บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

ในปัจจุบันโปรติเอสที่เสถียรต่ออุณหภูมิเป็นเอนไซม์ที่น่าสนใจสำหรับอุตสาหกรรมต่าง ๆ เนื่องจากสามารถช่วยเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิสูงซึ่งมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ดียิ่งขึ้นอีกส่วนหนึ่ง เทอร์โมไฟล์ F13, TLS43 และ P2 เป็นแบคทีเรียที่คัดเลือกจากบ่อน้ำร้อนฝาง เทพพนมและป่าแป๋ ตามลำดับ และสามารถผลิตโปรติเอสส่งออกนอกเซลล์ที่ 65°C ได้ดีกว่าแบคทีเรียที่คัดได้ทั้งหมดจากบ่อน้ำร้อนหนึ่ง ๆ [40] ผลการเปรียบเทียบการผลิตโปรติเอสของแบคทีเรียทั้งสาม พบว่า F13 และ TLS43 ให้ผลผลิตโปรติเอสใกล้เคียงกันและสูงกว่าแบคทีเรีย P2 การวิจัยครั้งนี้ได้เลือกใช้แบคทีเรีย F13 เพื่อศึกษาสมบัติของโปรติเอสนี้ ทั้งนี้เพื่อประโยชน์ในการประยุกต์ต่อไป

4.1 การผลิตโปรติเอสของแบคทีเรีย F13 TLS43 และ P2

การเลี้ยงแบคทีเรียเทอร์โมไฟล์ F13, TLS43 และ P2 ในอาหารเหลวที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 0.1% ในสารละลายเบสผสมพีเอช 7.2 พบว่า F13 และ TLS43 มีการเจริญเติบโตสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 เหมือนกันและใกล้เคียงกัน ในขณะที่ P2 เติบโตสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 และการเจริญเติบโตต่ำกว่า F13 1.4 เท่า (ตาราง 3.1) ส่วนการผลิตโปรติเอสนั้น เมื่อเปรียบเทียบกันพบว่าได้ผลในทำนองเดียวกัน คือ F13 และ TLS43 ผลิตโปรติเอสได้ใกล้เคียงกันและสูงกว่า P2 3.8-4.2 เท่า (ตาราง 3.1) ผลการทดลองหลาย ๆ ครั้ง ทำให้สรุปได้ว่า TLS43 และ F13 ผลิตโปรติเอสได้ในช่วง 500-600 UA/ลิตร แต่ P2 ผลิตโปรติเอสสูงสุดเพียง 138 UA/ลิตร เนื่องจากแบคทีเรีย F13 และ TLS43 สามารถผลิตโปรติเอสได้ใกล้เคียงกัน จึงได้ตรวจสอบแอคติวิตีของโปรติเอสโดยวิธีไฮโดรไลส์เคซีนเพื่อเปรียบเทียบอีกครั้ง และพบว่า TLS43 และ F13 ผลิตโปรติเอสได้ 9,700 และ 8,110 UC/ลิตร ตามลำดับ (ตาราง 3.3) ซึ่งจัดว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ใกล้เคียงกันเช่นเดิม ในการวิจัยนี้ได้เลือกศึกษาการผลิตและสมบัติของโปรติเอสจาก F13 ในขณะที่ TLS43 นั้นมีผู้อื่นที่ทำการวิจัยอยู่แล้ว

การตรวจสอบชนิดกรัมของแบคทีเรีย F13 โดยการย้อมสีด้วย crystal violet ติดสีน้ำเงิน-ม่วงของ crystal violet (รูป 3.5) ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรีย F13 เป็นแบคทีเรียกรัมบวก จากรูปถ่ายผ่านกล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีรูปร่างเป็นท่อน และมีความยาว 1.2-4 μm ซึ่งมีลักษณะเหมือนกับ *Bacillus* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรัมบวก ที่มีรูปร่างเป็นท่อนยาวขนาด 0.5-2.5 x 1.2-1.0 μm[41] ดังนั้นจึงคาด

ว่าแบคทีเรีย F13 จัดอยู่ในกลุ่ม *Bacillus* sp. ซึ่งแตกต่างจากแบคทีเรียจากโปรติเอส S2 ที่เป็นแบคทีเรียกรัมลบ[9]

4.2 การผลิตโปรติเอสโดยแบคทีเรีย F13

แบคทีเรีย F13 สามารถผลิตโปรติเอสส่งออกนอกเซลล์และผลการเลี้ยงในสารละลายอาหารที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 0.01-1% ในสารละลายเบสผสมซึ่งมี Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{3+} และ Titriplex I ที่พีเอช 7.2 พบว่าการเจริญเติบโตของ F13 ในอาหารเหลวที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 1.0% มีมากกว่าในอาหารที่มีส่วนประกอบทั้งสองอย่างละ 0.1 และ 0.01% ตามลำดับ (รูป 3.6) แสดงว่าการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย F13 แปรผันตามความเข้มข้นของสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทน สำหรับการผลิตโปรติเอสพบว่าในอาหารเหลวที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 0.01, 0.1 และ 1.0% ได้แอคติวิตีของโปรติเอสในการไฮโดรไลส์เอโซเคซีนสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12, 18 และ 6 ด้วยแอคติวิตี 260, 574 และ 152 UA/ลิตร ตามลำดับ (รูป 3.7) ในขณะที่แอคติวิตีของโปรติเอสต่อเคซีนพบว่าสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 12 เหมือนกัน โดยมีแอคติวิตีที่ 2,450, 3,958 และ 784 UC/ลิตร ตามลำดับ (รูป 3.8) ซึ่งจะเห็นได้ว่าต่ำกว่าผลผลิตโดย *Thermus* S2 (900 UA/ลิตร)[9], *Bacillus* sp. AK.1 (79,000 UA/ลิตร)[42], *Bacillus* sp. B18' (864,200 UC/ลิตร)[43], *B. stearothermophilus* (270,000 UA/ลิตร)[44], *Bacillus* sp. P-001A (65,000 UC/ลิตร)[45], *Thermus caldophilus* GK24 (139,000 UC/ลิตร), *T. aquaticus* T 351 (35,000 UC/ลิตร), *T. aquaticus* YT1 Aq. I และ Aq. II (114,000 และ 152,000 UC/ลิตร)[4] นั่นคือการเพิ่มความเข้มข้นของสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนในช่วง 0.01-1% ช่วยให้เชื้อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโตดีขึ้นตามลำดับของความเข้มข้น แต่ไม่สามารถทำให้ผลผลิตโปรติเอสได้มากขึ้นเป็นลำดับ และพบว่า F13 มีแอคติวิตีในการผลิตโปรติเอสสูงสุดเมื่อมีสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 0.1%

4.3 สมบัติของโปรติเอสจากแบคทีเรีย F13

การแยกโปรติเอสของแบคทีเรีย F13 ด้วยคอลัมน์ Sephadex G100-120 ขนาด 1.5x40 ซม. จำนวน 8 ครั้ง (ตาราง 3.9) พบโปรติเอสเพียงพีคเดียว โดยการแยกครั้งที่ 1-3 ใช้สารละลายโปรติเอสดิบ 0.1-0.2 ลบ.ซม. ในขณะที่การแยกครั้งที่ 4-8 นั้น ใช้สารละลายโปรติเอสดิบในปริมาณมากขึ้นเป็น 1-5 ลบ.ซม. พบว่าพีคที่ได้จากกราฟระหว่างปริมาตรที่ชะกับแอคติวิตีของโปรติเอสทุกครั้งมีลักษณะคล้ายรูปที่ 3.11 และ 3.12 ซึ่งมีส่วนปลายพีคของแอคติวิตีที่ซ้อนกับพีคโปรตีนค่อนข้างมาก ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุที่ทำให้แอคติวิตีจำเพาะส่วนมากไม่สูงขึ้น

การตรวจสอบสมบัติต่าง ๆ ของสารละลายโปรติเอสจากแบคทีเรีย F13 ที่ได้จากการแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G100-120 เช่น อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสม ผลของตัวยับยั้ง ผลของไอออน ความจำเพาะต่อสับสเตรทที่เป็นเอไมด์ เอสเทอร์และการไฮโดรไลส์โปรตีนด้วยวิธี TNBS ได้สรุปไว้ในตาราง 4.1 ซึ่งแสดงว่าโปรติเอสของแบคทีเรีย F13 มีแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 80°C และพีเอช 9.0 (รูป 3.16) นั่นคือโปรติเอสจากแบคทีเรีย F13 มีสมบัติเป็นอัลคาไลน์โปรติเอส (alkaline protease) เช่นเดียวกับโปรติเอสจากเทอร์โมไฟล์ เช่น *B. stearothermophilus* AP-4[46], *B. pumilus* Y sub(1)[47] และ *Bacillus* sp. JP 395[48] ซึ่งมีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 9.0 และ 50-65°C ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลของตัวยับยั้งพบว่า bestatin และ Iodoacetic acid ไม่มีผลยับยั้งการทำงานของโปรติเอสจากแบคทีเรีย F13 แสดงว่าไม่ใช่ Exopeptidase และ cystein protease ในขณะที่ leupeptin, 1,10-phenanthroline, amastatin และ phosphoramidon ในปริมาณ 0.001-10 mM มีผลทำให้โปรติเอสทำงานลดลงเพียง 20% (ตาราง 3.20) แต่โปรติเอสชนิดนี้ถูกยับยั้งการทำงานมาก (79%) เมื่อมีตัวยับยั้ง EDTA และ PMSF (ตาราง 3.20) โดยเฉพาะเมื่อมี PMSF 10 mM อยู่ในปฏิกิริยา พบว่าแอคติวิตีลดลงถึง 98% การที่ EDTA และ PMSF สามารถยับยั้งการทำงานของโปรติเอสได้แสดงว่าโปรติเอสของแบคทีเรีย F13 มีสมบัติเป็น metalloprotease และ serine protease ทั้งนี้เนื่องจาก EDTA สามารถที่จะเข้าไปจับพวกไอออนโลหะที่อยู่บนโมเลกุลของ metallo-protease ในขณะที่ PMSF สามารถจับกับหมู่ไฮดรอกซีลของกรดอะมิโน serine ที่บริเวณเร่งในโมเลกุลของ serine protease ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าแบคทีเรีย F13 ผลิตโปรติเอสจำพวก metallo และ serine protease เช่นเดียวกับโปรติเอสจาก *B. stearothermophilus* AP-4 ซึ่งเมื่อมี EDTA และ PMSF 10-20 mM พบแอคติวิตีเหลืออยู่ในช่วง 4-10% และ 2.3-19% ตามลำดับ[46] ในขณะที่โปรติเอสจาก *B. thermoruber* จะมีแอคติวิตีเหลืออยู่เพียง 10% เมื่อมี EDTA 1 mM อยู่ในปฏิกิริยา [49] และ *Sterptomyces* sp. YSA-130 มีแอคติวิตีของโปรติเอสลดลง 69% เมื่อมี PMSF 1 mM และถูกยับยั้งการทำงานทั้งหมดโดย PMSF ที่ความเข้มข้น 10 mM[50]

การทดสอบผลของไอออนโลหะ (ตาราง 3.23) พบว่า Mg^{2+} 1-10 mM ไม่มีผลต่อการทำงานของโปรติเอส ในขณะที่ Ca^{2+} ที่ความเข้มข้น 1-10 mM มีผลทำให้แอคติวิตีโปรติเอสลดลง 2-15% แต่ Fe^{3+} และ Mn^{2+} 1 mM ช่วยให้แอคติวิตีเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Fe^{3+} เป็น 5-10 mM โปรติเอสจะทำงานลดลงกว่า 50% และในทำนองเดียวกันเมื่อมีความเข้มข้นของ Mn^{2+} 5-10 mM พบแอคติวิตีเหลืออยู่ 80-68% ในขณะที่ Cu^{2+} 1-10 mM โปรติเอสจะทำงานลดลงกว่า 50% แอคติวิตีลดลงเหลือ 69-17% และโดยเฉพาะอย่างยิ่ง Co^{2+} และ Zn^{2+} มีผลยับยั้งแอคติวิตีจนหมดสิ้น เมื่อใช้ความเข้มข้น 10 mM ทำนองเดียวกับ *Lactobacillus brevis* ซึ่งแอคติวิตีถูก

ยับยั้งโดย Co^{2+} และ Zn^{2+}[21]

ตาราง 4.1 สมบัติต่าง ๆ ของโปรติเอสที่แยกได้จากคอลัมน์ Sephadex G100-120

สมบัติ	โปรติเอสของ F13
อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)	80
พีเอชที่เหมาะสม	9.0
ผลของตัวยับยั้ง(แอคติวิตีที่ปรากฏเมื่อเทียบกับไม่มีตัวยับยั้ง)	
Bestatin (0.1-1 mM)	ไม่เปลี่ยนแปลง
Iodoacetic acid (0.01-1 mM)	ไม่เปลี่ยนแปลง
Leupeptin (0.01-1 mM)	ลดลง (19%)
1,10-Phenanthroline ((0.1-10 mM)	ลดลง (21%)
Amastatin (0.001-0.01 mM)	ลดลง (20%)
Phosphoramidon (0.1-1 mM)	ลดลง (24%)
EDTA (0.1-10 mM)	ลดลงมาก (79%)
PMSF (0.1-10 mM)	ลดลงมาก (98%)
ผลของไอออน (แอคติวิตีที่ปรากฏเมื่อเทียบกับไม่มีไอออน)	
Mg^{2+} (1-10 mM)	ไม่เปลี่ยนแปลง
Ca^{2+} (10 mM)	ลดลง (15%)
Mn^{2+} (10 mM)	ลดลง (32%)
Fe^{3+} (10 mM)	ลดลงมาก (58%)
Cu^{2+} (10 mM)	ลดลงมาก (83%)
Zn^{2+} และ Co^{2+} (10 mM)	0
ความจำเพาะต่อเอไมด์	
BAPNA และ FAGLA	0
ความจำเพาะต่อเอสเทอร์	
ATEE, ATpEE, BAEE, PME และ TAME	0
การไฮโดรไลส์โปรตีน	
(ก = เอโซเคซีน, ข = เคซีน, ค = ฮีโมโกลบิน, ง = เจลาติน, จ =โปรตีนจากถั่วเหลืองและ ฉ = นมพร่องมันเนย)	ก > ฉ > ง > จ > ข > ค

การไฮโดรไลส์สับสเตรทที่เป็นเอไมด์ เช่น BAPNA และ FAGLA เปรียบเทียบกับโปรติเอสจากแบคทีเรีย S2, Alcalase, Metalloprotease type IX และทริปซิน พบว่าโปรติเอสของแบคทีเรีย F13, Alcalase และ Metalloprotease type IX ไม่สามารถไฮโดรไลส์สับสเตรท BAPNA ได้ ในขณะที่ทริปซินสามารถทำได้ด้วยอะมิเดสแอคติวิตีเท่ากับ 0.2 UAm (BAPNA)/ลบ.ซม. และเมื่อทดสอบการไฮโดรไลส์ FAGLA พบว่าโปรติเอสของแบคทีเรีย F13 ไม่สามารถไฮโดรไลส์ FAGLA ได้เช่นเดียวกับโปรติเอสจาก *Bacillus* sp. EA 1 และ OK 3A.1[61] ซึ่งต่างจาก Alcalase และ Metalloprotease type IX ซึ่งมีอะมิเดสแอคติวิตีต่อ FAGLA[10] จากการทดสอบด้วยตัวยับยั้งแสดงว่าโปรติเอสของแบคทีเรีย F13 เป็น metalloprotease แต่เมื่อทดสอบอะมิเดสแอคติวิตีในการไฮโดรไลส์ FAGLA ซึ่งเป็นสับสเตรทที่ metalloprotease สามารถไฮโดรไลส์ได้ พบว่าโปรติเอสของแบคทีเรีย F13 ไม่สามารถสลาย FAGLA ได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโปรติเอสของ F13 ที่เตรียมได้ยังมีแอคติวิตีไม่เพียงพอในการไฮโดรไลส์สับสเตรท FAGLA

การศึกษาการไฮโดรไลส์เอสเทอร์ 5 ชนิด ได้แก่ ATEE, ATpEE, BAEE, PME และ TAME เปรียบเทียบกับ Metalloprotease type IX, Alcalase และโปรติเอสจากแบคทีเรีย S2 (1 UA เท่ากัน) พบว่า Metalloprotease type IX และโปรติเอสของแบคทีเรีย F13 ไม่สามารถไฮโดรไลส์เอสเทอร์ทั้งห้าชนิด ในขณะที่ Alcalase จะมีแอคติวิตีต่อ BAEE ส่วนโปรติเอสจากแบคทีเรีย S2 นั้นสามารถไฮโดรไลส์เอสเทอร์ได้ทั้งห้าชนิด[10] เมื่อพิจารณาผลการทดสอบทั้งหมดพอสรุปได้ว่าโปรติเอสของแบคทีเรีย F13 เป็น Metalloprotease ที่ไม่ใช่ serine protease เนื่องจาก serine protease เช่น ทริปซิน สามารถไฮโดรไลส์ได้ทั้งพันธะเอไมด์ของ BAPNA และ FAGLA และพันธะเอสเทอร์ของ ATEE, ATpEE และ BAEE นอกจากนี้สมบัติการถูกยับยั้งแอคติวิตีของโปรติเอสด้วย EDTA เป็นข้อสนับสนุนในการสรุปว่าโปรติเอสของแบคทีเรีย F13 เป็น Metalloprotease และเนื่องจากมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่ 9.0 จึงจัดเป็นโปรติเอสในกลุ่ม alkaline metalloprotease เช่นเดียวกับ *Bacillus thermoruber* ซึ่งถูกยับยั้งการทำงานของโปรติเอส 90% เมื่อมี EDTA 1 mM [49] และ *B. stearothermophilus* AP-4 เมื่อมี EDTA ในปริมาณ 20 mM แอคติวิตีลดลงเหลือเพียง 4%[46] ในขณะที่มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากันคือ 9.0 ดังนั้นโปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียทั้งสองชนิดจึงมีสมบัติเป็น alkaline metalloprotease

ความสามารถในการไฮโดรไลส์โปรตีนโดยวิธี TNBS ของโปรติเอสจากแบคทีเรีย F13 ที่แยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G100-120 เปรียบเทียบกับโปรติเอสดิบของ F13 และ Alcalase โดยใช้เอโซเคซีน เคซีน ฮีโมโกลบิน เจลาติน โปรตีนจากถั่วเหลืองและนมพร่องมันเนยเป็นสับสเตรท

(ตาราง 3.29) พบว่าโปรติเอสดิบและโปรติเอสที่แยกได้จากคอลัมน์ของ Sephadex G100-120 สามารถไฮโดรไลส์เอโซเคซีนได้ดีที่สุด รองลงมาคือ นมพร่องมันเนย เจลาติน โปรตีนจากถั่วเหลือง เคซีนและฮีโมโกลบิน โดยมี % DH อยู่ในช่วง 6.46-0.46% และ 6.46-0.35% ตามลำดับ ส่วน Alcalase นั้นพบว่าสามารถไฮโดรไลส์โปรตีนจากเอโซเคซีนได้ดีที่สุด รองลงมาคือ เจลาติน นมพร่องมันเนย โปรตีนจากถั่วเหลือง เคซีน และฮีโมโกลบิน โดยที่มี % DH อยู่ในช่วง 13.78-2.29% แต่จากรายงานของบริษัท Novo ได้แสดงไว้ว่า Alcalase สามารถไฮโดรไลส์โปรตีนจากเคซีนได้ดีกว่าโปรตีนจากกากถั่วเหลืองและเจลาติน[24] ตามลำดับ ความแตกต่างของลำดับของประสิทธิภาพการไฮโดรไลส์โปรตีนด้วย Alcalase นี้ อาจเนื่องมาจากการใช้อัตราส่วนของ Alcalase ต่อโปรตีนแตกต่างกัน และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการไฮโดรไลส์โปรตีนต่าง ๆ กันระหว่างโปรติเอสจากแบคทีเรีย F13 และแบคทีเรีย S2 จะเห็นว่าโปรติเอสของแบคทีเรีย F13 สามารถไฮโดรไลส์เอโซเคซีนได้ดีที่สุด ในขณะที่โปรติเอสของแบคทีเรีย S2 ไฮโดรไลส์เคซีนได้สูงที่สุด[9] นั่นคือโปรติเอสจากแบคทีเรียทั้งสองมีความจำเพาะต่อพันธะเปปไทด์แตกต่างกัน

4.4 การทำบริสุทธิ์โปรติเอส

ผลการศึกษาการผลิตโปรติเอสส่งออกนอกเซลล์ของแบคทีเรีย F13 ทำให้เลือกเตรียมสารละลาย**โปรติเอสดิบ** โดยการเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่ให้แอคติวิตีโปรติเอสสูงที่สุด ซึ่งประกอบด้วยสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 0.1% ในสารละลายเบสผสม พีเอช 7.2 การทำบริสุทธิ์โปรติเอสเริ่มต้นจากการเตรียมผง**โปรติเอสดิบ** โดยไลโอฟิไลเซชัน ทำให้ได้ผงโปรติเอสดิบ 3.98 กรัม จากสารละลายโปรติเอสดิบ 1 ลิตร ซึ่งมีแอคติวิตีทั้งหมด 520 UA และมีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 13.9 มิลลิกรัม การทำไดอะไลซีสโดยแบ่งผงโปรติเอสดิบ 1 กรัม ละลายใน 0.02 M Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 10 ลบ.ซม. ทำให้ได้สารละลายที่มีแอคติวิตี 123.5 UA และปริมาณโปรตีนทั้งหมด 0.38 มิลลิกรัม การแยกและทำบริสุทธิ์เบื้องต้นโปรติเอสจากแบคทีเรีย F13 ด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100-120 8 ครั้ง ในแต่ละครั้งพบโปรติเอสเพียงชนิดเดียว ซึ่งการแยกครั้งที่ 1-3 ใช้สารละลายโปรติเอสดิบ 0.10-0.20 ลบ.ซม. พบว่ามีความบริสุทธิ์อยู่ในช่วง 1.04-1.07 เท่า ซึ่งแสดงว่าโปรติเอสที่แยกได้นั้นแทบจะยังไม่ถูกแยกจากโปรตีนทั้งหมด ส่วนการแยกในครั้งที่ 4-8 ใช้สารละลายโปรติเอสดิบมากขึ้นเป็น 0.50-5.00 ลบ.ซม. ทำให้ได้พีคโปรติเอสค่อนข้างกว้างเมื่อตรวจสอบปริมาณโปรตีนและแอคติวิตี พบว่าได้อัตราส่วนของโปรติเอสต่อโปรตีนที่ไม่เพิ่มขึ้นและในการเก็บสารละลายโปรติเอสนั้น มีการเลือกเก็บแตกต่างกัน เนื่องจากพีคโปรติเอสแต่ละครั้งมีความแตกต่างกันเล็กน้อย และส่งผลให้ไม่สามารถคำนวณร้อยละของผลผลิตให้ถูกต้องในกรณีที่ไม่ได้เก็บสารละลายในส่วนที่มีพีคของโปรติเอสทั้งหมด

ในการแยกและทำบริสุทธิ์โปรติเอสด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 นั้น เพื่อต้องการแยกโปรติเอสให้มีความบริสุทธิ์มากกว่าการใช้ Sephadex G 100-120 ผลการแยก 3 ครั้ง พบว่าการแยกครั้งที่ 1 และ 2 ซึ่งเริ่มจากสารละลายไดอะไลส์โปรติเอส 16.8 UA พบโปรติเอสเพียงพีคเดียว ซึ่งมีผลผลิตเท่ากับ 79.58 และ 48.44% ตามลำดับ แต่การแยกครั้งที่ 3 ใช้สารละลายไดอะไลส์เท่ากับ 2 UA พบโปรติเอส 6 พีค (รูป 3.13 และตาราง 3.14) แต่เนื่องจากพีค IV-VI มีแอคติวิตีและปริมาณโปรตีนต่ำมาก ซึ่งไม่เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ จึงได้ศึกษาเฉพาะโปรติเอส I-III ซึ่งคิดเป็นผลผลิตร้อยละ 15.10, 52.15 และ 4.95 และมีความบริสุทธิ์เป็น 2.43, 7.47 และ 1.27 เท่า ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบมวลโมเลกุลของโปรติเอสของแบคทีเรีย F13 ที่ได้จากการแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล พบว่าโปรติเอส I-III มีมวลโมเลกุลประมาณ 55,000, 27,000 และ 16,000 ดาลตัน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับโปรติเอสที่เสถียรต่ออุณหภูมิจากแหล่งอื่น ๆ พบว่าโปรติเอส II มีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกับโปรติเอสจาก *Thermoactinomyces vulgaris* ซึ่งมีมวลโมเลกุล 28,400 ดาลตัน และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานที่ 85°C[3] ส่วนโปรติเอส III นั้นมีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกับโปรติเอสที่ได้จาก *Thermomonospora fusca* YX ซึ่งมีมวลโมเลกุล 14,500 ดาลตัน และมีแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 80°C[3] การตรวจสอบมวลโมเลกุลของโปรติเอสจากแบคทีเรีย F13 ด้วย SDS-PAGE นั้น ใช้สารละลายโปรติเอส I และ II ที่ได้มาจากการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 ครั้งที่ 3 ส่วนโปรติเอส III นั้น มีโปรตีนไม่เพียงพอสำหรับการตรวจสอบมวลโมเลกุล จึงได้ศึกษาเฉพาะโปรติเอส I และ II เท่านั้น และได้ผลดังรูป 3.24 เมื่อเปรียบเทียบมวลโมเลกุลของโปรติเอสทั้งสองชนิดกับโปรตีนมาตรฐานพบว่าโปรติเอส I ให้แถบโปรตีน 3 แถบ แต่มีแถบที่ 1 ซึ่งมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 48,000 ดาลตัน ปรากฏเป็นแถบสีที่ชัดเจนที่สุด ในขณะที่โปรติเอส II พบแถบโปรตีน 3 แถบ เช่นเดียวกัน แต่มีแถบที่ 2 ซึ่งมีมวลโมเลกุล 29,000 ดาลตัน เป็นแถบที่ปรากฏชัดเจนกว่าแถบอื่น เมื่อเปรียบเทียบผลการตรวจสอบมวลโมเลกุลด้วยเจลฟิลเตรชันกับ SDS-PAGE คาดว่าโปรติเอส 3 ชนิดที่แบคทีเรีย F13 ผลิตขึ้นนั้น มีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 55,000-46,000, 29,000-27,000 และ 16,000 ดาลตัน (ตาราง 4.2)

การตรวจสอบค่า pI ด้วยวิธีไอโซอิเลคตริกโฟคัสซิงของโปรติเอสจากแบคทีเรีย F13 ที่แยกได้จากคอลัมน์ Sephadex G100-120 (ครั้งที่ 7) พบแถบโปรตีน 3 แถบ (รูป 3.28) เมื่อเทียบกับกราฟมาตรฐานของ pI พบว่าโปรตีน 3 แถบมี pI ที่ 6.2, 6.6 และ 8.4 เมื่อพิจารณาผลการทดสอบนี้ประกอบกับผลการแยกโปรติเอสของ F13 ด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100-120 ซึ่งมีพีคของโปรติเอสเพียงพีคเดียวและมีขนาดค่อนข้างใหญ่ (ปริมาตร 241 ลบ.ซม.) ทำให้คาดว่าพีคของโปรติเอสของแบคทีเรีย F13 ที่แยกโดยเจลฟิลเตรชันนั้น น่าจะมีโปรติเอสอยู่ 3 ชนิด ซึ่งมีค่า pI อยู่ในช่วง 6.2 ถึง 8.4

ตาราง 4.2 มวลโมเลกุลของโปรติเอสของแบคทีเรีย F13

วิธีหามวลโมเลกุล	โปรติเอสของแบคทีเรีย F13	มวลโมเลกุล (ดาลตัน)
Sephadex G-75	โปรติเอส I	55,000
	" II	27,000
	" III	16,000
SDS-PAGE	โปรติเอส I	48,000-46,000
	" II	29,000
	" III	16,000

การแยกและหาค่า pI ด้วยโครมาโตรโฟคัสซิง โดยใช้สารละลายโปรติเอสของแบคทีเรีย F13 ที่แยกได้จากคอลัมน์ Sephadex G-75 2 ครั้งแรก รวมกันและทำให้เข้มข้นด้วยอัลตราฟิลเตรชันนั้น เมื่อใช้โปรติเอสเริ่มต้นด้วยแอคติวิตี 20 UA ผ่านลงในคอลัมน์ polybuffer exchanger 94 และชะคอลัมน์ด้วย polybuffer 96 และตามด้วย polybuffer 74 พบโปรติเอส 3 ชนิด (รูป 3.28) ปรากฏที่พีเอช 7.5, 6.7 และ 6.3 โดยมีผลผลิตเหลืออยู่ร้อยละ 6.68, 0.97 และ 0.86 ตามลำดับ (ตาราง 3.36) ค่า pI ของโปรติเอส 3 ชนิด ที่แยกได้ด้วยโครมาโตรโฟคัสซิง มีค่าใกล้เคียงกับโปรติเอส 3 ชนิดที่แยกด้วยไอโซอิเลคตริกโฟคัสซิง (ตาราง 4.3) เมื่อเปรียบเทียบผลนี้กับการทำบริสุทธิ์โปรติเอสด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 ครั้งที่ 3 ซึ่งพบโปรติเอส 3 พีค (โปรติเอส I, II และ III) จึงคาดว่าโปรติเอสทั้งสามชนิดที่แยกด้วยไอโซอิเลคตริกโฟคัสซิง และโครมาโตรโฟกัสซิง น่าจะเป็นโปรติเอส 3 ชนิดที่แยกได้ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 ครั้งที่ 3

การทำบริสุทธิ์โปรติเอสของแบคทีเรีย F13 ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 ครั้งที่ 3 พบโปร-ติเอส I, II และ III ที่ทราบมวลโมเลกุลได้โดยเทคนิคเจลฟิลเตรชัน และ SDS-PAGE มี pI ในช่วง 6.2-8.4 แต่ไม่สามารถบ่งบอก pI ของโปรติเอสแต่ละชนิด เนื่องจากโปรติเอสที่แยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G 100-120 ทั้ง 8 ครั้ง และด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 2 ครั้งแรกนั้นมีพีคโปรติเอสเพียงพีคเดียว ซึ่งเมื่อนำไปตรวจด้วยไอโซอิเลคตริกโฟกัสซิงและโครมาโตรโฟคัสซิง จึงพบโปรติเอส 3 ชนิด ดังเช่นที่พบในการแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 ครั้งที่ 3 ซึ่งได้ใช้ปริมาณโปรติเอสดิบเริ่มต้นในปริมาณที่เหมาะสม จึงทำให้พบโปรติเอสบริสุทธิ์ทั้งหมด 6 ชนิด และมีเพียง 3 ชนิดที่มีปริมาณเพียงพอสำหรับการทดสอบต่างๆ ซึ่งคาดว่าโปรติเอสทั้งสามนี้ได้ปรากฏในการแยกและตรวจสอบด้วยไอโซอิเลคตริกโฟคัสซิงและโครมาโตรโฟคัสซิง แต่เนื่องจากสารตัวอย่างในการตรวจสอบค่า

pI ของโปรติเอสนั้นมิได้มาจากการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 ครั้งที่ 3 ทำให้ไม่สามารถสรุปค่า pI ของโปรติเอส I-III ได้ ส่วนอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมนั้น ได้ตรวจสอบด้วยโปรติเอสที่แยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G100-120 ซึ่งได้โปรติเอสเพียงพีคเดียว จึงทำให้อุณหภูมิที่เหมาะสม (80°C) และพีเอชที่เหมาะสม (9.0) นั้น เป็นสมบัติของโปรติเอส I-III (ตาราง 4.4)

ตาราง 4.3 pI ของโปรติเอสจากแบคทีเรีย F13 ซึ่งแยกด้วยไอโซอิเลคตริกโฟคัสซิง และโครมาโตรโฟคัสซิง

วิธี	pI ของโปรติเอส
ไอโซอิเลคตริกโฟคัสซิง	6.2
	6.6
	8.4
โครมาโตรโฟคัสซิง	6.3
	6.7
	7.5

ตาราง 4.4 สมบัติของโปรติเอสจากแบคทีเรีย F13 ที่แยกด้วยเจลฟิลเตรชัน (Sephadex G-75)

ชนิดโปรติเอส	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	% ผลผลิต	pI	MW (kd)		อุณหภูมิเหมาะสม (°C)	พีเอชที่เหมาะสม
				เจล-ฟิลเตรชัน	SDS-PAGE		
โปรติเอส I	2.43	15.10	6.2	55	48-46	> 80	9.0
โปรติเอส II	7.47	52.15	ถึง	27	29		
โปรติเอส III	1.27	4.95	8.4	16	16		

4.5 สรุปผลการทดลอง

เทอร์โมฟิลิคแบคทีเรีย F13 เป็นแบคทีเรียกรัมบวก มีรูปร่างเป็นท่อนและคาดว่าจะจัดอยู่ในกลุ่ม *Bacillus* sp. สามารถผลิตโปรติเอสได้สูงสุดเมื่อใช้อาหารที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 0.1% ในสารละลายเบสผสม พีเอช 7.2

การทำบริสุทธิ์โปรติเอสของแบคทีเรีย F13 ด้วยคอลัมน์ของ Sephadex G-75 ทำให้สามารถแยกโปรติเอสได้ 6 ชนิด แต่มีปริมาณเพียงพอสำหรับการศึกษาเพียง 3 ชนิด คือ โปรติเอส I, II และ III ซึ่งได้ความบริสุทธิ์เท่ากับ 2.43, 7.47 และ 1.27 เท่า และมีผลผลิตเหลืออยู่ 15.10, 52.15 และ 4.95% จากเจลฟิลเตรชันและ SDS-PAGE พบมวลโมเลกุลของโปรติเอสทั้งสามอยู่ในช่วง 55,000-46,000, 29,000-27,000 และ 16,000 ดาลตัน ตามลำดับ และพบค่า pI ที่ 6.2, 6.6 และ 8.4 ด้วยไอโซอิเลคตริกโฟคัสซิง

การทำบริสุทธิ์โปรติเอส พบความยุ่งยากในการทดลองค่อนข้างมาก เนื่องจากผลผลิตโปรติเอสที่ค่อนข้างต่ำมาก และการเลือกใช้ Sephadex G 100-120 ทำให้ไม่สามารถแยกโปรติเอส 3 ชนิดออกจากกันได้ดังเช่น Sephadex G-75 นั่นคือผลการศึกษาสมบัติของโปรติเอสนั้นได้จากแอคติวิตีของโปรติเอสทั้งสามชนิด ดังนั้นจึงควรแยกโปรติเอสทั้งสามด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 เพื่อให้ได้โปรติเอสที่บริสุทธิ์ก่อนการศึกษาสมบัติ

การศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของโปรติเอสจากแบคทีเรีย F13 พบว่าทำงานได้ดีที่สุดในสารละลายพีเอช 9 ที่อุณหภูมิ 80^{0}C และถูกยับยั้งการทำงานด้วย Co^{2+}, Zn^{2+}, EDTA และ PMSF แต่ต้องการ Fe^{3+} และ Mn^{2+} ในการเพิ่มแอคติวิตี ไม่มี amidase activity ต่อ BAPNA และ esterase activity ต่อ ATEE, ATpEE และ BAEE และสามารถไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์ของเอโซเคซีน > นมพร่องมันเนย > เจลาติน > โปรตีนจากถั่วเหลือง > เคซีน > ฮีโมโกลบิน จากสมบัติการถูกยับยั้งด้วยตัวยับยั้งโปรติเอสและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน ทำให้คาดว่าเป็นโปรติเอสสามชนิดของ F13 อยู่ในกลุ่ม alkaline, serine และ metalloprotease