บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกแบคทีเรียชนิดทนต่อสภาวะด่าง และสามารถสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอส

จากการนำตัวอย่างดินและน้ำจากบริเวณโรงงานฟอกหนัง 10 ตัวอย่าง มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วทำการแยกเชื้อโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง pH 10.5 (ภาคผนวกที่ 1.1) พบว่าสามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 9 เชื้อ จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมด้วยโปรตีนจากหางนม พบว่ามีแบคทีเรียเพียง 3 ชนิด (B-1,B-2,B-3)เท่านั้น ที่ให้บริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว pH 10.5 (ภาคผนวกที่ 1.2) พบว่าแบคทีเรีย B-1,B-2 และ B-3 จะให้โปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุดที่ 20, 24 และ 26 ชม. และให้โปรตีเอสแอคติวิตี เท่ากับ 18, 56 และ 20 หน่วย/มล. ตามลำดับ ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรีย B-2 เก็บไว้เพื่อนำมาศึกษาในขั้นตอนต่อไป (ตารางที่ 1)

2. การจำแนกสกุลของแบคทีเรีย B-2

หลังจากคัดเลือกแบคทีเรียชนิดทนต่อสภาวะด่างที่สังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอสได้แล้ว นำแบคทีเรียที่ได้ไปจำแนกลักษณะทางกายภาพ และทางชีวเคมีตามวิธีของ Bergey(Sneath และคณะ, 1986) ผลการทดสอบแสดงว่า แบคทีเรีย B-2 ควรจัดอยู่ในสกุล *Bacillus spp.* (ตารางที่ 2) ลักษณะของเซลล์ และตำแหน่งของสปอร์ แสดงในรูปที่ 1 และ 2

3. การศึกษาสภาวะการเจริญของ *Bacillus sp.* B-2

ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเจริญของแบคทีเรีย 2 ปัจจัยหลักที่ทำการศึกษา คือ อุณหภูมิ และ pH เมื่อทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารตามสูตรในภาคผนวกที่ 1.2 pH 10.5 และแปรผันอุณหภูมิ พบว่า *Bacillus sp.* B-2 เจริญได้ดีมากในช่วงอุณหภูมิ 35-45 ^{o}ซ และเจริญ

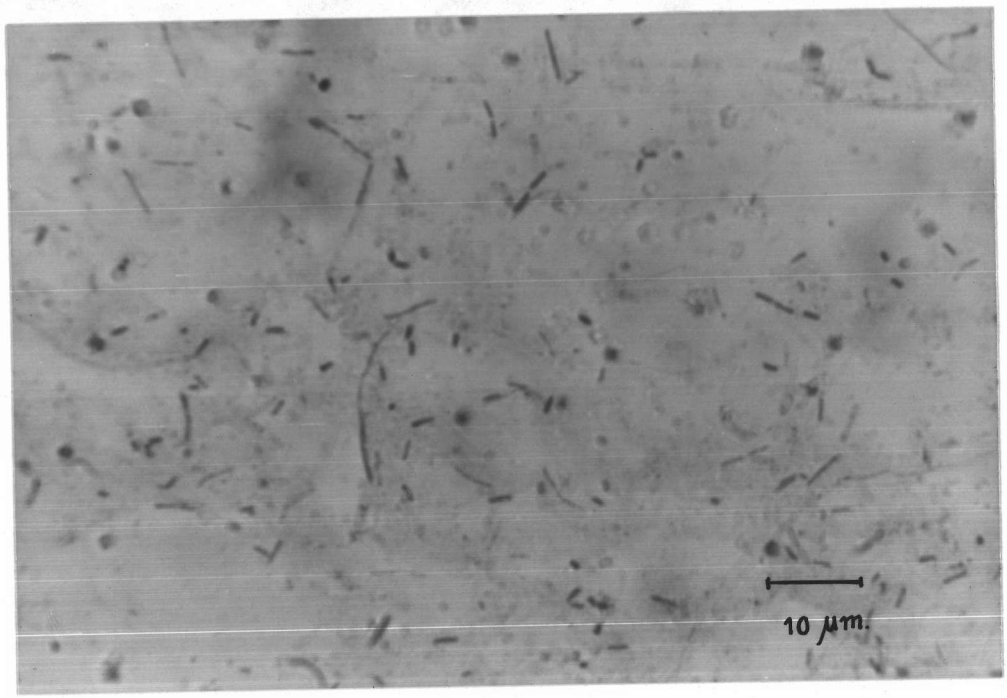
ตารางที่ 1 เปรียบเทียบความสามารถของแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสภาวะต่างในการย่อยสลายโปรตีน และโปรตีเอสแอคติวิตี จากตัวอย่างดิน และน้ำ

แบคทีเรีย	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (ซม.)	โปรตีเอสแอคติวิตี (หน่วย/มล.)	เวลาที่ให้แอคติวิตีสูงสุด (ชม.)
B-1	2.7	18	20
B-2	4.2	56	24
B-3	2.5	20	26

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

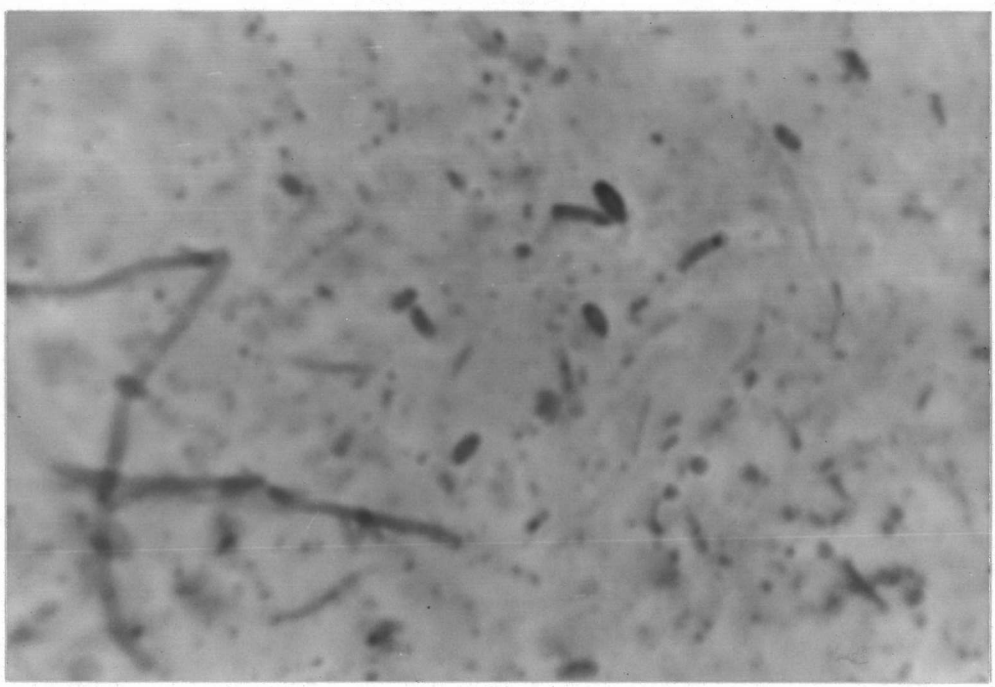
ตารางที่ 2 ลักษณะทางกายภาพ และผลการตรวจสอบทางชีวเคมีของ *Bacillus sp.* B-2

Cell morphology	
Vegetative cells	Motile rods
Sporangia	Middle of cell
Biochemical and cultural	
Growth temp (°C)	35-55 °C
Gram reaction	Positive
Nutrient agar (pH 7)	No growth
Nutrient agar (pH 10-11.5)	Exellent growth
Starch hydrolysis	Positive
Gelatine hydrolysis	Positive
Casein hydrolysis	Positive
Catalase activity	Positive
Oxidase activity	Positive
Nitrate reduced to nitrite	Positive
Sulfate reduced to sulfite	Negative
Marked acidity from glucose	Positive



รูปที่ 1 ลักษณะของเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus sp.* B-2 หลังย้อมกรัม ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวน้ำมัน กำลังขยาย 100 เท่า

รูปที่ 2 แสดงตำแหน่งสปอร์ในเซลล์ ซึ่งติดสีเขียว ของมาลาไคท์กรีน ส่วนเซลล์ติดสีแดง ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวน้ำมันกำลังขยาย 400 เท่า

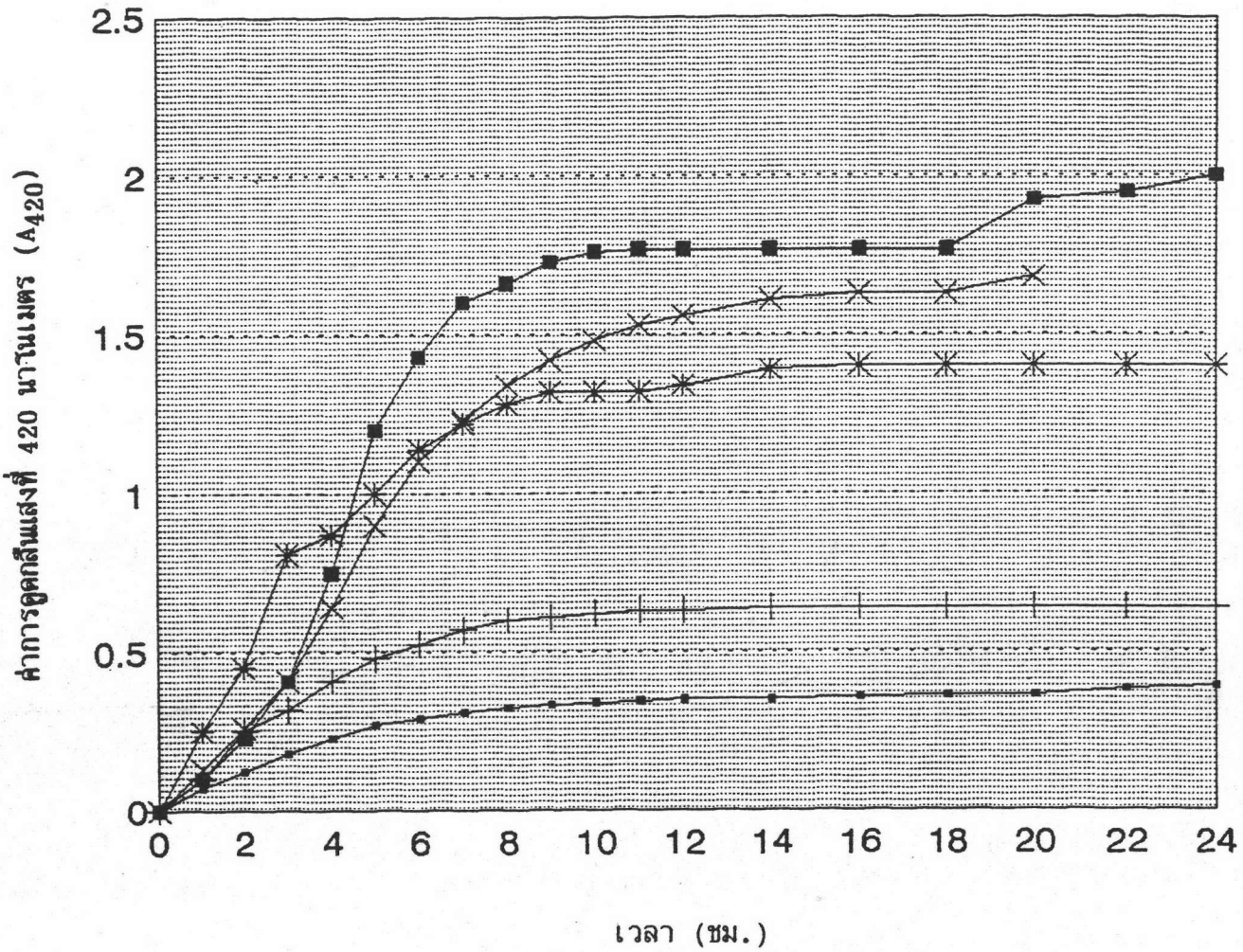


ได้ดีที่ 50 °ซ ส่วนที่อุณหภูมิ 55 °ซ เจริญได้ปานกลาง เมื่อเลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิคงที่ 40 °ซ แต่แปรผัน pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ pH 7-12 พบว่าที่ pH 7 *Bacillus sp.* B-2 ไม่สามารถเจริญได้เลย ที่ pH 8 เจริญได้ดี และเจริญได้ดีมากที่ pH 9-12 ดังนั้น สภาวะการเลี้ยงเชื้อในการศึกษาขั้นต่อไป จึงเลือกสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ pH 10 40 °ซ (รูปที่ 3 และ 4)

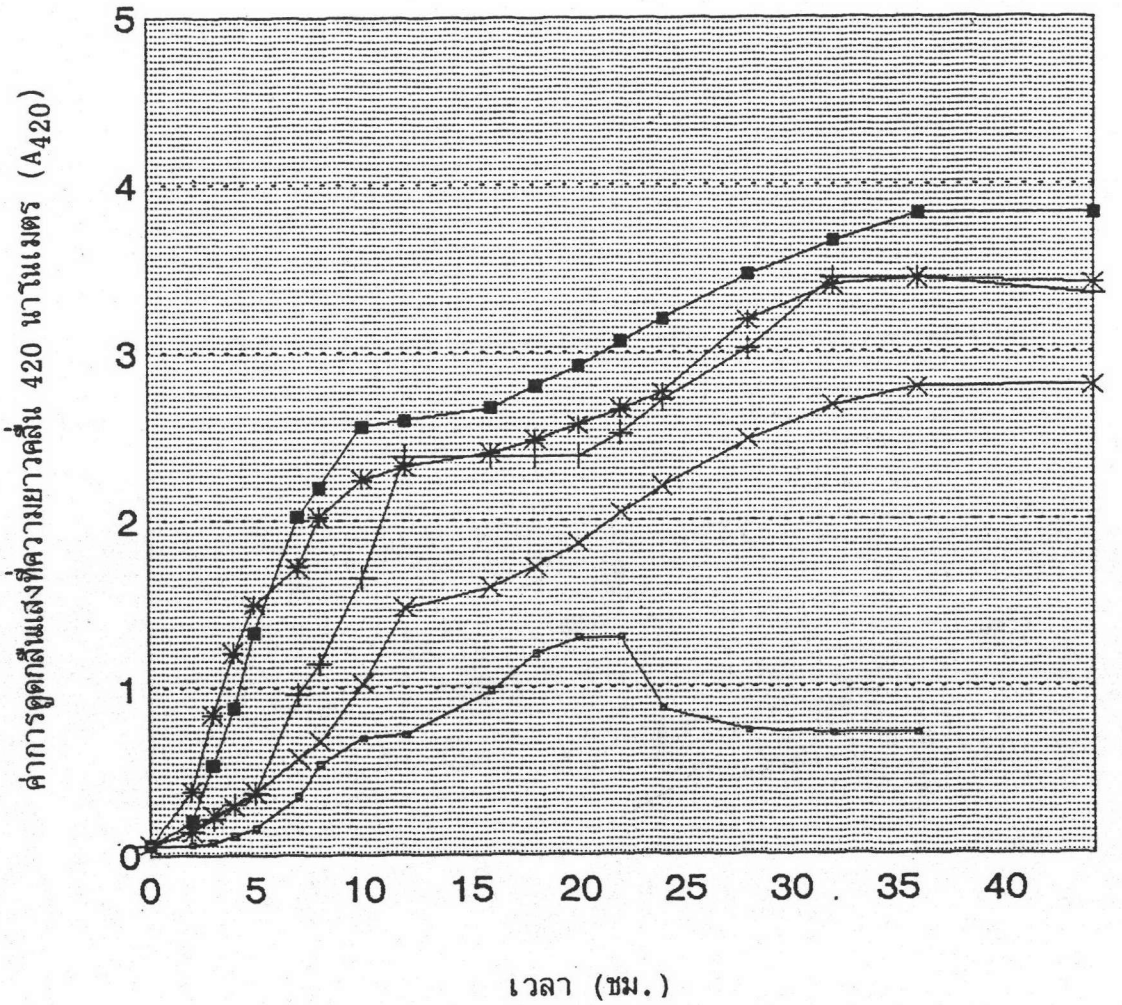
4. การศึกษาส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชักนำให้ *Bacillus sp.* B-2 สังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอส

สูตรอาหารที่ใช้เป็นสูตรอาหารอย่างง่ายที่มีส่วนประกอบไม่กี่ชนิด ตามภาคผนวกที่ 1.3 (Fujiwara และคณะ,1987) ส่วนประกอบในอาหารที่มีการแปรผัน คือแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ ทั้งชนิดและปริมาณ จากผลการทดลองรูปที่ 5 ทดลองใช้แหล่งคาร์บอน 8 ชนิด คือ กลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส แลคโตส กาแลคโตส แป้งมันสำปะหลัง รำข้าว(rice bran) และข้าวโพดป่น(corn meal) โดยเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 1% (กรัม/ปริมาตร) และใช้แหล่งไนโตรเจนคือ เปปโตน 0.5 % พบว่าชนิดแหล่งคาร์บอน และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่ให้โปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุด และค่าโปรตีเอสแอคติวิตีเรียงจากมากไปน้อยคือ กลูโคส : 52 ชม. 262 หน่วย/มล. ซูโครส: 60 ชม. 254 หน่วย/มล. ข้าวโพดป่น: 56 ชม. 197 หน่วย/มล. กาแลคโตส: 48 ชม. 84 หน่วย/มล. และ รำข้าว: 40 ชม. 63 หน่วย/มล. ตามลำดับ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมฟรุคโตส แลคโตส และแป้งมันสำปะหลัง ตรวจไม่พบโปรตีเอสแอคติวิตี จากนั้นทำการทดลองหาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมโดยการแปรผันปริมาณของกลูโคส 1-5 % (กรัม/ปริมาตร) ดังรูปที่ 6 ปริมาณกลูโคสที่ใช้ (%), ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่ให้โปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุด และค่าโปรตีเอสแอคติวิตีเรียงจากมากไปน้อยคือ 3 % : 48 ชม. 274 หน่วย/มล., 2% : 48 ชม. 268 หน่วย/มล., 4% : 48 ชม. 262 หน่วย/มล. 1% : 26 ชม. 74 หน่วย/มล. และ 5% : 26 ชม. 63 หน่วย/มล. ตามลำดับ

ในทำนองเดียวกัน เมื่อให้ปริมาณกลูโคสคงที่ 2% (กรัม/ปริมาตร) และแปรผันแหล่งไนโตรเจน 7 ชนิด คือ เปปโตน, สารสกัดจากยีสต์, corn steep liqour, กากถั่วเหลือง NH_4NO_3, NH_4Cl และ NH_4SO_4 โดยเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1% (กรัม/ปริมาตร) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 7 แหล่งไนโตรเจน และ ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่ให้โปรตีเอส



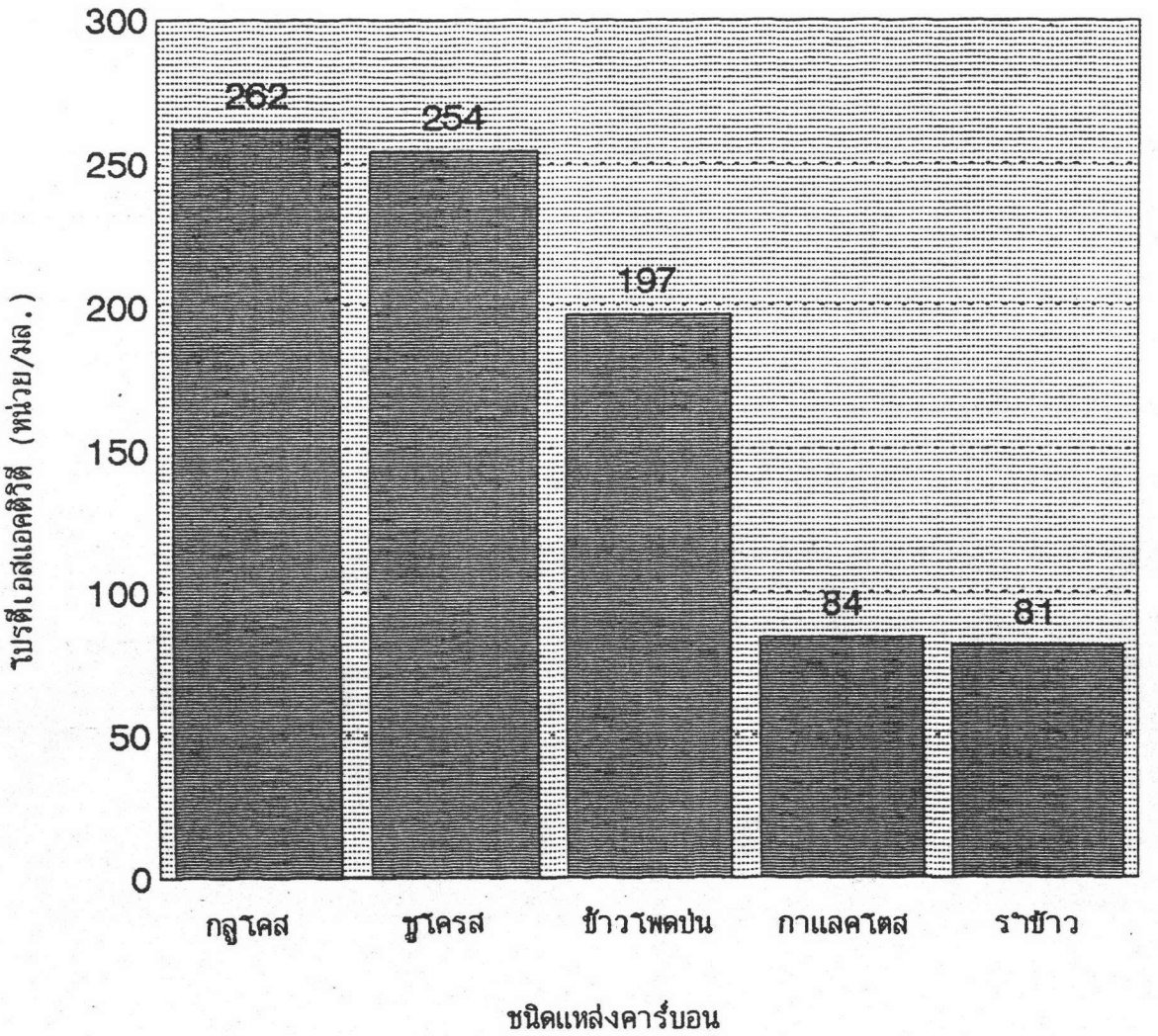
รูปที่ 3 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *Bacillus sp.* B-2 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย 0.1% K_2HPO_4, 0.5% เปปโตน, 0.5% สารสกัดจากยีสต์ และ 2% แป้ง (อาหารเลี้ยงเชื้อ I)



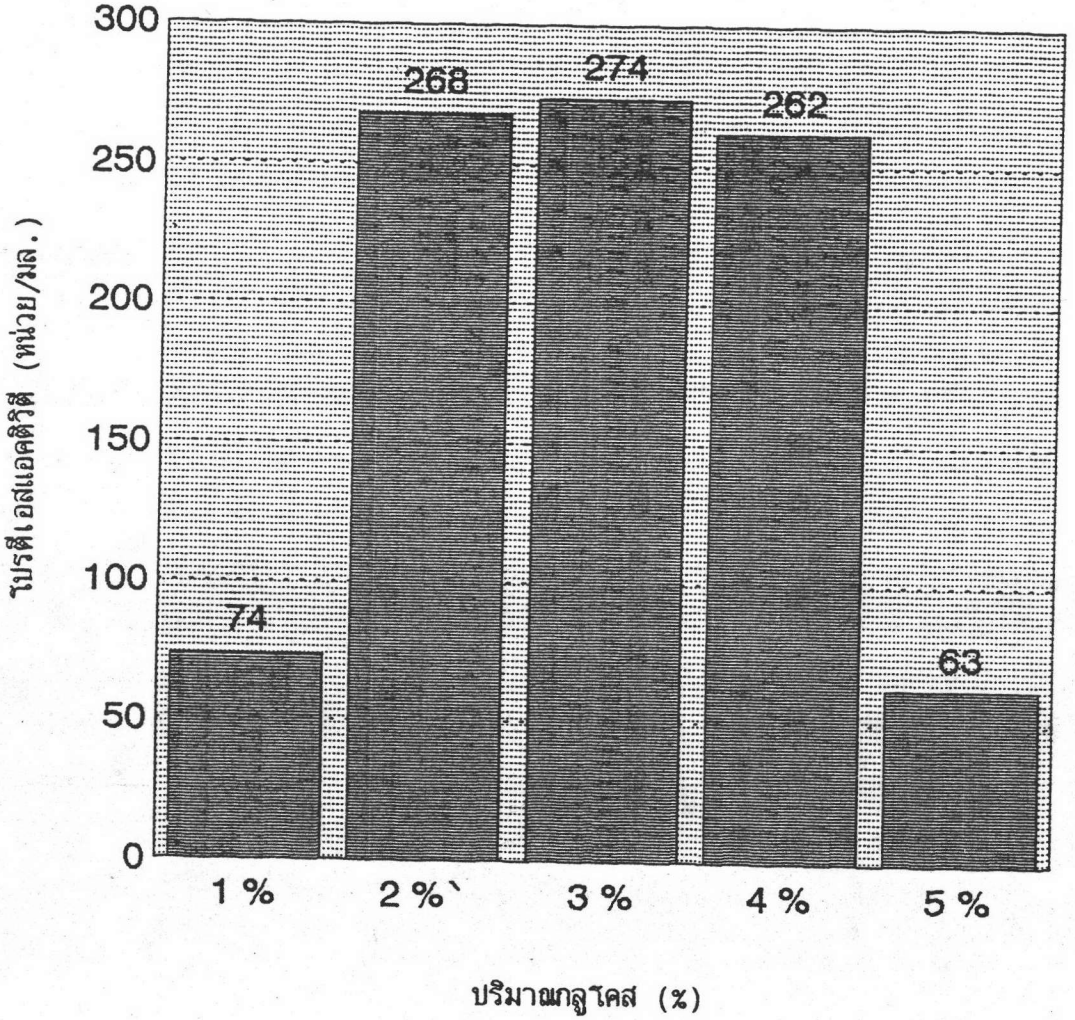
รูปที่ 4 ผลของ pH ต่อการเจริญของ *Bacillus sp.* B-2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ I ที่ 40 °ซ

