บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอสได้ ในการวิจัยนี้เลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ปรับ pH เป็นด่าง (pH 10.5) มีจุดประสงค์เพื่อให้ได้แบคทีเรียชนิดเจริญได้ดีในสภาวะด่าง (Alkalophilic Bacteria) เพื่อเพิ่มโอกาสที่จะได้อัลคาไลน์โปรตีเอส ซึ่งเป็นโปรตีเอสกลุ่มที่มีความสำคัญ และมีความต้องการมากในสถานการณ์ปัจจุบัน อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งผสมกับหางนม (skim milk) ปรับ pH เป็นด่าง ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน โดยวัดจากเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส ซึ่งแบคทีเรีย 7 ใน 9 ชนิด สร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ แต่มีเพียง 3 ชนิด เท่านั้น ที่ให้บริเวณใสที่เห็นได้ชัดเจน อย่างไรก็ตาม การคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน โดยดูจากบริเวณใสเพียงอย่างเดียว ไม่สามารถพิสูจน์ได้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ใดสร้างเอนไซม์ได้มากกว่ากัน เนื่องจากแบคทีเรียบางชนิดสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนในแนวดิ่ง บางชนิดสร้างเอนไซม์แผ่ออกในแนวราบ จึงทำการทดลองยืนยันโดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส

Bacillus sp. B-2 เป็นแบคทีเรียชนิดเจริญได้ดีในสภาวะด่าง ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำทิ้งของโรงงานฟอกหนังแห่งหนึ่งในกรุงเทพมหานคร ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ 56 หน่วย/มล. และได้จำแนกสมบัติทางกายภาพ และทางชีวเคมี โดยวิธีของ Bergey ว่าจัดอยู่ในสกุล *Bacillus*

จากการศึกษาช่วงอุณหภูมิที่แบคทีเรีย B-2 สามารถเจริญได้นั้น (รูปที่ 3) ที่อุณหภูมิ 35, 40 และ 45 °ซ ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่แบคทีเรียชนิดนี้เจริญได้ดีมาก มีรูปแบบการเจริญที่เรียกว่า dioxic growth คือ แทนที่เมื่อแบคทีเรียเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase แล้วจะเริ่มเข้าสู่ระยะ death phase เลย กลับมีการเจริญสูงขึ้นอีกเหมือนช่วง log phase

สมมติฐานที่อาจเป็นไปได้ 2 ประการ คือ ประการแรก ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรีย สามารถสร้างเอนไซม์ที่มาย่อยสารที่เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้ได้สารชนิดใหม่ ซึ่งเซลล์สามารถนำไปใช้ได้อีก หรืออีกประการหนึ่ง แบคทีเรียสามารถใช้สารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อได้หลายชนิด เมื่ออาหารชนิดหนึ่งเริ่มขาดแคลนก็เปลี่ยนไปใช้สารอาหารอีกชนิดหนึ่งแทน

จากการวิจัยที่ผ่านมา อาหารเลี้ยงเชื้อที่ชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีเอส มักมีส่วนประกอบเพียง 2-3 ชนิด และไม่ต้องการแร่ธาตุต่างๆมากนัก (Aunstrup และคณะ ,1971 ;Ajinomoto Co., Inc.,1973 ;Aunstrup,1980b)

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชักนำให้เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอสที่คัดเลือกได้จากการวิจัยนี้ ประกอบด้วย 0.1% กลูโคส และ 3% กากถั่วเหลือง ปริมาณกลูโคสที่มากกว่า 3 % จะไปยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอส ทำให้เกิดกระบวนการที่เรียกว่า Catabolite repression กระบวนการนี้พบเช่นกันในการวิจัยของ Aunstrup (1979b) นอกจากนี้ แหล่งคาร์บอนอื่นที่นำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ได้แก่ ข้าวบาเล่ย์ (Aunstrup,1979b), Starch (Keay และคณะ,1972 ;Rikagaku Kenkyusho,1973 ;Durham และคณะ,1987), Sodium citrate (Takii และคณะ, 1990), Dextrin (US Patent 4,764,470), Maltose (Jensen,1972) แต่การใช้กลูโคสเพียงอย่างเดียวก็ไม่สามารถชักนำให้เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอส แม้แบคทีเรียจะเจริญได้ก็ตาม และจากการวิจัยพบว่า แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม สามารถชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีเอสได้ ในขั้นตอนการแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน เหตุที่เลือกใช้ กลูโคส 2 % แทนที่จะใช้ 3 % เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนที่นำมาใช้บางชนิด ทำหน้าที่เป็นแหล่งไนโตรเจนได้เช่นเดียวกัน ดังนั้นเพื่อป้องกันการเกิด Catabolite repression จึงเลือกใช้กลูโคส 2% และจากการทดลอง 3% กากถั่วเหลือง เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ถูกคัดเลือก และ การใช้กากถั่วเหลือง โดยไม่เติมกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อก็สามารถชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีเอสได้ แต่ไม่ดีเท่ากับเติมกลูโคส เนื่องจากกลูโคสเป็นแหล่งพลังงานที่ดี แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้เลย ทำให้มีการเจริญอย่างรวดเร็ว และเอนไซม์โปรตีเอสจะถูกสร้างขึ้นอย่างมากหลังการเจริญช่วง log phase เมื่อแบคทีเรียแข็งแรงเจริญได้ดี โอกาสที่เอนไซม์โปรตีเอสจะถูกสร้างขึ้นในปริมาณมากขึ้น จึงมีสูงขึ้นด้วย แหล่งไนโตรเจนที่พบว่าเหมาะสมต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ ส่วนใหญ่เป็นวัตถุที่มีส่วนประกอบเป็นโปรตีน หรือสารสกัดจาก

โปรตีน ซึ่งในการวิจัยนี้เคยได้ทดลองใช้สารสกัดจากถั่วเหลือง (Soy bean hydrolysate) แต่ตรวจไม่พบโปรตีเอสแอคติวิตี อาจเป็นเพราะว่า ในสารสกัดจากถั่วเหลืองมีกรดอะมิโนมากมายที่เชื้อนำไปใช้ได้ จึงไม่จำเป็นต้องสร้างเอนไซม์โปรตีเอสเพื่อมาย่อยสารโมเลกุลใหญ่ให้เป็นโมเลกุลเล็ก ใน *B. subtilis* เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเพียงโซเดียมกลูตาเมทก็สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ใกล้เคียงกับอาหารที่ผสมเปปโตน (Jensen,1972) สารอื่นที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่พบในรายงานวิจัยอื่น ได้แก่ เกลือแอมโมเนียม (Markkanen และ Bailey,1974; Nehete และคณะ,1985) สารประกอบฟอสเฟต (Tang และคณะ,1980) แคลเซียม,ซัลเฟต,เหล็ก,แมงกานีส และโปแตสเซียม (Feldman และ Delecourt,1971; Shimamura และคณะ,1971; Ajinomoto Co. Inc.,1973) เมื่อทำการทดลองโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร ประกอบด้วย 0.1 % KH_2PO_4, 3 % กลูโคส , 3 % ภากถั่วเหลือง ปรับ pH ให้เป็น 10.5 ด้วย 10 % Na_2CO_3 (รูปที่ 11) ลักษณะการเจริญเป็นแบบ dioxic growth เอนไซม์โปรตีเอสถูกสังเคราะห์มากหลังการเจริญระยะ log phase แสดงว่าสับสเตรทตัวที่ 2 ที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ชักนำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีเอสซึ่งก็คือ กากถั่วเหลือง และในระหว่างการเลี้ยง แบคทีเรียสามารถผลิตสารที่ออกฤทธิ์เป็นกรด ทำให้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อลดต่ำลงเล็กน้อย crude enzyme ที่ได้นำไปทำให้บริสุทธิ์โดย DEAE-sephadex A-50 ที่แช่ในทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 DEAE-sephadex เป็น anion exchanger มีประจุบวกบนเรซินจะแลกเปลี่ยนสารที่มีประจุลบ โปรตีนที่มีประจุสุทธิเป็นลบจะจับกับประจุบวกบน DEAE -sephadexแต่เอนไซม์โปรตีเอสไม่จับกับ DEAE-sephadex แสดงว่าที่ pH 7.5 โปรตีนมีประจุสุทธิเป็นบวก และคาดว่าค่า isoelectric point ของเอนไซม์สูงกว่า 7.5 เมื่อนำสารละลายที่กรองผ่าน DEAE-sephadex มาผสมกับ CM-sephadex ที่แช่ในทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 7.5 เอนไซม์โปรตีเอสจะจับกับประจุลบบนโมเลกุล CM-sephadex นำสารผสมดังกล่าวไปบรรจุลงคอลัมน์ ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน แล้วจึงชะคอลัมน์ด้วยไกลซีนไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ 10 มิลลิโมลาร์ pH 10 ที่ pH 10 เอนไซม์มีประจุสุทธิเป็นลบจึงถูกชะออกมาจากคอลัมน์พร้อมกับบัฟเฟอร์

ผู้วิจัยได้เคยทดลองตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 40-65% สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร พบว่าได้ตะกอนโปรตีนประมาณ 7 กรัม นำไปไดอะไลส์ในทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 7.5 แล้วจึงนำไปผ่านคอลัมน์ CM-sephadex ที่สมดุลย์ในทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 7.5 เมื่อชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่มี NaCl 0-0.2 โมลาร์ สารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ จะมีสีของอาหารเลี้ยงเชื้อออกมาด้วยซึ่งรบกวนการวัดปริมาณโปรตีน และถ้าจะวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ทุกหลอดของสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ก็เป็นการเสียเวลามาก อีกทั้งตะกอนโปรตีน 7 กรัม เมื่อละลายบัฟเฟอร์จะมีปริมาตรเพิ่มขึ้นมาก การไดอะไลส์จึงต้องเพิ่มเวลามากขึ้น ซึ่งต้องคำนึงถึงเสถียรภาพของเอนไซม์ที่ pH นี้ว่ามีความเสถียรมากน้อยเพียงใด เพราะที่ pH 7.5 เอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.* B-2 ให้ relative activity 80 % ถ้าเดิมมีแอคติวิตีไม่มากนัก อาจทำให้ไม่สามารถตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ในการวิจัยนี้ ช่วยประหยัดเวลาได้มาก เนื่องจากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดย DEAE-sephadex ใช้เวลา 2 ชม. และ CM-sephadex ใช้เวลา 2 ชม. เปรียบเทียบกับการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต, ผ่านคอลัมน์ DEAE, CM-sephadex ซึ่งใช้เวลานานกว่ามาก วิธีนี้เหมาะที่จะใช้เมื่อสารที่นำมาทำให้บริสุทธิ์นั้นมีโปรตีนปริมาณมาก นอกจากนี้ pI ของเอนไซม์และ pH ของสารละลายเป็นตัวแปรที่สำคัญต่อประสิทธิภาพการยึดจับของเอนไซม์กับเรซิน ค่า pI ที่สูงอาจเป็นข้อได้เปรียบในขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ เช่น thermostable alkaline protease จาก *Bacillus sp.* no. AH-101 มีค่า pI เท่ากับ 9.2 สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้โดยง่ายโดยการนำ crude enzyme มาผสมกับเรซินแลกเปลี่ยนประจุ 2 ชนิด คือ DEAE-Toyopearl pH 9.5 ที่ pH นี้ thermostable alkaline protease มีประจุสุทธิเป็นลบแต่ไม่มากนัก ในขณะที่โปรตีนส่วนใหญ่มักมีค่า pI ประมาณ 6-7 ประจุสุทธิเป็นลบมาก ดังนั้นโปรตีนปะปนส่วนใหญ่จึงถูกจับโดยประจุบวกบนเรซิน ถ้าโปรตีนที่ต้องการแยกมีค่า pI ใกล้เคียงกับโปรตีนปะปนอื่น ทำให้มีโอกาสพอๆกันที่จะถูกจับโดยประจุบวกบนเรซิน และ CM-Toyopearl pH 5.5 ประจุสุทธิของเอนไซม์เป็นบวกมากจึงถูกจับได้ดีกับประจุลบบนเรซิน (Takami และคณะ,1989) Alkaline serine protease จาก *Bacillus alcalophilus* subsp. *haloduran* KP 1239 ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ 2 ขั้นตอนเช่นกัน คือ ขั้นตอนการผสมกับ DEAE-cellulose pH 7.5 และ CM-cellulose pH

7.5 ก่อนนำไปบรรจุลงคอลัมน์ ซึ่งการวิจัยมีจุดประสงค์หลักในการศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรตีเอส จึงต้องการลดระยะเวลาในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (Takii และคณะ,1990) ข้อเสียของวิธีนี้ คือ yield ที่ได้ค่อนข้างน้อย ในตัวอย่างที่ 1 ข้างต้นได้ yield 20 % และตัวอย่างที่ 2 ได้ yield 5 % ส่วน yield ที่ได้จากการวิจัยนี้ คือ 4.7 % เมื่อเทียบกับ yield ที่ได้จากขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ DEAE- และ CM-cellulose ที่ได้ yield 43% (Fujiwara และ Kazuhiko,1987) และ 62% (Horikoshi,1971) หรือขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ทั้งก่อนและหลังผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose แล้วจึงผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 ได้ yield 56%

จากการทำโพลีอะคลิลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส (รูปที่ 13) เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่แยกได้ โดยใส่ทั้ง EDTA และ PMSF อย่างละ 3 มิลลิโมลาร์ เพื่อป้องกันการย่อยตัวเองของเอนไซม์ หลังล้างสีย้อมโปรตีน พบแถบโปรตีนเข้ม 1 แถบ และรูปแบบของโปรตีนที่ได้จากการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชันมีลักษณะที่สมมาตร แสดงว่าเอนไซม์โปรตีเอสที่แยกได้บริสุทธิ์แล้ว และไม่มีหน่วยย่อย ซึ่งทราบได้จากการทำเอสดีเอสโพลีอะคลิลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส แบคทีเรียหลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอสได้มากกว่า 1 ชนิด เช่น *B.licheniformis* และ *B.pumilus* สร้างได้ทั้งนิวทรัลและอัลคาไลน์โปรตีเอส แต่อัลคาไลน์โปรตีเอสจะมีปริมาณมากกว่ามาก *B.subtilis* , *B.stearothermophilus* และ *B.amyloliquefaciens* สร้างได้ทั้งอัลคาไลน์และนิวทรัลโปรตีเอส แต่อัตราส่วนไม่แน่นอน ขึ้นกับสภาวะการเลี้ยงเชื้อ และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ *B.polymyxa*, *B.thermoproteolyticus*, *B.cereus*, *B. megaterium* และ *B.thuringiensis* จะสร้างนิวทรัลโปรตีเอสประมาณ 90-100 % ในช่วงต้นของ stationary phase (Keay และ Moser,1969; Keay,1972) แบคทีเรียบางชนิดสร้างเอนไซม์โปรตีเอสได้ถึง 3 ชนิด ซึ่งทราบได้จากผลการทำเจลอิเลคโตรโฟรีซีส เช่น *Bacillus sp.* GX6638 (ATCC 53278) สามารถสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส (AP) ซึ่งสูญเสียสภาพเร็วมาก (extremely labile) โปรตีเอสชนิด alkaline stable (AS) และโปรตีเอสชนิด Heat stable (HS) ซึ่งทั้ง 3 ชนิดจะมี

สมบัติแตกต่างกันในเรื่องค่า pI , น้ำหนักโมเลกุล และลักษณะการเคลื่อนที่ในเจลอิเลคโตรโฟรีซีส (Durham และคณะ,1987)

การศึกษา pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ของเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.* B-2 ก่อนการทำให้บริสุทธิ์ ได้สภาวะเหมาะสมคือที่ pH 11 และ 60 °ซ (รูปที่ 9 และ 10) หลังการทำให้บริสุทธิ์ได้สภาวะเหมาะสมที่ pH 10.5 และ 55 °ซ (รูปที่ 14 และ 16) ซึ่งค่าที่ได้ลดลง อาจเป็นเพราะว่าใน crude enzyme เต็มไปด้วยโปรตีนนานาชนิด จึงมีผลรบกวนการวัดแอคติวิตี สำหรับผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ (รูปที่ 15 และ 17) มีรูปแบบความเสถียรของเอนไซม์เหมือนกับอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* (Barfoed, 1983) ที่ pH 7-11 และแคลเซียมอิออนมีส่วนช่วยรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์เป็นอย่างมาก กล่าวคือที่อุณหภูมิ 50 °ซ หลังการบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที แอคติวิตีของเอนไซม์จะเหลือประมาณ 30 % แต่ถ้ามีแคลเซียมอิออน 2 มิลลิโมลาร์ พบว่ายังมีโปรตีเอสแอคติวิตีเหลือถึง 89 % ที่อุณหภูมิ 55 °ซ หลัง 60 นาที แอคติวิตีของเอนไซม์จะเหลือประมาณ 62 % ถ้าไม่มีแคลเซียมอิออนจะไม่มีแอคติวิตีเหลืออยู่เลย ที่อุณหภูมิ 60 °ซ จะสูญเสียโปรตีเอสแอคติวิตีทั้ง 100% หลังบ่มเอนไซม์เป็นเวลานาน 45 นาที เมื่อมีแคลเซียม และ 15 นาที เมื่อไม่มีแคลเซียม

การศึกษาผลของไอออนโลหะที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส (ตารางที่ 5) พบว่าส่วนใหญ่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์โดยเฉพาะอิออนโลหะของโคบอลท์ กระตุ้นการทำงานของโปรตีเอสได้ถึง 197 % ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของ metalloprotease ที่อิออนโลหะจะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ อิออนโลหะอีกชนิดหนึ่งที่พบได้บ่อยว่า สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส คือ อิออนของสังกะสี (Zn^{2+}) กระตุ้นการทำงานของนิวทรัลโปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* NRRL B3411 (Keay และ Bernard,1970) นอกจากนี้ได้ศึกษาผลของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (ตารางที่ 7) พบว่า 10 มิลลิโมลาร์ของ EDTA และ PMSF ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์ ยังมีโปรตีเอสแอคติวิตีเหลือ 83.6, 45.2% ตามลำดับ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่า เอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.* B-2 มีทั้งโมเลกุลของ Co^{2+} และ serine อยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่พบบ่อยนัก ตัวอย่างของเอนไซม์ลักษณะนี้ ได้แก่ serine metal protease จาก *Bacillus pumilus* (Chau

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และ Urbanek,1974) จาก *B.licheniformis* (Vitkovic และ Sadoff, 1975) สารที่เป็น reducing agent เช่น Cysteine HCl และ alkylating agent เช่น Iodoacetamide ไม่ยับยั้งโปรตีเอสแอคติวิตี แสดงว่า พันธะไดซัลไฟด์ กับหมู่ซัลไฮดริล ไม่มีผลต่อโปรตีเอสแอคติวิตี เมื่อใช้สารยับยั้ง soybean trypsin inhibitor 1 มก./มล. พบว่าไม่มีผลยับยั้งโปรตีเอสแอคติวิตี แสดงว่าลักษณะที่บริเวณเร่งของเอนไซม์นี้ แตกต่างจากเอนไซม์ trypsin ซึ่งเป็นเอนไซม์โปรตีเอสที่พบในสัตว์ จากข้อมูลการวิจัย สรุปได้ว่าเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.* B-2 ควรจัดอยู่ในกลุ่ม Alkaline metalloprotease (Ward,1985) เนื่องจาก pH ที่เหมาะสมต่อแอคติวิตีของเอนไซม์อยู่ในช่วงด่าง และอิออนโลหะสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์

การศึกษาสมบัติทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ โดยใช้สับสเตรทธรรมชาติ 2 ชนิด คือ casein ความเข้มข้น 0-40 มก./มล. และ BSA 0-20 มก./มล. แสดงว่าเอนไซม์โปรตีเอสสามารถไฮโดรไลส์สับสเตรททั้งสองชนิดได้ โดยสามารถยึดจับกับ BSAได้ดีกว่า เคซีน แสดงว่าโมเลกุลของเคซีนมีโครงสร้างที่เหมาะสมกับบริเวณเร่งของเอนไซม์มากกว่า BSA (K_m casein = 22.5 มก./มล., K_m BSA = 5 มก./มล.) แต่เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลส์ BSA ได้ดีกว่า casein (V_{max} BSA = 10 หน่วย, V_{max} casein = 22 หน่วย) เอนไซม์โปรตีเอสส่วนใหญ่นอกจากมีความสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์แล้ว ยังมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลส์พันธะเอสเทอร์ (esterase activity) อีกด้วย สับสเตรทสังเคราะห์จำพวกเอสเทอร์ ได้แก่ N α-benzoyl arginine ethyl ester (BAEE), benzoyl tyrosine ethyl ester (BTEE), N α- benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide (BAPNA), Acetyl tyrosine ethyl ester (ATEE) และ Acetyl phenylalanine ethyl ester (APEE) เป็นต้น การวิจัยได้เลือกใช้สับสเตรทเอสทอร์ 2 ชนิด คือ BAEE BAPNA เข้มข้น 1-5 มิลลิโมลาร์ พบว่าเอนไซม์โปรตีเอสสามารถยึดจับกับ BAPNA ได้ดีกว่า BAEE (K_m BAEE = 1.5 มิลลิโมลาร์, K_m BAPNA = 0.2 มิลลิโมลาร์) และยังเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลส์เอสเทอร์ BAEE ได้เร็วกว่า BAPNA อีกด้วย (V_{max} BAEE = 140 หน่วย, V_{max} BAPNA = 100 หน่วย) นอกจากนี้ยังพบว่าอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.* AH-101 สามารถเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลส์สารจำพวกอิลาสติน และเคลาตินได้อีกด้วย(Takii และคณะ,1990)

สรุปผลการทดลอง

Bacillus sp. B-2 เป็นแบคทีเรียชนิดเจริญได้ดีในสภาวะด่างที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียของโรงงานฟอกหนัง ซึ่งได้รับการจำแนกอยู่ในสกุล *Bacillus* สามารถเจริญได้ดีที่ pH 8 ขึ้นไป และที่อุณหภูมิ 35-55 °ซ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 3% กลูโคส และ 3% กากถั่วเหลือง จะให้โปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุดที่ 56 ชม. เท่ากับ 380 หน่วย/มล. สามารถทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านเรซินแลกเปลี่ยนประจุ 2 ชนิด คือ DEAE-sephadex ที่ pH 7.5 เอนไซม์โปรตีเอสจะไม่จับกับเรซิน แต่จะจับกับ CM-sephadex ที่ pH 7.5 ชะเอนไซม์โปรตีเอสออกจากคอลัมน์ด้วย Glycine-NaOH buffer pH 10 ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยโพลีอะคลิลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส พบโปรตีน 1 แถบ แสดงว่าแบคทีเรียสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอสเพียงชนิดเดียว จากนั้นนำไปศึกษาสมบัติต่างๆของเอนไซม์ได้ผลดังนี้

1. เอนไซม์โปรตีเอสมีแอคติวิตีดีที่สุดที่ pH 10.5 และ 55 °ซ เอนไซม์มีความเสถียรที่ pH 7-10 และที่อุณหภูมิ 30-50 °ซ

2. สารยับยั้ง PMSF และ EDTA 10 มิลลิโมลาร์ ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้สมบูรณ์ ส่วนสารยับยั้ง Iodoacetamide, Soybean trypsin inhibitor และ cysteine HCl ไม่มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ เอนไซม์ถูกกระตุ้นการทำงานด้วยไอออนโลหะของโคบอลท์ ได้สูงถึง 197% จึงจัดเอนไซม์โปรตีเอสนี้อยู่ในกลุ่ม Alkaline metalloprotease

3. การศึกษาสมบัติทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ ให้ค่า K_m และ V_{max} ของ casein, BSA, BAEE และ BAPNA เท่ากับ 22.5 มก./มล. 22 หน่วย, 5 มก./มล. 10 หน่วย, 1.5 มิลลิโมลาร์ 140 หน่วย และ 0.2 มิลลิโมลาร์ 100 หน่วย ตามลำดับ

4. การหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน ของเอนไซม์โปรตีเอสได้เท่ากับ 26,000 ดาลตัน และ 24,000 ดาลตัน โดยวิธีเอสดีเอสโพลีอะคลิลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส