หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

สกัดแยกเอนไซม์โปรตีเอสจาก B.subtilis TISTR 25 ซึ่งผลิตทั้งเอนไซม์นิวทรัลและอัลคาไลน์โปรตีเอสเช่นเดียวกับ B.subtilis สายพันธุ์อื่น(จิโรจน์กุลกิจ.2532) นำมาแยกเฉพาะนิวทรัลโปรตีเอสให้บริสุทธิ์เพื่อไปศึกษาสมบัติของเอนไซม์ โดยนำเอนไซม์ที่สกัดแยกจากสายพันธุ์ TISTR 25 (crude enzyme) มาทำให้บริสุทธิ์ขั้นแรก โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-40 % พบว่ามีเอนไซม์โปรตีเอสตกตะกอนออกมาน้อยมากเพียง 0.8% (ตารางที่ 2) และสามารถกำจัดโปรตีนอื่นที่ไม่มีแอคติวิตีของโปรตีเอสออกได้บางส่วน จึงนำมาตกตะกอนโปรตีนเพิ่มที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40-70 % พบว่ามีเอนไซม์โปรตีเอสตกตะกอนออกมา 58 % และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2 เท่า ขั้นตอนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตนี้ได้ดัดแปลงจากวิธีของ จิโรจน์กุลกิจ (2532) พบว่าด้วยวิธีใหม่นี้ ได้ yield เพิ่มขึ้นประมาณ 15% จึงนำเอนไซม์ไปแยกให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยวิธี คอลัมน์โครมาโตกราฟฟี

โดยการใช้คอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุบวก (ซีเอ็ม-เซลลูโลส) (รูปที่ 2) เพื่อแยกเอนไซม์ออกโดยอาศัยความแตกต่างของประจุในโปรตีนแต่ละชนิด ทำการทดลองเหมือนของจิโรจน์กุลกิจ (2532) พบว่าสามารถแยกโปรตีนที่ไม่มีแอคติวิตีของโปรตีเอสออกได้ 50% (ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่ยึดจับกับคอลัมน์) หลังจากการชะด้วยเกรเดียนท์ของโซเดียมคลอไรด์ พบว่านิวทรัลโปรตีเอสถูกชะออกมาก่อนด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.04 โมลาร์ ใน peak B ส่วนอัลคาไลน์โปรตีเอสถูกชะออกมาใน peak C ที่ความเข้มข้น 0.07 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ แสดงว่า ที่ pH 6.5 นิวทรัลโปรตีเอสมีประจุสุทธิเป็นบวกน้อยกว่าอัลคาไลน์โปรตีเอส และเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสที่แยกได้นี้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.7 เท่า เมื่อตรวจความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยโพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส พบแถบโปรตีน 2-3 แถบ (รูปที่ 4) นำไปตรวจสอบแอคติวิตีแล้ว พบว่าเฉพาะโปรตีนแถบบน (คือแถบที่มี

ระยะทางจากขอบบนแท่งเจลประมาณ 1 ซม.) เท่านั้นที่มีแอคติวิตีของโปรตีเอส (รูปที่ 5) เมื่อทดสอบชนิดของโปรตีเอส โดยใช้สารยับยั้งที่จำเพาะ พบว่าเอนไซม์ที่พบในแท่งเจลถูกยับยั้งโดยสารคีเลตติ้ง O-Phenanthroline และไม่ถูกยับยั้งโดย PMSF (รูปที่ 6) ซึ่งแสดงว่าด้วยคอลัมน์ ซีเอ็ม - เซลลูโลส สามารถแยกเอนไซม์นิวทรัลออกจากอัลคาไลน์โปรตีเอสได้ แต่ยังมีโปรตีนอื่นปนอยู่ จึงต้องนำไปทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยใช้คอลัมน์เจล ฟิลเตรชัน (เซฟาเด็กซ์ จี-75) ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 3 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าคอลัมน์นี้สามารถแยกเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสออกจากโปรตีนชนิดอื่น ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าและถูกชะออกจากคอลัมน์ก่อนเอนไซม์ได้ และเมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์โดย โพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส ได้แถบโปรตีนเพียงแถบเดียว (รูปที่ 4) แสดงว่าเอนไซม์ที่แยกได้มีความบริสุทธิ์สูง เหมาะที่จะนำไปศึกษาสมบัติเฉพาะทางด้านต่างๆของเอนไซม์ต่อไป

ในการศึกษาขนาดโมเลกุลของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอส จาก B.subtilis TISTR 25 โดยวิธี เจล ฟิลเตรชัน และวิธีเอสดีเอส อิเลคโตรโฟรีซีส ซึ่งจะสามารถหาขนาดและหน่วยย่อย (subunit)ของเอนไซม์ได้ด้วย จากผลการทดลองพบว่าวิธี เจล ฟิลเตรชัน เอนไซม์มีขนาด 27,000 ดาลตัน เมื่อเทียบจากขนาดของโปรตีนมาตรฐานและเอนไซม์ออกจากคอลัมน์ด้วยค่า K_{av} ใกล้เคียงกับโปรตีนมาตรฐาน Chymotrypsinogen (25,000 ดาลตัน) และ Thermolysin ที่มีขนาด 34,000 ดาลตัน (Titani และคณะ, 1972) แต่จากการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์จาก TISTR 25 ด้วยวิธี เอสดีเอส โพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส พบว่าเอนไซม์มี 1 หน่วยย่อยเท่านั้น มีขนาด 37,000 ดาลตัน และมีค่า R_f ใกล้เคียงกับค่าของ Thermolysin แต่ต่างจากค่า R_f ของ Chymotrypsinogen อย่างชัดเจน (รูปที่11) ผลการทดลองนี้มีข้อสันนิษฐานว่าการหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี เจลฟิลเตรชัน อาจมีบางส่วนในโมเลกุลของเอนไซม์ทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของเด็กซ์แทรน ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเซฟาเด็กซ์ จึงเป็นผลให้เอนไซม์ออกจากคอลัมน์ช้า (retarded) จึงได้ทดลองเพิ่มความแรงของประจุในบัฟเฟอร์(ionic stength) ที่ใช้ โดยการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (เป็นความเข้มข้นในช่วงที่ทำให้เอนไซม์ออกจากคอลัมน์ ซีเอ็ม-เซลลูโลส) โดยคาดว่าอาจลดปฏิกิริยาระหว่าง

เอนไซม์กับเด็กซ์แทรนได้ แต่จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ยังคงออกจากคอลัมน์ด้วยค่า K_{av} ใกล้เคียงกับ Chymotrypsinogen A เช่นเดิม จึงได้ลองเปลี่ยน pH ของบัฟเฟอร์จากpH 6.5 เป็น pH 8 ซึ่งเป็น pH ที่เอนไซม์น่าจะมีประจุสุทธิเป็นลบ จึงไม่ควรมีปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับเด็กซ์แทรน แต่จากผลการทดลองพบว่า ไม่สามารถทำให้เอนไซม์ออกจากคอลัมน์เร็วขึ้นได้ เมื่อสำรวจรายงานที่ผ่านมา พบว่า Keay & Wildi (1970) ได้รายงานผลทำนองเดียวกันในการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก B. subtilis NRRL B3411 โดยพบว่าด้วยวิธี เจลฟิลเตรชัน (เซฟาเด็กซ์ จี 100 และไบโอเจล พี - 60) เอนไซม์มีขนาด 26,700 ดาลตัน ซึ่งมีขนาดเล็กกว่า เมื่อหาโดยวิธี Osmometry & ultracentrifugation ซึ่งได้ขนาดของเอนไซม์ประมาณ 38,000 ดาลตัน โดยได้สันนิษฐานว่า เอนไซม์อาจเกิดการย่อยตัวเองในระหว่างการทำ เจลฟิลเตรชันได้ เนื่องจากเอนไซม์อยู่ในสภาพธรรมชาติ (native) ซึ่งมีความสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดี และอยู่ในความเข้มข้นสูงอีกด้วย ข้อสันนิษฐานนี้มีการทดลองยืนยัน โดยพบว่าขนาดโมเลกุลเอนไซม์ที่หาโดยวิธี ultracentrifugation จะลดลงเมื่อใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้นสูง และปั่นที่ความเร็วที่ทำให้เอนไซม์อยู่ในสภาพ equilibrium นาน เนื่องจากในการทดลองนี้ไม่ได้ทดลองใส่สารยับยั้งปฏิกิริยา ซึ่งจะช่วยลดการเกิดการย่อยตัวเอง (autolysis) ของเอนไซม์ได้ ดังเช่นในการทดลองหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี เอสดีเอส โพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส (รูปที่ 10) ดังนั้นในการศึกษานี้ จึงคาดว่าค่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก TISTR 25 ที่ได้จากวิธีอิเลคโตรโฟรีซิส เป็นค่าที่ใกล้เคียงกับเอนไซม์ในสภาพ native มากที่สุดและเป็นค่าที่น่าเชื่อถือกว่าค่าที่ได้จากการหาโดยวิธี เจล ฟิลเตรชัน

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเคซีนของนิวทรัลโปรตีเอสจาก TISTR 25 เปรียบเทียบกับ Thermolysin และนิวทรัลโปรตีเอสจาก B. polymyxa ซึ่งแสดงผลในรูปที่ 12 และ 13 พบว่าเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสทั้งสามชนิดสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 7 แต่ลักษณะ pattern ของ Thermolysin และเอนไซม์จาก B.polymyxa ค่อนข้างกว้างกว่า(broad pH) เอนไซม์จาก TISTR 25 ซึ่งคล้ายกับ

ที่มีผู้ศึกษาไว้ในนิวทรัลโปรตีเอสทั้งสองชนิดนี้ (Griffin & Fogarty, 1973; Keay, 1969) นิวทรัลโปรตีเอสอื่นที่มีผู้ศึกษาไว้แล้ว ส่วนใหญ่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของสับสเตรทเคซีนได้ดีที่ pH เป็นกลางเช่นกัน เช่น นิวทรัลโปรตีเอสจาก B. subtilis (McConn และคณะ, 1964) และ B.subtilis var amylosaccharlticus (Tsuru & Fukumoto, 1966) สำหรับผลการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาของนิวทรัลโปรตีเอสจาก TISTR 25 พบว่าใกล้เคียงกับของ Thermolysin คือ ที่อุณหภูมิ 50 และ 55 °ซ ตามลำดับ และพบว่านิวทรัลโปรตีเอสจาก TISTR 25 มีคุณสมบัติทนต่อความร้อนได้ใกล้เคียงกับ Theromolysin ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์จาก B. polymyxa ที่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาได้ดีที่ อุณหภูมิ 30°ซ ค่าที่หาได้จากการทดลองนี้ใกล้เคียงกับค่า 37°ซ ที่ Griffin & Fogarty (1973) ได้รายงานสำหรับเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก B. polymyxa นอกจากนี้ พบว่านิวทรัลโปรตีเอสจาก TIRTS 25 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา เหมือนกับนิวทรัลโปรตีเอสจาก B. subtilis สายพันธุ์อื่นๆ ที่มีผู้รายงาน คือ 50°ซ สำหรับ B.subtilis (McConn และคณะ, 1964) และ 52°ซ สำหรับ B.subtilis var amylosaccharlticus (Tsuru & Fukumoto, 1966) ตามลำดับ และในเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้พบว่าถ้ามีการเติมแคลเซียมอะซิเตต ที่ความเข้มข้น 5.5×10^{-4} โมลาร์ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาจะเปลี่ยนเป็น 58°ซ และมีอัตราเร็วในการเร่งปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นประมาณ 20-40% ซึ่งคาดว่าเป็นผลเนื่องจากความเสถียรที่เพิ่มขึ้นของเอนไซม์เมื่อมี Ca^{++} อยู่ในสารละลาย

จากการเก็บเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสที่ทำให้บริสุทธิ์จาก TISTR 25 ในอิมิดาโซล บัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่มี 2 มิลลิโมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 และ -20°ซ พบว่าสามารถเก็บเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ ได้นานกว่าที่ -20°ซ ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์ไม่ทนต่อการ freeze and thaw Feder & Schuck (1970) รายงานว่าเอนไซม์นิวทรัล-โปรตีเอสที่อยู่ในรูปบริสุทธิ์จะสูญเสียแอคติวิตีหมด เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ -70°ซ เมื่อเปรียบเทียบกับอัลคาไลน์โปรตีเอส จากรายงานของจิโรจน์กุลกิจ (2532) พบว่าอัลคาไลน์โปรตีเอสมีความเสถียรมากกว่านิวทรัลโปรตีเอสมาก โดยสามารถเก็บเอนไซม์ในอิมิดาโซลบัฟเฟอร์

pH 6.5 ที่อุณหภูมิ -20°ซ เป็นเวลา 1 เดือนโดยไม่สูญเสียแอคติวิตีเลย และสูญเสียแอคติวิตีเพียง 10 % เมื่อเก็บที่ 4°ซ เป็นเวลา 1 เดือน

