หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

โปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลส์โปรตีน ใช้มากในอุตสาหกรรมหลายประเภท แหล่งของโปรตีเอสอาจสกัดได้จากพืช สัตว์ และจุลชีพ (Ward, 1985) เอนไซม์โปรตีเอสที่ได้จากพืชได้แก่ปาเปนจากมะละกอ โบรมีเลนจากสับปะรด มักใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเช่น การทำให้เนื้อสัตว์นุ่ม การทำให้เบียร์ใส และการหมักน้ำปลา ใช้ในอุตสาหกรรมยาโดยเป็นส่วนประกอบในยาช่วยย่อย ในยารักษาแผลเป็นและแผลไฟไหม้ และอุตสาหกรรมทางเคมีเช่นการทอผ้า และฟอกหนัง เป็นต้น (Godfrey และReichelt, 1983) โปรตีเอสจากสัตว์ได้แก่สารสกัด rennet จากกระเพาะลูกวัว Pancreatin จากตับอ่อน และ Pepsin จากกระเพาะสุกร มักใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเช่นการผลิตเนยแข็ง (Ward, 1985) ส่วนโปรตีเอสจากจุลชีพที่มีการใช้ในทางอุตสาหกรรมมากเป็นอันดับหนึ่งได้แก่ แอลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรีย Bacillus licheniformis , Bacillus subtilis และ Alkalophilic Bacillus ซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสารซักฟอก เอนไซม์จากจุลชีพที่มีปริมาณการใช้รองลงมาได้แก่โปรตีเอสจากรา Mucor spp. และ Aspergillus oryzae ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร (Ward, 1983; Aunstrup, 1980) ข้อมูลในตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่าโปรตีเอสจากจุลชีพมีส่วนแบ่งในการตลาดประมาณ 50 เปอร์เซนต์ของเอนไซม์จากจุลชีพทั้งหมดที่ใช้ในวงการอุตสาหกรรมทุกชนิด การผลิตโปรตีเอสจากจุลชีพโดยเฉพาะ Bacillus spp. เป็นที่นิยมในระดับอุตสาหกรรมในปัจจุบัน ถ้าพิจารณาปริมาณการขายเอนไซม์โปรตีเอส จากจุลชีพทั่วโลกในปี 1981 พบว่ามีค่าประมาณ 120 ล้านดอลลาร์สหรัฐอเมริกา ขณะที่โปรตีเอสจากสัตว์และพืชมียอดขายประมาณ 60 ล้านดอลลาร์สหรัฐอเมริกา (Ward, 1983)

การผลิตโปรตีเอสและความสำคัญของเอนไซม์ต่อเซลล์

Bacillus spp. ผลิตโปรตีเอสในช่วงระยะการเจริญคงที่(stationary phase)

ตารางที่ 1 ข้อมูลเชิงพาณิชย์ของเอนไซม์โปรตีเอสทั่วโลกในปี 1981 (Ward, 1983)

Enzyme	Millions of dollars	Market share of microbial proteases	
		Microbial enzymes (%)	Total enzymes (%)
Bacterial alkaline proteases	90	37	30
Microbial rennet	18	7	6
Other Microbial proteases	10	4	3.5
Animal rennet	18	-	11
Other animal proteases	8	-	2.5
Plant proteases	33	-	11
All other microbial enzymes(non-proteolytic)	125	52	41
Total	302	100	100

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในลักษณะของเอนไซม์ที่อยู่นอกเซลล์(extracellular enzyme) คือเป็นเอนไซม์ที่ปล่อยออกมาจากเซลล์ และพบเป็นอิสระในน้ำเลี้ยงเชื้อ (Markkanen และ Bailey , 1974 ; Priest, 1977) วิธีที่เชื้อปล่อย(secrete)เอนไซม์ออกนอกเซลล์มีสมมุติฐานที่เป็นที่ยอมรับมากที่สุดคือ Signal hypothesis สมมุติฐานนี้เสนอว่า การสังเคราะห์เอนไซม์เกิดที่ไรโบโซม สารตั้งต้น(primary precursor)ของการสังเคราะห์เอนไซม์จะมีกรดอะมิโนชนิดไฮโดรโฟบิคที่บริเวณปลายด้านอะมิโนของสายโพลีเพปไทด์ ทำหน้าที่เป็น leading (signal) sequence ทำให้สายเพปไทด์ที่ถูกสร้างขึ้นผ่านออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ได้ จากนั้น signal sequence จะถูกตัดออกโดยเอนไซม์เพปติเดสที่ด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์และส่วนโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ก็จะพับ (fold) อยู่ในโครงรูป (conformation) ที่เสถียร (Ward , 1985 ; Sheeler และ Bianchi, 1987)

ในธรรมชาติ เอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อ Bacillus spp. มีบทบาทที่สำคัญคือช่วยไฮโดรไลส์สับสเตรตที่เป็นโพลีเพปไทด์สายใหญ่ให้เป็นโมเลกุลเล็กทำให้เซลล์สามารถดูดซึมเป็นสารอาหารได้ ในกรณีนี้รวมไปถึงเอนไซม์จากจุลินทรีย์อื่นๆเช่น รา และยีสต์ และรวมทั้งเอนไซม์จากสัตว์ด้วย (Priest, 1977; Ward, 1983) นอกจากนี้ยังมีการคาดหมายว่าเอนไซม์จากจุลชีพมีบทบาทที่ซับซ้อนอย่างอื่นได้แก่

1. บทบาทในการสร้างสปอร์

การเกิดสปอร์ถูกกระตุ้นโดยการขาดแคลน(starvation)แหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน และบางครั้งเกิดจากการขาดแคลนฟอสเฟต มีหลักฐานแสดงให้เห็นว่าการสร้างเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสเกี่ยวข้องกับการเกิดสปอร์ โดยมิวแตนท์ของ B. subtilis ที่ไม่สร้างเอนไซม์จะไม่สามารถสร้างสปอร์ และ phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) ซึ่งเป็นสารยับยั้งของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสไม่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ แต่ยับยั้งการสร้างสปอร์ สำหรับนิวทรัลโปรตีเอสไม่มีความจำเป็นในการสร้างสปอร์เพราะมิวแตนท์ที่ขาดเอนไซม์นี้ยังสามารถสร้างสปอร์ได้ (Piggot และ Coote, 1976; Dancer และ Mandelstam, 1975) นอกจากนี้ยังปรากฏว่าเอนไซม์โปรตีเอสยังเกี่ยวข้องกับการงอก (germination) ของสปอร์ โดยการเตรียมกรดอะมิโนซึ่งสปอร์ไม่สามารถสังเคราะห์ได้ในระยะแรกเริ่ม(early part of germination) (Ward, 1983) อย่างไรก็ดี มีงานวิจัย

ของนักวิจัยบางกลุ่มที่คัดค้านบทบาทของเอนไซม์ในแง่นี้โดยเสนอว่าโปรตีเอสที่อยู่นอกเซลล์ไม่มีความจำเป็นในการสร้างสปอร์ของบาซิลลัส (Maurizi และ Switzer, 1980)

2. บทบาทในการควบคุมการ turnover ของผนังเซลล์

มีรายงานว่าอัตราการ turnover ของ peptidoglycan (ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์) ในระยะการเจริญทวีคูณ(exponential growth) ขึ้นกับเอนไซม์โปรตีเอสที่อยู่นอกเซลล์ (Jolliffe และคณะ, 1980) โดยพบว่าในมิวแตนท์ของ B. subtilis ที่ไม่สร้างโปรตีเอส อัตราการ turnover ของ peptidoglycan มีมากกว่าในสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) ในขณะที่สายพันธุ์ที่สร้างโปรตีเอสมากกว่าปกติ (hyperprotease-producing strains) จะมีอัตราการ turnover ของ peptidoglycan ต่ำ และอัตราการ turnover ของ peptidoglycan ในสายพันธุ์ที่ไม่สร้างโปรตีเอสลดลงเมื่อเลี้ยงเชื้อรวมกับสายพันธุ์ที่สร้างโปรตีเอสมากกว่าปกติ การเติม PMSF ซึ่งเป็นตัวยับยั้งแอลคาไลน์โปรตีเอสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์ที่สร้างโปรตีเอสมากจะเพิ่มอัตรา turnover ของผนังเซลล์ และเมื่อเติม Subtilisin ซึ่งเป็นแอลคาไลน์โปรตีเอสสกัดจาก B. subtilis ลงในสายพันธุ์ที่ไม่สร้างโปรตีเอสจะพบว่าการเกิดการ turnover ของผนังเซลล์ลดลง ผลการทดลองเหล่านี้สนับสนุนว่าการ turnover ของผนังเซลล์ใน B. subtilis น่าจะถูกควบคุมโดยโปรตีเอสที่อยู่นอกเซลล์

3. บทบาทในการไฮโดรไลส์เอนไซม์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่ให้อยู่ในสภาพที่ทำงานได้ (activated form)(โดยตัด signal sequence ออกจากเอนไซม์)

บทบาทในการเปลี่ยน inactive precursor form ของเอนไซม์บางชนิดให้เป็น active enzyme มีรายงานโดย Aiyappa และคณะ (1977) ว่า แอลคาไลน์โปรตีเอสที่อยู่นอกเซลล์ จาก B. licheniformis 749 สามารถเปลี่ยนเอนไซม์เพนนิซิลิเนสที่เกาะกับเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งอยู่ในรูปของ precursor form ให้เป็นรูปแบบที่เป็นอิสระ (free exoenzyme form) ซึ่งแสดงแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ นอกจากนี้ Drapeau(1978) ยังได้รายงานว่า metalloprotease จาก Staphylococcus aureus V8 มีบทบาทในการเปลี่ยน inactive precursor ของโปรตีเอสอีกชนิดหนึ่งซึ่งสร้างโดยตัวของมันเองในระหว่างกระบวนการขนส่งให้เป็น active enzyme นอกเซลล์

ชนิดและคุณสมบัติของโปรตีเอสจากแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส

Bacillus spp. ผลิตโปรตีเอสที่อยู่นอกเซลล์ได้ 2 ชนิดคือ นิวทรัลและแอลคาไลน์โปรตีเอส อัตราส่วนแอคติวิตีของเอนไซม์นิวทรัลต่อแอลคาไลน์ใน B. subtilis Marburg คือ 1:1 ใน B. subtilis NAT คือ 1:13 และใน B. subtilis YN 118 คือ 1:2 (Priest, 1977; Yoneda และ Maruo, 1975) นอกจากสายพันธุ์ของแบคทีเรียแล้ว ยังมีรายงานว่าอัตราส่วนของการสร้างนิวทรัลและแอลคาไลน์โปรตีเอสขึ้นอยู่กับสภาวะของการเลี้ยงเชื้อเช่น pH อุณหภูมิ และยังขึ้นกับส่วนประกอบในน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยเช่น อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม casamino acids ใน B. subtilis จะเพิ่มปริมาณแอลคาไลน์โปรตีเอสเป็น 2 เท่า ในขณะที่นิวทรัลโปรตีเอสไม่เพิ่ม (Maurizi และ Switzer , 1980) การสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอสถูกควบคุมโดยกระบวนการยับยั้งที่เรียกว่าคาตาบอไลต์รีเพรสชัน (catabolite repression) คือการมีกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อจะไปยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ นอกจากนี้การมีกรดอะมิโนหรือสายเพบไทด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อมากเกินไปจะยับยั้งการสร้างเอนไซม์ด้วย โดยความสามารถของกรดอะมิโนแต่ละชนิดในการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ไม่เท่ากัน กรดอะมิโนที่ยับยั้งการสร้างเอนไซม์ได้ดีได้แก่ ไอโซลูซีน และโปรลีน (Ward, 1985 ; Doi, 1972)

นิวทรัลโปรตีเอส(E.C.3.4.24.4) เป็นเอนไซม์ที่มีอะตอมของโลหะซึ่งมักเป็นสังกะสี (Zn)ยึดจับกับเอนไซม์ค่อนข้างแน่นในลักษณะเป็นหมู่ prosthetic จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Metalloprotease (Ward, 1983) เอนไซม์นี้อาจพบตามลำพังหรือรวมกับโปรตีเอสอื่นในจุลินทรีย์ทั่วๆไป ในแบคทีเรียมีรายงานการพบเอนไซม์นี้ใน Bacillus spp. เช่น B. subtilis , B. cereus , B. megaterium และ B. thermoproteolyticus (Priest, 1977) นิวทรัลโปรตีเอสมีแอคติวิตีที่สูงสุด(optimum activity)ในการไฮโดรไลส์เคซีนในช่วง pH 7-8 แต่มีความเสถียรในช่วง pH ค่อนข้างกว้างคือ pH 5-10 และเมื่อมีแคลเซียมไอออนจะมีความเสถียรเพิ่มขึ้น สาร ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ทำหน้าที่เป็น chelating agent ยับยั้งเอนไซม์โดยดึงอะตอมของสังกะสีออก ตัวอย่างของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสที่สำคัญคือ Thermolysin ผลิตโดยเชื้อ B. thermoproteolyticus เอนไซม์นี้มีลักษณะเป็นโพลีเพปไทด์สายเดี่ยวที่มีกรดอะมิโน 316

ตัว ไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ โมเลกุลพับ(folded)ทำให้เกิด lobe 2 lobes แยกจากกันโดยร่องลึก(deep cleft) ซึ่งจะมีอะตอมของสังกะสีอยู่ บริเวณ active site ประกอบด้วยกรดอะมิโน 6 ตัวใกล้อะตอมสังกะสี และมีบริเวณที่แคลเซียม 6 อะตอมจะจับกับโมเลกุลของเอนไซม์ได้ซึ่งจะยังผลให้เอนไซม์เสถียรต่อความร้อน นิวทรัลโปรตีเอสอีกชนิดหนึ่งคือเอนไซม์จาก B. amyloliquefaciens ซึ่งคล้ายกับ Thermolysin โดยโมเลกุลประกอบด้วยสายเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 326 ตัว แต่มีข้อแตกต่างที่สำคัญคือ การเสถียรต่อความร้อน (thermostability) เอนไซม์ Thermolysin ที่ pH 7.2 จะสูญเสียแอคติวิตีไป 50 เปอร์เซนต์ เมื่อทำให้ร้อนที่ 84 °ซ เป็นเวลา 15 นาที ขณะที่เอนไซม์จากเชื้อ B. amyloliquefaciens สูญเสียแอคติวิตีเท่ากันที่ pH และช่วงเวลาเดียวกันที่อุณหภูมิ 59 °ซ เหตุผลที่เอนไซม์มีความเสถียรต่อความร้อนแตกต่างกันอาจเกิดจากในเอนไซม์ Thermolysin มีเปอร์เซนต์ของกรดอะมิโนชนิดไฮโดรโฟบิคสูง และมีแคลเซียมอะตอม 4 อะตอม(Aunstrup, 1980) ในด้านความจำเพาะของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจากเชื้อต่างชนิดกันจะมีความจำเพาะต่อสับสเตรตแตกต่างกัน จากการทดลองใช้เพปไทด์สังเคราะห์คือ Carbobenzoxy-Phe-X-Ala (X เป็นกรดอะมิโนใดๆ) พบว่าเอนไซม์นี้ไฮโดรไลส์พันธะระหว่าง Phe-X เอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอส จาก B. subtilis มีความจำเพาะต่อ X ที่เป็น ลูซีน > เฟนิลอะลานีน >> ไทโรซีน ส่วนเอนไซม์ Thermolysin จาก B. thermoproteolyticus มีความจำเพาะต่อ X ที่เป็น ลูซีน > เฟนิลอะลานีน > ไทโรซีน (Ward, 1983) สรุปได้ว่าเอนไซม์จาก Bacillus มีความจำเพาะต่อ hydrophobic-aliphatic มากกว่า aromatic residues

แอลคาไลน์โปรตีเอส(E.C.3.4.21.14.)มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 25,000-30,000 ดาลตัน(Priest, 1977) เนื่องจากมีกรดอะมิโนเซรีน อยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่าเซรีนโปรตีเอส (serine protease) เอนไซม์นี้ถูกยับยั้งโดยสาร di-isopropyl fluorophosphate (DFP) และ PMSF ไม่มีอะตอมของโลหะเป็นหมู่ prosthetic แคลเซียมไอออนช่วยทำให้เอนไซม์เสถียร และ EDTA ไม่ยับยั้งเอนไซม์นี้ pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา(optimum pH)ของเอนไซม์อยู่ระหว่าง 7-11 และมีลักษณะการไฮโดรไลส์โปรตีนเป็นแบบตัดพันธะในสาย(endopeptidase) (Ward, 1983; Horikoshi

และ Akiba, 1982) แอลคาไลน์โปรตีเอสแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยอาศัยความแตกต่างในกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบรวมทั้งคุณสมบัติทางอิมมูนวิทยา และจลนศาสตร์ (Keay และ Wildi, 1970b) ดังนี้

กลุ่มเอ (group A) ได้แก่เอนไซม์ Subtilisin Carlsberg จากเชื้อ B. licheniformis และเอนไซม์จาก B. pumilus เอนไซม์ Subtilisin Carlsberg เตรียมขึ้นเป็นครั้งแรกในรูปของผลึกในปี 1952 โดย Guntelberg & Ottensen จากเชื้อ B. licheniformis เอนไซม์นี้มีลักษณะเป็นโพลีเพปไทด์สายเดี่ยวที่มีกรดอะมิโน 274 ตัว และไม่มี ซิสไตน์ หรือ ซิสเตอีน ดังนั้นจึงไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ โครงสร้างตติยภูมิเป็นรูปทรงกลม(spherical)ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.2 นาโนเมตร บริเวณเร่งประกอบด้วยกรดอะมิโน เซรีน 221 ฮิสติดีน 64 และแอสปาร์เตท 32 ที่มีความจำเพาะต่อสับสเตรตไม่สูงนัก (broad specificity) และจะไฮโดรไลส์พันธะเพปไทด์เป็นส่วนใหญ่และพันธะเอสเทอร์บางส่วน ในการไฮโดรไลส์โปรตีนไม่จำเป็นต้องมีตัวกระตุ้น(activators) และไม่ต้องใช้แคลเซียมไอออนสำหรับทำให้เอนไซม์เสถียรเหมือนแอลคาไลน์โปรตีเอสอื่นๆ เอนไซม์มีความเสถียรในช่วง pH กว้าง และแอคติวิตีจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อ pH ต่ำกว่า 5 และสูงกว่า 11 ซึ่งสันนิษฐานว่าเอนไซม์เกิดการย่อยตัวเอง (autodigestion) โดยโมเลกุลโปรตีนจะคลายรูป(unfold) และเอนไซม์ยังคงเสถียรเมื่ออุณหภูมิสูงถึง 50 °ซ(Ward, 1983)

เอนไซม์ Subtilisin (Subtilopeptidase A) จาก B. subtilis เป็น แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ไม่ค่อยจำเพาะ โดยจะไฮโดรไลส์พันธะเพปไทด์ส่วนใหญ่โดยเฉพาะพันธะที่ถัดจากกรดอะมิโน อะลานีน เฟนิลอะลานีน ไทโรซีน ทริปโตเฟน และลูซีน (Morihara และ Tsuzuki, 1969 ; Markland และ Smith, 1971 ; Lyublinskaya และคณะ, 1974) และยังพบอีกว่าสามารถไฮโดรไลส์พันธะเพปไทด์ตรงกรดอะมิโนชนิดเบสิก เช่น อาร์จินีนอีกด้วย (Pozsgay และคณะ, 1977)

กลุ่มบี (group B) ได้แก่แอลคาไลน์โปรตีเอสที่มีชื่อว่า Subtilisin BPN (Bacterial Protease Nagarse) จาก B. amyloliquefaciens ในปี 1954 Hagihara เตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์อยู่ในรูปผลึกเป็นครั้งแรก ในปี 1960 Ottesen & Spector ได้แยกเอนไซม์ Subtilisin Novo ซึ่งเหมือน(identical) กับเอนไซม์

Subtilisin BPN โดยเปรียบเทียบจากลำดับกรดอะมิโน Subtilisin Novo มีลักษณะเป็นโพลีเพปไทด์สายเดี่ยวที่มีกรดอะมิโน 275 ตัว กรดอะมิโนส่วนใหญ่จะเหมือน(homology) กับของ Subtilisin Carlsberg โดยมีกรดอะมิโนเพียง 58 ตัวเท่านั้นที่แตกต่างกัน ในโมเลกุลไม่มีกรดอะมิโนซิสเตอีนดังนั้นจึงไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ มีกรดอะมิโนอะลานีนอยู่ปลายทางด้านอะมิโน และ กลูตามีนอยู่ที่ปลายทางด้านคาร์บอกซิล บริเวณเร่งของเอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโน เซรีน 221 ฮิสติดีน 54 และ แอสปาร์เตท 32 แคลเซียมไอออนช่วยทำให้เอนไซม์เสถียรโดยเฉพาะที่อุณหภูมิสูงหรือที่ pH ที่สูงหรือต่ำมาก เอนไซม์นี้ไฮโดร-ไลส์พันธะเพปไทด์ และพันธะเอสเทอร์ แต่มีความจำเพาะแตกต่างจากเอนไซม์ Subtilisin Carlsberg แอคติวิตี และความเสถียรของเอนไซม์นี้ที่ pH และอุณหภูมิต่างๆคล้ายกับเอนไซม์ Subtilisin Carlsberg (Ward, 1983)

เนื่องจากการใช้แอลคาไลน์โปรตีเอสเป็นองค์ประกอบในการผลิตสารซักฟอกประสบความสำเร็จในทางการค้า ดังนั้นจึงมีการค้นคว้าหาแอลคาไลน์โปรตีเอสที่มีคุณสมบัติที่ดีขึ้น คือมีความเสถียรในขณะซักล้าง (washing condition) เช่น pH 9-10 อุณหภูมิสูงกว่า 50 °ซ และในสภาพที่มี surfactants และ sequestering agents พบว่าคุณสมบัติเหล่านี้มีในโปรตีเอสกลุ่ม Alkalophilic bacilli จุลชีพกลุ่มนี้มีอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ และส่วนใหญ่อาจแยกได้จากตัวอย่างดินได้แก่ B. subtilis และ B. licheniformis ที่ทนต่อสภาวะด่างได้ดี จุลชีพเหล่านี้เจริญใน pH สูงกว่า 7.5 บางตัวมีแอคติวิตีสูงสุด (maximum activity)ที่ pH 12 สมบัติของแอลคาไลน์โปรตีเอสเหล่านี้เหมือน Subtilisin โดยประกอบด้วยสายเพปไทด์เดี่ยวที่ไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ ไม่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบในโปรตีน มีกรดอะมิโนอะลานีนอยู่ที่ปลายทางด้านอะมิโน ไม่ค่อยมีความจำเพาะในการไฮโดรไลส์เพปไทด์(broad specificity) มีเอสเทอเรสแอคติวิตี น้ำหนักโมเลกุล 20,000 - 30,000 และจุดไอโซอีเลคทริก(Isoelectric point) ประมาณ 11 เอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ Esperase® ซึ่งเสถียร และมีแอคติวิตีในช่วง pH 6-12 สามารถใช้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 °ซ(Aunstrup, 1980) และแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก Alkalophilic Bacillus spp. strains No.221, AB42 และ PB12 (Horikoshi และ Akiba, 1982)

การแยกและการทำโปรตีเอสให้บริสุทธิ์

การแยกชนิดของเอนไซม์โปรตีเอสและการทำเอนไซม์จาก B. subtilis ให้บริสุทธิ์เท่าที่ผ่านมาทำได้โดยอาศัยเทคนิคต่างๆ เช่น โครมาโตกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography) โครมาโตกราฟีชนิดแยกตามขนาด (molecular-sieve chromatography) และ แอฟฟินิตี โครมาโตกราฟี (affinity chromatography) ซึ่งอาศัยความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสารที่คล้ายสับสเตรต (substrate analog) หรือตัวยับยั้ง เป็นต้น ดังตัวอย่างการแยกองค์ประกอบของเอนไซม์ โปรตีเอสจาก B. subtilis สายพันธุ์ต่างๆ (ตารางที่ 2)

เอนไซม์โปรตีเอสทั้งชนิดนิวทรัลและแอลคาไลน์มีความสำคัญในแง่ใช้เป็นองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมหลายประเภทดังกล่าวข้างต้น การศึกษาหาแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผลิตโปรตีเอสชนิดที่ต้องการในปริมาณสูง หรือเพื่อค้นหาเอนไซม์ชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติที่ดีขึ้น หรือเหมาะสมมากขึ้นในการใช้งานแต่ละด้าน จึงเป็นงานวิจัยที่นอกจากจะมีความสำคัญต่อความรู้ความเข้าใจในการศึกษาวิทยาศาสตร์พื้นฐานแล้ว ยังอาจเกิดศักยภาพการนำไปประยุกต์ใช้ได้ โครงงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ดังต่อไปนี้คือ

1. ศึกษาสภาวะของการผลิต และชนิดของเอนไซม์โปรตีเอสในเชื้อ Bacillus subtilis TISTR 25 (แยกจากดินในประเทศไทย)
2. ศึกษาวิธีทำให้เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์
3. ศึกษาสมบัติทางกายภาพ ทางเคมี และจลนศาสตร์ของเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน
4. ศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนในการย่อยสลายพันธะเพปไทด์
5. เปรียบเทียบเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน กับแอลคาไลน์โปรตีเอสที่มีผู้ศึกษามาก่อนนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 ขั้นตอนการแยกชนิดของเอนไซม์โปรตีเอสจาก B. subtilis สายพันธุ์ต่างๆให้บริสุทธิ์

B. subtilis	ชนิดของโปรตีเอส	Step of Purification	Reference
B. subtilis Marburg	neutral และ alkaline	Ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-25, CM-Sephadex C-50 , Molecular-sieve chromatography on Sephadex G-75	Millet, 1970
B. subtilis 168(indole)	alkaline	Ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A25, CM-Sephadex C-25 , Molecular sieve chromatography on Sephadex G-200	Boyer และ Carlton, 1968
B. subtilis (hpr-97)	neutral และ alkaline	Ion-exchange chromatography on Hydroxyapatite, DEAE-cellulose	Prestidge และคณะ, 1971
B. subtilis YY88	neutral และ alkaline	Ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose, CM-cellulose	Matsala และ Zalkin, 1980

ตารางที่ 2 (ต่อ)

B. subtilis	ชนิดของโปรตีเอส	Step of Purification	Reference
B. subtilis (from the Pacific Enzyme Laboratories, Honolulu)	neutral	Ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose, CM-cellulose	McConn และคณะ, 1964
B. subtilis 6160	neutral และ alkaline	Ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50	Uehara และคณะ, 1974
B. subtilis NRRL 3411	neutral และ alkaline	Ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose, Hydroxyapatite, Molecular sieve chromatography on Sephadex G-100	Keay และ Wildi , 1970a
B. subtilis Marburg 168(Trp^-)	intra-cellular alkaline	Ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose DE-52, Affinity chromato-graphy of Gramicidin S-Sepharose 4B	Strongin และคณะ 1979

ตารางที่ 2 (ต่อ)

B. subtilis	ชนิดของโปรตีเอส	Step of Purification	Reference
B. subtilis NRRL 3411	neutral และ alkaline	Ion-exchange chromatography on CM-cellulose	Keay และ Wildi , 1970b
B. subtilis NPro-58, ts-NPro-17	neutral และ alkaline	Ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-25, DEAE-Sephadex A-50	Uehara และคณะ, 1979
B. subtilis WB 746 และ WB 746 ts-5	alkaline	Ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50 , CM-cellulose-Sephadex C-50	Leighton และ Doi , 1973

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย