสภาวะที่ทำการทดลอง จากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่ากรดอะมิโนเซรีน มีความสำคัญต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ ในขณะที่ ซีสไธน และ ซีสเตอีน ไม่มีบทบาทต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ และการที่สารยับยั้งเอนไซม์ trypsin (trypsin inhibitor) ไม่สามารถยับยั้งแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก B. subtilis TISTR 25 ได้ แสดงว่าเอนไซม์ทั้งสองมีบริเวณเร่งแตกต่างกัน

รูปที่ 25 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส
(● — ●) (ปริมาณเอนไซม์ = 0.12 หน่วย/มล.) เปรียบเทียบ
กับ Subtilisin Carlsberg (○ — ○) (ปริมาณเอนไซม์ =
0.03 หน่วย/มล.) เมื่อใช้ BTEE เป็นสับสเตรต ติดตามการเปลี่ยนค่า
absorbance ที่ 256 นาโนเมตร ในเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 55 °ซ
pH 8.5 ตามวิธีในข้อ 3.4.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 สรุปค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสกับ
Subtilisin Carlsberg เมื่อใช้โปรตีนต่างชนิดหรือเอสเทอร์
เป็นสับสเตรต (วิธีทดลองข้อ 3.4)

substrate	type of protease	Kinetic parameters	
		K_m *	V_{max} **
<u>Protein substrate</u>			
casein	TISTR 25	0.02	0.14
	Subtilisin	0.01	0.04
azocasein	TISTR 25	3.03	0.05
	Subtilisin	0.67	0.01
azocoll	TISTR 25	33.33	0.32
	Subtilisin	33.33	0.36
hemoglobin	TISTR 25	0.07	0.08
	Subtilisin	0.05	0.06
<u>Ester substrate</u>			
BTEE	TISTR 25	8.0	0.30
	Subtilisin	1.1	0.02

* K_m ของ casein, hemoglobin และ BTEE มีหน่วยเป็น มิลลิโมล/ลิตร แต่ azo-
casein และ azocoll มีหน่วยเป็น มก./มล.

** V_{max} มีหน่วยเป็น units ของเอนไซม์ (ดูรายละเอียดในคำอธิบายรูปที่ 20 - 24)

ตารางที่ 8 ผลของไอออนของโลหะต่อแอกติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์
โปรตีเอสจาก *B. subtilis* TISTR 25

1 mM metal ion	% Remaining activity
control	100
Mg ⁺⁺	102.0
Mn ⁺⁺	83.3
Fe ⁺⁺	113.3
Fe ⁺⁺⁺	103.6
Co ⁺⁺	89.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 ผลของสารเคมีต่างชนิดต่อแอกติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก

B. subtilis TISTR 25

Inhibitors	% Remaining activity
control	100
10 mM PMSF	2.0
2.5 mM 1,10-Phenanthroline	97.7
2.5 mM DL-Dithiothreitol	102.0
1 mM Iodoacetamide	96.1
1 mM p-Chloromercuribenzoic acid	103.2
1 mM Mercaptoethanol	100.8
1 mM L-Cysteine	100.6
0.1 mg/ml Soybean trypsin inhibitor	114.8
0.5 mg/ml Soybean trypsin inhibitor	125.3
1 mg/ml Soybean trypsin inhibitor	129.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.7.9 ผลการศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสต่อเพปไทด์สังเคราะห์

การวัดการไฮโดรไลสเปปไทด์สังเคราะห์ที่มีส่วด้วยการติดตามจลนศาสตร์ของการไฮโดรไลสโดยใช้สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ตามวิธีในข้อ 3.13.9 พบว่าเอนไซม์แต่ละชนิดมีแอกติวิตีต่อเพปไทด์สังเคราะห์แตกต่างกันเช่น เอนไซม์ Trypsin มีแอกติวิตีต่อ NBZ-Arg pNA ดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 26ก และ เอนไซม์ Trypsin, TISTR 25, Subtilisin Carlsberg และ Nagarse (Subtilisin BPN) มีแอกติวิตีต่อ NBZ-Phe-Val-Arg pNA ดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 26ข ตารางที่ 10 รวบรวมผลการไฮโดรไลสเปปไทด์สังเคราะห์ 8 ชนิด โดยเปรียบเทียบแอกติวิตีของเอนไซม์ทั้ง 4 ดังกล่าว พบว่าเอนไซม์ทุกชนิดไฮโดรไลสเปปไทด์สังเคราะห์เหมือนกันคือ NBZ-Phe-Val-Arg pNA , NBZ-Val-Gly-Arg pNA , N-Succ-Ala-Ala-Pro-Phe pNA , N-Succ-Ala-Ala-Pro-Leu pNA และไม่ไฮโดรไลส N-Succ-Phe pNA และไฮโดรไลสแตกต่างกันมี 3 ตัวคือ NBZ-Arg pNA , NBZ-Tyr pNA และ N-Succ-Ala-Ala-Ala pNA โดย Trypsin สามารถไฮโดรไลส NBZ-Arg pNA และ NBZ-Tyr pNA แต่ไม่ไฮโดรไลส N-Succ-Ala-Ala-Ala pNA ตรงข้ามกับเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจาก TISTR 25 , Subtilisin และ Nagarse จะไฮโดรไลส N-Succ-Ala-Ala-Ala pNA แต่ไม่ไฮโดรไลส NBZ-Arg pNA และ NBZ-Tyr pNA

เมื่อพิจารณาการไฮโดรไลสเปปไทด์ของแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก TISTR 25 โดยเปรียบเทียบเปปไทด์ที่มีและไม่มีปลายอะมิโนอิสระ พบว่าเอนไซม์ไม่ไฮโดรไลสเปปไทด์ที่มีปลายอะมิโนอิสระ และเป็น aliphatic group (เนื่องจากเป็นเปปไทด์ไม่มีสี จึงติดตามปฏิกิริยาโดยการวิเคราะห์ผลด้วย TLC) แต่จะไฮโดรไลสเปปไทด์ที่ปลายอะมิโนมีหมู่ hydrophobic ยึดเกาะ (ตารางที่ 11) อย่างไรก็ตาม ถ้าเปปไทด์สายสั้นเกินไปเช่นกรณี NBZ-Arg pNA , NBZ-Tyr pNA หรือ N-Succ-Phe pNA เอนไซม์ก็ไม่สามารถไฮโดรไลสได้

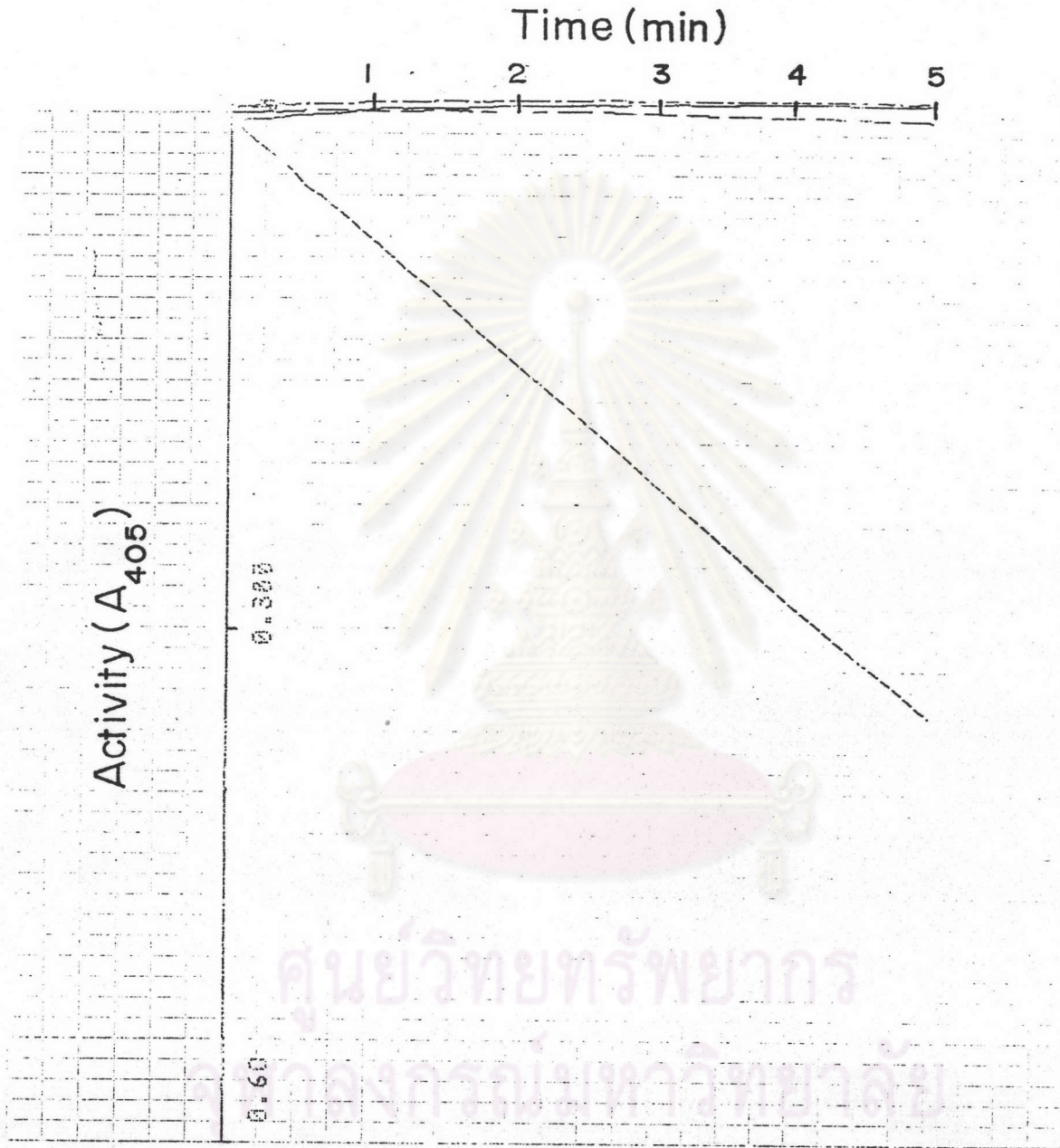
เพื่อศึกษาความจำเพาะในการไฮโดรไลสพันธะเปปไทด์ในเปปไทด์สังเคราะห์ชนิดต่างๆ ได้ทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์หลังการไฮโดรไลสโดยการ run TLC ผลดังแสดงในตารางที่ 12 จะเห็นว่า

ก. hydrolysates ที่ได้จากการไฮโดรไลสเปปไทด์สังเคราะห์ของเอนไซม์ทั้ง 3

รูปที่ 26ก การไฮโดรไลส์เพปไทด์สังเคราะห์ที่มีชื่อ NBz-Arg pNA โดย
 เอนไซม์ชนิดต่างๆที่อุณหภูมิ 55 °ซ pH 8.5 ตามวิธีทำในข้อ 3.13.9
 ติดตามผลโดยวัดการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

ชนิดของเอนไซม์	แอกติวิตี
TISTR 25	_____
Trypsin	-----
Subtilisin	-----
Nagarse	_____

ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



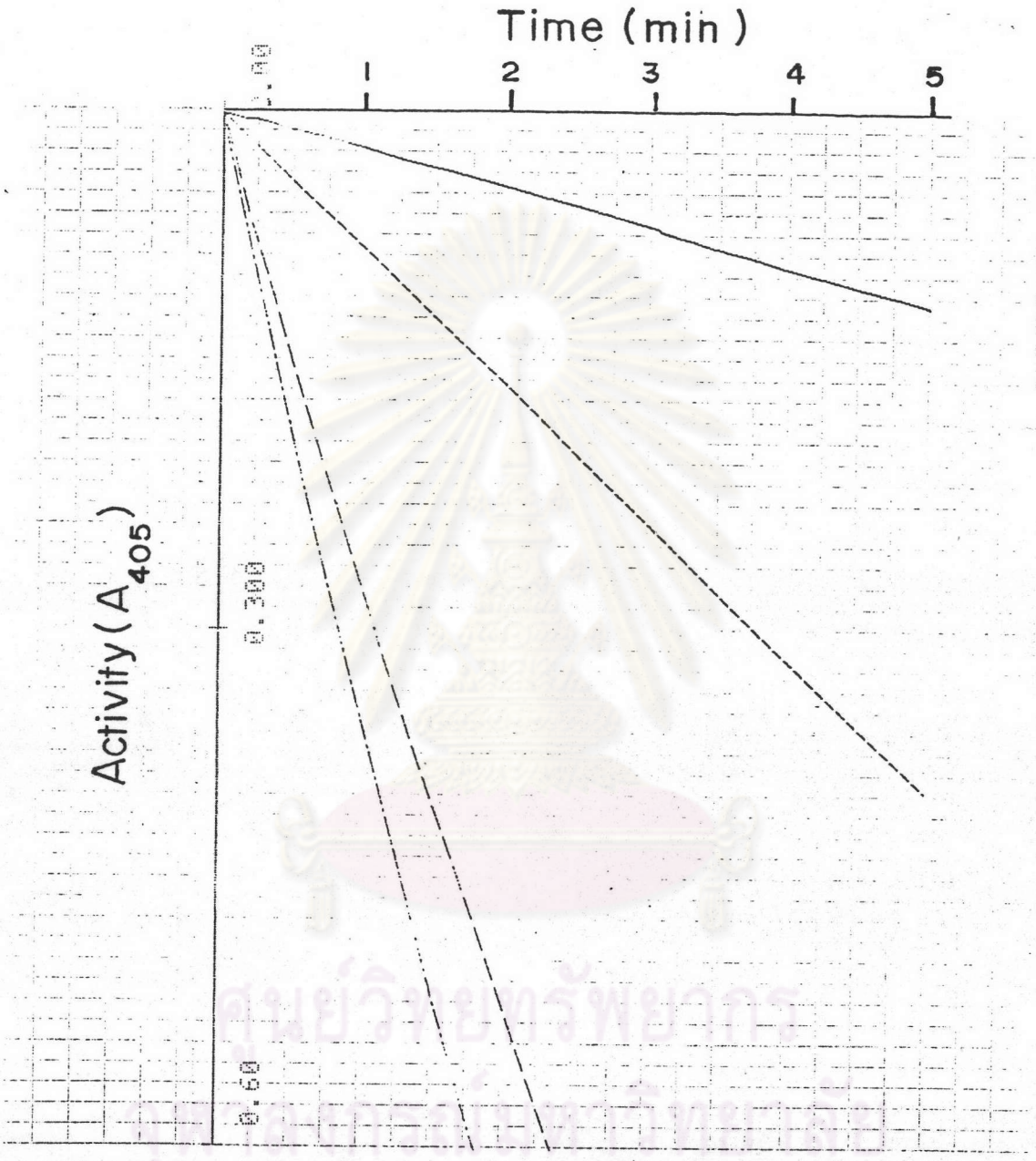
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 26 ข การไฮโดรไลส์เพปไทด์สังเคราะห์ที่มีชื่อ NBz-Phe-Val-Arg pNA
 โดยเอนไซม์ชนิดต่างๆที่อุณหภูมิ 55 °C pH 8.5 ตามวิธีทำ ในข้อ 3.13.9
 ติดตามผล โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

ชนิดของเอนไซม์	แอกติวิตี
TISTR 25	_____
Trypsin	-----
Subtilisin	_____
Nagarse	_____

ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STAD NONLINEAR FINITE ELEMENTS



ตารางที่ 10 เปรียบเทียบแอกติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจาก B.

subtilis TISTR 25 , Subtilisin Carlsberg , Nagarse
(Subtilisin BPN) และ Trypsin ในการไฮโดรไลส์เพปไทด์
สังเคราะห์ชนิดต่างๆ (+) ไฮโดรไลส์ , (-) ไม่ไฮโดรไลส์

Synthetic peptides	TISTR 25	Nagarse	Subtilisin	Trypsin
NBz-Arg pNA	-	-	-	+
NBz-Tyr pNA	-	-	-	+
NBz-Phe-Val-Arg pNA	+	+	+	+
NBz-Val-Gly-Arg pNA	+	+	+	+
N-Succ-Phe pNA	-	-	-	-
N-Succ-Ala-Ala-Ala pNA	+	+	+	-
N-Succ-Ala-Ala-Pro-Phe pNA	+	+	+	+
N-Succ-Ala-Ala-Pro-Leu pNA	+	+	+	+

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 การไฮโดรไลสเพปไทด์สังเคราะห์โดยเอนไซม์แอลคาไลน์
โปรตีเอสจาก *B. subtilis* TISTR 25 (+) ไฮโดรไลส,
(-) ไม่ไฮโดรไลส

Synthetic peptides	Hydrolysis
ชนิดที่มีปลายอะมิโนอิสระ	
Gly-Phe-Ala-Ala	-
Gly-Pro-Ala	-
Gly-Gly-Phe	-
Gly-Gly-Leu	-
Gly-Gly-Ala	-
ชนิดที่ปลายอะมิโนไม่อิสระ	
NBz-Arg pNA	-
NBz-Tyr pNA	-
NBz-Phe-Val-Arg pNA	+
NBz-Val-Gly-Arg pNA	+
N-Succ-Phe pNA	-
N-Succ-Ala-Ala-Ala pNA	+
N-Succ-Ala-Ala-Pro-Phe pNA	+
N-Succ-Ala-Ala-Pro-Leu pNA	+

ตารางที่ 12 ค่า R_f ของ spot บนแผ่น TLC ของกรดอะมิโนมาตรฐาน และ enzyme hydrolysates ที่ได้จากการอินคิวเบตเอนไซม์ชนิดต่างๆกับ สับสเตรตชนิดต่างๆ (วิธีข้อ 13.3.9)

Synthetic peptides and amino acids	R_f			
	control	TISTR 25	Nagarse	Subtilisin
p-Nitroaniline	0.89	-	-	-
Ala	0.56	-	-	-
Val	0.68	-	-	-
Arg	0.34	-	-	-
NBz-Phe-Val-Arg pNA	-	-	0.33	0.32
	-	0.87	0.87	0.83
NBz-Val-Gly-Arg pNA	-	0.63	0.63	0.62
	-	0.86	0.87	0.88
N-Succ-Ala-Ala-Ala pNA	-	0.53	0.54	0.55
	-	0.75	0.75	0.77
	-	0.80	0.79	0.80
	-	0.88	0.89	0.90
N-Succ-Ala-Ala-Pro-Phe pNA	-	0.85	0.87	0.86
N-Succ-Ala-Ala-Pro-Leu pNA	-	0.88	0.90	0.89

ชนิดคือ TISTR 25, Subtilisin, Nagarse ในกรณีที่เพปไทด์เป็น N-Succ-Ala-Ala-Pro-Leu pNA และ N-Succ-Ala-Ala-Pro-Phe pNA ได้ spots เหมือนกันคือแต่ละสับสเตรตจะให้เพียง spot เดียวซึ่งมีค่า R_f อยู่ระหว่าง 0.85 - 0.90 พบว่าเป็น p-Nitroaniline แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดมีความจำเพาะต่อปลายด้านคาร์บอกซิลของกรดอะมิโน Phe และ Leu

ข. สำหรับ hydrolysates ที่ให้ spots มากกว่า 1 spots ได้แก่ NBz-Phe-Val-Arg pNA โดย เอนไซม์ Subtilisin, Nagarse ให้ spots ซึ่งสังเกตเห็นได้จางๆ ที่มีค่า R_f 0.32 และ 0.33 ตามลำดับ จากการเทียบค่า R_f พบว่าควรเป็นกรดอะมิโน Arg แสดงว่าเอนไซม์ทั้งสองมีความจำเพาะต่อปลายคาร์บอกซิลของกรดอะมิโน Val ส่วน TISTR 25 จะไม่เห็น spot นี้ นอกจากนี้เอนไซม์ทั้งสามยังให้ spot ที่มีค่า R_f 0.83 - 0.87 ซึ่งพบว่าเป็น p-Nitroaniline แสดงว่าเอนไซม์ทั้ง 3 นี้มีความจำเพาะต่อปลายด้านคาร์บอกซิลของกรดอะมิโน Arg

ค. สำหรับ hydrolysates จาก NBz-Val-Gly-Arg pNA เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดจะให้ spot เหมือนกันอย่างละ 2 spot โดย spot แรกจะมีค่า R_f อยู่ในช่วง 0.62 - 0.63 คาดว่าน่าจะเป็น dipeptide Gly-Arg และ spot ที่สองคือ p-Nitroaniline แสดงว่าเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดมีความจำเพาะต่อกรดอะมิโน Val และ Arg ซึ่งยืนยันผลการวิเคราะห์การไฮโดรไลส์เพปไทด์ NBz-Phe-Val-Arg pNA ในข้อ ข.

ง. สำหรับ hydrolysates จาก N-Succ-Ala-Ala-Ala pNA พบว่าเอนไซม์ทั้ง 3 จะให้ spot เหมือนกัน 4 spots เมื่อเปรียบเทียบกับค่า R_f พบว่าเป็นกรดอะมิโน Ala และ p-Nitroaniline ส่วน spot ที่เหลือคาดว่าน่าจะเป็น dipeptide แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดมีความจำเพาะต่อกรดอะมิโน Ala

การทดลองอีกอันหนึ่งซึ่งยืนยันความเชื่อได้ของระบบที่ทดลอง โดยได้เปรียบเทียบ hydrolysates ที่ได้จากการไฮโดรไลส์ NBz-Val-Gly-Arg pNA ด้วย TISTR 25 , Chymotrypsin และ TISTR 25 ผสมกับ Chymotrypsin หลังการ run TLC พบว่ามีหลาย spots (ตารางที่ 13) เมื่อเปรียบเทียบกับค่า R_f ของกรดอะมิโนมาตรฐานพบว่าเอนไซม์ Chymotrypsin และ TISTR 25 ผสมกับ Chymotrypsin จะให้กรดอะมิโน

ตารางที่ 13 ค่า R_f ของ spot บนแผ่น TLC ของกรดอะมิโนมาตรฐาน และ

enzyme hydrolysates ที่ได้จากการอินคิวเบตเอนไซม์ชนิดเดียวหรือ

ต่างชนิดกับสับสเตรต NBZ-Phe-Val-Arg pNA เป็นเวลา 9 ชม. (วิธี

ข้อ 3.13.9)

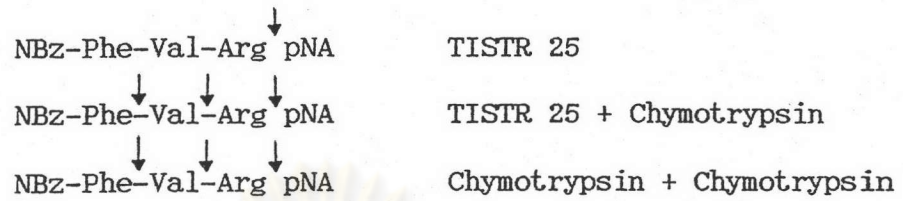
Standard amino acids or enzyme hydrolysates	R_f
p-Nitroaniline	0.89
Arg	0.37
Val	0.64
Phe	0.71
TISTR 25	0.89
TISTR 25 + Chymotrypsin	0.41
	0.59
	0.63
	0.91
Chymotrypsin + Chymotrypsin	0.36
	0.56
	0.64
	0.91

Val($R_f = 0.64, 0.63$ เปรียบเทียบกับ Standard $R_f = 0.64$) และ Arg ($R_f = 0.36, 0.41$ เปรียบเทียบกับ Standard $R_f = 0.37$) ในขณะที่เมื่อมีเอนไซม์ TISTR 25 อย่างเดียวจะให้ spot เดียวซึ่งมี $R_f = 0.89$ (p-Nitroaniline) เนื่องจาก Chymotrypsin ไฮโดรไลส์พันธะเพปไทด์ทางด้านปลายคาร์บอกซิลของกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิก เช่น Phe และ Val การทดลองนี้จึงยืนยันว่าแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก TISTR 25 มีความจำเพาะต่อปลายด้านคาร์บอกซิลของกรดอะมิโน Arg ดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 27

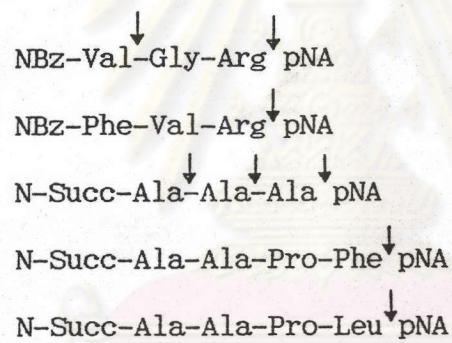
จากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่าเอนไซม์จาก TISTR 25 เหมือน Subtilisin และ Nagarse ตรงที่มีความจำเพาะในการไฮโดรไลส์กรดอะมิโนด้านคาร์บอกซิลของกรดอะมิโนอะลานีน ลูซีน เนิลอะลานีน อาร์จินีน และเวอรีน ดังแสดงให้เห็นในรูปที่ 28 อย่างไรก็ตาม เนิลอะลานีน และ เวอรีน เอนไซม์อาจไฮโดรไลส์หรือไม่ไฮโดรไลส์ขึ้นกับกรดอะมิโนใกล้เคียงด้วย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 27 ความจำเพาะในการไฮโดรไลส์เพปไทด์สังเคราะห์ของเอนไซม์โปรตีเอสต่างชนิด (ลูกศรแสดงพันธะที่เอนไซม์สามารถตัดได้)



รูปที่ 28 ความจำเพาะในการไฮโดรไลส์เพปไทด์สังเคราะห์ของเอนไซม์โปรตีเอส TISTR 25 (ลูกศรแสดงพันธะที่เอนไซม์สามารถตัดได้)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย