บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ซึ่งเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของโปรตีน เช่น การทำให้เนื้อนุ่ม การผลิตยาช่วยย่อยอาหาร ใช้ทำความสะอาดระบบอัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration) ในกระบวนการผลิตอาหารประเภทนม การสังเคราะห์แอสปาร์แทมและการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท สำหรับผู้ป่วยที่ต้องใช้อาหารเหลว เป็นต้น [1] หรือใช้โปรติเอสในปฏิกิริยาการสังเคราะห์เปปไทด์สายสั้นๆ โดยให้ปฏิกิริยาเกิดในตัวทำละลายอินทรีย์ [2]

การนำโปรติเอสที่เสถียรต่ออุณหภูมิ (thermostable protease) มาประยุกต์ใช้ในงานบางอย่างที่กล่าวมาข้างต้นจะให้ผลดีกว่าการใช้โปรติเอสที่ไม่เสถียรต่ออุณหภูมิเพราะการเพิ่มอุณหภูมิในกระบวนการใช้งาน จะมีผลทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาการเร่งของเอนไซม์สูงขึ้นและทำให้เวลาที่ใช้ในการเกิดผลิตภัณฑ์ลดลง ดังนั้นจึงสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ด้วย นอกจากนี้ยังมีผลดีอื่นๆ ได้แก่ ทำให้การละลายของสารเริ่มต้นและผลิตภัณฑ์ที่ไม่ใช่แก๊สดีขึ้น ลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์พวก mesophile และเพิ่มความเสถียรต่อการเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เกิดความสนใจศึกษาโปรติเอสที่เสถียรต่ออุณหภูมิ เพื่อนำไปสู่การประยุกต์ในระดับอุตสาหกรรม [3]

แม้ว่าแหล่งของโปรติเอสที่เสถียรต่ออุณหภูมิมีทั้งในพืชและจุลินทรีย์ แต่จะพบว่าในการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรม จุลินทรีย์เป็นแหล่งของเอนไซม์ได้ดีกว่าพืช ทั้งนี้เนื่องจากจุลินทรีย์นั้นใช้พื้นที่และเวลาในการเลี้ยงน้อยกว่าพืช ทำให้ช่วยให้ลดต้นทุนการผลิตได้มากกว่า ผลงานวิจัยของนักวิจัยกลุ่มต่าง ๆ ซึ่งได้พบการผลิตโปรติเอสที่เสถียรต่ออุณหภูมิสูงจากแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ชนิดต่าง ๆ เช่น *Thermomonospora fusca* YX [3] *Bacillus thermoproteolyticus B. stearothermophilus Thermoactinomyces vulgaris* และ *Thermus aquaticus* [4] *T. caldophilus* GK 24 [5] และ *Thermus S2* [6,7] จุลินทรีย์เทอร์โมไฟล์ในตาราง 1.1 เจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิ 55-75 °C และ *T. aquaticus* YT-1 ผลิตโปรติเอส (Aq.I และ Aq II) ได้สูงกว่าแบคทีเรียอื่น ในตาราง 1.2 เป็นตัวอย่างของชนิดของโปรติเอสที่ผลิตจากเทอร์โมไฟล์จำนวนหนึ่งซึ่งมีทั้งชนิดที่เป็น serine และ metal โดยที่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วง 80-90 °C และมีมวลโมเลกุลในช่วง 14,500-34,500 ดาลตัน ส่วน *Thermus S2* ซึ่งคัดเลือกจากบ่อน้ำร้อนสันกำแพงในจังหวัดเชียงใหม่นั้น สามารถผลิตโปรติเอสส่งออกนอกเซลล์ได้มากที่สุดในบรรดาเทอร์โมไฟล์ที่คัดเลือกจากบ่อน้ำร้อนสันกำแพง ป่าแป๋ และเทพพนม [7,8] ผลการศึกษาในเบื้องต้นพบว่าเจริญเติบโต

ตาราง 1.1 การผลิตโปรติเอสและอุณหภูมิของการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์[4]

จุลินทรีย์	อุณหภูมิในการเจริญเติบโต (°C)	แอคติวิตีโปรติเอส (UC/ลบ.ซม.)*	อุณหภูมิในการตรวจสอบ (°C)
B. stearothemophilus	55	1	55
Thermus caldophilus GK 24	70	139	70
T. aquaticus T351	75	35	75
T. aquaticus YT-1 Aq. I	75	114	70
Aq. II	75	152	95

* 1 UC = ปริมาณไทโรซีน 1 ไมโครกรัมที่ถูกทำให้เกิดขึ้นในเวลา 1 นาที

ตาราง 1.2 คุณสมบัติของโปรติเอสที่ผลิตจากเทอร์โมฟิลิคแบคทีเรีย[3]

จุลินทรีย์	ชนิดของโปรติเอส	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)	พีเอชที่เหมาะสม	มวลโมเลกุล (ดาลตัน)
Thermomonospora fusca YX	Serine	80	9.0	14,500
Thermus caldophilus GK 24	Serine	90	7.8	31,000
Thermoactinomyces vulgaris	Serine	85	8.5	28,400
B. thermoproteolyticus	metal	80	7.2	34,500

ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 65 °C ในสารละลายอาหาร Degryse 162 ที่ไม่มีฟอสเฟตและมีพีเอช 7.0 การเจริญของเซลล์จะถูกยับยั้งโดยไอออนฟอสเฟต ซักซิเนต (succinate) ทรีส (Tris) และโซเดียมคลอไรด์ เมื่อตรึงเซลล์แบคทีเรียในแคลเซียมอัลจิเนตด้วยวิธีดักจับ การวิเคราะห์แอคติวิตีของโปรติเอสโดยวิธีการไฮโดรไลส์เคซีนชี้ให้เห็นได้ว่าระบบเซลล์ตรึงที่เลี้ยงแบบแบทช์ในอาหาร Degryse 162 ที่ไม่มีฟอสเฟตจะมีการผลิตโปรติเอสได้มากที่สุดที่ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งมีแอคติวิตีมากกว่า 5.38 UC/ลบ.ซม. ซึ่งมากกว่ากรณีของระบบเซลล์อิสระที่ให้แอคติวิตีสูงที่สุดที่ 4.59-5.11 UC/ลบ.-ซม เซลล์ตรึงจะผลิตโปรติเอสในอัตราที่ต่ำลงมากเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง[8] การเปรียบเทียบการตรึงเซลล์เพื่อการผลิตโปรติเอสโดยตรึงเซลล์แบบดักจับ (entrapment) ด้วยสารพาหะ 5 ชนิด ได้แก่

calcium alginate, alginate-agar, polyacrylamide, PAAH-alginate และ crosslinked-PAAH พบว่าเซลล์ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ซึ่งมีเซลล์ 20% มีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่ 65 °C ได้นานกว่า 2 เดือนและมีการผลิตโปรติเอสได้สูงสุดที่ 8.9 และ 8.2 UC/ ลบ.ซม. เมื่อใช้ปฏิกรแบบแบทช์และแบบต่อเนื่อง ตามลำดับ[6] แบคทีเรีย S2 สามารถผลิตโปรติเอสได้มากขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย Nitrilotriacetic acid สิ่งสกัดจากยีสต์ ทริปโทนและแร่ธาตุที่จำเป็นในสารละลายพี-เอช 7.2 ที่ 65°C ได้แอคติวิตีสูงสุด 8.5 UC/ ลบ.ซม. ในเวลา 32 ชั่วโมง และได้ปริมาณเซลล์เปียก 3.02 กรัมจากอาหาร 1 ลิตร โปรติเอสที่ได้นี้มีแอคติวิตีสูงสุดที่พีเอช 7.0 และที่อุณหภูมิ 65°C โดยมีค่า K_m และ V_{max} เมื่อใช้เคซีนเป็นสับสเตรทเท่ากับ 0.35 µg/ลบ.ซม.และ 5.6 µg /นาที ตามลำดับ และพบว่ามีประสิทธิภาพการสลายโปรตีนเร็วขึ้นเมื่อมี Ca^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์และเร็วกว่าการสลายฮีโมโกลบินและเจลาติน ตามลำดับ[6] การเติม Ca^{2+}, Mg^{2+} และ Fe^{3+} ลงในอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย S2 ทำให้มีการผลิตโปรติเอสได้สูงสุดที่ 900 UA/ลิตร แต่ถ้าเติมตัวยับยั้ง เช่น PMSF 5 mM หรือ EDTA และ Dithiothreitol อย่างละมากกว่า 1 mM ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลทำให้การเจริญเติบโตและการผลิตโปรติเอสลดลงเกือบหมด โปรติเอสที่ได้มีสมบัติในการไฮโดรไลส์โปรตีนต่างกันเป็นลำดับจากเคซีน > โปรตีนจากถั่วเหลือง > ฮีโมโกลบิน > เจลาติน โดยมีแอคติวิตีเท่ากับ 8.30, 2.45, 1.51 และ 0.70 UA/ลบ.ซม. ตามลำดับ แอคติวิตีของเอนไซม์นี้ถูกยับยั้งด้วย EDTA, 1,10-Phenanthroline, Phosphoramidon และ $ZnCl_2$ มากกว่า 8 mM การทำโปรติเอสดิบให้มีความเข้มข้นขึ้น 3 เท่า โดยอัลตราฟิลเตรชัน ทำให้แอคติวิตีของโปรติเอสลดลงเหลือ 76% ส่วนโปรติเอสที่ตกตะกอนด้วย 90% ของสารละลายอิ่มตัวแอมโมเนียมซัลเฟต ทำให้ได้แอคติวิตีกลับคืนมา 73% และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4 เท่า การทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-50 พบโปร-ติเอส 2 ชนิด (มีมวลโมเลกุลประมาณ 23,900 และ 15,000 ดาลตัน) ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9.1 และ 2.8 เท่าและมีผลผลิต 23 และ 21% ตามลำดับ ในขณะที่พบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 80° และ 65°C ตามลำดับ แต่พบพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากันที่ 8.0 การศึกษาการไฮโดรไลส์โปรตีนแสดงว่าโปรติเอสชนิดแรกมีแอคติวิตีในการไฮโดรไลส์โปรตีนจากถั่วเหลืองชนิดอบ >เจลาติน > โปรตีนจากถั่วเหลืองชนิดไม่อบ > ฮีโมโกลบิน > เคซีน แต่โปรติเอสชนิดที่สองสามารถไฮโดรไลส์โปรตีนจากถั่วเหลืองชนิดอบ > เคซีน > โปรตีนจากถั่วเหลืองชนิดไม่อบ > ฮีโมโกลบิน > เจลาติน[9] เมื่อเปรียบเทียบความจำเพาะต่อ BAPNA ของโปรติเอสชนิดที่สองพบว่ามีแอคติวิตีสูงกว่าโปรติเอสชนิดแรกแต่ต่ำกว่าทริปซิน ส่วนแอคติวิตีในการไฮโดรไลส์ FAGLA พบว่าโปรติเอสชนิดที่สองมีแอคติวิตีต่ำกว่าโปรติเอสจาก *Bacillus thermoproteolyticus* Rokko (โปร-ติเอส Type X ของ Sigma) แต่ไม่พบแอคติวิตีสำหรับโปรติเอสชนิดแรก[10] โปรติเอสทั้งสองมีแอค-ติวิตีต่อ ATpEE > ATEE > BAEE และ ATEE > ATpEE > BAEE ตามลำดับ และไฮโดรไลส์ได-

เปปไทด์บางชนิดได้เหมือนกัน แต่บางชนิดแตกต่างกัน ผลการทำ SDS-PAGE แสดงว่าโปรติเอสชนิดแรกและชนิดที่สองมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 22,900 และ 17,800 ดาลตัน ตามลำดับ[9] ซึ่งใกล้เคียงกับมวลโมเลกุลจากการหาด้วยเจลฟิลเตรชัน การทำบริสุทธิ์โปรติเอสด้วยคอลัมน์ Sephadex G-50 และโครมาโตโฟคัสซิงซึ่งใช้คอลัมน์ polybuffer exchanger 94 ทำให้ได้โปรติเอส 3 ชนิด ซึ่งมี pI ที่ 8.7, 7.2 และ 6.5 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อตรวจสอบค่า pI ด้วยไอโซอิเลคตริกโฟคัสซิง พบว่าโปรติเอส 2 ชนิดแรกมี pI 9.3 และ 8.3 ส่วนโปรติเอสชนิดที่สามนั้นไม่ปรากฏแถบโปรตีนให้เห็น[11]

การคัดเลือกแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ที่ผลิตโปรติเอสที่เสถียรต่ออุณหภูมิจากตัวอย่างน้ำที่เก็บจากบ่อน้ำร้อนอื่น ๆ ในจังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งได้แก่ บ่อน้ำร้อนที่ฝาง เทพพนมและป่าแป๋ พบแบคทีเรีย F13, TLS43 และ P2 ที่ผลิตโปรติเอสได้ค่อนข้างดีกว่าแบคทีเรียอื่น ๆ ที่แยกได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรีย F13 สามารถผลิตโปรติเอสที่มีแอคติวิตีสูงที่สุด[12] ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้แบคทีเรีย F13 ที่ผลิตโปรติเอสที่เสถียรต่ออุณหภูมิเพื่อศึกษาการปรับปรุงการผลิตโปรติเอสให้มีแอคติวิตีสูงขึ้นและศึกษาการแยกและการทำบริสุทธิ์โปรติเอส รวมทั้งสมบัติเฉพาะของโปรติเอสบริสุทธิ์เพื่อประโยชน์ในการใช้งานที่เหมาะสมต่อไป

1.2 โปรติเอส

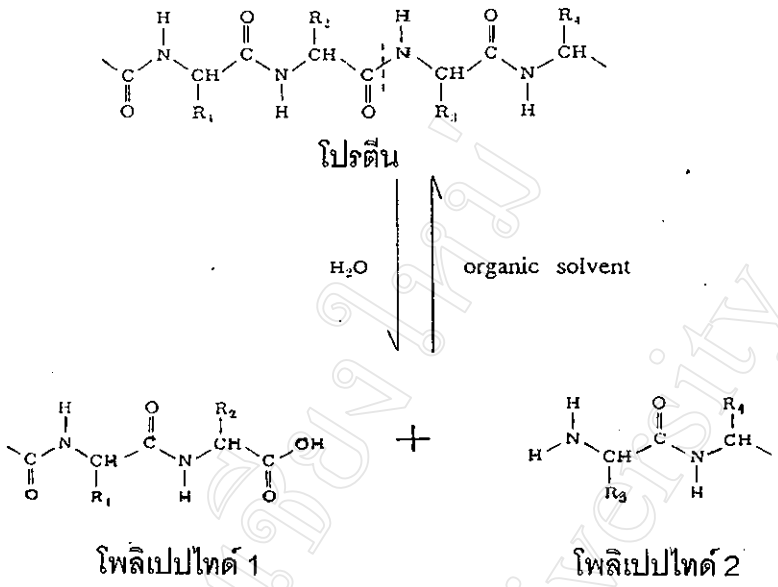
โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในสารละลายของน้ำและเร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะเปปไทด์ในสารละลายของตัวทำละลายอินทรีย์ ดังสมการรูป 1.1

1.2.1 การจำแนกประเภท[13]

โปรติเอสสามารถจำแนกตามลักษณะการสลายพันธะเปปไทด์ของโพลีเปปไทด์ได้ 2 ชนิด ได้แก่ peptidase และ proteinase เมื่อจัดแบ่งประเภทของโปรติเอสแต่ละชนิดตามแอคติวิตีที่มีต่อ C หรือ N-terminal และตามกลไกการเร่งปฏิกิริยาจะได้โปรติเอสประเภทต่าง ๆ และมีรายละเอียดดังนี้

1. **Peptidase** ได้แก่ โปรติเอสที่สามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ที่ปลาย C หรือ N ของโพลีเปปไทด์เท่านั้น ซึ่งถ้าจัดแบ่งตามความจำเพาะต่อปลาย C และ N จะแบ่งออกได้ 2 กลุ่มดังนี้

1.1 Aminopeptidase เป็น exopeptidase ที่สลายพันธะเปปไทด์ของกรดอะมิโนที่ปลาย N และมีความจำเพาะต่อสับสเตรท L-lysyl-L-alanine มีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานระหว่าง 7.5-10.5 ต้องการไอออนของโลหะบางชนิด เช่น Mg^{2+} หรือ Mn^{2+} สำหรับการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสถูกยับยั้งการทำงานโดย sulphydryl reagent แบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสชนิดนี้ เช่น *Bacillus subtilis* และ *B. stearothermophilus*



รูป 1.1 ปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์ในสารละลายน้ำและปฏิกิริยาการสร้างเปปไทด์ในสารละลายอินทรีย์โดยโปรติเอส

1.2 Carboxypeptidase เป็นโปรติเอสที่ย่อยพันธะเปปไทด์ของกรดอะมิโนที่ปลาย C ของโพลีเปปไทด์และถ้าจัดประเภทตามกลไกการเร่งปฏิกิริยา แบ่งเป็น 2 ชนิด

1.2.1 Serine carboxypeptidase ได้แก่ carboxypeptidase ที่มี serine ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ 4.5-6.0 จะพบใน *Aspergillus* sp. เช่น *A. aureus, A. niger, A. oryzae, A. sojae* เป็นต้น

1.2.2 Metallocarboxypeptidase ได้แก่ carboxypeptidase ที่ต้องการไอออนของโลหะในการทำงาน เช่น โปรติเอสที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp. ซึ่งต้องการ Zn^{2+} หรือ Co^{2+} ในการทำงาน

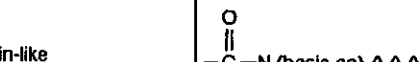
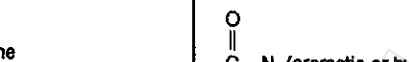
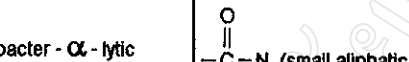
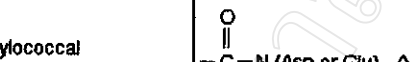
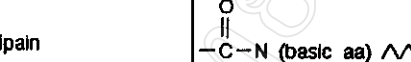
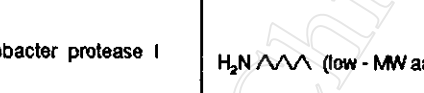
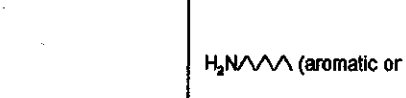
2. Proteinase ได้แก่ โปรติเอสที่สลายพันธะเปปไทด์ภายในโพลีเปปไทด์ จึงจัดเป็น endo-peptidase และเมื่อแบ่งตามความจำเพาะเบื้องต้นจัดแบ่งได้ 4 กลุ่ม (ตาราง 1.3) ดังนี้

2.1 Serine proteinase แบ่งเป็น 4 ชนิด ดังนี้

2.1.1 trypsin - like proteinase เป็นโปรติเอสที่ทำงานได้ดีที่พีเอชประมาณ 8.0 มีความไวต่อ trypsin inhibitors เช่น diisopropyl fluorophosphate (DFP), soybean trypsin inhibitor และ tosyl - L - lysine chloromethylketone (TLCK)

2.1.2 Alkaline proteinase ทำงานได้ดีที่พีเอชประมาณ 10.0 ถูกยับยั้งการทำงานด้วย DFP, potato inhibitor แต่ไม่ถูกยับยั้งโดย TLCK และ tosyl - L - phenylalanine chloromethylketone (TPCK) ซึ่งมีความจำเพาะต่อ trypsin หรือ chymotrypsin แต่ไม่ถูก

ตาราง 1.3 การจำแนกชนิดของ Proteinase ตามความจำเพาะเบื้องต้น [13] (aa = amino acid)

ชนิดของ Proteinase	พันธะเปปไทด์ที่จำเพาะ	ตัวอย่างจุลินทรีย์
Serine		
Trypsin-like		*Streptomyces griseus, S. fradiae, S. erythreus*
Alkaline		*Bacillus subtilis, Saccharomyces cerevisiae, S. griseus, S. rectus, Aspergillus oryzae*
Myxobacter - α - lytic		*Sporangium* sp.
Staphylococcal		Staphylococcus aureus
Thiol		
Clostripain		*Clostridium hystolyticum*
Streptococcal	ไม่เจาะจง	*Streptococcus* sp.
Metal		
Neutral		*B. subtilis, B. thermoproteolyticus, B. cereus, B. megaterium, B. griseus, A. oryzae, Pseudomones aeruginosa, C. hystolyticum*
Alkaline	ไม่เจาะจง	*Serratia* sp.
Myxobacter protease I		*Sporangium* sp.
Myxobacter protease II		*Myxobacter* AL-1
Acid		*A. oryzae, A. niger, Penicillium notatum, Rhizopus chinensin, Mucor pusillus, M. miechi, Endothia parasitica, Candida albicans, S. cerevisiae, Rhodotolura glutinis*

ยับยั้งโดยอนุพันธ์ของ peptide chloromethylketone alkaline proteinase มี 5 จำพวกและที่รู้จักกันดี คือ Subtilisins ซึ่งผลิตจาก *B. subtilis*

2.1.2.1 Subtilisin Carlsberg ผลิตจาก *B. licheniformis* มีสายเดี่ยวของเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 274 ตัว ซึ่งไม่มี cystein residue ดังนั้นจึงไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุล บริเวณแร่งของเอนไซม์ประกอบด้วย Ser - 221, His - 64, Asp - 32 ถูกยับยั้งการทำงานโดย DFP, PMSF (Phenyl methyl sulphonylfluoride) เอนไซม์ชนิดนี้ไม่ต้องการ Ca^{2+} ในการทำงาน จึงไม่ถูกยับยั้งโดยสารที่เป็น Chelating พีเอชที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วง 8-9

2.1.2.2 Subtilisin BPN ผลิตจาก *B. amyloliquefaciens, B. subtilis* และ *B. stearothermophilus* ประกอบด้วยกรดอะมิโน 275 ตัว ต้องการ Ca^{2+} เพื่อการทำงานของเอนไซม์

2.1.2.3 Proteinase จาก alkalophilic *Bacillus* sp. ประกอบด้วยสายเดี่ยวเปปไทด์ ไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ ทำงานได้ดีที่พีเอช 7-12

2.1.2.4 Fungal serine alkaline proteinase ผลิตจาก *Aspergillus flavus, A. oryzae*, A. *sojae A. sulphureus* ถูกยับยั้งการทำงานโดย sulphydryl reagent, p-chloromercuribenzoate (pCMB), KCN และ cystein

2.1.2.5 *Streptomyces* proteinase จัดเป็น thermostable alkaline serine proteinase ที่บริเวณแร่งมี - SH จึงถูกยับยั้งได้จาก pCMB, DFP, PMSF พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน 4.0 - 4.5

2.1.3 *Myxobacter α - lytic* proteinase ผลิตจาก *Sporangium* sp. ทำงานได้ดีที่พีเอช 9.0 เมื่อใช้เคซีนเป็นสับสเตรท มีความไวต่อ DFP มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง carboxyl ของ aliphatic amino acid ตัวเล็กๆ เช่น alanine เอนไซม์นี้ไม่สามารถไฮโดรไลส์ Ac - Tyr - OEt (ATEE), Ac - Trp - OMe (ATpME) หรือ Bz - Arg - OEt (BAEE)

2.1.4 *Staphylococcal* proteinase ผลิตจาก *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ V8 ถูกยับยั้งอย่างรวดเร็วด้วย DFP ทำงานได้ดีที่พีเอช 3.5 - 9.5 มีความจำเพาะต่อพันธะเปปไทด์ด้านปลาย carboxyl ของ aspartic acid หรือ glutamic acid

2.2 Thiol Proteinase ทำงานได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง ถูกกระตุ้นการทำงานได้ด้วยสารรีดิวส์ (reducing agent) เช่น HCN หรือ cystein ถูกยับยั้งอย่างรวดเร็วด้วย pCMB แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ดังนี้

2.2.1 Clostripain ผลิตจาก *Clostridium hystolyticum* เป็น sulfhydryl protein-ase ที่ทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับ pCMB หรือ TLCK และต้องการสารรีดิวส์ เช่น HCN หรือ cystein เพื่อการทำงาน

2.2.2 Streptococcal proteinase ผลิตจาก *Streptococcus* sp. ต้องการสารรีดิวส์ในการทำงาน ถูกยับยั้งโดย pCMB และสามารถไฮโดรไลส์สับสเตรทของ trypsin เช่น Bz - Arg - NH_2, Bz - Lys - NH_2, Bz - His - NH_2, Z - isoglutamine และ Z - isoasparagine

2.3 Metal - Chelator - Sensitive Proteinase แบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มดังนี้

2.3.1 Neutral proteinase ทำงานได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง ทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับ EDTA หรือ o-phenanthroline มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนพวกไฮโดรโฟบิค พบแอคติวิตีสูงมากเมื่อใช้ FAGLA เป็นสับสเตรท เช่น โปรติเอสจาก *Bacillus cereus*, *B. megaterium*, *B. stearothermophilus* ซึ่งมีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนพวกอลิฟาติคมากกว่าพวกอโรมาติค

2.3.1.1 *Bacillus* neutral proteinase พบใน *B. subtilis* Ca^{2+} มีความจำเป็นต่อความเสถียรของเอนไซม์ เอนไซม์ชนิดนี้ที่รู้จักกันดีคือ Thermolysin ผลิตจาก *B. stearothermophilus*

2.3.1.2 *Aspergillus* neutral proteinase ผลิตจากเชื้อรา มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 7.0 โปรติเอสนี้ผลิตจาก *A. oryzae* ถูกยับยั้งด้วย EDTA และ cystein

2.3.2 Alkaline proteinase ส่วนมากผลิตจากแบคทีเรียกรัมลบ ให้แอคติวิตีสูงเมื่อใช้เคซีนเป็นสับเสตรท พีเอช 7 - 9 มีความไวต่อการทำปฏิกิริยากับ o - phenanthroline

2.3.3 *Myxobacter AL - 1* protease I โปรติเอสชนิดที่ 1 ผลิตจาก *Myxobacter* ย่อยผนังเซลล์ของ *Arthrobacter crystallopoietes* และทำงานได้ดีที่พีเอช 9.0

2.3.4 *Myxobacter AL - 1* protease II โปรติเอสชนิดที่ 2 ผลิตจาก *Myxobacter* AL-1 ซึ่งไม่สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียและมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน 8.5-9.0

2.4 Acid Proteinase พบได้ทั่วไปในราและยีสต์ แต่พบน้อยมากในแบคทีเรีย มีแอคติวิตีต่อสับสเตรทที่เป็นโปรตีน เช่น ฮีโมโกลบิน ที่พีเอช 3-4 ทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็วกับสารประกอบพวก diazoketone เช่น diazoacetyl - DL - norleucine methyl ester (ซึ่งมี Cu^{2+}) แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

2.4.1 Pepsin - like จัดเป็นโปรติเอสที่มีสมบัติคล้าย pepsin ทำงานได้ดีที่พีเอช 2.5 - 3.0 มีลักษณะเป็นสายเดี่ยวของเปปไทด์ที่ประกอบด้วย cystein 2 ตัวในโมเลกุล พบว่าเอนไซม์ในกลุ่มนี้ผลิตได้จาก *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp.

2.4.2 Renin - like ผลิตได้จาก *Mucor* sp., *Endothia* sp. แบ่งเป็น 2 ประเภทดังนี้

2.4.2.1 Mucor proteinase พบได้จาก *Mucorphilus* ซึ่งผลิตโปรติเอสที่มีสมบัติคล้าย renin พีเอชที่เหมาะสม 4.0 เมื่อใช้ฮีโมโกลบินเป็นสับสเตรท

2.4.2.2 Endothia parasitica proteinase ทำให้โปรตีนในน้ำนมตกตะกอน เช่นเดียวกับ renin และ *Mucor* proteinase มีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน 4.5

1.2.2 **ประโยชน์ของโปรติเอส**[14]

โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. *สารซักฟอก* โปรติเอสถูกนำมาผสมลงในผงซักฟอก เพื่อทำหน้าที่ย่อยสลายคราบโปรตีนต่าง ๆ ที่ติดบนเสื้อผ้า จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตโปรติเอสในอุตสาหกรรมสารซักฟอก ได้แก่ *Bacillus lincheniformis* หรือ Alkalophilic *Bacilli* สายพันธุ์ Ya, Yb, GK 6664, GK 6638 - I, GK 6638 - II, GK 6638 - III และ *Fusarium* sp., *Canidiolobus* sp., *Bacillus thermoruber* เป็นต้น

2. *อุตสาหกรรมเนย* ใช้ renin ซึ่งเป็นโปรติเอสที่ช่วยตกตะกอนน้ำนมเพื่อการผลิตเนยแข็ง

3. *อุตสาหกรรมการทำเครื่องหนัง* Alkalophilic *Bacilli* ช่วยในขั้นตอนการขูดขนออกจากแผ่นหนังแทนการใช้สารเคมี เช่น ปูนขาวหรือโซเดียมซัลไฟด์ ส่วนขั้นตอนการทำให้หนังนิ่มและมีความยืดหยุ่น ทำโดยใช้ trypsin หรือ pancreatin จากตับอ่อน ปัจจุบันมีการใช้สารเคมีผสมกับโปรติเอสที่ผลิตจาก *Aspergillus oryzae*, *Bacillus amyloliquefaciens* และ *B. licheniformis* ซึ่งทำให้ได้ผลที่ดีกว่าเดิม

4. *การทำเครื่องดื่ม* ในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ใช้ papain ช่วยลดความขุ่นในเบียร์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ ทั้งนี้เนื่องจาก papain จะช่วยสลายโปรตีนซึ่งเป็นต้นเหตุหนึ่งของความขุ่น

5. *อุตสาหกรรมขนมปัง* โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อราและแบคทีเรียบางชนิด สามารถทำให้กลูเทน (gluten) ในแป้งขนมปังมีคุณสมบัติที่กรอบแตกต่างจากกรณีที่ไม่ใช้โปรติเอส

6. *การสังเคราะห์แอสปาร์แทม* (Aspartame) ซึ่งใช้เป็นสารให้ความหวานชนิดหนึ่งที่สามารถสังเคราะห์จากปฏิกิริยาที่ใช้ N - Benzoyloxycarbonyl - L - aspartic acid และ L - phenylalanine methyl ester ที่เร่งด้วย metalloprotease ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์คือ N - Carbobenzoxyl - L - aspartyl - L - phenylalanine methyl ester ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์แอสปาร์แทม

7. *ประโยชน์อื่นๆ* เช่น

7.1 ใช้ papain และ bromelain ผลิตสารเนื้อนุ่ม (meat tenderizer) และยาช่วยย่อยอาหาร

7.2 ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท (protein hydrolysate) สำหรับผู้ป่วย

1.2.3 การหาแอคติวิตีของโปรติเอส [15]

แอคติวิตีของโปรติเอสสามารถตรวจสอบได้หลายวิธี ดังสรุปรวบรวมไว้ในตาราง 1.4 ซึ่งจะเห็นได้ว่าวิธีการตรวจสอบแอคติวิตีขึ้นอยู่กับชนิดของสับสเตรทของโปรติเอส เช่นเมื่อใช้เคซีนหรือฮีโมโกลบินเป็นสับสเตรท หลังจากการตกตะกอนของสับสเตรทที่เหลือจากการย่อยด้วยโปรติเอส ทำให้ได้สารผลิตภัณฑ์ที่มีไทโรซีนและทริปโตฟานในสารละลายใสซึ่งสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ดังนั้นจึงสามารถตรวจสอบแอคติวิตีโดย spectrophotometry หรือใช้สารละลาย Folin ซึ่งอาศัยเทคนิคทาง Colorimetric ข้อเสียของวิธีเหล่านี้คือความไม่สะดวกในขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนที่เหลือ และการกรองตะกอนออกจากสารละลายของผลิตภัณฑ์ ความไม่แน่นอนของสับสเตรท ความสามารถในการละลายจำกัดในจุดที่ใกล้กับค่า pI ของสับสเตรท ดังนั้นจึงได้เลือกใช้สับสเตรทที่มีสี เช่น เอโซเคซีน (azocasein) เอโซอัลบูมิน (azoalbumin) ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาการไฮโดรไลส์ของโปรติเอสมีหมู่เอโซซึ่งจะทำให้การตรวจสอบแอคติวิตีรวดเร็วและถูกต้องมากขึ้น นอกจากสับสเตรทที่มีสีแล้วยังมีสับสเตรทจำเพาะหลายชนิด เช่น orcein-elastin และ collagen ใช้ตรวจสอบ elastase และ collagenase ตามลำดับ สับสเตรทสังเคราะห์และเปปไทด์บริสุทธิ์ที่ทราบองค์ประกอบ นิยมใช้สำหรับการตรวจสอบความจำเพาะต่อ

ตาราง 1.4 การวิเคราะห์แอคติวิตีของโปรติเอส [15]

เทคนิค	วิธีการ
Titrimetry	1) Formal titration 2) Alkalimetric titration ในสารละลายอัลกอฮอล์ 3) Acidimetric titration ในสารละลายอะซิโตน 4) การไตเตรทแอมโมเนีย หลังจากการ Diffusion
Manometry	5) การตรวจสอบ Amino - nitrogen 6) ทำปฏิกิริยากับ amino acid oxidase และหาปริมาณออกซิเจนที่ใช้ไป 7) ทำปฏิกิริยากับ amino acid decarboxylase และหาปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ผลิตได้
Colorimetry	หาปริมาณกรดอะมิโนโดยใช้นินไฮดริน (ninhydrin)
Spectrophotometry	การวัดหา Kinetic หาปริมาณกรดอะมิโนที่มี aromatic ring เช่น Tyrosine
Chromatography	หาปริมาณกรดอะมิโนโดยใช้โครมาโตกราฟีแบบกระดาษ
Chromagenic substrates	การตรวจสอบทาง Colorimetric และ Kinetic
Application type assay	เช่น การตกตะกอนนม การละลายของตะกอน

พันธะเปปไทด์มากกว่าการหาแอคติวิตี การวิเคราะห์แอคติวิตีโปรติเอสในทางการค้าอาจจะใช้เทคนิคจำเพาะสำหรับแต่ละกรณี ตัวอย่าง เช่นการตรวจสอบแบบ milk - clotting ซึ่งใช้วิเคราะห์แอคติวิตีของ renin ซึ่งเป็นโปรติเอสในนม

1.2.4 การยับยั้งของโปรติเอส [16 a)]

การวิเคราะห์การสูญเสียแอคติวิตีและการย่อยสลายตัวเองของโปรติเอส ทำได้โดยอาศัยการใช้ตัวยับยั้งการทำงานของโปรติเอส ความรู้จากการจัดพวกการเร่งปฏิกิริยาของโปรติเอสทำให้ทราบได้ว่าโปรติเอสยับยั้งแอคติวิตีของตัวมันเองซึ่งบางครั้งจึงต้องกำจัดออกจากสารละลายนั้น ๆ การยับยั้งการสูญเสียแอคติวิตีเนื่องจากไฮโดรไลส์ของโปรติเอสเองทำได้ 2 วิธี ในกรณีแรกนั้นจะรักษาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของตัวยับยั้งที่ผันกลับได้ (reversible inhibitor) ซึ่งมีโอกาสสูญเสียตัวยับยั้งได้หลายเท่าด้วยกระบวนการต่างๆ เช่น ไดอะไลซีส เจลฟิลเตรชันและโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ หรือสารเคมี หรือสิ่งมีชีวิตที่มีการกระตุ้นให้เกิดการยับยั้งด้วยตัวมันเอง ตัวยับยั้งหลายชนิดเป็นเปปไทด์หรือมีหมู่ฟังก์ชันที่ไม่เสถียร เช่น อัลดีไฮด์ ซึ่งอาจถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ การเลือกใช้ตัวยับยั้งผสมกันหลายๆ ชนิดจะเป็นที่นิยมมากกว่าการใช้ตัวยับยั้งชนิดเดียว ตัวอย่างเช่น leupeptin, chymostatin, EDTA หรือ 1, 10 - Phenanthroline ผลของการยับยั้งจริงๆ นั้นจะต้องได้จากการทดลองเบื้องต้นก่อนนำไปใช้ประโยชน์

ตัวยับยั้งผันกลับได้อาจถูกเลือกใช้ในขั้นตอนแรกของสองขั้นตอนการยับยั้งสำหรับสารผสมซึ่งเริ่มมีการยับยั้งจากการเติมตัวยับยั้งไม่ผันกลับ (irreversible inhibitor) เป็นที่น่าสังเกตได้ว่าตัวยับยั้งผันกลับได้อาจทำงานแข่งขันกับตัวยับยั้งไม่ผันกลับ จึงนิยมที่จะใช้ตัวยับยั้งไม่ผันกลับในขั้นตอนแรกสุด การใช้ส่วนผสมของตัวยับยั้งไม่ผันกลับของ serine protease เช่น DipF, phenylmethyl-sulphonyl fluoride (PMSF) หรือ DCI ร่วมกับตัวยับยั้งที่ผันกลับไม่ได้ของ cystein protease เช่น E-64 จะให้ประสิทธิภาพการยับยั้งโปรติเอสได้ดีมาก แม้ว่าจะไม่มีตัวยับยั้งที่ผันกลับไม่ได้ของ metalloproteases หรือ aspartic proteases ก็ตาม แต่ถ้าพบว่าแอคติวิตีของโปรติเอสลดลงเนื่องจากโปรติเอส 2 ชนิดนี้ก็สามารถเลือกใช้ตัวยับยั้งของโปรติเอสแต่ละชนิดได้ เช่นเลือกใช้ EDTA ซึ่งเป็นสารพวก Chelator ที่ช่วยยับยั้งการทำงานของ metalloprotease ได้ หรือเลือกใช้ pepstatin สำหรับกรณีของ aspartic protease ตัวยับยั้งของโปรติเอสชนิดต่าง ๆ ได้รวบรวมไว้ในตาราง 1.5

1.2.5 อิทธิพลของไอออนโลหะต่อแอคติวิตีของโปรติเอส

เอนไซม์บางชนิดต้องการไอออนของโลหะ (ทำหน้าที่เป็น cofacter) ช่วยเพิ่มความเสถียรและ/หรือแอคติวิตี แต่เอนไซม์บางชนิดก็ไม่ต้องการโคแฟคเตอร์เหล่านี้ ในทำนองเดียวกับโปรติเอส

ตาราง 1.5 ตัวยับยั้งของโปรติเอสแต่ละชนิด [16 a)]

ชนิดของโปรติเอส	ชนิดของตัวยับยั้ง	ความเข้มข้น (μM)
Serine proteases	Irreversible inhibitors	
	1) Diisopropylphosphofluoride (DipF)	100
	2) Phenylmethanesulphonylfluoride (PMSF)	10^2 - 10^3
	3) 4-Aminophenylmethanesulphonylfluoride	5-50
	4) 3, 4-Dichloroesocoumarin (3, 4-DCl)	5-100
	5) L-l-Chloro-3 - [4-tosylamido] -7- amino -2-heptanone - HCl (TCLK)	10-100
	6) L-l-Chloro-3-[4-tosylamido]-4-phenyl-2-butanone (TPCK)	10-100
	Reversible inhibitors	
	1) Leupeptin	1-100
	2) Antipain	1-100
	3) Chymostatin	10-100
	4) Elastatinal	10-100
Cystein proteases	Iodoacetate	10-50
	E - 64	10
	Chloroacetyl - HO - Leu - Ala - Gly - NH_2	1
Aspartic proteases	Pepstatin	1
	H - Val - D - Leu - Pro - Phe - Val - D - Leu - OH	1
Metalloproteases	EDTA	10^3
	1, 10 - Phenanthroline	10^3-10^4
	phosporamidon	1
Exopeptidases	Amastatin	1-10
	Bestatin	1-10
	Diprotin A	10-50
	Diprotin B	50-100

ซึ่งเป็นเอนไซม์พวก hydrolases นั้นบางชนิดสามารถเพิ่มแอคติวิตีได้ด้วยไอออนของโลหะบางชนิด เช่น Metalloprotease จัดเป็นโปรติเอสที่ต้องมีไอออนของโลหะเพื่อให้มีแอคติวิตีในการสลายพันธะเปปไทด์ อย่างไรก็ตามไอออนของโลหะต่างชนิดกันมีผลที่แตกต่างกันต่อแอคติวิตีของโปรติเอสชนิดต่าง ๆ หรือ metalloproteases จากแหล่งที่ต่างกัน โดยทั่วไป Ca^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+} และ Fe^{3+} มีผลต่อแอคติวิตีของโปรติเอส เช่น โปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* และ *B. amyloliquefaciens* ต้องการ Ca^{2+} เพื่อรักษาเสถียรภาพต่ออุณหภูมิของเอนไซม์[13] ในขณะที่โปรติเอสที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp. ต้องการ Co^{2+} หรือ Zn^{2+} เพื่อการทำงานของเอนไซม์[13] การเติม Ca^{2+} จะช่วยเพิ่มความเสถียรต่ออุณหภูมิของโปรติเอสที่ผลิตจาก *Pseudomonas fluorescences* [17] Thiol protease ต้องการ Ca^{2+} โดยที่ไอออนอื่นๆ เช่น Mg^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Ba^{2+} และ Cd^{2+} ไม่สามารถทดแทน Ca^{2+} ได้ [18] ในขณะที่โปรติเอสจาก *Clostidium sporogenes* ต้องการ Ca^{2+}, Mn^{2+} และ Co^{2+} [19] เพื่อรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์เช่นเดียวกับ Alkaline protease ที่ผลิตจาก *B. licheniformis* ต้องการ Cu^{2+} และ Co^{2+} [20] นอกจากนี้โปรติเอสที่ผลิตจาก *Lactobacillus brevis* จะถูกกระตุ้นด้วย Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+} และ K^{+} แต่ถูกยับยั้งด้วย Zn^{2+} และ Co^{2+} [21] ในขณะที่ neutral metalloprotease จากไมโตคอนเดรียของมันฝรั่งไม่มีความจำเป็นที่จะต้องใช้ไอออนของโลหะชนิดใด ๆ เพื่อกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์[22] โปรติเอสที่ผลิตจาก *Drasphilia melanogaster* ต้องการ Ca^{2+} กระตุ้นการทำงานของโปรติเอสให้เพิ่มขึ้น 50% โดยที่ไอออนของโลหะ Mg^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Ba^{2+} และ Cd^{2+} ไม่สามารถทดแทนได้ [18] นอกจากนี้ยังพบว่า Ca^{2+} มีความจำเป็นต่อความเสถียรของ neutral metalloprotease และ Substilisin (ในอัตรา 4:1) ที่ผลิตจาก *B. subtilis* Thermolysin ที่ผลิตจาก *B. stearothermophilus* มี Zn^{2+} ในโมเลกุลโดยจับ histidine ที่ตำแหน่ง 142, 146, และ glutamic acid ที่ตำแหน่ง 166 ซึ่งมีความสำคัญต่อความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์[13] และสำหรับ neutral metalloprotease ที่ผลิตจากเทอร์โมไฟล์ *Themus S2* ต้องการ Ca^{2+} ในปริมาณ 2-4 mM ในการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์[9]

1.3 การไฮโดรไลส์โปรตีนโดย Trinitrobenzenesulfonic acid

โปรติเอสต่างชนิดกันมีความสามารถในการไฮโดรไลส์โปรตีนชนิดหนึ่ง ๆ ได้แตกต่างกัน เนื่องจากมีความจำเพาะต่อพันธะเปปไทด์ที่แตกต่างกัน ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการไฮโดรไลส์สามารถทำได้ 2 วิธีดังนี้

1. วัดปริมาณของสารผลิตภัณฑ์ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร เทียบกับไทโรซีน ซึ่งวิธีนี้ทำโดยวิธีเดียวกับการหาแอคติวิตีของโปรติเอสที่ใช้โปรตีนชนิดต่าง ๆ เป็นสับสเตรท ผลการทดสอบกับโปรติเอสที่ผลิตจาก *Thermomonospora fusca* [3] สามารถไฮโดรไลส์

โปรตีน β- lactoglobulin > casein > BSA ในขณะที่โปรติเอสจาก *Thermus S2* ไฮโดรไลส์ เคซีน > โปรตีนจากถั่วเหลือง > ซีโมโกลบิน > เจลาติน[9]

2. วัดองศาของไฮโดรไลซีส (degree of hydrolysis ; DH) ซึ่งหมายถึงอัตราส่วนร้อยละของพันธะเปปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลส์เมื่อเทียบกับพันธะเปปไทด์ทั้งหมดของโปรตีนชนิดนั้นๆ ทำได้โดยใช้ Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)[23] โดยใช้วิเคราะห์ประสิทธิภาพของไฮโดรไลซีสด้วยโปรติเอสโดยปฏิกิริยาของ TNBS กับกลุ่มอะมิโนหรือ primary amines ของโปรตีน (รูป 1.2)

$$\text{องศาของไฮโดรไลซีส} = \frac{h}{h_{tot}} \times 100\%$$

โดยที่ h (hydrolysis equivalents) คือ ความเข้มข้นเป็น milliequivalents (meqv.) ต่อกรัมของ α - amino groups ที่เกิดขึ้นหลังจากไฮโดรไลซีส

h_{tot} (complete hydrolysis) คือ ปริมาณกรดอะมิโนเดี่ยวๆ ใน 1 กรัมของโปรตีน

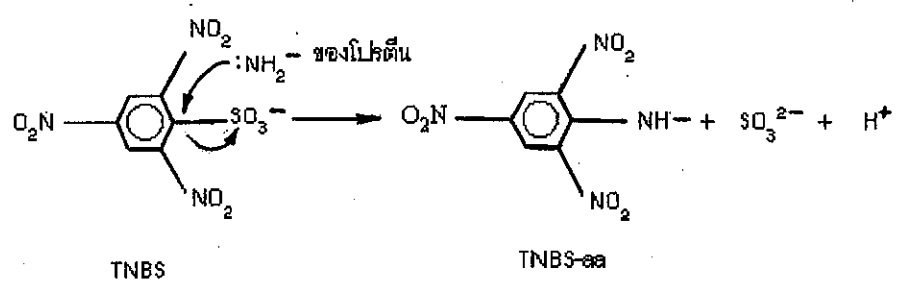
การหาค่า h ทำได้โดยเทียบค่า A_{340} ของสารตัวอย่างโปรตีนที่ถูกย่อยด้วยโปรติเอสแล้วตรวจสอบด้วย TNBS กับกราฟมาตรฐานของ leucine จะได้ milliequivalent ของ leucine ของสารตัวอย่างโปรตีนที่ถูกไฮโดรไลส์ด้วยโปรติเอสที่ทดสอบและทำให้สามารถคำนวณค่า milliequivalent ของ leucine ต่อกรัมของโปรตีนทดสอบได้ ส่วนการหาค่า h_{tot} คำนวณได้ดังนี้

$$h_{tot} = N \times f_N$$

โดยที่ N = มวลโมเลกุลของกรดอะมิโนโดยเฉลี่ยประมาณ 125 กรัมต่อโมล หาได้โดยวิธี Kjeldahl

f_N = Kjeldahl conversion factors (ตาราง 1.6)

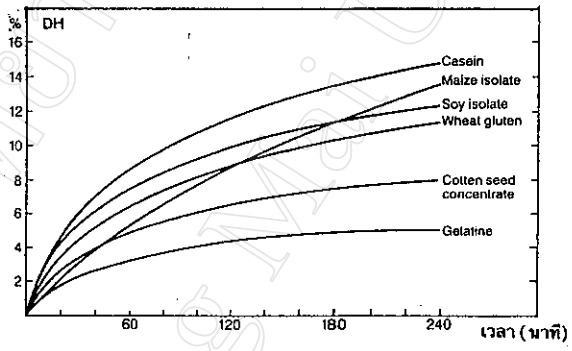
การไฮโดรไลส์โปรตีนต่าง ๆ ด้วย Alcalase (โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis*) และ Neutrase (โปรติเอสจาก *B. Subtilis*) แสดงในรูปองศาการไฮโดรไลซีส ดังรูป 1.3 และ 1.4 แสดงว่า Alcalase สามารถไฮโดรไลส์โปรตีนต่าง ๆ ด้วยอัตราเร็วค่อนข้างคงที่ ซึ่งการไฮโดรไลส์เจลาติน



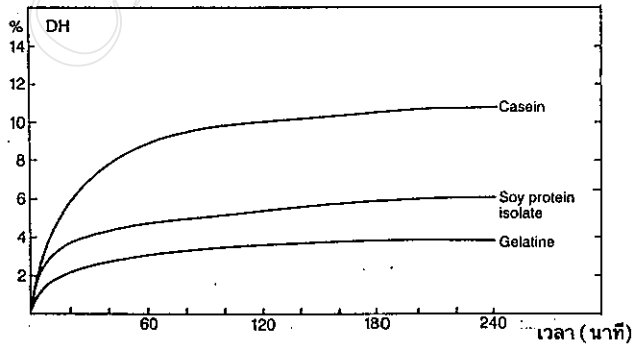
รูป 1.2 ปฏิกิริยาระหว่าง TNBS กับกลุ่มอะมิโนของโปรตีนที่เกิดขึ้นจากการหาพันธะเปปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลส์โดยวิธี TNBS

ตาราง 1.6 Kjeldahl conversion factors และ h_{tot} ของโปรตีนต่างๆ [24]

ชนิดของโปรตีน	Kjeldahl conversion factor, f_N	h_{tot} eqv/kg ($N \times f_N$)
เคซีน	6.38	8.2
โปรตีนจาก whey	6.38	8.8
เนื้อวัว	6.25	7.6
เนื้อปลา	6.25	8.6
ไข่ขาว	6.25	ประมาณ 8.0
เนื้อถั่วเหลืองและกาก	6.25	7.8
เมล็ดฝ้าย	6.25	7.8
เซลล์เม็ดเลือดแดง	6.25	8.3
โปรตีนจากข้าวสาลี	5.70	8.3
เจลาติน	5.55	11.1



รูป 1.3 การไฮโดรไลส์โปรตีนชนิดต่างๆ โดย Alcalase ซึ่งใช้ความเข้มข้นของโปรตีน (S) = 8% ของ (N x 6.25) ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อโปรตีน (E/S) = 0.5% ที่ อุณหภูมิ 50°C พีเอช 8.0 [24]



รูป 1.4 การไฮโดรไลส์โปรตีนชนิดต่างๆ โดย Neutrase ซึ่งใช้ความเข้มข้นของโปรตีน (S) = 8% ของ (N x 6.25) ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อโปรตีน (E/S) = 2.0% ที่ อุณหภูมิ 50° C พีเอช 8.0 [24]

และเมล็ดฝ้ายเข้มข้นมีไฮโดรไลซีสค่อนข้างเร็วในช่วง 20 นาทีแรก และจากนั้นค่อนข้างคงที่ ส่วนการไฮโดรไลส์โปรตีนที่เหลือจะเป็นไปค่อนข้างช้า ในเวลา 4 ชั่วโมง Alcalase สามารถไฮโดรไลส์เคซีน > โปรตีนจากกากข้าวโพด > โปรตีนจากกากถั่วเหลือง > กลูเทนจากแป้งสาลี > โปรตีนในเมล็ดฝ้าย > เจลาติน ในขณะที่ Neutrase ไฮโดรไลส์เคซีน > Soy protein isolate > เจลาติน อัตราเร็วของการไฮโดรไลส์โปรตีนชนิดต่างๆ โดย Alcalase และ Neutrase จะแปรผกผันตามเวลาที่ใช้และปฏิกิริยาการไฮโดรไลซีสจะสิ้นสุดลงเมื่อไม่มีพันธะเปปไทด์ที่จำเพาะกับเอนไซม์[24]

1.4 การทำบริสุทธิ์และการตรวจสอบโปรติเอส

โปรติเอสสามารถพบได้ทั้งภายในเซลล์และที่ขับออกมานอกเซลล์ สำหรับโปรติเอสที่อยู่ภายในเซลล์พบได้ใน cytoplasm, lysosomes, mitochondria, nuclei และ celluar membranes ขั้นตอนแรกของการทำบริสุทธิ์ จะต้องแยกสารละลายโปรติเอสออกจากเซลล์ เช่น การแยกโปรติเอสจาก lysosomes ทำโดยใช้ Triton WR - 1339 หรือสารอื่นเช่น Dextran - 500 และสารผสมของ iron - sorbitol - citric acid ทำให้เซลล์แตกแล้วจึงเซนติฟิวจ์แยกโปรติเอสออกจากกากเซลล์ ในบางครั้งสารละลายโปรติเอสที่ได้จะมีตัวยับยั้งอยู่ร่วมอยู่ด้วยซึ่งทำให้รบกวนการหาแอคติวิตีของโปรติเอส ดังนั้นต้องแยกโปรติเอสออกจากตัวยับยั้งโดยใช้เทคนิคเจลฟิลเตรชัน นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่นที่มีผลกระทบต่อขั้นตอนการทำบริสุทธ์ เช่น ความเสถียรของโปรตีน ความไวต่ออุณหภูมิ พีเอช ionic strenght สารละลายอินทรีย์ และ detergents เป็นต้น

สิ่งสำคัญในการทำบริสุทธิ์โปรติเอสจะต้องคำนึงถึงเวลาที่ใช้ ขั้นตอน ราคา แอคติวิตีของโปรติเอสที่เหลือ ปริมาณโปรติเอสบริสุทธิ์ที่ต้องการนำไปใช้และจุดประสงค์การนำโปรติเอสไปศึกษา เช่น การศึกษาโครงสร้างของโปรติเอสหรือการศึกษาลักษณะเฉพาะของโปรติเอส จะต้องทำให้โปร-ติเอสมีความบริสุทธิ์มากกว่า 95% เป็นต้น การทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์นั้นไม่สามารถกำหนดขั้นตอนมาตรฐานเพียงชุดเดียวที่จะใช้ศึกษาวิเคราะห์หรือทำเอนไซม์ทุกชนิดให้บริสุทธิ์ขึ้นได้เนื่องจากความหลากหลายของแหล่งที่มาและความเสถียรของเอนไซม์ ส่วนหนึ่งของเทคนิคการแยกและทำบริสุทธิ์เอนไซม์มีดังต่อไปนี้

1. **อัลตราฟิลเตรชัน**[25] เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารที่มีมวลโมเลกุลต่างกันออกจากกันโดยอาศัยขนาด รูปร่าง/หรือประจุโมเลกุลของโปรตีนในการแยกและถูกกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูพรุนซึ่งกำหนดด้วยค่า Molecular weight cut - off ภายใต้สภาวะที่มีความดันสูง เช่น การใช้แรงดันของแก๊สไนโตรเจนช่วยทำให้โมเลกุลที่มีมวลโมเลกุลต่ำกว่า MW cut - off ของเมมเบรนผ่านมาได้ เช่น โปรตีนที่เป็นก้อนกลมที่มีมวลโมเลกุล 100,000 ไม่สามารถผ่านเมมเบรนที่มี MW cut - off 100,000 แต่โมเลกุลที่มีรูปร่างเป็นเส้นตรงและมีมวลโมเลกุล 1,000,000 สามารถผ่านเมมเบรนได้ภายใต้

สภาวะอย่างหนึ่ง เนื่องจากในกระบวนการผลิตนั้นไม่สามารถทำให้ขนาดรูพรุนของเมมเบรนนั้นสม่ำเสมอเท่ากันหมดและแต่ละบริษัทมีการผลิตที่แตกต่างกัน ดังนั้นการเลือกเมมเบรน ควรให้มีขนาดของ MW cut - off ต่ำกว่ามวลโมเลกุลของสารที่ต้องการมากกว่าตั้งแต่ 20% ขึ้นไป แต่ถ้าเลือกเมมเบรนที่มีขนาดรูพรุนเล็กเกินไปจะทำให้อัตราการกรองช้าและต้องใช้แรงดันมากเกินไปในการกรอง

2. **การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต**[16 b] การตกตะกอนโดยการเติมเกลือ (neutral salts) ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เป็นวิธีที่ใช้กันมากที่สุดสำหรับการตกตะกอนโปรตีนในเบื้องต้นและเรียกกระบวนการนี้ว่า fractionating precipitation โดยที่โปรตีนที่ตกตะกอนจะไม่เสียสภาพทางธรรมชาติและมีแอคติวิตีเหลืออยู่ การเติมเกลือจะช่วยรักษาเสถียรของโปรตีนจากการสูญเสียสภาพธรรมชาติ การย่อยสลายโปรตีนหรือการปนเปื้อนของแบคทีเรียได้ ดังนั้นขั้นตอน salting - out จะช่วยเก็บรักษาสารสกัดไว้ได้นานขึ้น การตกตะกอนโปรตีนด้วยวิธีนี้จะแตกต่างจากการตกตะกอนด้วยค่า pI โดยที่ salting - out จะขึ้นอยู่กับธรรมชาติความไม่ชอบน้ำ (hydrophobic nature) บนผิวหน้าของโมเลกุลโปรตีน ซึ่งกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำนี้จะอยู่ภายในโมเลกุลโปรตีน แต่บางครั้งจะพบบริเวณผิวหน้าของโปรตีนมีลักษณะเป็นหย่อมเล็กๆ (patches) จะทำให้โมเลกุลของน้ำสามารถเข้าจับกับกลุ่มเหล่านี้ได้ การเติมเกลือลงในระบบ จะทำให้ไอออนของเกลือไปดึงโมเลกุลน้ำออกจากโมเลกุลของโปรตีน ทำให้ความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้นและโมเลกุลของโปรตีนมีโอกาสจับกันเองมากขึ้น (aggregation) จนมีขนาดใหญ่ขึ้นหรือจุดที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic patches) จะรวมตัวกันและทำให้โปรตีนตกตะกอนลงมา ซึ่งจะมีโปรตีนหลายชนิดรวมกันอยู่เหมือนกับการตกตะกอนด้วยค่า pI แต่สภาพของสารสกัดที่ได้จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเกลือที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีนที่ต้องการศึกษา อย่างไรก็ตามการตกตะกอนโปรตีนด้วยวิธีนี้ควรกระทำที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อลดความเสี่ยงจากการสูญเสียสภาพธรรมชาติและการยับยั้งโดยโปรติเอส

ประสิทธิภาพของเกลือเรียงลำดับจาก ฟอสเฟต > ซัลเฟต > อะซิเตท > คลอไรด์ แต่ถึงแม้ว่าเกลือฟอสเฟต จะมีประสิทธิภาพดีกว่าซัลเฟตก็ตาม แต่ฟอสเฟตจะอยู่ในรูป HPO_4^{2-} และ $H_2PO_4^-$ ที่มีพีเอชเป็นกลาง และมีประสิทธิภาพค่อนข้างดีกว่าเมื่ออยู่ในรูป PO_4^{3-} ส่วนประสิทธิภาพของไอออนบวกของเกลือนั้น เรียงจาก $NH_4^+ > K^+ > Na^+$ ข้อสำคัญในการเลือกใช้เกลือได้แก่ เกลือจะต้องมีความบริสุทธิ์สูง ละลายน้ำได้ดีและสามารถเตรียมได้หลายความเข้มข้นตามความต้องการ นอกจากนี้ต้องไม่เสื่อมสภาพหรือเปลี่ยนแปลงการละลายได้ง่าย เนื่องมาจากการใช้ความร้อนในการละลายเกลือ และความหนาแน่นของเกลือจะต้องไม่แตกต่างกันระหว่างขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนหรือในสารละลายที่ได้จากการแยกด้วยเซนติฟิวจ์ ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้นนี้ทำให้เกลือโปแตสเซียมไม่เหมาะสมต่อการใช้งานดังกล่าว ดังนั้นจึงนิยมใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เนื่องจากราคาถูกและละลายน้ำได้ดีมาก ซึ่งมีความเข้มข้นสูงสุดเมื่อละลายในน้ำบริสุทธิ์ประมาณ 4 M และมีความ

หนาแน่นของสารละลายอิ่มตัวเท่ากับ 1.235 กรัมต่อลบ.ซม. โดยที่ความเข้มข้นของสารละลายอิ่มตัว 75-100% จะมีความหนาแน่นมากกว่า 1.235 กรัมต่อลบ.ซม. ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ต้องใช้เติมเพื่อการตกตะกอนโปรตีนสามารถคำนวณได้จากความสัมพันธ์ดังต่อไปนี้

$$\text{น้ำหนักของแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม)} = \frac{533\ (S_2 - S_1)}{100 - 0.3\ S_2}$$

เมื่อ S_1 = % สารละลายอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตก่อนเติม

S_2 = % สารละลายอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตหลังจากเติมลงไปใหม่

โดยแอมโมเนียมซัลเฟต 761 กรัมในสารละลาย 1 ลิตร คิดเป็น 100% ของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว

แอมโมเนียมซัลเฟตจะทำให้สารสกัดที่ได้มีความเป็นกรดเล็กน้อย ดังนั้นจึงควรเติม 50 mM บัฟเฟอร์เพื่อรักษาพีเอชให้อยู่ในช่วง 6.0 - 7.5 แต่ถ้าพีเอชสูงกว่านี้สามารถใช้เกลือโซเดียมซิเตรทแทนได้ อย่างไรก็ตามแอมโมเนียมซัลเฟตบริสุทธิ์จะให้ประสิทธิภาพการตกตะกอนโปรตีนดีที่สุด ในกรณีที่เอนไซม์ที่ต้องการมีความไวต่อโลหะหนัก จะต้องเติม EDTA ลงในสารละลายบัฟเฟอร์ (ถ้าระดับของโลหะหนัก เท่ากับ 1 ในล้านส่วน และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 75% จะมีความเข้มข้นของโลหะหนักเท่ากับ 3 μM) การลดปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตจะทำให้ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น แต่โปรตีนที่ต้องการอาจจะไม่สามารถตกตะกอน แต่ถ้าหากเติมแอมโมเนียมซัลเฟตมากไป อาจจะทำให้ได้โปรตีนที่ไม่ต้องการปนกับโปรตีนที่ต้องการตกตะกอนและถูกแยกออกมาพร้อมกัน นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนประกอบภายในสารสกัดจะมีผลกระทบต่อการตกตะกอนของโปรตีนรวมทั้งความเข้มข้นของโปรตีนด้วย ซึ่งจะต้องมีการศึกษาก่อนเพื่อที่จะนำส่วนประกอบเหล่านี้ออกจากสารสกัดโดยกระทำในสภาวะเดิมด้วยวิธีการทำบริสุทธิ์ต่าง ๆ ในขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนนั้น การควบคุมอุณหภูมิมีความสำคัญ เนื่องจากอุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้สารละลายของโปรตีนลดลง นอกจากนี้การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตอย่างช้าๆ และกวนอย่างมีประสิทธิภาพก็มีความสำคัญเช่นกัน ทั้งนี้เพราะการกวนอย่างแรงทำให้เกิดฟองอากาศซึ่งเป็นเหตุให้โปรตีนเสียสภาพได้ ตะกอนโปรตีนที่ได้จะถูกแยกออกโดยการเซนติฟิวจ์ สำหรับกรณีที่ความหนาแน่นของโปรตีนที่ตกตะกอนใกล้เคียงหรือต่ำกว่าสารละลาย จะแยกตะกอนโดยใช้เซนติฟิวจ์ที่ 100,000 x g 1 นาที แต่อย่างไรก็ตามถ้าความเข้มข้นของเกลือมากขึ้น จะเซนติฟิวจ์แยกตะกอนโปรตีนออกมาที่ 10,000 x g 10 นาที หรือที่ 3,000 x g 35 นาที ตะกอนที่ได้ควรจะเก็บไว้ในบัฟเฟอร์ที่มีปริมาตร 1-2 เท่าของปริมาตรของตะกอน ในบางครั้งต้องเซนติฟิวจ์แยกแอมโมเนียมซัลเฟตที่ไม่ละลายหรือโปรตีนที่เสียสภาพออกมาจึงจะหาปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี Bradford ได้ การเลือกความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตจะต้องพิจารณา

ถึงผลผลิตและความบริสุทธิ์ของโปรตีนเป็นสำคัญ การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือนี้เมื่อใช้ความเข้มข้นของเกลือในช่วงแคบ จะทำให้ผลผลิตต่ำแต่มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น

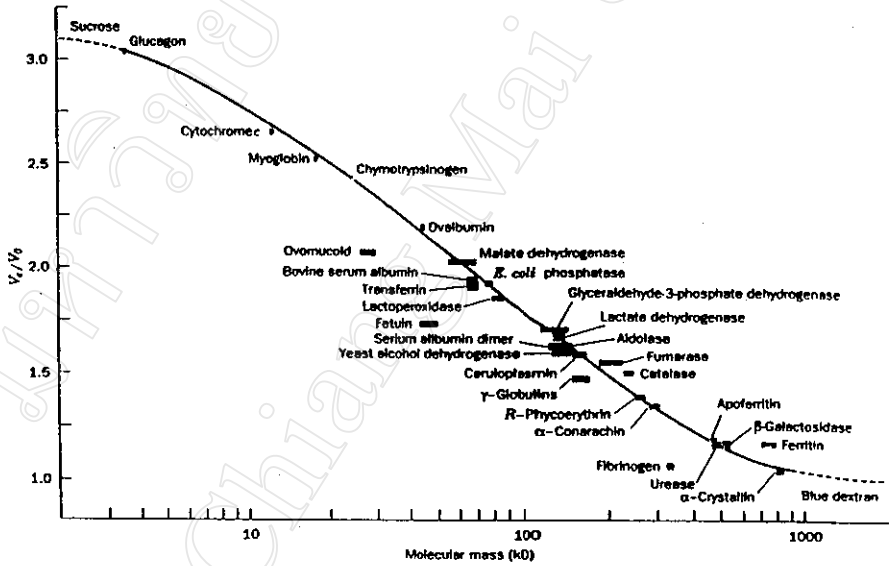
3. **ไดอะไลซีส** (dialysis) [26] ใช้แยกโมเลกุลที่มีขนาดโมเลกุลที่แตกต่างกัน โดยสารที่มีมวลโมเลกุลเล็กจะถูกแยกออกจากสารที่มีโมเลกุลใหญ่ได้ด้วยเมมเบรน semipermeable ที่มีขนาดของรูพรุนที่เล็กกว่าสารที่มีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่ เมื่อบรรจุสารผสมที่ต้องการแยกลงในถุงไดอะไลซีสที่มีเมมเบรนขนาดของ MW cut - off ที่ต้องการ จะทำให้สารมวลโมเลกุลเล็กกว่า MW cut - off เคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนออกจากถุงไดอะไลซีส วัสดุที่ใช้ทำเมมเบรนมีหลายชนิดและส่วนมากนิยมใช้ Cellulose acetate

4. **โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน** (Ion Exchange Chromatography) [27] ใช้หลักการของการแลกเปลี่ยนสารที่มีประจุระหว่างตัวแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchanger) กับสารตัวอย่างที่มีประจุ และจะถูกแยกออกจากกันโดยสารละลายตัวกลาง เช่น การแยกโปรตีนชนิดหนึ่ง (B^-) ออกจากโปรตีนอื่น ๆ โดยใช้ตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ (R^+) ที่แช่อยู่ในสารละลายตัวกลาง (A^-) เมื่อแยกโปรตีนด้วยคอลัมน์หรือในภาชนะแบบแบทช์ของ R^+ จะเกิดการแลกเปลี่ยนประจุด้วยสมการ $R^+A^- + B^- \leftrightarrow R^+B^- + A^-$ นั่นคือโปรตีนที่มีประจุบวกไม่สามารถจับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุจึงทำให้เกิดการเคลื่อนตัวแยกออกไปพร้อมกับสารละลายตัวชะ ประจุสิทธิของโปรตีนอาจถูกปรับเปลี่ยนได้โดยการปรับพีเอชของสารละลาย ดังนั้นเมื่อเปลี่ยนพีเอชของสารละลายจนกระทั่งโปรตีนที่ต้องการมีประจุเปลี่ยนไปเป็นศูนย์หรือเป็นบวกเหมือนกับตัวแลกเปลี่ยนประจุ โปรตีนก็จะหลุดออกมาพร้อมกับสารละลายตัวชะและเก็บโปรตีนที่ต้องการได้ ในการชะโปรตีนทำได้อีกวิธีหนึ่ง ซึ่งใช้การเพิ่ม ionic strenght ของสารละลายที่ใช้ชะ

5. **เจลฟิลเตรชัน** (Gel filtration) [28] เป็นวิธีที่ใช้แยกสารตามขนาดโมเลกุลซึ่งต้องอาศัยตัวกลางที่มีสมบัติยอมให้สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็กผ่านรูพรุนของตัวกลางได้ ในขณะที่สารโมเลกุลใหญ่ผ่านเข้าไปไม่ได้เมื่อชะสารเหล่านี้ด้วยบัฟเฟอร์ สารที่โมเลกุลขนาดเล็กกว่าจะมีอัตราการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ที่มีตัวกลางเหล่านี้ได้ช้ากว่าสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ตัวกลางที่ใช้ได้แก่ dextran, polyacrylamide, agarose และตัวกลางที่เป็นสารผสมระหว่าง polyacrylamide กับ dextran ตัวกลางแต่ละชนิดมีขนาดรูพรุนแตกต่างกันจึงมีความสามารถในการแยกสารที่มีมวลโมเลกุลต่างกัน ตัวอย่างเช่น Sephadex ซึ่งเป็น dextran ที่ทำให้มีขนาดรูพรุนแตกต่างกัน และมีผลทำให้มีสมบัติแตกต่างกันดังปรากฏในตาราง 1.7 การทำเจลฟิลเตรชันสามารถใช้ประมาณค่ามวลโมเลกุลของโปรตีนที่ต้องการศึกษา โดยเทียบกับกราฟระหว่าง log MW ของโปรตีนมาตราฐานกับ V_e/V_o (รูป 1.5) โดย V_e คือ ปริมาตรการชะโปรตีนชนิดนั้นๆ ออกจากคอลัมน์และ V_o คือ ปริมาตรช่องว่างนอกเม็ดเจลซึ่งเท่ากับปริมาตรการชะ blue dextran ซึ่งเป็นสารที่มีมวลโมเลกุลสูงออกจากคอลัมน์ เมื่อต้องการ

ตาราง 1.7 ชนิดของ Sephadex และสมบัติที่ใช้ในการทำเจลฟิลเตรชัน[28]

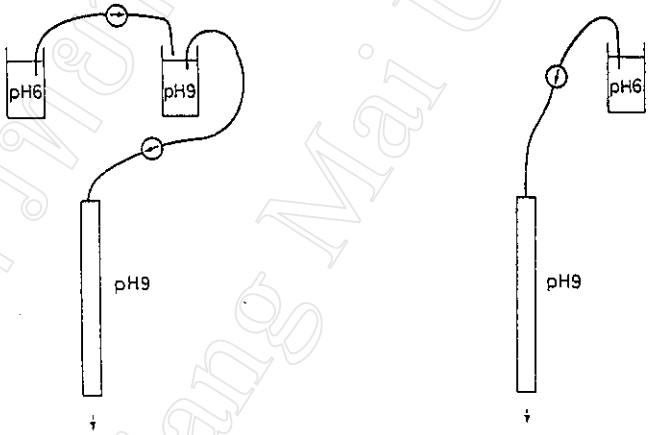
ชนิด	Fractionation Range for Proteins (daltons)	Water Regain (mL/g dry gel)	Bed Volume (mL/g dry gel)
Dextran (Sephadex)			
G-10	0-700	1.0 ± 0.1	2-3
G-15	0-1,500	1.5 ± 0.2	2.5-3.5
G-25	1,000-5,000	2.5 ± 0.2	4-6
G-50	1,500-30,000	5.0 ± 0.3	9-11
G-75	3,000-80,000	7.5 ± 0.5	12-15
G-100	4,000-150,000	10 ± 1.0	15-20
G-150	5,000-300,000	15 ± 1.5	20-30
G-200	5,000-600,000	20 ± 2.0	30-40



รูป 1.5 กราฟมาตรฐานมวลโมเลกุลโปรตีนที่ได้จากการทำเจลฟิลเตรชัน[29]

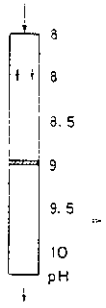
ทราบมวลโมเลกุลของโปรตีนที่ศึกษา ทำโดยผ่านโปรตีนชนิดนั้นลงในคอลัมน์ชนิดเดิมที่ผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐาน คำนวณหา V_e / V_o และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีนจะทำให้ทราบค่ามวลโมเลกุลโดยประมาณได้ การประมาณค่ามวลโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิลเตรชันนี้มีความแม่นยำในช่วง ± 26% ดังนั้นในการหามวลโมเลกุลของสารจึงต้องใช้วิธีอื่น ๆ เปรียบเทียบร่วมกันด้วย เช่น Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS - PAGE) เป็นต้น

6. **โครมาโตโฟคัสซิง** (Chromatofocusing) [16 c] เป็นเทคนิคทางโครมาโตกราฟีที่ใช้แยกโปรตีนตามค่าไอโซอิเลคตริก (isoelectric point) มีหลักการแยกสารคล้ายคลึงกับโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (รูป 1.6) สำหรับการแยกโดยโครมาโตโฟคัสซิงนั้น โปรตีนจะถูกจับไว้ในคอลัมน์ที่พีเอชเริ่มต้นและถูกชะออกโดยการค่อย ๆ เปลี่ยนพีเอช (pH gradient) ซึ่งเกิดจากการผสมระหว่างบัฟเฟอร์กำหนด (limit buffer) ของสารละลายที่มีพีเอชต่าง ๆ กับบัฟเฟอร์เริ่มต้น (initial buffer) การเปลี่ยนแปลงของพีเอชจะเกิดขึ้นในคอลัมน์ โดยการผสมระหว่างบัฟเฟอร์ในคอลัมน์ที่ค่าหนึ่งกับบัฟเฟอร์ที่เติมลงในคอลัมน์ดังแสดงในรูป 1.6 เมื่อต้องการแยกโปรตีนที่มี pI เท่ากับ 9 ออกจากโปรตีนอื่น ๆ ควรจะต้องทำให้บัฟเฟอร์ในคอลัมน์ต่ำกว่า 9 เช่น เริ่มต้นที่พีเอช 8 และชะด้วยบัฟเฟอร์พีเอชสูงกว่า 9 เช่นที่พีเอช 10 ดังนั้นเมื่อผ่านบัฟเฟอร์พีเอช 10 เพื่อชะโปรตีนที่ต้องการ โปรตีนจะเคลื่อนที่ลงพร้อมกับบัฟเฟอร์ซึ่งมีการเพิ่มขึ้นของพีเอชตามระยะทางเคลื่อนที่ลงในคอลัมน์ เมื่อโปรตีนเคลื่อนเข้าใกล้บริเวณที่พีเอชเท่ากับ pI ซึ่งเท่ากับ 9 โปรตีนจะถูกจับด้วย matrix ของคอลัมน์ ดังแสดงในรูป 1.7 เมื่อบัฟเฟอร์ชะผ่านคอลัมน์ต่อไป พีเอชของบัฟเฟอร์จะสูงขึ้น และทำให้



(ก) Ion Exchange (ข) Chromatofocusing

รูป 1.6 โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (ก) และโครมาโตโฟคัสซิง (ข)



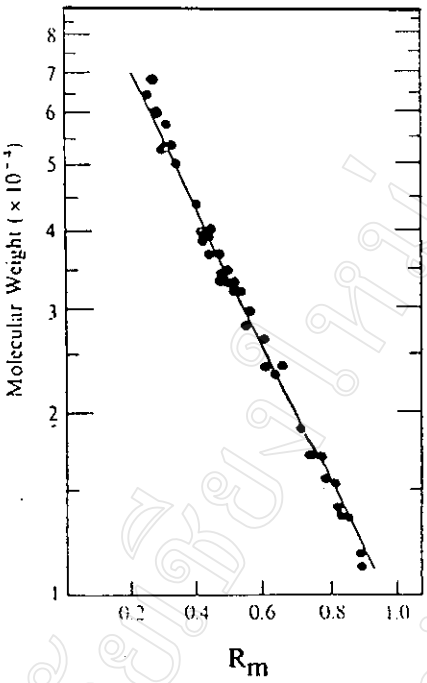
รูป 1.7 การเคลื่อนที่ของโปรตีนที่มีค่า pI เท่ากับ 9 โดยโครมาโตโฟคัสซิงในคอลัมน์ที่มีพีเอช 8-10

โปรตีนที่ถูกจับไว้มีประจุลบและหลุดออกจากเม็ดเจลเคลื่อนที่ลงมาพร้อมกับบัฟเฟอร์ที่พีเอชสูงกว่าค่า pI

7. **การตรวจสอบมวลโมเลกุลโดยวิธี SDS - PAGE** [16 d] SDS เป็นสารซักฟอกที่มีประจุลบ (anionic detergent) ละลายโปรตีนหลายชนิดได้ดี โปรตีนส่วนใหญ่จับกับ SDS ในอัตราส่วน 1.4 กรัมของ SDS ต่อ 1 กรัมโปรตีน ทำให้ประจุสุทธิต่อหน่วยมวลโปรตีนเป็นค่าคงที่โดยประมาณ ความเข้มข้นของ polyacrylamide gel ที่ใช้มีประสิทธิภาพในการแยกโปรตีนแตกต่างกัน ตัวอย่าง เช่น 5% gel จะแยกโปรตีนได้ในช่วง 20 - 350 kD ในขณะที่ 10% gel เหมาะสำหรับการแยกโปรตีนในช่วง 15 - 200 kD การใช้ SDS - PAGE แบบ gradient เหมาะสำหรับตัวอย่างที่มีโปรตีนหลายชนิดอยู่ในช่วง MW ที่กว้าง ตัวอย่างเช่น 3-30% gradient gel สามารถแยกโปรตีนที่มี MW ในช่วง 10 kD ถึงใกล้ 500 kD อย่างไรก็ตามเปปไทด์และโพลีเปปไทด์สายสั้น ๆ (< 10 kD) ไม่สามารถแยกด้วย SDS - PAGE ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าโดยสามารถแยกโปรตีนที่มี MW ต่างกัน 1% (ช่วง 1 - 100 kD) การใช้ 2-5% w/ v SDS และมี 0.1 M 2 - mercaptoethanol หรือ 20 mM dithiothreitol ผสมกับสารตัวอย่างและต้ม 3 - 5 นาที ทำให้ตัดพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีนได้ อย่างไรก็ตาม SDS-PAGE ไม่สามารถใช้กับโปรตีนที่ประกอบด้วยส่วนอื่นที่ไม่ใช่โปรตีน เช่น glycoproteins, phosphoproteins, lipoproteins, และ nucleoproteins ซึ่งสามารถจับกับ SDS ทำให้การเคลื่อนที่ผิดลักษณะและการแยกไม่เกิดขึ้น แต่สามารถใช้ borate buffer ช่วยป้องกันการจับของ glycoproteins กับ SDS โดยที่ไอออนของ borate จับกับหมู่ cis - hydroxyl ของน้ำตาล

SDS - PAGE เป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรตีนในระหว่างขั้นตอนการทำบริสุทธิ์และเป็นวิธีที่ใช้ศึกษาหามวลโมเลกุลของโปรตีนหรือหน่วยย่อย (subunit) ของโปรตีน ในการหามวลโมเลกุลของโปรตีนทำได้โดยใช้โปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุลแล้วมาทำ SDS - PAGE ควบคู่กับสารตัวอย่างที่ต้องการทราบมวลโมเลกุล เนื่องจากการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลต่างกันจะทำให้ระยะทางการเคลื่อนที่แตกต่างกันด้วย ระยะทางที่โปรตีนชนิดนั้นๆ เคลื่อนที่ต่อความยาวของเจลเรียกว่า Relative mobility (R_m) กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า R_m กับ log มวลโมเลกุลของสารซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นตรงในช่วงหนึ่งดังแสดงในรูป 1.8 ซึ่งสามารถใช้หามวลโมเลกุลของสารตัวอย่างได้ การหามวลโมเลกุลโดยวิธีนี้มีความแม่นยำประมาณ $\pm$ 5 - 10%

8. **ไอโซอิเลคตริกโฟคัสชิง** (Isoelectric focusing:IEF) [27] เป็นการพัฒนาระบบอิเลคโตรโฟริซีสในโพลีอคริลาไมด์แบบหนึ่ง โดยการเพิ่มเติม ampholytes เข้าไปในระบบ สารผสมนี้จะมีขนาดคละกันตั้งแต่ 300 - 600 D และมีลักษณะเป็น amphotheric โดยมีหมู่อะมิโนและหมู่



รูป 1.8 กราฟมาตรฐานของโมเลกุลโปรตีนจากการทำ SDS - PAGE [30]

คาร์บอกซิลอยู่ในโมเลกุลเดียวกันและมีค่า Isoelectric point อยู่ในช่วงหนึ่ง เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าลงไปจะทำให้เกิด pH gradient บนเจล ทั้งนี้เนื่องจาก ampholyte จัดเรียงตัวในเจลซึ่งจะจัดเรียงจากพีเอชต่ำทางด้านขั้วบวกไปสูงทางด้านขั้วลบ ดังนั้นเมื่อให้โปรตีนที่ต้องการแยกผ่านบนเจลไปในระบบนี้ โปรตีนก็จะเคลื่อนตัวไปสู่ขั้วที่ตรงกันข้ามกับประจุของมัน ขณะที่เคลื่อนที่ไปประจุของโปรตีนนี้ก็จะค่อย ๆ เปลี่ยนเข้าใกล้ศูนย์ เนื่องจากพีเอชของตัวกลางเปลี่ยนไปและโปรตีนจะมีประจุเป็นศูนย์เมื่อโมเลกุลเคลื่อนถึงตำแหน่งที่พีเอชของตัวกลางมีค่าเท่ากับ pI และหยุดเคลื่อนที่ ดังนั้นวิธีนี้จึงทำให้แยกโปรตีนออกจากกันตามค่า pI ของโปรตีนนั้น ๆ โดยทั่วไปจะไม่ใช้ IEF เพื่อการทำบริสุทธิ์โปรตีน แต่ใช้สำหรับบ่งบอกความบริสุทธิ์ของโปรตีนบริสุทธิ์ในขั้นตอนสุดท้าย เมื่อใช้เทคนิคนี้ควบคู่กับ SDS - PAGE จะทำให้บ่งบอกถึงความบริสุทธิ์ของโปรตีนได้ชัดเจนยิ่งขึ้น โดยที่ IEF บ่งบอกถึงลักษณะของประจุของโปรตีน แต่ SDS-PAGE จะบ่งบอกถึงขนาด (มวลโมเลกุล)

การทำบริสุทธิ์โปรติเอสนอกจากการใช้สมบัติทางฟิสิกส์และเคมีแล้ว อาจใช้ทางเทคนิคทาง affinity ร่วมกันโดยอาศัยคุณสมบัติทางด้าน specific catalytic และ functional proterties เช่น Substrate affinity, Inhibitor affinity และ Functional affinity chromatography เป็นต้น ตัวอย่างการทำบริสุทธิ์เทอร์โมไฟล์โปรติเอสที่ได้จาก *Thermus* สายพันธุ์ Rt4A2 ซึ่งผลิตโปรติเอสที่ส่งออกนอกเซลล์และทนทานต่อ chelator แยกได้จากปอน้ำร้อนใน Rotorua สหรัฐอเมริกา เมื่อนำโปรติเอสดิบมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 70% พบแอคติวิตีของโปรติเอสลดลง 19%

การทำโปรติเอสให้เข้มข้นขึ้น 9 เท่าด้วยอัลตราฟิลเตรชันและไดอะไลซีส แอคติวิตีลดลงเหลือร้อยละ 79 และมีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 1,467 มิลลิกรัม ทำให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3 เท่าจากขั้นตอนอัลตราฟิลเตรชันและไดอะไลซีส การนำสารละลายไดอะไลส์ผ่านคอลัมน์ S Sepharose cation - exchange ทำให้โปรติเอสที่ชะออกมาได้นั้น มีแอคติวิตีคิดเป็นร้อยละ 50 ของแอคติวิตีเริ่มต้นและมีความบริสุทธิ์เป็น 12 เท่า เมื่อกำจัดเกลือด้วยไดอะฟิลเตรชัน การนำโปรติเอสเข้มข้นหลังจากผ่านคอลัมน์ S Sepharose มาผ่านคอลัมน์ Superdex 200 ทำให้ได้โปรติเอสที่มีความบริสุทธิ์ 20 เท่า หลังจากนั้นเมื่อทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Mono P HR anion - exchange พบโปรติเอสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 30 เท่า โดยได้แอคติวิตีเหลืออยู่ 49% การตรวจสอบมวลโมเลกุลของโปรติเอสบริสุทธิ์ด้วย SDS - PAGE พบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวซึ่งมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 31.6 kD การตรวจสอบค่าpI ด้วยไอโซอิเลคตริกโฟคัสซิงมีค่า pI > 10.25 ซึ่งแสดงว่าโปรติเอสของ *Thermus* สายพันธุ์ Rt4A2 มีสมบัติเป็น Alkaline protease [31] ในขณะที่การทำบริสุทธิ์โปรติเอสจากเทอร์โมฟิลิค *Bacillus* และ *Thermus* ด้วยวิธี dye - ligand chromatography วิธีเดียว ทำให้ได้โปรติเอสมีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้นถึง 2,195 และ 115 เท่า ตามลำดับ[32] สำหรับโปรติเอสที่ผลิตจากเทอร์โมไฟล์อื่นๆ เช่น โปรติเอสจาก *Thermomonospora fusca* YX ได้ผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนโปรตีนและโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 39 เท่า และมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 17.1%[33] ส่วนโปรติเอสที่ผลิตจาก *Thermus caldophilus* GK 24 เมื่อทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนโปรตีน เจลฟิลเตรชันและโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน พบโปรติเอสมีความบริสุทธิ์ขึ้นประมาณ 6 เท่า และมีแอคติวิตีเหลือเพียง 24%[5] เป็นต้น

1.5 วัตถุประสงค์การวิจัย

ในการวิจัยนี้ได้เล็งเห็นถึงประโยชน์จากการใช้โปรติเอสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแทนการใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมีในอุตสาหกรรมต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรติเอสที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงซึ่งจะทำให้ได้โปรติเอสที่เสถียรและสามารถใช้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง ในการวิจัยนี้ได้เลือกแบคทีเรีย F13 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสได้แอคติวิตีใกล้เคียงกับ TLS 43 และสูงกว่า P2 ในการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ดังนี้

1) ศึกษาการผลิตโปรติเอสของแบคทีเรีย F13 เปรียบเทียบกับแบคทีเรีย TLS43 และ P2
2) ศึกษาการทำบริสุทธิ์โปรติเอสของเทอร์โมไฟล์ F13
3) ศึกษาสมบัติต่าง ๆ ได้แก่ อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมในการทำงาน ผลของตัวยับยั้งและไอออนโลหะต่อการทำงาน ความจำเพาะต่อสับสเตรทที่เป็นเอไมด์ เอสเทอร์และการไฮโดรไลส์โปรตีน มวลโมเลกุลและจุดไอโซอิเลคตริก

ทั้งนี้ เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาการใช้ประโยชน์จากโปรติเอสของแบคทีเรีย F13 ต่อไป

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University