pH : □——□ 8 ×——× 9 +——+ 10

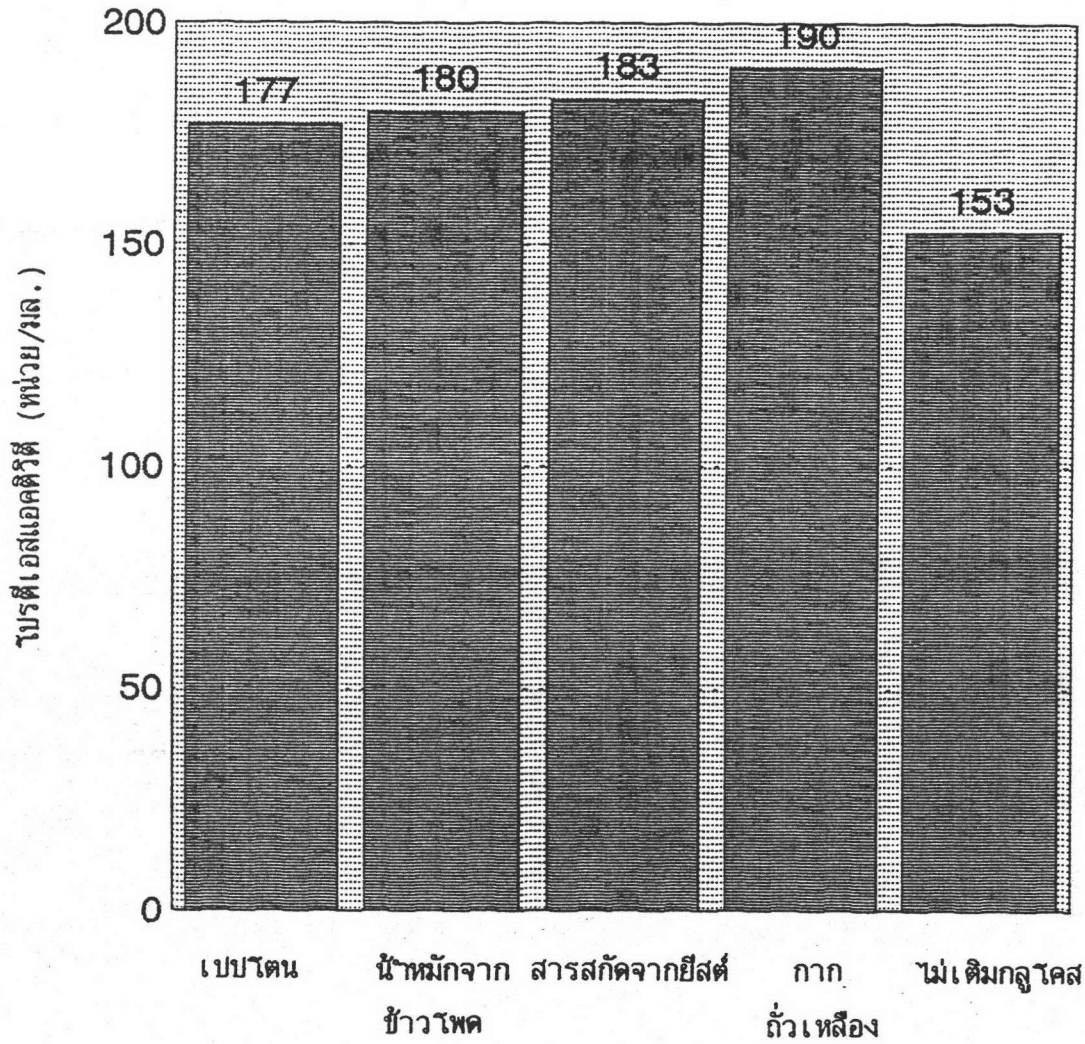
✳——✳ 11 ■——■ 12



รูปที่ 5 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.* B-2 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมด้วยแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ 1% ยกเว้นกลูโคสใช้ 2% และ 0.5% เปปโตน pH 10.5 40 °ซ วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ 45 °ซ pH 10.5 10 นาที

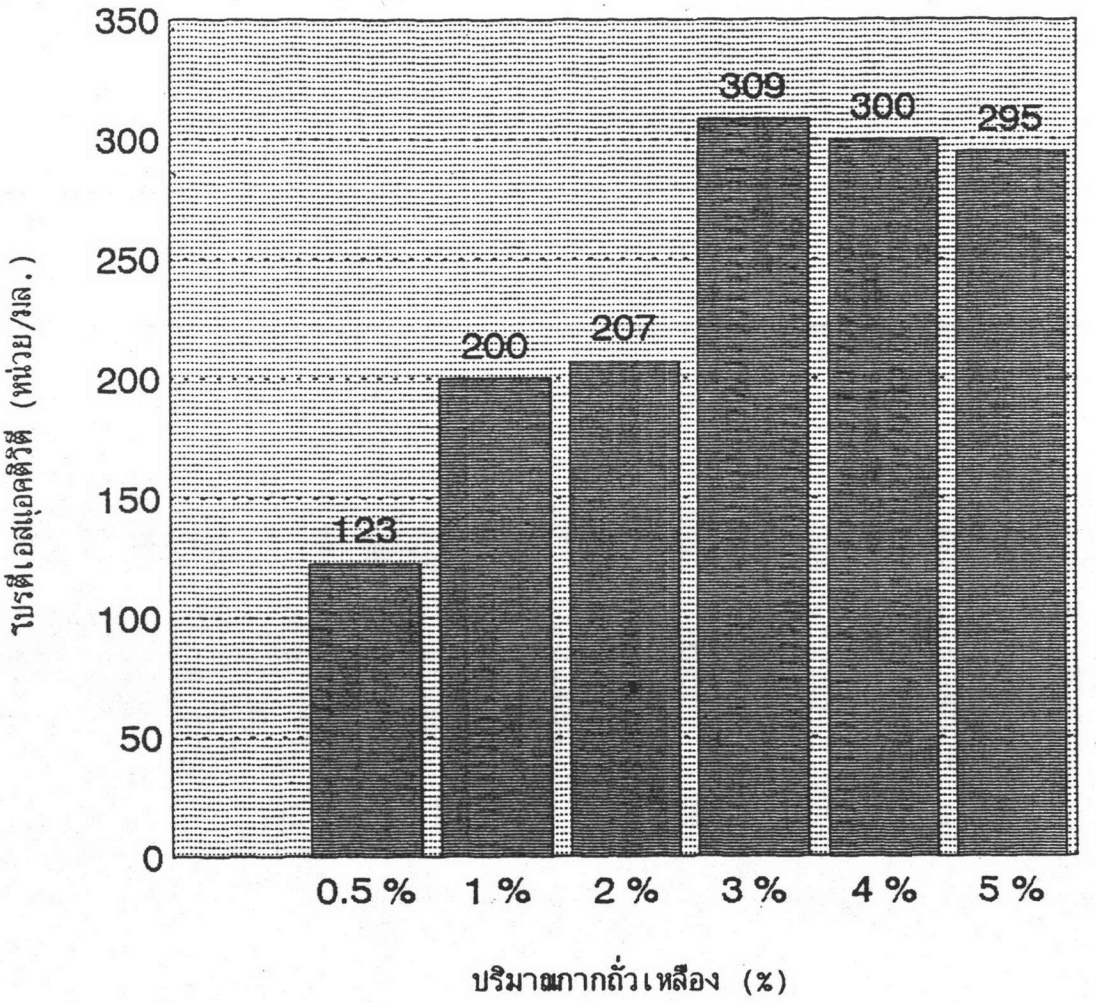


รูปที่ 6 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.* B-2 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย 0.1% KH_2PO_4, 0.5% เปปโตน และ 1-5% กลูโคส ที่ pH 10.5 40 °ซ วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ pH 10.5 45 °ซ 10 นาที



รูปที่ 7 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.* B-2 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย 0.1% KH_2PO_4, 2% กลูโคส และแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ 1% ที่ pH 10.5 40 °ซ วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ pH 10.5 40 °ซ 10 นาที

หมายเหตุ ไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส เมื่อใช้ 1% NH_4SO_4, NH_4NO_3 และ NH_4Cl เป็นแหล่งไนโตรเจน



รูปที่ 8 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.* B-2 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย 0.1% KH_2PO_4, 3% กลูโคส และ 0-5% กากถั่วเหลือง ที่ pH 10.5 40 °ซ วัดแอคติวิตีของโปรตีเอสที่ pH 10.5 45 °ซ 10 นาที

แอคติวิตีสูงสุด และ ค่าโปรตีเอสแอคติวิตีเรียงจากมากไปน้อย คือ กากถั่วเหลือง : 52 ชม. 190 หน่วย/มล., สารสกัดจากยีสต์ : 48 ชม. 183 หน่วย/มล., corn steep liqour : 48 ชม, 180 หน่วย/มล. และ เปปโตน : 52 ชม. 177 หน่วย/มล. ตามลำดับ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมด้วย NH_4Cl, NH_4NO_3 และ NH_4SO_4 ตรวจไม่พบโปรตีเอสแอคติวิตี เพื่อหาปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม จึงทำการแปรผันปริมาณกากถั่วเหลืองที่ใช้ 1-5% (กรัม/ปริมาตร) ดังรูปที่ 8 ปริมาณกากถั่วเหลืองที่ใช้, ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่ให้โปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุด และค่าโปรตีเอสแอคติวิตีเรียงจากมากไปน้อย คือ 3% : 68 ชม. 207 หน่วย/มล., 4% : 68 ชม. 300 หน่วย/มล., 5% : 68 ชม. 295 หน่วย/มล., 2% : 68 ชม. 207 หน่วย/มล., 1% : 68 ชม. 200 หน่วย/มล. และ 0.5% : 68 ชม. 125 หน่วย/มล. ตามลำดับ

ดังนั้นในการวิจัยขั้นต่อไป อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้จะประกอบด้วยส่วนประกอบตามสูตรในภาคผนวกที่ 1.3 ที่เสริมด้วย 3% กลูโคส และ 3% กากถั่วเหลือง

5. การศึกษาสภาวะเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส (crude enzyme) จาก *Bacillus sp.* B-2

หลังจากเลี้ยงเชื้อไปจนกระทั่ง 68 ชม. แล้ว นำอาหารเลี้ยงเชื้อไปปั่นตกตะกอนเซลที่ 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสมาศึกษาสภาวะเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ดังนี้

5.1 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส

นำส่วนน้ำใสมาวัดแอคติวิตีที่ pH 10.5 อุณหภูมิ 25-70 °ซ บ่มเอนไซม์นาน 10 นาที โดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรท ดังรูปที่ 9 แสดงว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสมากที่สุด คือ 60 °ซ และแคลเซียมอิออน 2 มิลลิโมลาร์ ช่วยรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์โดยเฉพาะที่อุณหภูมิสูง (รูปที่ 9)

5.2 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์ของเอนไซม์โปรตีเอส

นำส่วนน้ำใสมาวัดแอคติวิตีของโปรตีเอสที่อุณหภูมิ 60 °ซ pH 7-13 บ่มเอนไซม์นาน 10 นาที โดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรท ระบบบัฟเฟอร์ที่ใช้มีดังนี้ pH 6-9: 0.1 ทริสไฮโดรคลอไรด์ ,pH 9-12: 0.1 โมลาร์ ไกลซีนไฮดรอกไซด์ pH 12-13: 0.1 โมลาร์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โปแตสเซียมคลอไรด์ไฮดรอกไซด์ จากรูปที่ 10 pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์มากที่สุด คือ pH 11

เมื่อได้ศึกษาถึงสภาวะการเจริญ ส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสแล้ว จึงทดลองเลี้ยงเชื้อตามสภาวะดังกล่าวข้างต้น โดยติดตามการเจริญที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร ควบคู่ไปกับการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ และ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองในรูปที่ 11 พบว่า *Bacillus sp.* B-2 เริ่มสร้างเอนไซม์หลังจากการเลี้ยงผ่านไป 24 ชม. และสร้างเอนไซม์ได้มากที่สุด 380 หน่วย/มล. ที่ 56 ชม. ซึ่งเซลเริ่มเข้าสู่สภาวะการเจริญคงที่ (Stationary phase) pH เริ่มต้นที่ 10.5 และจะค่อยๆลดลง จนเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อที่ 68 ชม. pH สุดท้ายที่วัดได้ คือ 9.3

6. การทำเอนไซม์โปรตีเอสให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ

6.1 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดย DEAE-sephadex resin

เลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อขวดละ 200 มล. 5 ขวด เลี้ยงเชื้อด้วยสภาวะที่เหมาะสมปั่นแยกส่วนน้ำใส (โปรตีเอสแอคติวิตี 240หน่วย/มล., แอคติวิตีรวม 2.4 x 10^5 หน่วย)

ปรับ pH ให้เป็น 7.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 % (กรัม/ปริมาตร) นำมาผสมกับเรซิน DEAE-sephadex 500 มล. ที่อยู่ในสภาวะสมดุลใน 10 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ pH 7.5 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 2 มิลลิโมลาร์ กวนเบาๆเป็นเวลา 2 ชม. ล้างด้วย 10 มิลลิโมลาร์ ไกลซีนไฮดรอกไซด์ pH 7.5 500 มล.กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 เก็บส่วนน้ำใส เมื่อผ่านขั้นตอนนี้พบว่าสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกกำจัดออก รวมทั้งโปรตีนบางส่วน วัดแอคติวิตีของโปรตีเอสในส่วนน้ำใสได้เท่ากับ 92 หน่วย/มล., แอคติวิตีรวม 1.38 x 10^5 หน่วย

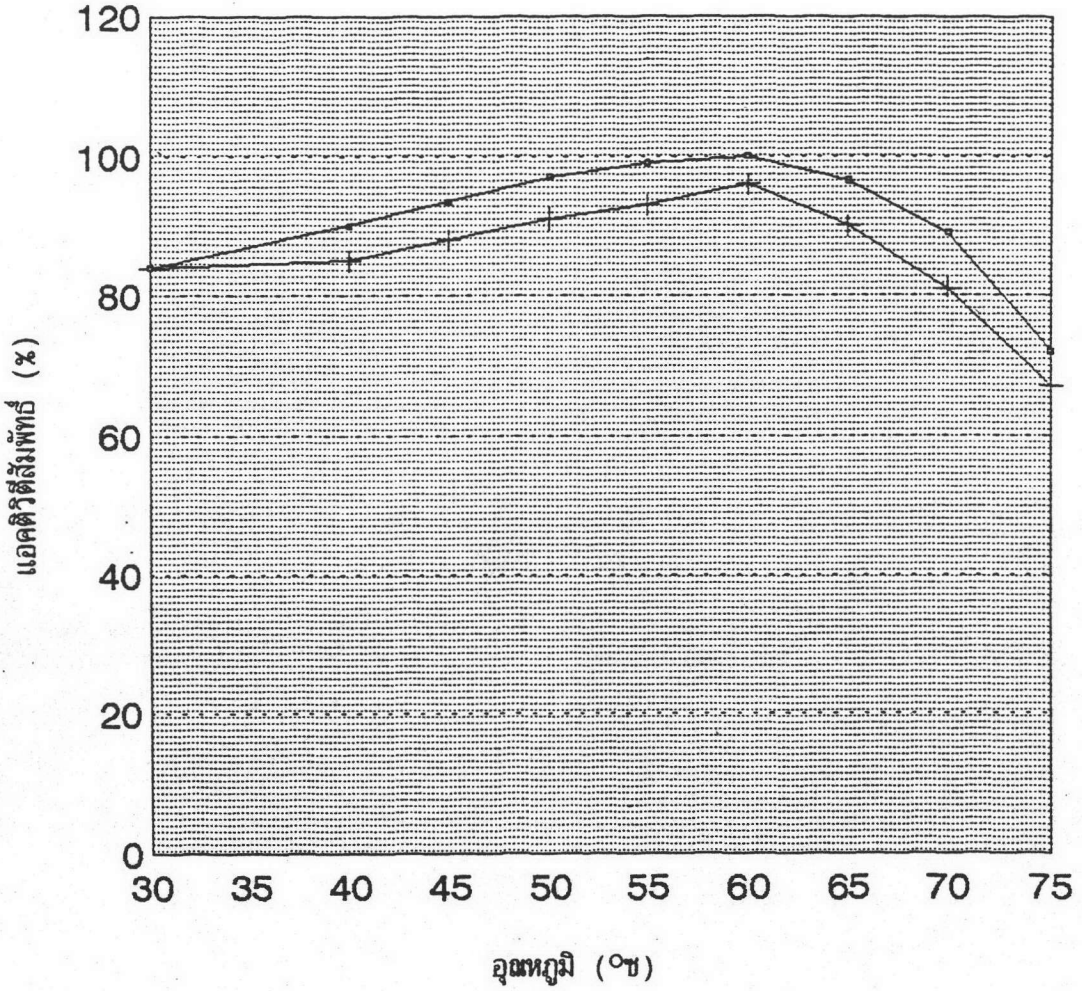
6.2 การทำเอนไซม์โปรตีเอสให้บริสุทธิ์โดย CM-sephadex resin

ส่วนน้ำใสที่มีโปรตีเอสแอคติวิตีจากขั้นตอนก่อนหน้า 1500 มล. นำมาผสมกับเรซิน CM-sephadex A-50 ซึ่งอยู่ในสภาวะสมดุลใน 10 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์ pH 7.5 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 2 มิลลิโมลาร์ 500 มล. กวนผสมกันนาน 2 ชม. ก่อนนำไปบรรจุลงคอลัมน์

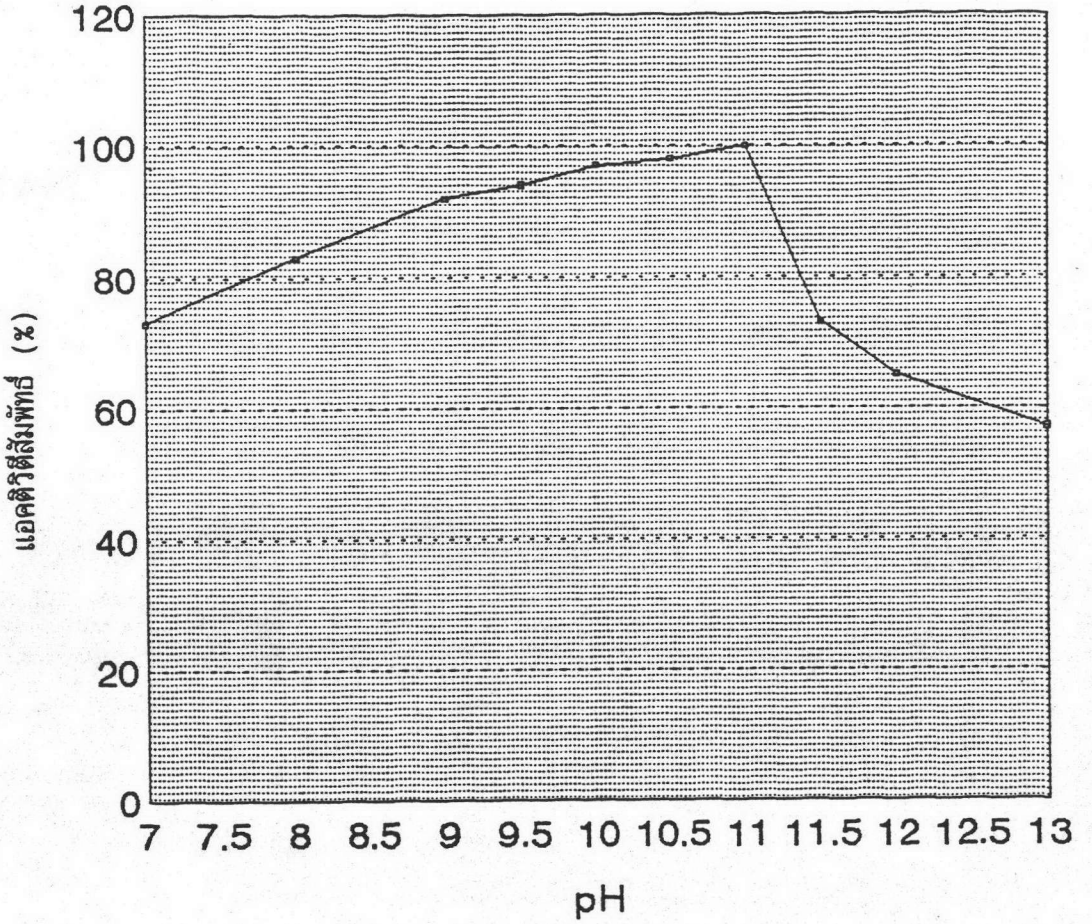
ตารางที่ 3 ผลของแคลเซียมอิออนต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp. B-2*

ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)
0	100
1	99
2	114
3	108
4	102
5	95

วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ 55 °ซ pH 10.5 10 นาที



รูปที่ 9 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส (crude enzyme) เมื่อวัดแอคติวิตีที่ pH 11 10 นาที



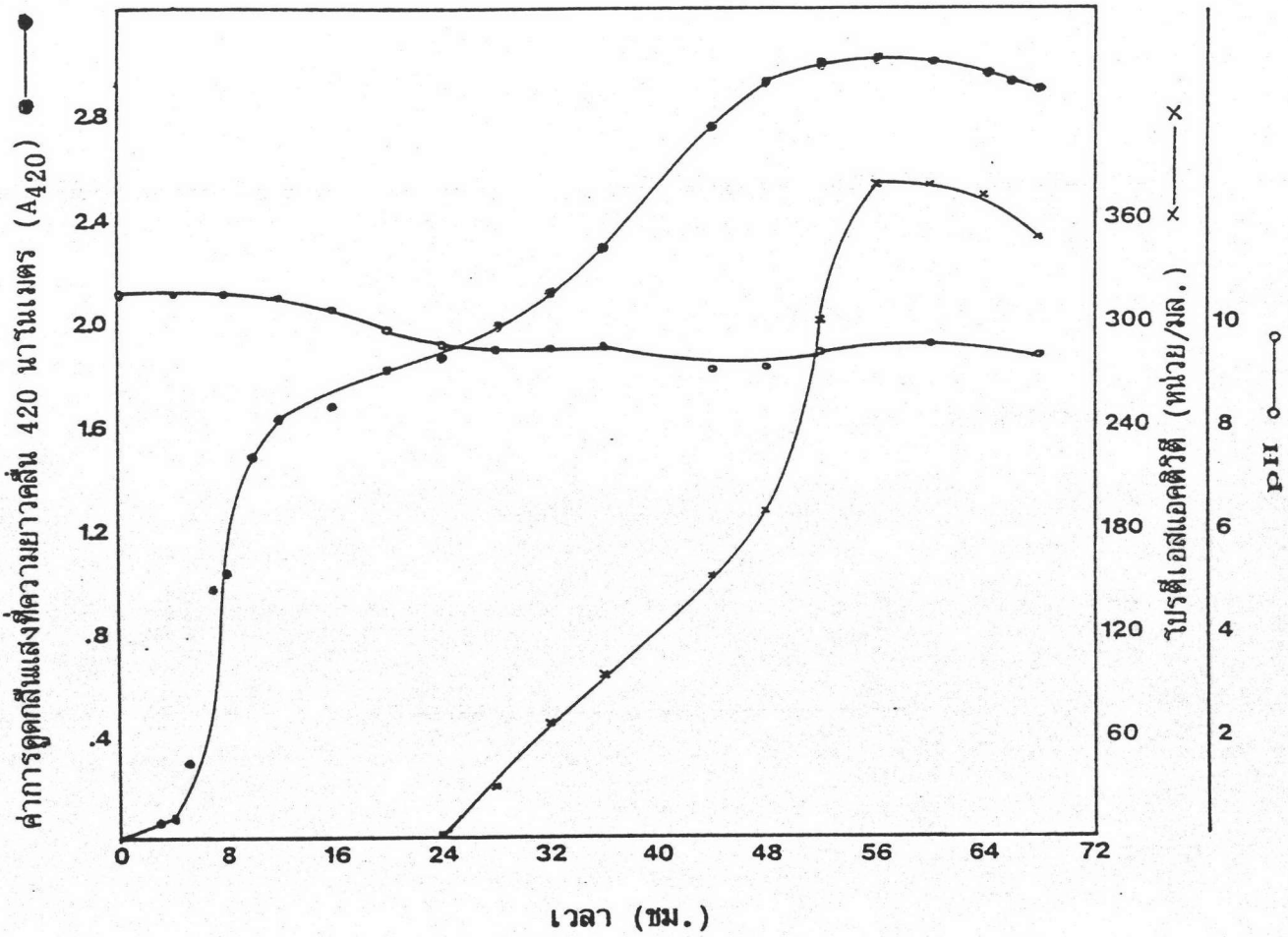
รูปที่ 10 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส (crude enzyme) เมื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ 60 °ซ 10 นาที

ระบบบัฟเฟอร์: pH 6-9 , 0.1 โมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์

pH 9-12 , 0.1 โมลาร์ ไกลซีนไฮดรอกไซม์

pH 12-13 , 0.1 โมลาร์ โปแตสเซียมคลอไรด์ ไฮดรอกไซด์

□——□ + 2 มิลลิโมลาร์ Ca^{2+} ×——× ไม่เติม Ca^{2+}



รูปที่ 11 แสดงการเจริญของ *Bacillus sp.* B-2, แอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส และ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเวลาผ่านไป ในอาหารที่ประกอบด้วย 3 % กลูโคส, 3 % กากถั่วเหลือง และ 0.1 % KH_2PO_4 ที่อุณหภูมิ 40 °ซ pH 10.5 และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ 55 °ซ pH 10.5 10 นาที

ขนาด 4x90 ซม. ล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน แล้วเปลี่ยนเป็นชะคอลัมน์ด้วย 10 มิลลิโมลาร์ ไกลซีนไฮดรอกไซด์ pH 10 ที่มี 2 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ รวบรวมสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์ และมีโปรตีเอสแอคติวิตีได้ 135 มล. 43 หน่วย/มล. รูปแบบของโปรตีนที่ออกจากคอลัมน์แสดงในรูปที่ 12

สรุปขั้นตอนต่างๆในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์แสดงในตารางที่ 4

7. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โปรตีเอสที่แยกได้โดยวิธีโพลีอะคลิลาไมด์เจล อิเลคโตรโฟรีซีส

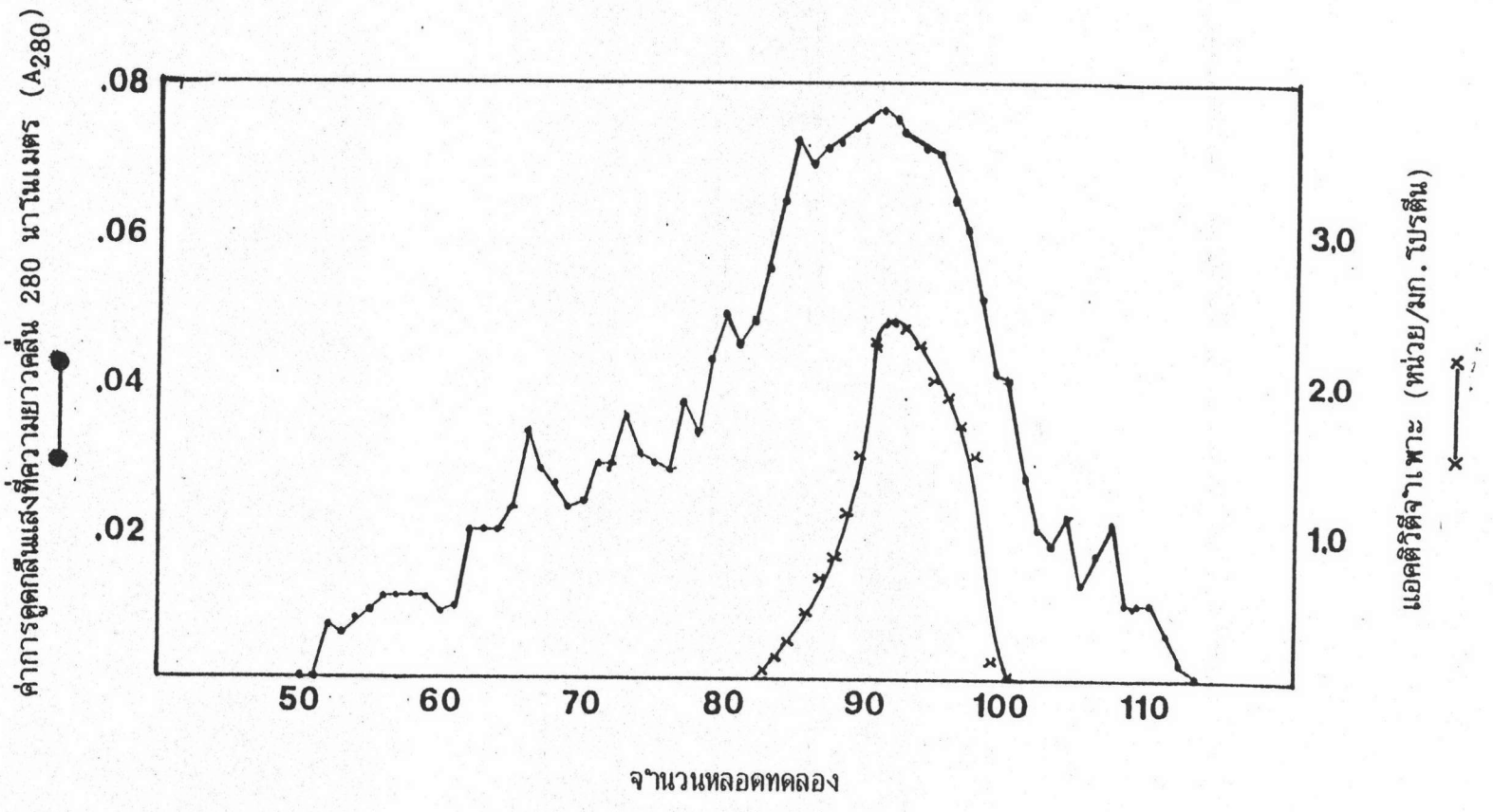
เอนไซม์โปรตีเอสที่แยกได้ในข้อ 6.2 ยังไม่เข้มข้นพอ จึงนำไปผ่านเมมเบรน (YM-10 Amicon) ก่อนแล้วจึงนำมาทำอิเลคโตรโฟรีซีส

จากรูปที่ 13 เจลช่องที่ 1 เป็นเอนไซม์โปรตีเอสก่อนการทำให้บริสุทธิ์ พบว่ามีโปรตีนหลายชนิดปะปนอยู่ เมื่อนำมาผสมกับ DEAE-sephadex สี และโปรตีนบางส่วนถูกกำจัดโปรตีนปนเปื้อนจึงลดน้อยลงดังแสดงในเจลช่องที่ 2 และจะถูกกำจัดให้หมดไปเหลือเพียงแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวซึ่งคาดว่าเป็นแถบโปรตีนของเอนไซม์โปรตีเอส ในเจลช่องที่ 3

8. การศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรตีเอสที่แยกได้

8.1 การจำแนกชนิดของเอนไซม์โปรตีเอสโดยใช้สารยับยั้ง และอิออนโลหะ

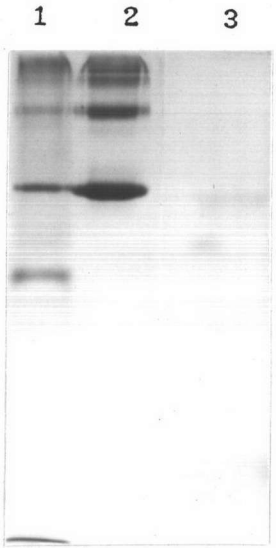
จากการทดลองโดยเติม 1 มิลลิโมลาร์ ของอิออนโลหะหลายชนิด (ตารางที่ 5) พบว่าอิออนโลหะของโคบอลต์ สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสให้สูงขึ้นได้ถึง 197 % และเมื่อใช้สารยับยั้ง EDTA และ PMSF ที่แปรผันความเข้มข้น 2-10 มิลลิโมลาร์ พบว่า ทั้งสองไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์ แม้ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์(ตารางที่ 6) ส่วนสารยับยั้งชนิดอื่นแสดงในตารางที่ 7 เมื่อเอนไซม์ถูกกระตุ้นการทำงานได้ด้วยอิออนของโลหะ และ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วงด่าง จึงจัดเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.* B-2 อยู่ในกลุ่ม Alkaline metalloprotease



รูปที่ 12 รูปแบบของโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสจากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วย CM-sephadex เมื่อชะคอลัมน์ด้วย 10 มิลลิโมลาร์ ไกลซีนไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ pH 10 ที่มี 2 มิลลิโมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ และเก็บสารละลายหลอดละ 7 มล. วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ 55°ซ pH 10.5 10 นาที

ตารางที่ 4. สรุปขั้นตอนการทำเอนไซม์โปรตีเอสให้บริสุทธิ์

ขั้นตอน	ปริมาตร (มล.)	แอคติวิตี (หน่วย/มล.)	แอคติวิตีรวม (หน่วย)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	ผลผลิต (%)
crude enzyme	1,000	240	2.4×10^5	36,000	7	1	100
DEAE-sephadex A-50	1,500	92	1.38×10^5	13,500	11	1.57	57.5
CM-sephadex C-50	135	43	6480	140	46.3	4.2	4.7



รูปที่ 13 รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีโพลีอะคลิลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิส pH 8.3

1. Crude enzyme (180 ไมโครกรัม)
2. หลังผ่าน DEAE-Sephadex (50 ไมโครกรัม)
3. หลังผ่าน CM-Sephadex (20 ไมโครกรัม)

ตารางที่ 5 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.* B-2

อิออนโลหะ	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)
ไม่มี	-	100
LiCl	1	113.7
$MgCl_2.6H_2O$	1	103.8
$CaCl_2.2H_2O$	1	99
$CuCl_2.2H_2O$	1	104.4
$ZnSO_4$	1	100.2
$HgCl_2$	1	103.7
$MnSO_4.4H_2O$	1	93.3
$CoCl_2.6H_2O$	1	197
$NiCl_2.6H_2O$	1	108.9
$FeCl_3$	1	108.3
$FeSO_4$	1	108.6

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 ผลของสารยับยั้ง PMSF และ EDTA ต่อการทำงานของเอนไซม์เมื่อแปรผันความเข้มข้น

ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	แอคติวิตีที่เหลือ (%)	
	PMSF	EDTA
0	100	100
2	100	91.6
4	100	89.6
6	99	87.6
8	69.5	85.4
10	45.2	83.6

หมายเหตุ บ่มเอนไซม์ที่ 37 °ซ pH 10.5 นาน 30 นาที
วัดแอคติวิตีเอนไซม์ที่เหลือที่ 55 °ซ pH 10.5 10 นาที

ตารางที่ 7 ผลของสารยับยั้งบางชนิดต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.* B-2

สารยับยั้ง	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	แอคติวิตีที่เหลือ (%)
หลอดควบคุม	-	100
PMSF	10	45.2
EDTA	10	83.6
Iodoacetamide	10	105
Soybean trypsin inhibitor	1 mg/ml	113
Cysteine HCl	10	102

หมายเหตุ บ่มเอนไซม์ที่ 37 °ซ pH 10.5 30 นาที วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือที่ 55 °ซ pH 10.5 10 นาที

8.2 การศึกษาสภาวะเหมาะสมต่อการทำงาน และ ความเสถียรของเอนไซม์

8.2.1 ผลของ pH ต่อการทำงาน และความเสถียรของเอนไซม์

จากการ วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ 55 °ซ 10 นาที และแปรผัน pH จาก 4-12 โดยใช้บัฟเฟอร์เช่นเดียวกับการศึกษาผลของ pH ก่อนทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ ผลแสดงในรูปที่ 14 ปรากฏว่า pH ที่ให้ โปรตีเอสแอคติวิตี สูงที่สุด คือ pH 10.5 สำหรับผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ แสดงในรูปที่ 15 ต้องทำการบ่มเอนไซม์กับบัฟเฟอร์ pH 4-12 ที่ 50 °ซ 30 นาที แล้งจึงวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือ ที่ 55 °ซ 10 นาที pH 10.5 เปรียบเทียบ กับผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ เมื่อเติม 2 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์ พบว่า โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.* B-2 จะมีความเสถียรในช่วง pH 9-10 และ แคลเซียมอิออน ช่วยให้โปรตีเอสมีความเสถียรมากขึ้น ที่ pH สูง

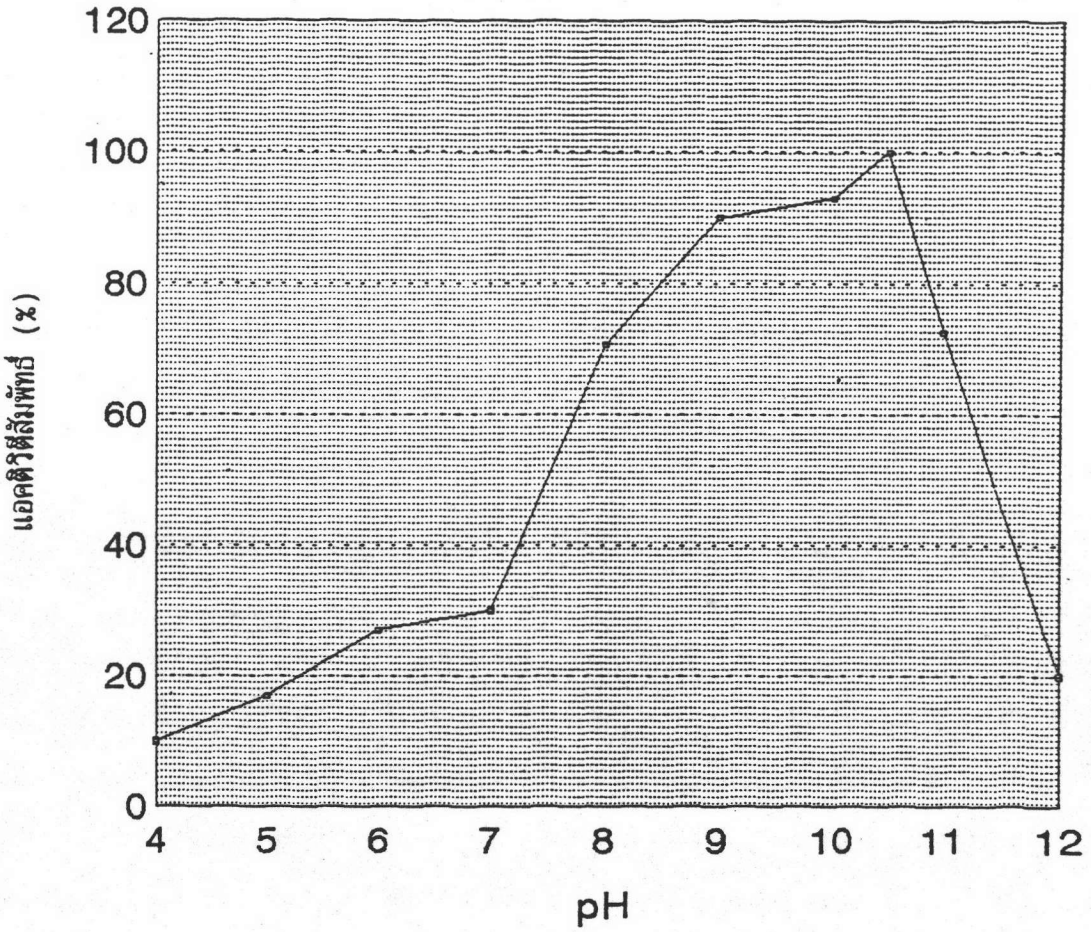
8.2.2 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงาน และเสถียรของเอนไซม์โปรตีเอส

จากการวัดแอคติวิติของเอนไซม์ ที่ pH 10.5 อุณหภูมิ 25-70°ซ บ่มเอนไซม์นาน 10 นาที พบว่า อุณหภูมิที่ให้โปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุด คือ ที่อุณหภูมิ 55 °ซ (รูปที่ 16) ส่วนผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์แสดงใน รูปที่ 17 เมื่อบ่มเอนไซม์กับบัฟเฟอร์ pH 10.5 ที่ อุณหภูมิ 50,55 และ 60 °ซ เป็นเวลา 0-60 นาที แล้ววัดแอคติวิตีที่เหลือที่อุณหภูมิ 55 °ซ 10 นาที แสดงว่าเอนไซม์เสถียรที่อุณหภูมิ 50 °ซ หรือต่ำกว่า และแคลเซียมอิออนช่วยรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูง

8.2.3 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงต่อสับสเตรท และสมบัติทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์โปรตีเอส

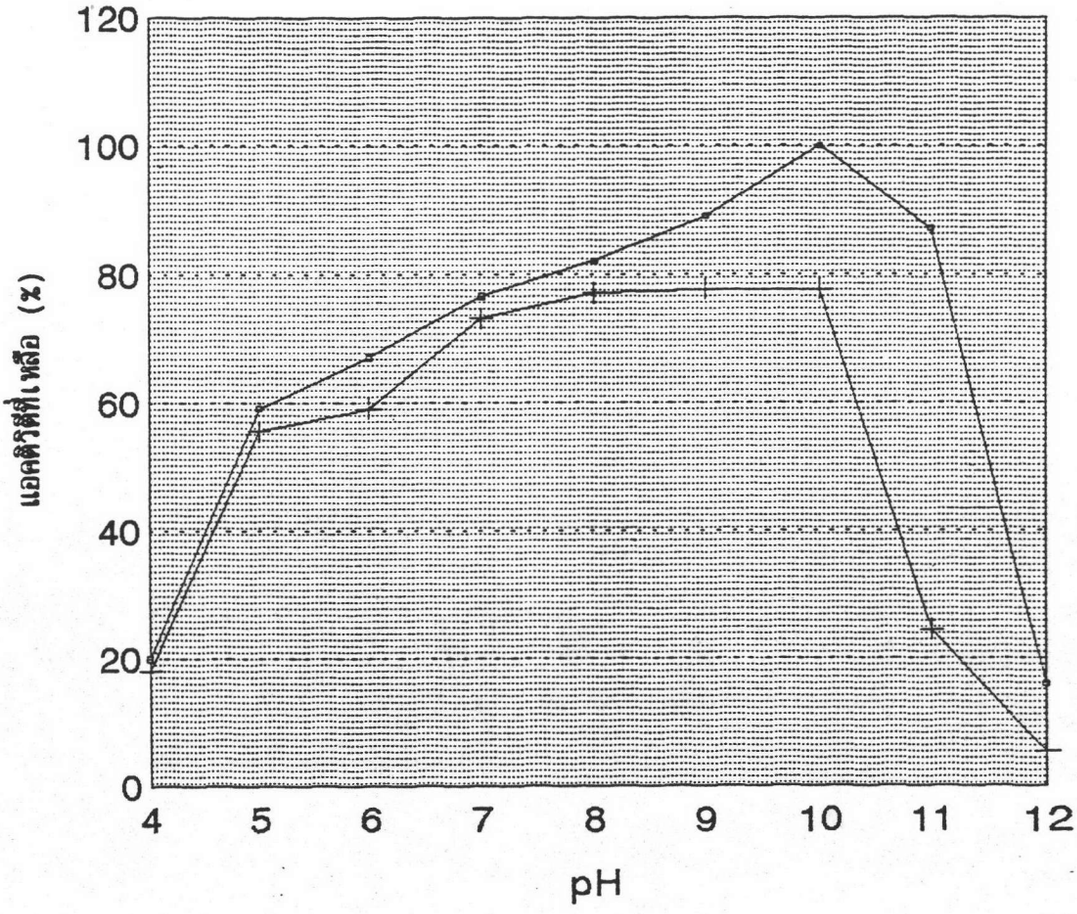
8.2.3.1 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้สับสเตรทจากธรรมชาติ

สับสเตรทจากธรรมชาติที่ใช้มี 2 ชนิด คือ casein (0-40 มก./มล.) และ Bovine serum albumin (BSA)(0-80 มก./มล.) นำข้อมูลมาพลอตโดยวิธี Lineweaver-Burk จากกราฟรูปที่ 18 และ 19 คำนวณค่า K_m และ V_{max} ของ casein ได้ 22.5 มก./มล., 22 หน่วย ส่วนของ BSA ได้ 5 มก./มล., 10 หน่วย จะเห็นว่า ค่า K_m และ V_{max} ของ casein ต่ำกว่าของ BSA แสดงว่าเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.* B-2 สามารถจับเคซีนได้ดีกว่า BSA แต่เร่งปฏิกิริยาเคซีนได้ช้ากว่า BSA

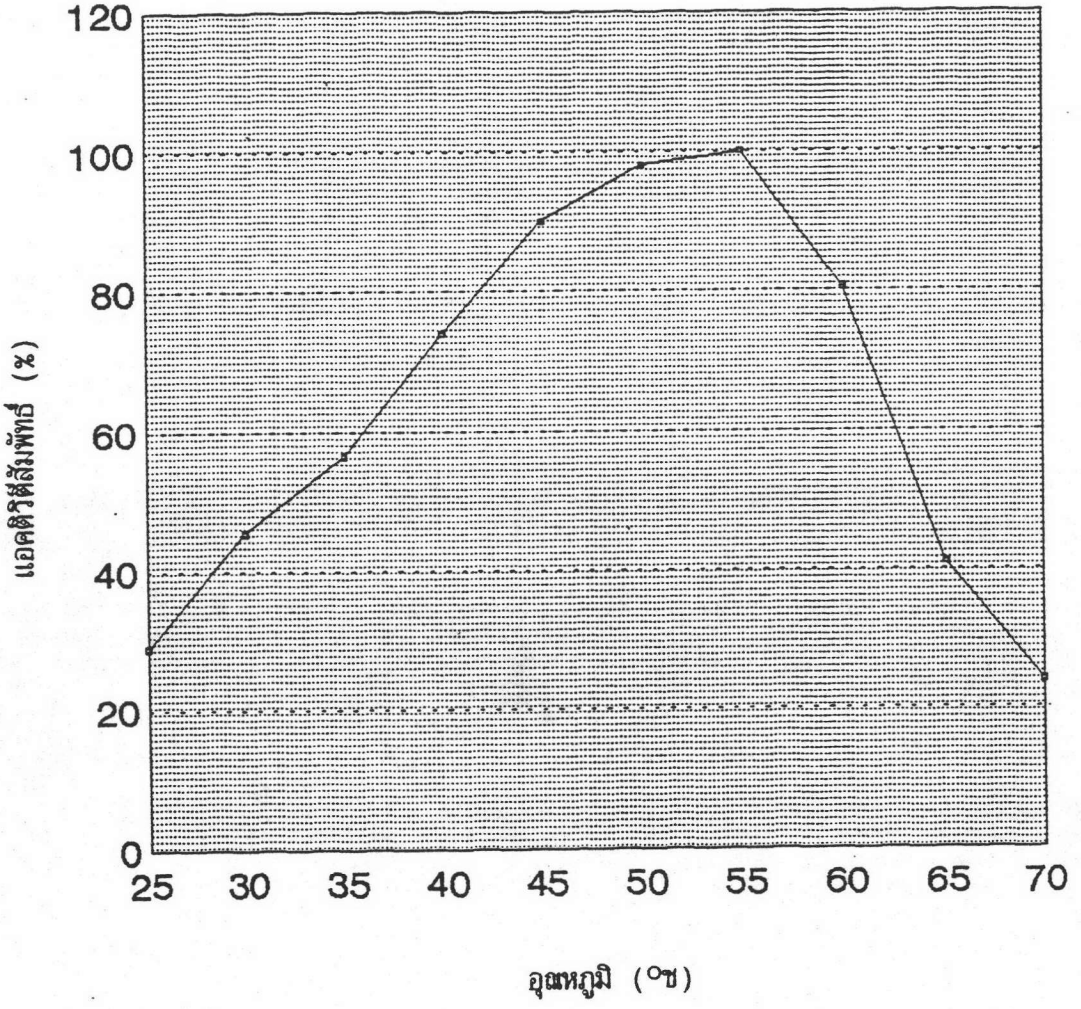


รูปที่ 14 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์ เมื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 °ซ 10 นาที

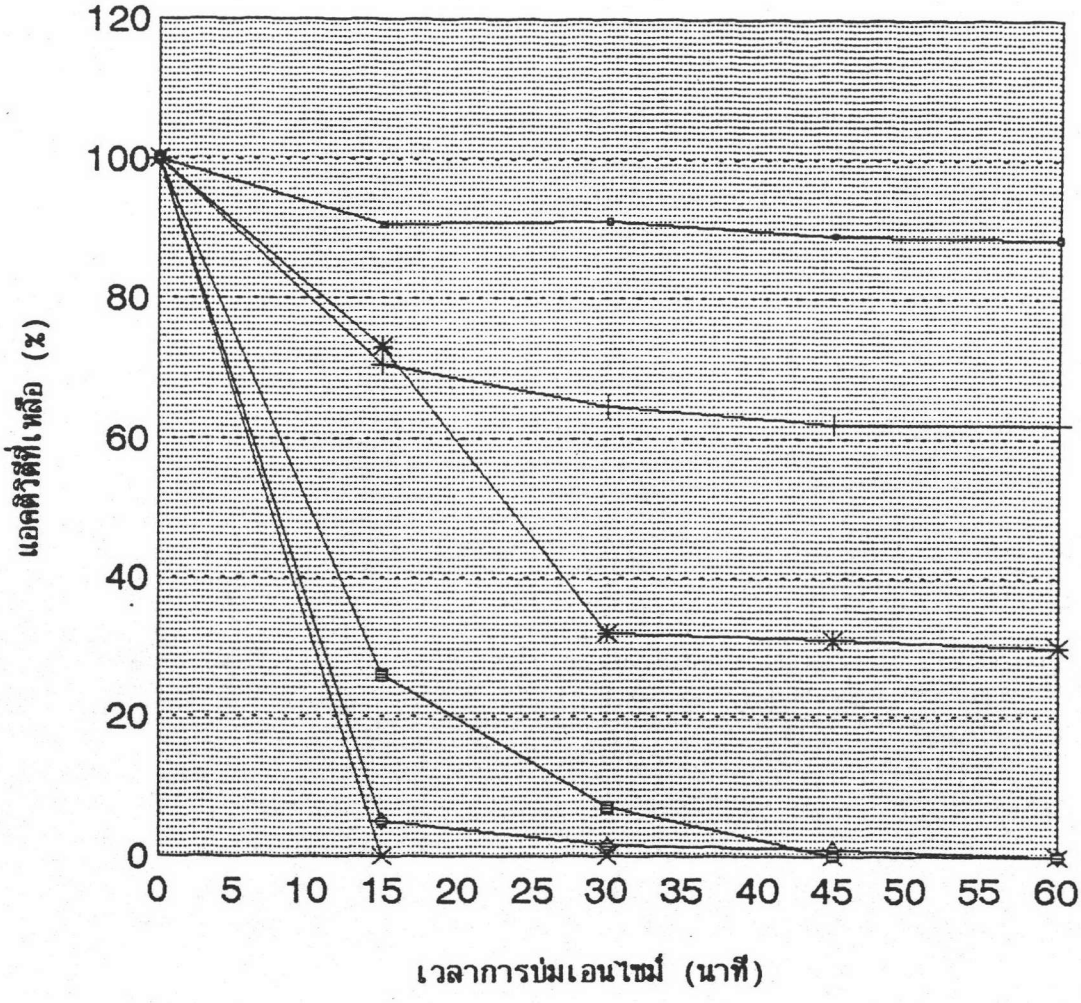
□——□ + 2 มิลลิโมลาร์ Ca^{2+} +——+ ไม่เติม Ca^{2+}



รูปที่ 15 ผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50°ซ 30 นาที วัดโปรตีเอสแอคติวิตีที่เหลือที่อุณหภูมิ 55°ซ 10 นาที



รูปที่ 16 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส เมื่อให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยาที่ pH 10.5 10 นาที



รูปที่ 17 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์โปรตีเอส เมื่อบ่มเอนไซม์ที่ pH 10.5 เป็นเวลา 0-60 นาที วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือที่อุณหภูมิ 55 °ซ 10 นาที

□——□ 50 °ซ + 2 มิลลิโมลาร์ Ca^{2+}

+——+ 55 °ซ + 2 มิลลิโมลาร์ Ca^{2+}

◆——◆ 60 °ซ + 2 มิลลิโมลาร์ Ca^{2+}

—— 50 °ซ ไม่มี Ca^{2+}

■——■ 55 °ซ ไม่มี Ca^{2+}

×——× 60 °ซ ไม่มี Ca^{2+}

8.2.3.2 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โดยใช้สับสเตรทสังเคราะห์

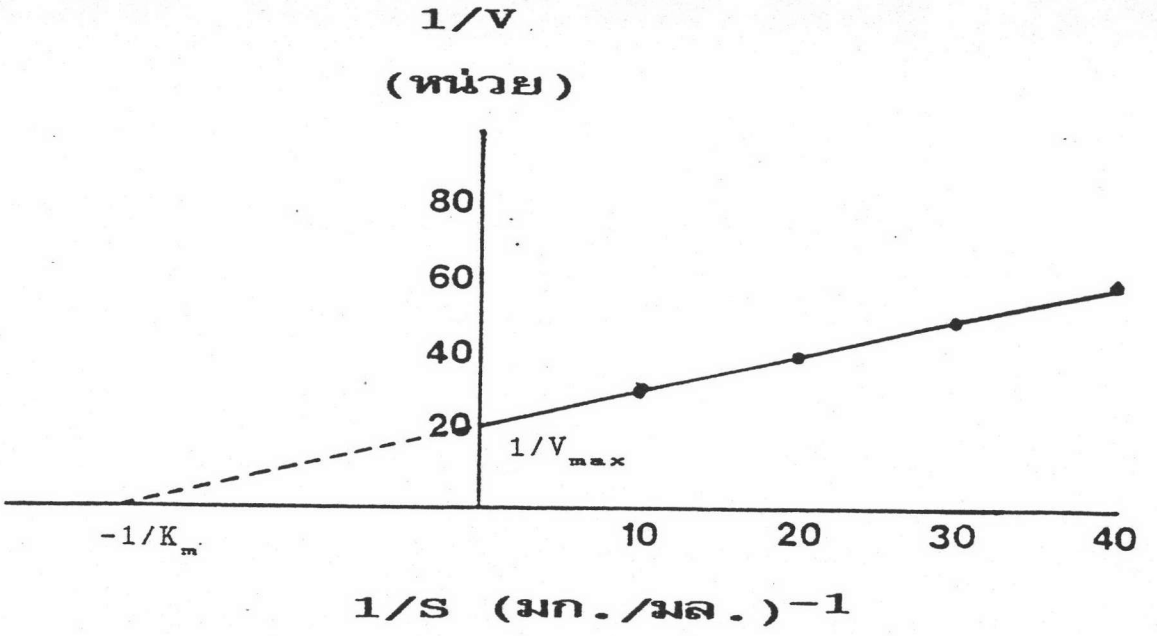
สับสเตรทที่ใช้คือ BAEE และ BAPNA ซึ่งภายในโครงสร้างจับกันด้วยพันธะเอสเทอร์ ความเข้มข้น 1-5 มิลลิโมลาร์ จากกราฟ Lineweaver-Burk รูปที่ 20 และ 21 ค่า K_m และ V_{max} ของ BAEE และ BAPNA คือ 1.5 มิลลิโมลาร์, 140 หน่วย และ 0.2 มิลลิโมลาร์, 100 หน่วย แสดงว่าเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.* B-2 สามารถยึดจับกับ BAEE ได้ดีกว่า BAPNA และสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลส์พันธะเอสเทอร์ของ BAEE ได้เร็วกว่าของ BAPNA

9. การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.*B-2 โดยวิธีเจลฟิลเตรชัน

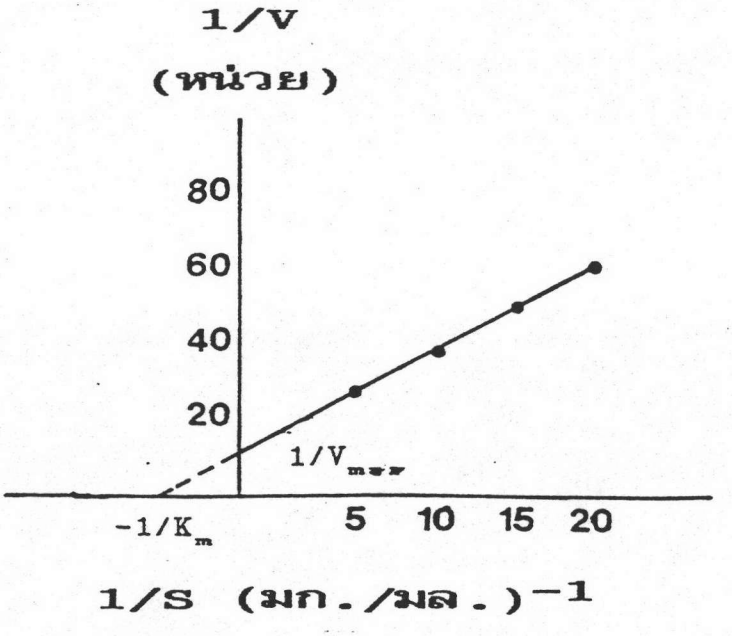
จากการหาประสิทธิภาพของคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-75 ของโปรตีนมาตรฐาน 4 ชนิด คือ BSA, Ovalbumin, Subtilisin Carlsberg และ Lysozyme ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 66,000 , 45,000 , 27,600 และ 14,300 ตามลำดับ ปริมาตรของสารละลายที่ออกจากคอลัมน์เรียงตามลำดับมีดังนี้ 97.5 , 105, 128.5 และ 151.5 มล. ส่วน void volume และ total bed volume ของคอลัมน์ วัดได้จากปริมาตรของสารละลายที่บลูเดกซ์แทรน และโปแตสเซียมไดโครเมท ผ่านออกมาจากคอลัมน์ คือ 73.5 และ 211.5 มล. ตามลำดับ (รูปที่ 22) เมื่อผ่านสารละลายเอนไซม์ลงคอลัมน์ วัดปริมาตรสารละลายที่ออกมาได้ 130 มล. คำนวณหาค่า K_{av} แล้วเทียบกับกราฟน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ 23) สามารถประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โปรตีเอสนี้ได้ 26,000 ดาลตัน

10. การหาหน่วยย่อย และน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.* B-2 โดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะคลิลาไมน์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส

รูปที่ 24 จากการทำเอสดีเอส-โพลีอะคลิลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีสของสารละลายเอนไซม์เข้มข้น ควบคู่ไปกับโปรตีนมาตรฐาน พบว่า โปรตีนมาตรฐาน Horse myoglobin, β-lactoglobulin A, Carbonic Anhydrase, Lactic dehydrogenase และ Amyloglucosidase เคลื่อนที่ในแผ่นเจล ให้ค่า relative mobility เท่ากับ 0.2, 0.29,0.42,0.71 และ 0.75 เมื่อนำไปเทียบกับกราฟน้ำหนักโมเลกุลได้เท่ากับ 24,000 ดาลตัน และจากการที่เห็นแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวในแผ่นเจลของเอนไซม์โปรตีเอส แสดงว่าโปรตีเอสชนิดนี้ เป็นโปรตีนสายเดี่ยวที่ไม่มีหน่วยย่อย (รูปที่ 25)



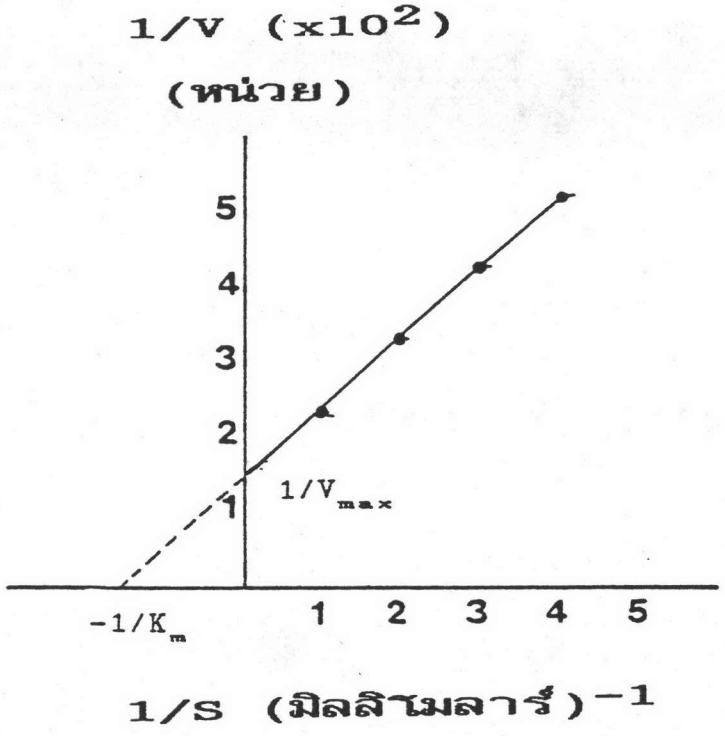
รูปที่ 18 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.* B-2 เมื่อใช้เคซีนเป็นสับสเตรท วัดโปรตีเอสแอคติวิตีที่ 55 °ซ 10 นาที

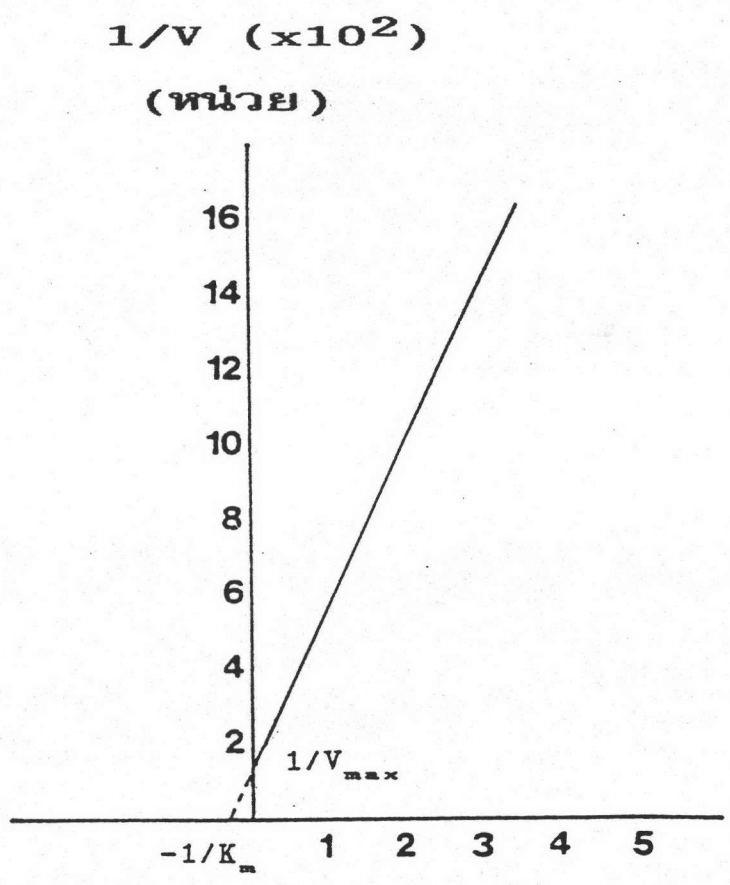


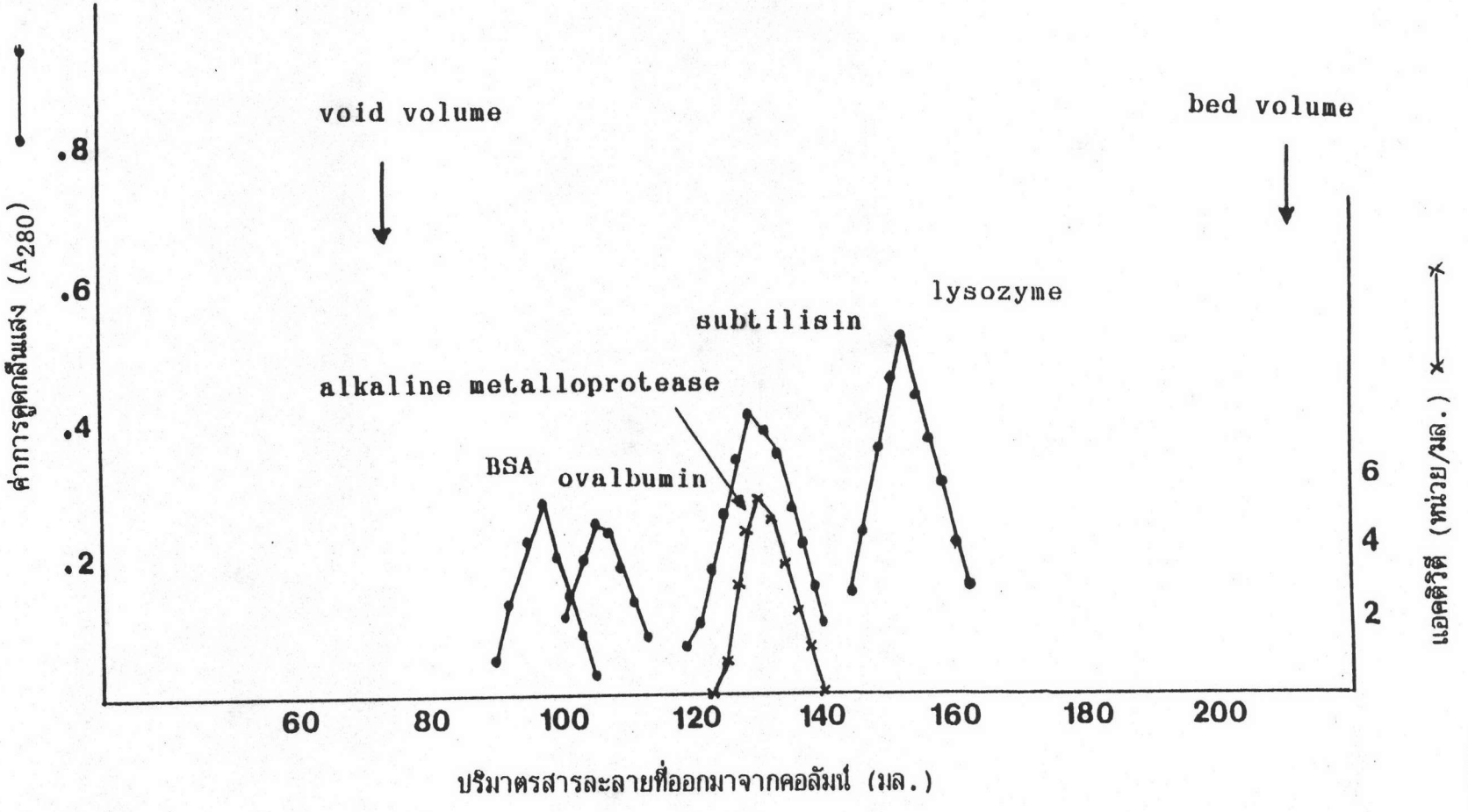
รูปที่ 19 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.* B-2 เมื่อใช้ Bovine Serum Albumin(BSA) เป็นสับสเตรท วัดโปรตีเอสแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 55 °ซ 10 นาที

รูปที่ 20 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.* B-2 เมื่อใช้สับสเตรทเอสเทอร์สังเคราะห์ BAEE วัดโปรตีเอสแอคติวิตีที่ อุณหภูมิ 55 °ซ 10 นาที

รูปที่ 21 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.* B-2 เมื่อใช้สับสเตรทเอสเทอร์สังเคราะห์ BAPNA วัดโปรตีเอสแอคติวิตีที่ อุณหภูมิ 55 °ซ 10 นาที

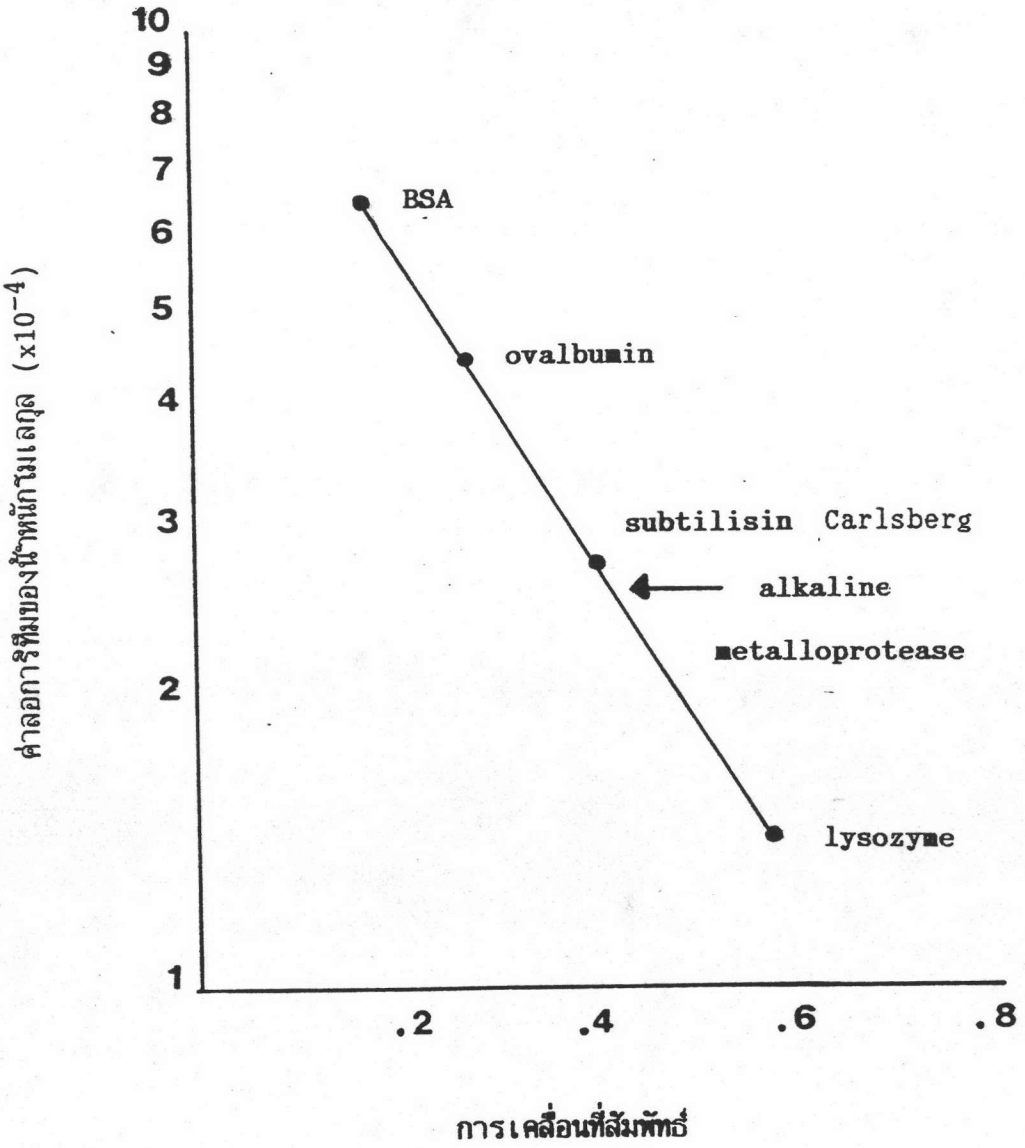

1/V (x10²)
(หน่วย)
5
4
3
2
1
1/V max
-1/K m
1 2 3 4 5
1/S (มิลลิโมลาร์)⁻¹


1/V (x10²)
(หน่วย)
16
14
12
10
8
6
4
2
1/V max
-1/K m
1 2 3 4 5
1/S (มิลลิโมลาร์)⁻¹

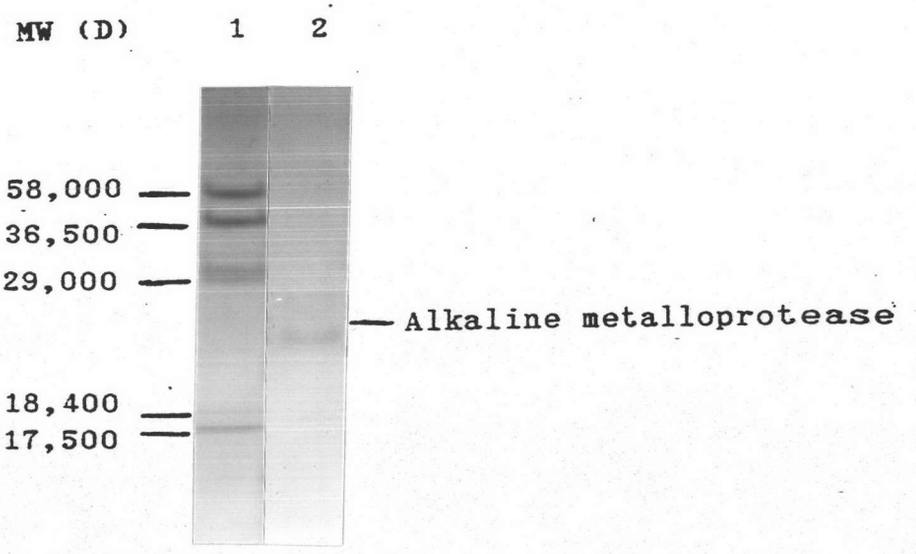


รูปที่ 22 รูปแบบของโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-75 เมื่อเก็บสารละลายหลอดละ 1.5 มล. เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.* B-2

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

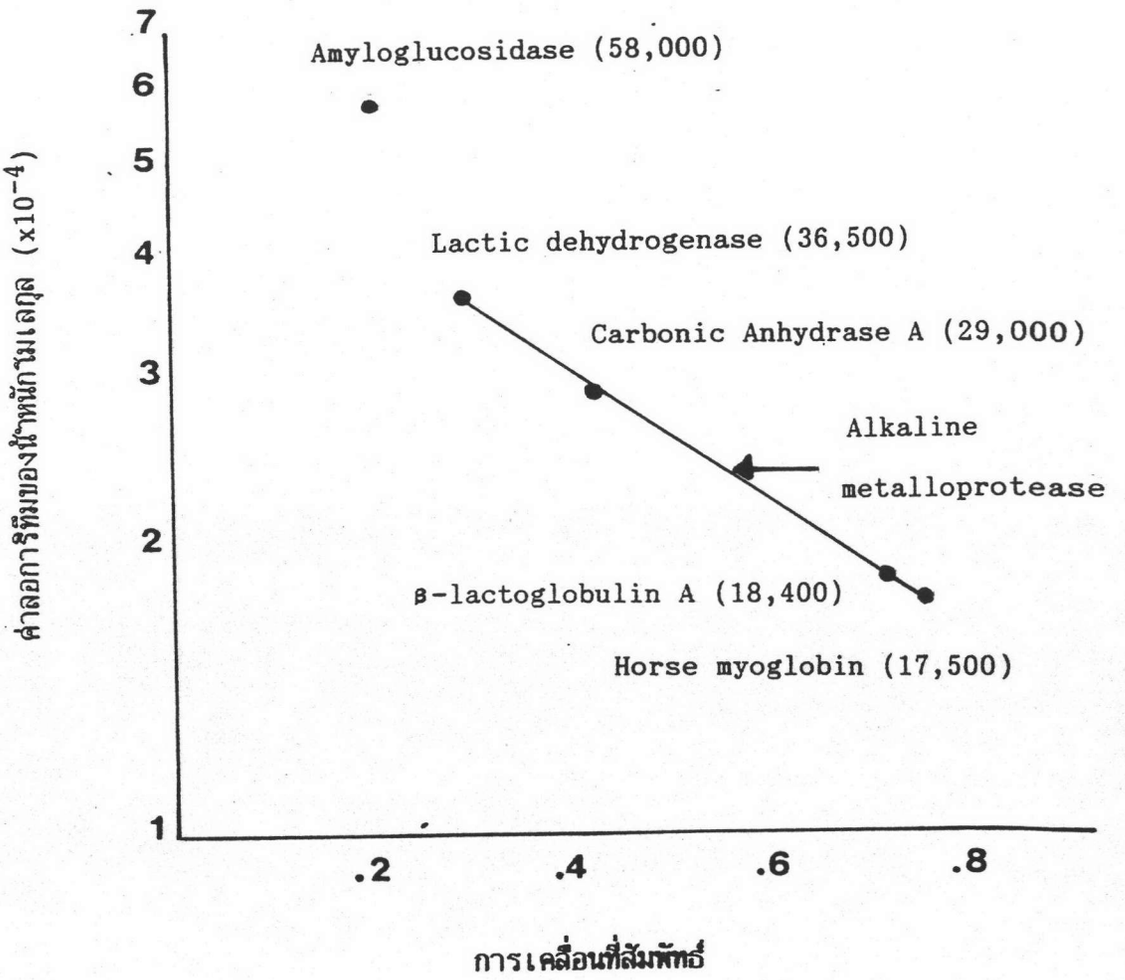


รูปที่ 23 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน กับ ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ที่ได้จากวิธีเจลฟิลเตรชัน



รูปที่ 24 รูปแบบของโปรตีนมาตรฐาน และ เอนไซม์โปรตีเอสที่ได้จากการทำเอสดีเอสโพลีอะคลิลาไมด์เจลอิเลคโตโฟรีซิส

1. โปรตีนมาตรฐานประกอบด้วย Horse myoglobin (17,500), β-lactoglobulin A (18,400), Carbonic Anhydrase B (29,000), Lactic Dehydrogenase (36,500), Amyloglucosidase (58,000)
2. เอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus sp.* B-2 (20 ไมโครกรัมโปรตีน)



รูปที่ 25 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน กับ ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ที่ได้จากวิธีเอสดีเอสโพลีอะคริลาไมด์เจล อิเลคโตรโฟรีซีส