ศึกษาผลของสารเคมีต่างชนิดต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยใช้สารเคมีแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ อินคิวเบตกับเอนไซม์ 15 นาที ที่ 45°ซ แล้ววัดแอคติวิตีของเอนไซม์ ผลการทดลองพบว่าสาร Iodoacetamide,p-chloromercuribenzoate และ N-Ethylmaleimide ซึ่งเป็นสารเคมีชนิดที่ทำปฏิกิริยากับ หมู่ซิลไฮดริล (-SH) ของกรดอะมิโนไม่มีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ แสดงว่าเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก TISTR 25 นี้ไม่มีกรดอะมิโนซิสเตอีนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ และเอนไซม์ไม่ถูกยับยั้งด้วยสาร DNSF แสดงว่าไม่มีกรดอะมิโนฮีสทีนเป็นส่วนสำคัญที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ด้วยเช่นกัน แต่เอนไซม์ถูกยับยั้งโดยสารคีเลตติ้ง EDTA และ Phenanthroline ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์มีโลหะเป็นส่วนประกอบสำคัญที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ ซึ่งพบในนิวทรัลโปรตีเอสชนิดอื่นเช่นกัน เช่น จากการศึกษาของ Yasunobu และคณะ (1960) พบว่าเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก B.subtilis ถูกยับยั้งปฏิกิริยาไป 50% เมื่อเติมสาร EDTA , Phenanthroline , Dithizone , Cyanide หรือ Sodium diethyldithiocarbamate ที่ความเข้มข้น 2.2×10^{-6} , 5.0×10^{-5} , 4.5×10^{-4} , 1.8×10^{-3} และ 2.5×10^{-3} โมลาร์ตามลำดับ

ในการศึกษาผลของไอออนโลหะชนิดต่างๆต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยการอินคิวเบต 1 มิลลิโมลาร์ของไอออนโลหะกับเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 45°ซ 15 นาที แล้ววัดแอคติวิตีที่เหลือ (ตารางที่ 4) จากผลที่ได้คาดว่าการที่ไอออนโลหะ Ca^{++} และ Mg^{++} ทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย (5-14%) อาจเนื่องจาก Mg^{++} เป็นไอออนโลหะธาตุหมู่เดียวกับ Ca^{++} ที่ได้มีการศึกษาไว้แล้วว่า มีการจับกับเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสแล้วช่วยยึดโครงรูปของเอนไซม์ (conformation) ให้เหมาะสมกับการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ดังนั้นอาจมีการแลกเปลี่ยนประจุระหว่าง Mg^{++} กับ Ca^{++} ทำให้ยึดจับกับเอนไซม์ได้ดีขึ้น และการที่แอคติวิตีเพิ่มเพียงเล็กน้อย อาจเป็นเพราะ Ca^{++} อยู่ในส่วนโมเลกุลด้านนอกที่ expose กับสารละลายอยู่แล้ว Ca^{++} ปริมาณมากที่เติมลงไป จึงไม่อาจชักนำให้

เกิดการแลกเปลี่ยนประจุมากนัก สำหรับ Fe^{++}, Mn^{++}และ Co^{++} ซึ่งเป็นไอออนโลหะธาตุทรานสิชันและสามารถเกิดพันธะโคออดิเนตโควาเลนท์กับกรดอะมิโนในโปรตีนได้เช่นเดียวกับ Zn^{++} จึงอาจมีการแลกเปลี่ยนประจุกับ Zn^{++} ที่มีอยู่แล้วในโมเลกุลของเอนไซม์ได้บ้างแต่ไม่สามารถยึดจับกับโมเลกุลของเอนไซม์ หรือไม่สามารถทำให้โครงรูปของเอนไซม์เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาได้ดีเท่า Zn^{++}จึงทำให้แอคติวิตีลดลงประมาณ 10-15 % และในกรณีเพิ่มเติม Zn^{++} แล้วมีผลให้แอคติวิตีลดลงถึง 50 % น่าจะเกิดจากการที่ในโมเลกุลของเอนไซม์มี Zn^{++}อยู่แล้วเมื่อเติมเข้าไปอีกทำให้มีมากเกินพอ (excess) อาจทำให้เกิดการจับ Zn^{++}ในโมเลกุลได้ตำแหน่งอยู่ในรูปที่ไม่เหมาะสมนั้น เนื่องจาก Zn^{++}อยู่ในส่วน hydrophobic pocket ของโมเลกุล ซึ่งเป็นส่วน deep cleft (Ward, 1983) ซึ่งน่าจะถูกสกัดกั้นได้ยากเมื่อเติม Zn^{++}เข้าไปมากเกินไปก็ไม่น่าจะ [illegible] Zn^{++} กับเอนไซม์เพิ่มขึ้น จนทำให้เอนไซม์เปลี่ยนโครงรูปที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา จึงทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลง

เมื่อศึกษาความสำคัญของ Zn^{++}ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยเริ่มจากการหาปริมาณ Zn^{++} พบว่าเมื่อทริปซินจากตับอ่อนวัว TIRTS 25 มีปริมาณ Zn^{++} 0.85 ppm ซึ่งใกล้เคียงกับที่เคยหาได้ของ Thermolysin คือ 1.20 ppm เมื่อคำนวณปริมาณ Zn^{++} เป็น กรัมอะตอม/โมเลกุลเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์ของ TIRTS 25 และ Thermolysin มีค่า 1.5 และ 2 ตามลำดับ (ค่าของ Thermolysin ที่รายงานไว้โดย Matsubara & Feder (1970) คือ 1 กรัมอะตอม/โมเลกุล) เมื่อใช้ 0.2 มิลลิโมลาร์ EDTA จับ Zn^{++} ออกจากโมเลกุลเอนไซม์โดยวิธีไดอะไลซิส ในบัฟเฟอร์ที่มี 0.2 มิลลิโมลาร์ของ $CaCl_2$ (ตารางที่ 6) พบว่า ปริมาณ Zn^{++} ลดลงประมาณครึ่งหนึ่ง และแอคติวิตีก็ลดลงไปเกือบหมด การไดอะไลส์เอนไซม์ด้วยบัฟเฟอร์ที่มี $CaCl_2$ โดยที่ [illegible] ปริมาณ Zn^{++} เพิ่มขึ้น และแอคติวิตีก็เพิ่มขึ้น [illegible] ด้วย EDTA ที่จับ Zn^{++} [illegible] ถ้าเติม Zn^{++} ที่ความเข้มข้น 0.5-2 มิลลิโมลาร์ลงไป ไดอะไลซ์โดยไดอะไลส์ชนิดเดิม พบว่าการเติม Zn^{++} ทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีกลับคืนมาเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เติม แต่ไม่ได้กลับคืนถึงร้อยเปอร์เซนต์ อย่างไรก็ดี สรุปว่า Zn^{++} มีความสำคัญต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ นอกจากนี้

ในการทดลองพบว่าถ้าไม่เติม $CaCl_2$ ลงไปในบัฟเฟอร์ที่ใช้ เมื่อเติม Zn^{++} กลับเข้าไปใหม่ เอนไซม์ไม่สามารถมีแอคติวิตีกลับคืนได้ ไม่ได้แสดงผลการทดลอง ดังนั้น Ca^{++} น่าจะมีส่วนช่วยในการรักษาโครงรูปของเอนไซม์จากรายงานของ McConn และคณะ (1964) ยืนยันความสำคัญของ Zn^{++} และ Ca^{++} พบว่าการดึง Zn^{++} ออกจากโมเลกุลโปรตีเอสจาก B.subtilis var.amylosaccharilicus ด้วย $1x10^{-4}$M EDTA ทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีไปเกือบหมด การ reactivate เอนไซม์โดยการเติม 10^{-4}M Zn^{++} 30นาที หลังการเติม EDTA ทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีกลับคืนเพียง 35% แต่ถ้าเติม $8x10^{-3}$M Ca^{++} ในช่วงต้น คือ 2 นาที แล้ว reactivate ด้วย Zn^{++}ที่ 30 นาทีหลังการ treat ด้วย EDTA จะสามารถช่วยให้เอนไซม์มีแอคติวิตีกลับคืนได้เกือบ 100 เปอร์เซนต์

เมื่อศึกษาการแทนที่ Zn^{++}ด้วยไดวาเลนท์ไอออนชนิดอื่น โดยการดึง Zn^{++}ออกจากเอนไซม์ด้วยการอินคิวเบตกับ 1 mM EDTA แล้วเติมไดวาเลนท์ไอออนชนิดต่างๆ ตารางที่ 7) พบว่าเมื่อเติม 1 mM Co^{++} ,Mn^{++} และ Zn^{++} ทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีกลับคืนมาได้ในช่วงประมาณ 20-30 เปอร์เซนต์ ในขณะที่ Ca^{++},Fe^{++}และMg^{++}ช่วยให้แอคติวิตีกลับคืนมาได้น้อยกว่า คือ อยู่ในช่วง 8-16 เปอร์เซนต์ การที่ Zn^{++},Mn^{++} และ Co^{++} สามารถ reactivated เอนไซม์ได้มากกว่าไอออนชนิดอื่น อาจเป็นเพราะเป็นไอออนของธาตุทรานสิชัน ที่สามารถเกิดพันธะโคออดิเนตโควาเลนท์กับโมเลกุลของเอนไซม์ได้เช่นเดียวกับ Zn^{++} และอาจจับกับโมเลกุลของเอนไซม์ได้ดีกว่า Fe^{++} ที่เป็นโลหะทรานสิชันเช่นกัน ดังนั้นเมื่อมีการดึง Zn^{++} ออกจากโมเลกุลเอนไซม์แล้วเติมไอออน 3 ชนิดนี้ลงไปแทน จึงทำให้มีแอคติวิตีกลับคืนได้มากกว่าเมื่อเติม ไอออนโลหะตัวอื่น โดยเฉพาะ Ca^{++}กับ Mg^{++} ซึ่งเป็นไอออนโลหะกลุ่มเดียวกันและไม่ใช่ประเภททรานสิชัน และการที่แอคติวิตีไม่สามารถกลับคืนถึง 100% น่าเกิดจากการที่ใช้ EDTA 1mM ซึ่งมีถึง 6 โมลอิควิวาเลนท์ ที่จะสามารถดึงไอออนโลหะออกจากโมเลกุลของเอนไซม์ แต่มีการเติมไอออนโลหะลงไป 1 mM ที่มีเพียง 2 โมลอิควิวาเลนท์ลงไปแทนที่โลหะที่ถูกดึง ผลการทดลองที่ได้จากการศึกษานี้คล้ายกับการทดลองของ Tsuru และคณะ (1966) ซึ่งทดลองในบาซิลโปรตีเอสจาก Bacillus. subtilis var. amylosaccharilicus โดยพบว่าเมื่อเอนไซม์ถูกยับยั้ง

ด้วย EDTA อาจถูก reactivated ได้บ้าง โดย Zn^{++}, Co^{++}, Fe^{++}, Mn^{++} และ Ni^{++} แต่จะไม่สามารถถูก reactivated ได้โดย Ca^{++}, Mg^{++} หรือ Cu^{++} ในช่วงความเข้มข้นของไอออน 10^{-4} โมลาร์

ในการศึกษาจลนศาสตร์ของการย่อยสลายสับสเตรท โดยเริ่มจากสับสเตรทเอสเทอร์ BTEE พบว่าเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก TISTR 25 ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ได้เช่นเดียวกับเอนไซม์ Thermolysin และจากรายงานของนิวทรัลโปรตีเอสชนิดอื่นๆที่มีผู้ศึกษาไว้ ยังไม่พบว่ามีนิวทรัลโปรตีเอสชนิดใดที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ได้ (Matsubara, 1970) ซึ่งสมบัตินี้เป็นข้อแตกต่างชัดเจนของเอนไซม์โปรตีเอสส่วนใหญ่ ที่มีรายงานว่ามีเอสเทอเรสแอคติวิตี คือสามารถไฮโดรไลส์พันธะเอสเทอร์ได้ด้วย (จิโรจน์กุลกิจ 2532, Ward 1983)

เมื่อศึกษาการย่อยสับสเตรทที่เป็นโปรตีนโดยธรรมชาติ พบว่าเอนไซม์นิวทรัล-โปรตีเอสจาก B. subtilis TISTR 25 มีความจำเพาะต่อสับสเตรทธรรมชาติ เคซีน, ฮีโมโกลบิน และ เอโซคอล ต่างจากเอนไซม์ Thermolysin ผลการทดลองได้ค่าคงที่ทางจลน์ศาสตร์ (K_m) ต่อสับสเตรททั้งสามชนิดมากกว่าของ Thermolysin (ตารางที่ 3) แสดงว่าเอนไซม์ Thermolysin มีความสามารถในการจับระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท (affinity) ได้ดีกว่าเอนไซม์จาก TISTR 25 ส่วนการวัดความเร็วสูงสุดในการเร่งปฏิกิริยาพันธะเปปไทด์ในสับสเตรท ได้ผลว่าเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก TISTR 25 มีความเร็วสูงสุด (V_{max}) ในการเร่งปฏิกิริยาได้ดีกว่า Thermolysin ในสับสเตรททั้ง 3 ชนิด ผลสรุปจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก B. subtilis TISTR 25 สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนได้กว้างขวางหลายชนิด ได้แก่ ฮีโมโกลบิน ซึ่งเป็น functional protein ที่มีโครงสร้างระดับตติยภูมิ มีรูปทรงเป็นโปรตีนขนาดใหญ่ มีโครงสร้างระดับจตุรภูมิ (quaternary structure) ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยรูปทรงตัวสี่หน้า (tetrahedral) ส่วนเคซีนเป็น storage protein ที่มีโครงสร้างระดับต่ำกว่า มีโครงสร้างระดับทุติยภูมิ (secondary structure) เป็นโปรตีนชนิด

ก้อนกลม (globular protein) ส่วนเอโซคอลนั้น คือ คอลลาเจน (ซึ่งเป็น structural protein ที่สำคัญ) ที่มีการเติมหมู่เอโซเพื่อช่วยในการติดตามปฏิกิริยาได้ง่ายขึ้น เป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างแบบตติยภูมิ และมีลักษณะเป็นโปรตีนเส้นใย (fibrous protein)

ในการศึกษานี้ ได้ทดลองใช้เปปไทด์สังเคราะห์เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ด้วย ทั้งนี้เพื่อหาความจำเพาะของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสในการย่อยพันธะเปปไทด์ เมื่อใช้สับสเตรทสังเคราะห์ที่มีปลายด้านคาร์บอนิลเป็น p-Nitroanilide แล้วติดตามการเกิดปฏิกิริยาโดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร พบว่าด้วยวิธีนี้สามารถติดตามการดูดกลืนแสงได้เฉพาะคู่เอนไซม์จาก TISTR 25 กับสับสเตรท Succ-Ala-Ala-Pro-Leu pNA และ Succ-Ala-Ala-Pro-Phe pNA แสดงว่าเอนไซม์จาก TISTR 25 มีความจำเพาะต่อสับสเตรท 2 ชนิดนี้มากกว่าสับสเตรทชนิดอื่น จึงเกิดปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว และเมื่อเพิ่มช่วงเวลาในการอินคิวเบต แล้ววิเคราะห์ไฮโดรไลเสทที่ได้ด้วยวิธี TLC พบว่าเอนไซม์จาก TISTR 25 สามารถไฮโดรไลส์สับสเตรท Succ-Ala-Ala-Pro-Leu pNA ที่ตำแหน่งระหว่าง Pro-Leu หรือ Leu-pNA แต่เอนไซม์ Thermolysin สามารถไฮโดรไลส์เฉพาะที่ตำแหน่ง Pro-Leu เท่านั้น และในทำนองเดียวกันสำหรับสับสเตรท Succ-Ala-Ala-Pro-Phe pNA ซึ่งเอนไซม์จาก TISTR 25 สามารถตัดเฉพาะตำแหน่งระหว่าง Phe กับ pNA สำหรับสับสเตรทชนิดอื่นที่เอนไซม์สามารถตัดที่ตำแหน่งที่ต่อกับ pNA แต่ไม่สามารถติดตามจลน์ศาสตร์เอนไซม์ภายในเวลา 5 นาที แสดงว่าเอนไซม์อาจมีความจำเพาะต่อสับสเตรทชนิดนั้นน้อยกว่าสับสเตรท Succ-Ala-Ala-Pro-Leu pNA และ Succ-Ala-Ala-Pro-Phe pNA จึงเกิดปฏิกิริยาได้ช้ากว่า นอกจากนี้ยังสรุปได้ว่าเอนไซม์ตัดสับสเตรทที่เป็น tripeptide หรือ tetrapeptide เท่านั้น แต่ไม่สามารถไฮโดรไลส์สับสเตรทที่มีขนาดเล็ก เช่น มีกรดอะมิโนเพียงตัวเดียวได้ ซึ่งน่าจะเกิดจากสับสเตรทมีขนาดเล็กไม่สามารถจับกับที่บริเวณยึดจับกับสับสเตรท(binding site) ของเอนไซม์ และนอกจากนี้ในสับสเตรทชนิดปลายอะมิโนอิสระ ได้ผลการทดลองทำนองเดียวกัน คือ พบว่าเอนไซม์จาก TISTR 25 และ Thermolysin สามารถเกิดปฏิกิริยา

ที่สับสเตรทได้ใกล้เคียงกัน คือ ต้องปลายด้านละมีโนของสับสเตรทที่มีกรดอะมิโนขนาดใหญ่ (bulky amino acid) เช่น ฟีนิลอะลานีน ลิวซีน หรือ อาร์จินีน จึงสรุปได้ว่า ไม่ว่าปลายอะมิโนของเปปไทด์จะเป็นอิสระหรือไม่ ไม่มีผลต่อสมบัติการเป็นสับสเตรท แต่ขนาดของเปปไทด์และชนิดของกรดอะมิโนในเปปไทด์มีความสำคัญมาก ผลการทดลองที่ได้นี้เหมือนกับที่มีผู้รายงานไว้ว่า นิวทรัลโปรตีเอสจาก B. subtilis คล้ายกับ Thermolysin คือ มีความจำเพาะต่อพันธะเปปไทด์ที่ตำแหน่งปลายด้านละมีโนของพวกไฮโดรโฟบิค เช่น ลิวซีน และ ฟีนิลอะลานีน (Matsubara และคณะ, 1965 ; Matsubara, 1966 ; Feder, 1967 ; Morihara, 1967) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Feder (1967) ใน นิวทรัลโปรตีเอสจาก B.subtilis ยังพบว่าอัตราการไฮโดรไลส์จะเพิ่มขึ้นถ้ามี Ala, Ser, Thr หรือ His ที่ตำแหน่งปลาย C จับกับปลาย N ของ Leu และจากรายงานของ Morihara และคณะ (1968) ที่ได้ศึกษาความจำเพาะของนิวทรัลโปรตีเอสจากจุลชีพหลายชนิด เมื่อใช้สับสเตรทเปปไทด์สังเคราะห์ Z-Gly-X-NH_2 พบว่าเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจะเร่งปฏิกิริยาได้ดี ถ้า X คือ ลิวซีน และเกิดปฏิกิริยาได้บ้างถ้า X คือ ฟีนิลอะลานีน เมทไธโอนีน และจะเกิดปฏิกิริยาได้เพียงเล็กน้อยถ้า X คือ ไกลซีน เซรีน วาลีน ไอโซลิวซีน ไทโรซีน หรือ ทริปโตเฟน นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าใช้สับสเตรทเป็น Z-X-Leu-NH_2 ปฏิกิริยาจะเกิดดีที่สุดถ้า X คือ ไทโรซีน สำหรับเอนไซม์จาก B. subtilis และ B. Thermoproteolyticus และ X คือ ลิวซีน สำหรับเอนไซม์จาก P. aeruginosa ถ้า X คือ ฟีนิลอะลานีน เมทไธโอนีน ไทโรซีน จะไม่เกิดปฏิกิริยาได้เลย ซึ่งแสดงว่า [illegible] และจากทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่า ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ซึ่งมีการศึกษาไว้ว่ามีลักษณะเป็นร่องลึก น่าจะมีกลุ่มอะมิโนชนิดไฮโดรโฟบิค จึงทำให้สามารถจับกับสับสเตรทชนิดไฮโดรโฟบิคแล้วเกิดการเร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะเปปไทด์ได้

สรุปผลการทดลอง

1. นำสารละลายเอนไซม์ที่สกัดจาก B.subtilis TISTR 25 มาทำให้บริสุทธิ์ พบว่าสามารถทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4.6 เท่า

2. เอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสที่แยกได้เป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 38,000 ดาลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับ Thermolysin ที่มีขนาด 34,000ดาลตัน

3. นิวทรัลโปรตีเอสจากB.subtilis TISTR 25 มี pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเคซีนที่ pH 7 แต่เอนไซม์ จาก B.polymyxa และ Thermolysin มี pH ที่เหมาะสมที่ช่วง pH 6-8

4. อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเคซีนของนิวทรัลโปรตีเอสจาก B. subtilis TISTR 25 คือ 50°ซ เปรียบเทียบกับเอนไซม์ Thermolysin และเอนไซม์จาก B. polymyxa ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 55 และ 30°ซ ตามลำดับ

5. นิวทรัลโปรตีเอสจาก TISTR 25 ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์เช่นเดียวกับ Thermolysin

6. เอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก B.subtilis TISTR 25 เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ ในบัฟเฟอร์ pH 6.5 เป็นเวลา 15 วัน หรือเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ. 1 วัน เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีประมาณ 40%

7. เมื่อศึกษาทางด้านจลนศาสตร์ พบว่าเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก B.subtilis TISTR 25 มีค่าแอฟฟินิตีต่อสับสเตรท Casein ,Hemoglobin และ Azocoll ต่ำกว่าค่าของ Thermolysin และเอนไซม์จาก TISTR 25 มีความเร็วสูงสุดในการเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลส์สับสเตรททั้ง 3 ชนิด ได้ดีกว่า Thermolysin

8. Zn^{++}ที่ความเข้มข้น 1mM ยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสได้ประมาณ 50 เปอร์เซนต์ ในขณะที่ 10 mM EDTA และ 10mM O-Phenanthroline ยับยั้งได้ 100%

9. เอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก TISTR 25 มี Zn^{++}1.5 อะตอมต่อโมเลกุลเอนไซม์

10. การแทนที่ Zn^{++}ที่ถูกดึงออกจากโมเลกุลเอนไซม์ด้วย Co^{++},Mn^{++}และ Zn^{++} ทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีกลับคืนมามากที่สุด ส่วน Ca^{++},Fe^{++}และ Mg^{++}ทำให้แอคติวิตีกลับคืนมาน้อยกว่าเล็กน้อย

11. เอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก TISTR 25 มีความจำเพาะต่อปลายด้าน N ของกรดอะมิโนที่มีขนาดใหญ่ เช่น ลิวซีน, ฟีนิลอะลานีน และ อาร์จินีน เช่นเดียวกับ Thermolysin