



วิทยานิพนธ์

การทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

จาก *Bacillus* sp. A39

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ALKALINE
PROTEASE FROM *BACILLUS* SP. A39

นางสาวสิรินภา ช่วงโอภาส

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา

จุลชีววิทยา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส
จาก *Bacillus* sp. A39

Purification and Characterization of Alkaline Protease from *Bacillus* sp. A39

นามผู้วิจัย นางสาวสิรินภา ช่างโอภาส

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปทุมพร ฉิมเอนก, Dr.Eng.)

กรรมการ

(อาจารย์เสรี เจริญกิจมงคล, Dr.Agric.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อมรรัตน์ พรหมบุญ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ชัยวัฒน์ กิตติกุล, M.Sc.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อางคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 1 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2550

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. A39

Purification and Characterization of Alkaline Protease from *Bacillus* sp. A39

โดย

นางสาวสิรินภา ช่างโอภาส

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

พ.ศ. 2550

สรินภา ช่วงโอภาส 2550: การทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์
โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. A39 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) สาขาวิชา
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภาควิชาจุลชีววิทยา ปรธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์
ปทุมพร จิมเอนก, Dr.Eng. 121 หน้า

เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. A39 เป็นเอนไซม์ที่อยู่นอกเซลล์
ซึ่งการทดลองนี้ผลิตโดยวิธี constantly fed-batch culture ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BMSM ที่มี 2%
กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนและ 0.25% skim milk เป็นสารเหนียวและควบคุม pH ที่ 11.0
อุณหภูมิ 30°C ได้ crude enzyme 0.87 U/mg แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย 80%
(NH₄)₂SO₄ แล้วผ่านคอลัมน์ phenyl sepharose และต่อดัวยคอลัมน์ mono Q พบว่าได้เอนไซม์
บริสุทธิ์มีค่าความบริสุทธิ์เท่ากับ 66.88 เท่า และ yield เท่ากับ 3.52%

เมื่อนำเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้มาศึกษาคุณสมบัติต่างๆ พบว่ามวลโมเลกุลที่วิเคราะห์โดยวิธี
SDS-PAGE คือ 35 kDa และโดยวิธี gel filtration คือ 79 kDa ดังนั้นเอนไซม์นี้เป็น dimeric
enzyme และทำการยืนยันอีกครั้งด้วยวิธี MALDI-MS พบว่า monomer มีมวลโมเลกุล 26,964 Da
และ dimer มีมวลโมเลกุล 53,973 Da ในการวิจัยนี้ใช้เคซีนเป็นสับสเตรทในการวิเคราะห์กิจกรรม
ของเอนไซม์ เอนไซม์บริสุทธิ์มีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 11.0 และ 55°C ตามลำดับ โดย
มีความคงตัวในช่วง pH ที่กว้างคือ 7.0 ถึง 12.0 และความคงตัวที่อุณหภูมิ 30°C ถึง 40°C มีค่า
Km เท่ากับ 0.73 $\mu\text{mol/ml}$ และ Vmax เท่ากับ 10.71 $\mu\text{mol/ml.min}$ ตามลำดับ อีออนโลหะ Ca²⁺
และ Cu²⁺ กระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์อย่างเห็นได้ชัด เอนไซม์นี้จัดอยู่ในกลุ่ม metalloprotease
ซึ่งมี Ca²⁺ จำเป็นสำหรับบริเวณเร่งของเอนไซม์ เพราะถูกยับยั้งอย่างรุนแรงด้วย EDTA และ
EGTA เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์จาก *Bacillus* sp. A39 กับเอนไซม์ทางการค้า พบว่ามีค่ากิจกรรม
จำเพาะต่ำกว่า thermolysin 1.74 เท่า แต่สูงกว่า proteinase K 1.42 เท่า crude enzyme สามารถ
ประยุกต์ใช้ในการลอกกาวย sericin ส่วนใหญ่จากเส้นไหมไทยโดยสามารถลอกกาวยได้ประมาณ
27%

น.ส. สรินภา ช่วงโอภาส
ลายมือชื่อนิสิต

ปทุมพร จิมเอนก
ลายมือชื่อประธานกรรมการ

28 / พ.ค. / 50

Sirinapa Chungopast 2007: Purification and Characterization of Alkaline Protease from *Bacillus* sp. A39. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Assistant Professor Patoomporn Chim-anage, Dr.Eng. 121 pages.

An extracellular alkaline protease produced by *Bacillus* sp. A39 was grown by a laboratory constantly fed-batch fermentation. The BMSM medium was used for cultivation with 2% glucose and 0.25% skim milk as carbon source and inducible substrate, respectively. The cultivation was controlled at pH 11.0, 30°C, 300-550 rpm agitation and dissolved oxygen concentration of 70% air saturation. The crude enzyme of 0.87 U/mg was obtained. The enzyme was purified using 80% ammonium sulfate precipitation, phenyl sepharose column and mono Q column. The purified enzyme exhibited a 66.88 fold purification and yield of 3.52%

The molecular mass of the purified alkaline protease as revealed by SDS-PAGE was 35 kDa while the molecular mass was estimated to be 79 kDa on gel filtration therefore it is dimeric enzyme. Confirmation molecular mass by MALDI-MS was subsequently estimated to be 26,964 Da as monomer and 53,973 Da for dimer. In this experiment casein was used as the substrate for determination of enzyme activity. The enzyme exhibited pH and temperature optimal of 11.0 and 55°C, respectively. It was stable at a wide pH range of 7.0 to 12.0 and temperature between 30°C and 40°C. The K_m was 0.73 $\mu\text{mol/ml}$ and V_{max} was 10.71 $\mu\text{mol/ml.min}$. Metal ions as Ca^{2+} and Cu^{2+} activated alkaline protease activity. The alkaline protease from *Bacillus* sp. A39 was classified as metalloprotease which required Ca^{2+} for active site because the enzyme was strongly inhibited by EDTA and EGTA. When compared the specific activity with commercial proteolytic enzymes, alkaline protease from *Bacillus* sp. A39 showed 1.74 times lower than thermolysin but 1.42 times higher than proteinase K. Moreover, the crude enzyme could be applicable for removing most of sericin contents from Thai silk yarn with the yield of 27%.

Sirinapa chungopast

Student's signature

P. Chim

Thesis Advisor's signature

28 / may / 07

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.ปทุมพร นิเมอนก ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และแก้ไขปัญหามาตลอดจนให้คำแนะนำในเรื่องวิทยานิพนธ์ รวมทั้งการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณ ดร.เสรี เจริญกิจมงคล กรรมการสาขาวิชาเอก และ ผศ.ดร.อมรรัตน์ พรหมบุญ กรรมการสาขาวิชารอง ที่ได้ให้คำแนะนำ และช่วยเหลือเวลาที่มีปัญหาในงานวิจัย ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.สุนันทา รัตนโก ที่ได้ให้คำชี้แนะที่เป็นประโยชน์กับงานวิจัย และขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้ข้อคิดเห็นเพื่อความสะดวกสมบูรณ์ของวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณทุนวิจัยมหาบัณฑิตของสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปีพ.ศ. 2549 และสถาบันวิจัย และพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สวพ.มก.) ที่ได้ให้การสนับสนุนเงินทุนในการวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณศูนย์พันธุ์ชีวกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ภายใต้สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ให้ใช้เครื่องมือในการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และขอขอบคุณ พี่ เพื่อน น้อง และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาจุลชีววิทยา และชีวเคมี ที่ให้ความช่วยเหลือในการศึกษา และการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ น้องชาย และเพื่อนสนิท ของข้าพเจ้า ที่ส่งเสริมและสนับสนุน ตลอดจนเป็นกำลังใจที่ทำให้ข้าพเจ้าได้รับความสำเร็จครั้งนี้

สิรินภา ช่างโสภาส

มิถุนายน 2550

สารบัญ

หน้า

สารบัญ.....	(1)
สารบัญตาราง.....	(2)
สารบัญภาพ.....	(4)
คำนำ.....	1
วัตถุประสงค์.....	3
การตรวจเอกสาร.....	4
อุปกรณ์และวิธีการ.....	39
ผลและวิจารณ์.....	51
สรุป.....	82
ข้อเสนอแนะ.....	84
เอกสารและสิ่งอ้างอิง.....	85
ภาคผนวก.....	98
ประวัติการศึกษาและการทำงาน.....	120

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	สารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส.....8
2	สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส.....12
3	เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ใช้ในทางการค้า.....16
4	คุณสมบัติของ crude enzyme จากแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. A39.....22
5	บัฟเฟอร์ที่ใช้สำหรับโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ.....25
6	ชนิดของเจลฟิลเตรชัน โครมาโตกราฟีซึ่งมี cross-linked ต่างๆกัน.....28
7	กลุ่มสารที่ต้องการแยก และชนิดของลิแกนด์ที่จำเพาะกัน.....31
8	ความคงตัวของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสในสภาวะต่างๆซึ่งเก็บไว้ที่ 4°C นาน 1 เดือน.....52
9	การทำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก <i>Bacillus</i> sp. A39 ให้บริสุทธิ์.....58
10	มวลโมเลกุล, ระยะทาง และ relative mobility (R _f) ของโปรตีนมาตรฐานที่ได้ จากวิธี SDS-PAGE.....60
11	มวลโมเลกุล, Ve และ Kav ของโปรตีนมาตรฐานต่างๆที่ผ่านคอลัมน์ Sephacryl S-200.....63
12	ผลของออสโมลิตที่ความเข้มข้น 1 mM ต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส บริสุทธิ์จาก <i>Bacillus</i> sp. A39.....72
13	ผลของสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก <i>Bacillus</i> sp. A39.....75
14	กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก <i>Bacillus</i> sp. A39 ต่อสับสเตรท ที่แตกต่างกัน.....76
15	เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก <i>Bacillus</i> sp. A39 กับเอนไซม์ทางการค้า.....78
16	Initial velocity (V ₀) ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก <i>Bacillus</i> sp. A39 และ 1/V ที่ความเข้มข้นของเคซินที่แตกต่างกัน.....79
17	การลอกกาวยเส้นไหมดิบโดยเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก <i>Bacillus</i> sp. A39.....80

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่

ค1 การชั่งแอมโมเนียมซัลเฟต (g/l).....	115
ง1 การลอกกวาวของเส้นไหมดิบจากเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. A39.....	117
ง2 ความคงตัวของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสในสถานะต่างๆซึ่งเก็บไว้ที่ 4°C นาน 1 เดือน.....	118

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ภาพแสดงโครงสร้างของกรโคอะมิโน เมื่ออยู่ใน pH ที่เป็นกรด กลาง และด่าง.....	4
2 ภาพแสดงเอนไซม์ที่จับกับสับสเตรท.....	5
3 โครงสร้างของการแลกเปลี่ยนประจุบวก และประจุลบ.....	26
4 องค์ประกอบของเฟสคงที่เป็นกลุ่มที่ไม่มีขั้วขนาดเล็กเช่น (butyl, octyl or phenyl) ซึ่งจะยึดเกาะกับโพลิเมอร์ที่ชอบน้ำเช่น cross-linked dextran หรือ agarose.....	27
5 การแยกสารโมเลกุลใหญ่ และโมเลกุลเล็กในคอลัมน์เจลฟิลเตรชัน.....	29
6 กราฟของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก <i>Bacillus</i> sp. A39 โดยโพลิดโปรตีน 22.32 mg ผ่านเครื่อง FPLC ซึ่งใช้คอลัมน์ Phenyl Sepharose 6 Fast flow (high sub) ทำ Stepwise ด้วย 50 mM glycine-NaOH buffer pH 11.0 ที่มีเกลือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ตั้งแต่ 1M ถึง 0M ที่อัตราการ ไหล 60 ml/h เก็บ fractions 2.5 ml.....	55
7 กราฟของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก <i>Bacillus</i> sp. A39 โดยโพลิดโปรตีน 11.16 mg ผ่านเครื่อง FPLC ซึ่งใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5 (0.5 x 5 cm.) ทำ gradient ชะด้วย 20 mM Tris-HCl buffer pH11.0 ตั้งแต่ 0 ถึง 0.5 M NaCl อัตราการไหล 12 ml/h เก็บ fractions 1 ml.....	57
8 SDS-PAGE ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก <i>Bacillus</i> sp. A39 lane 1: โปรตีนมาตรฐาน, lane 2: โปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ Mono Q (15.4 μg), lane 3: โปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ Phenyl sepharose (9.3 μg), lane 4: โปรตีนที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (27.9 μg) และ lane 5: โปรตีนของ crude enzyme (40 μg).....	59
9 การหามวลโมเลกุลของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก <i>Bacillus</i> sp. A39 โดยวิธี SDS-PAGE.....	61
10 การหามวลโมเลกุลของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก <i>Bacillus</i> sp. A39 โดยผ่านคอลัมน์ Sephacryl S-200.....	63
11 แสดงมวลโมเลกุลของ monomer ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์ จาก <i>Bacillus</i> sp. A39 โดยเครื่อง MALDI-MS.....	64

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
12 แสดงมวลโมเลกุลของ dimer ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส จาก <i>Bacillus</i> sp. A39 โดยเครื่อง MALDI-MS.....	65
13 ผลของอุณหภูมิต่อค่า relative activity (%) ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์ จาก <i>Bacillus</i> sp. A39.....	66
14 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก <i>Bacillus</i> sp. A39.....	68
15 ผลของ pH ต่อ relative activity (%) ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์ จาก <i>Bacillus</i> sp. A39.....	69
16 ผลของ pH ต่อความคงตัวของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก <i>Bacillus</i> sp. A39.....	70
17 ผลของ Ca^{2+} ต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์ จาก <i>Bacillus</i> sp. A39.....	73
18 ผลของ Cu^{2+} ต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์ จาก <i>Bacillus</i> sp. A39.....	73
19 กราฟ Lineweaver-Burk ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก <i>Bacillus</i> sp. A39.....	79
20 การเปรียบเทียบการลอกกาว sericin จากเส้นไหมดิบด้วยน้ำกลั่น, 50 mM Glycine-NaOH buffer, crude enzyme (ที่ความเจือจาง 1:20) and crude enzyme.....	81
ภาพผนวกที่	
ข1 กราฟมาตรฐานของไทโรซีน.....	113
ข2 กราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumin.....	113
ง1 <i>Bacillus</i> sp. A39 ที่ติดสีแกรมบวก.....	116

การทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

จาก *Bacillus* sp. A39

Purification and Characterization of Alkaline Protease from *Bacillus* sp. A39

คำนำ

เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่นำมาใช้ในหลายอุตสาหกรรม ซึ่งเราสนใจศึกษา “เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส” ที่สามารถผลิตได้โดยจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ และพบในพืช รวมทั้งเนื้อเยื่อของสัตว์ (Banerjee *et al.*, 1999) นักวิทยาศาสตร์พบว่าเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากแบคทีเรียจาก *Bacillus* sp. มีลักษณะเด่นคือ เกิดกิจกรรม และคงตัวได้ดีในสภาวะที่มีความเป็นด่างสูง ส่วนใหญ่จึงนำไปใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก เอนไซม์นี้มีความสำคัญในอุตสาหกรรมประมาณ 60% ของตลาดเอนไซม์ของโลก (Ward, 1985; Kalisz, 1988) แต่เนื่องจากเอนไซม์ อัลคาไลน์โปรติเอสที่ทำการศึกษาคจัดอยู่ในกลุ่ม metalloprotease จึงไม่สามารถนำไปใช้เป็น ผงซักฟอกได้ เนื่องจากส่วน ประกอบของผงซักฟอกมักใส่สาร ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) ซึ่งเป็นสาร chelating ion มีผลไปจับกับพวกโลหะ ซึ่งจะมีผลไปยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ภายหลังมีผู้นำเอนไซม์นี้มาใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร, อาหารสัตว์, การฟอกหนัง, จุดประสงค์ทางยา และการบำบัดของเสีย เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหาร มีการนำเอนไซม์นี้มาใช้มาก เนื่องจากประเทศไทยมีวัตถุดิบทางการเกษตรหลากหลายชนิด เช่น ธัญพืช, ผัก, ผลไม้ และ เนื้อสัตว์ เป็นต้น

การผลิตเอนไซม์จากพืชหรือสัตว์นั้นจะได้ปริมาณเอนไซม์น้อย ต้องปลูกพืช หรือเลี้ยงสัตว์ในปริมาณที่มากจึงทำให้ได้เอนไซม์ที่เพียงพอ ดังนั้นการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากจุลินทรีย์ จึงทำได้ง่าย และรวดเร็วกว่า มีต้นทุนการผลิตต่ำ เหมาะต่อการใช้ในอุตสาหกรรมที่มีสภาพ pH ของกระบวนการผลิต หรือการใช้งานเป็นด่าง และเนื่องจากปัจจุบันไม่สามารถผลิตเอนไซม์ใช้ได้อย่างภายใน ประเทศ ต้องมีการนำเข้าเอนไซม์จากต่างประเทศทั้งหมด คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์นี้เพื่อทดแทนการนำเข้า และได้ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้ดี แต่มีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาพื้นฐานและคุณสมบัติของเอนไซม์ จึงได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ หลังจากการทำให้บริสุทธิ์แล้ว เพื่อทำให้สามารถขยายผลผลิตไปใช้ในอุตสาหกรรมต่อไป

วิทยานิพนธ์นี้เป็นงานวิจัยต่อเนื่องจากผลการทดลองที่ทำมาแล้วพบว่า เอนไซม์อัลคาไลน์ โปรติเอสผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* sp. A39 หลังจากมีการปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และวิธีการหมักบางส่วน สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสได้ประมาณ 1,400 U/ml แต่มี แนวโน้ม จะพัฒนาให้สูงกว่านี้ได้ ซึ่งกำลังอยู่ในระหว่างการวิจัย และการที่จะพัฒนาการผลิตสู่ อุตสาหกรรมจำเป็นต้องทราบคุณสมบัติของเอนไซม์อย่างละเอียด เพื่อเป็นข้อมูลนำไปใช้ประโยชน์ ในเชิงพาณิชย์ต่อไป สำหรับวิทยานิพนธ์นี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาวิธีการทำให้บริสุทธิ์ และศึกษา คุณสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. A39 เพื่อใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนงานที่ ได้ทำมาแล้ว

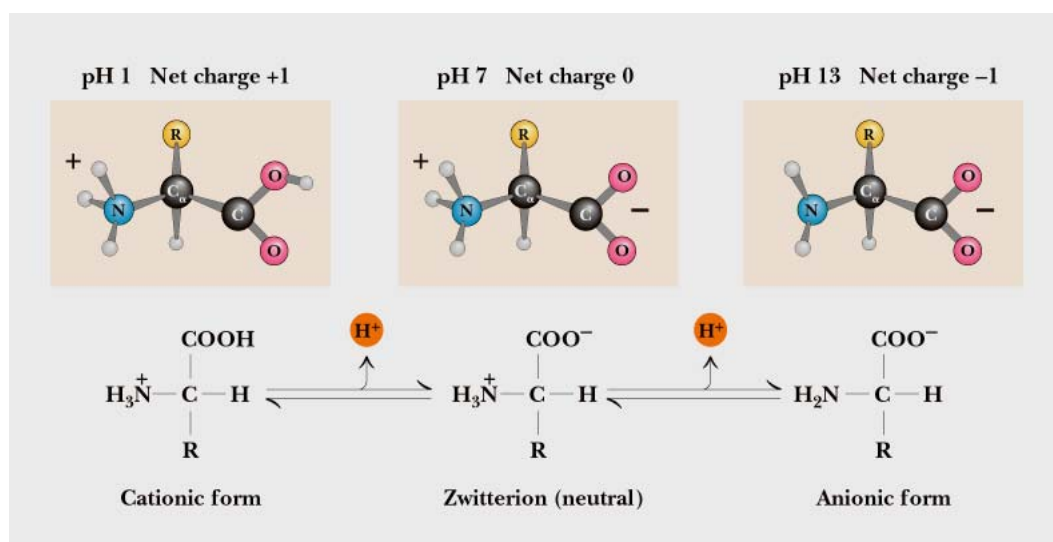
วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus sp.* A39 ให้บริสุทธิ์
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่บริสุทธิ์

การตรวจเอกสาร

1. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับเอนไซม์

เอนไซม์ คือ ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ การที่จะเข้าใจถึง การทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ ต้องอาศัยความรู้เกี่ยวกับโครงสร้างของโปรตีนมาช่วยอธิบาย ซึ่งโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโน มาต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเปปไทด์ กรดอะมิโนมีคุณสมบัติเป็นได้ทั้งกรดและเบส เมื่อละลายอยู่ในน้ำที่มี pH 7.0 จะอยู่ในสภาพไอออนิก โดยหมู่ะมิโนอัลฟาจะอยู่ในสภาพที่ได้รับโปรตอน เพิ่มขึ้นหนึ่งอะตอม (protonated form, $-\text{NH}_3^+$) และหมู่คาร์บอกซิลอยู่ในสภาพที่สูญเสียโปรตอน ไปหนึ่งอะตอม (deprotonated form, $-\text{COO}^-$) ดังนั้นกรดอะมิโนส่วนใหญ่ที่ pH 7.0 จะไม่มีประจุสุทธิ (no net charge) โดยจะอยู่ในรูปไอออนที่มีขั้วประจุสองขั้ว หรือซวิทเทอร์ไอออน (Zwitterion)

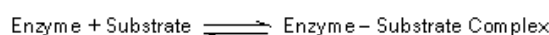
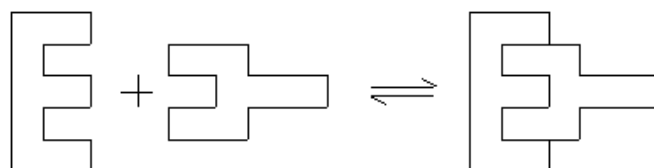


ภาพที่ 1 ภาพแสดงโครงสร้างของกรดอะมิโน เมื่ออยู่ใน pH ที่เป็นกรด กลาง และด่าง

ที่มา: Mari (2006)

โครงสร้างของโปรตีนแบ่งออกได้เป็นสี่ระดับคือ โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) โครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) และโครงสร้างจตุรภูมิ (quaternary structure) แต่สายโพลิเปปไทด์ของเอนไซม์ไม่ได้อยู่ในรูปเส้นตรง จะอยู่ในรูปที่พันกัน (folding) จนเป็นก้อน มีผลทำให้หมู่แขนงข้าง R (side chain R group) ของกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา เข้ามาอยู่ใกล้กันเกิดเป็นบริเวณเร่ง (active site) สำหรับสับสเตรท โคเอนไซม์ โคแฟกเตอร์ หรือสารที่มีโครงสร้างคล้ายกับสับสเตรท (Walton, 1981)

เอนไซม์สามารถลดพลังงานก่อกัมมันต์ของปฏิกิริยา เอนไซม์ จะเร่งเฉพาะชนิดของปฏิกิริยา และชนิดของสารที่เข้าทำปฏิกิริยา การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ กำหนดให้ E เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (เอนไซม์), S เป็นสารตั้งต้นเรียกว่า สับสเตรท และ P เป็นสารผลิตภัณฑ์



ภาพที่ 2 ภาพแสดงเอนไซม์ที่จับกับสับสเตรท

ที่มา: เขียวพา (ม.ป.ป.)

เอนไซม์บางตัวต้องใช้โคแฟกเตอร์ (cofactor)

การทำงานของเอนไซม์บางตัวอาจต้องมีสารอื่นนอกเหนือไปจากสับสเตรท สารเหล่านี้เป็นสารโมเลกุลเล็ก เรียกว่าโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ โคแฟกเตอร์บางตัวอาจจับแน่นมากกับเอนไซม์ เช่นจับด้วยพันธะโควาเลนต์ ซึ่งในกรณีนี้อาจเรียกว่าเป็น prosthetic group ของเอนไซม์ แต่บางทีอาจแยกโคแฟกเตอร์ออกได้ ทำให้เอนไซม์ขาดความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา เอนไซม์ในสภาพที่มีโคแฟกเตอร์จับติดอยู่และทำงานได้ เรียกว่า โฮโลเอนไซม์ (holoenzyme) (Dixon and webb, 1979) ส่วนโปรตีนที่เหลือหลังจากแยกโคแฟกเตอร์แล้ว เรียกว่า apoenzyme โคแฟกเตอร์มี 2 ชนิดคือ

1 อออนของโลหะ ซึ่งอาจช่วยยึดสับสเตรทและโครงร่างของเอนไซม์ หรือมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยาโดยตรง อออนเหล่านี้จะไม่ถูกเปลี่ยนแปลงไปในปฏิกิริยา ตัวอย่างของอออนของโลหะที่อาจเป็นโคแฟกเตอร์ได้แก่ Zn^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} และ Cu^{2+} เป็นต้น

2 โคเอนไซม์ (coenzyme) โคเอนไซม์เป็นโมเลกุลอินทรีย์ โดยมากมีต้นกำเนิดมาจากวิตามินที่ละลายน้ำได้ ทำหน้าที่ในปฏิกิริยาที่มีการโยกย้ายของหมู่เคมี อะตอม หรืออิเล็กตรอน โดยการทำปฏิกิริยากับสับสเตรทเอง ดังนั้น โครงสร้างของเอนไซม์อาจเปลี่ยนแปลงได้ระหว่างที่

เกิดปฏิกิริยา จึงมีลักษณะคล้ายกับสับสเตรตอีกชนิดหนึ่ง แต่โคเอนไซม์มักทำปฏิกิริยาต่อไป แล้วเปลี่ยนกลับคืนมาสู่สภาพเดิมได้

โปรติเอส (Protease)

โปรติเอสเป็นปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์ด้วยน้ำ แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ

1 Exopeptidase (EC 3.4.11 ถึง 19) เป็นเอนไซม์ย่อย residue เดี่ยวจากปลาย C เอนไซม์นี้จะจำเพาะกับสับสเตรตที่เป็นไดเปปไทด์และเอนไซม์จะทำการตัดหน่วยของไดเปปไทด์ออกทั้งจากปลาย N และปลาย C ซึ่งสามารถแบ่งเอนไซม์ได้เป็น 6 ประเภท ตาม (Barrett, 1985) คือ

1.1. Aminopeptidases (EC 3.4.11) คือโปรติเอสที่ย่อยพันธะเปปไทด์จากทางด้านปลายอะมิโน (N-terminal) ของโปรตีนเข้ามาทีละหน่วย

1.2. Dipeptidases (EC 3.4.13) คือโปรติเอสที่มีความจำเพาะต่อการย่อยพันธะเปปไทด์ของ dipeptide

1.3. Dipeptidyl-peptidases, Tripeptidyl-peptidases (EC 3.4.14) คือโปรติเอสที่ย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีนจากทางด้านปลายอะมิโนเข้ามาทีละสองหรือสามหน่วย

1.4. Dipeptidyl-dipeptidases (EC 3.4.15) คือโปรติเอสที่ย่อยพันธะเปปไทด์จากทางด้านปลายคาร์บอกซิล (C-terminal) ของโปรตีน เข้ามาทีละสองหน่วย

1.5. Carboxypeptidases (EC 3.4.16 ถึง 18) คือโปรติเอสที่ย่อยพันธะเปปไทด์จากทางด้านปลายคาร์บอกซิลของโปรตีน เข้ามาทีละหน่วย แบ่งได้ 3 กลุ่มคือ Serine carboxypeptidases (EC 3.4.16), Metallo carboxypeptidases (EC 3.4.17) และ Cysteine carboxypeptidases (EC 3.4.18)

1.6. Omega peptidases (EC 3.4.19) คือโปรติเอสที่สามารถย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีน ได้ทั้งจากทางด้านปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซิล

2. Endopeptidase (EC 3.4.21 ถึง 24 และ 99) เป็นโปรติเอสที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ภายในสายโปรตีนซึ่งมักมีความจำเพาะต่อชนิดของกรดอะมิโนระหว่างตำแหน่งพันธะเปปไทด์ที่ย่อย สามารถแบ่งโปรติเอสตามกลไกการทำงานที่บริเวณเร่ง และความจำเพาะของเอนไซม์ (Dixon and Webb, 1979; Barrett *et al.*, 2003) ได้ 5 กลุ่มดังนี้

2.1 serine peptidase (EC 3.4.21) มีบริเวณเร่งคือ serine และ histidine residue กลไกการเร่งปฏิกิริยาขึ้นกับหมู่ hydroxyl ของ serine residue องค์ประกอบอื่นที่สำคัญในการเร่งการตัดพันธะเปปไทด์โดย serine peptidase คือ การมีหมู่-NH- ที่สองสายแกนหลักเพื่อนำมาใช้สำหรับพันธะไฮโดรเจนกับการพัฒนาประจุลบของออกซิเจนจากหมู่คาร์บอนิลของพันธะเปปไทด์ที่จับได้ ซึ่งยากที่จะวัดค่าปริมาณที่มาตรฐานได้เนื่องจากหมู่ -NH- จะมีความจำเป็นสำหรับโครงสร้างที่เป็นอันหนึ่งอันเดียวกันของโปรตีน มี pH ที่เหมาะสมสำหรับเกิดปฏิกิริยาที่ช่วง 7-11 เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) และทริปซิน (trypsin) เป็นต้น

2.2 Cysteine peptidase (EC 3.4.22) มีบริเวณที่เร่งปฏิกิริยา คือ cysteine (-SH) และ histidine residue กลไกการเร่งปฏิกิริยาจะคล้ายกับกลุ่มของ serine peptidase เป็นอย่างมากเนื่องจากจะมีการสร้างโควาเลนต์ของสารตัวกลาง (covalent intermediate) โดยจะมีการจับนิวคลีโอไฟล์ซึ่งเป็นอะตอมซัลเฟอร์ของสายข้าง cysteine ส่วนสายข้างของ histidine จะส่งเสริมในการเป็นตัวรับไฮโดรเจนหรือบทบาทที่วิ่งกลับไปกลับมา เอนไซม์เหล่านี้จะไวต่อออกซิเจน มี pH ที่เหมาะสมสำหรับเกิดปฏิกิริยาที่ช่วง 6-7.5 ตัวอย่างเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ ปาเปน (papain) และบรอมีเลน (bromelain)

2.3 Aspartic peptidase (EC 3.4.23) มี aspartic residue เป็นลิแกนด์ เอนไซม์กลุ่มนี้เชื่อว่า จะเร่งการตัดพันธะเปปไทด์ โดยจะไม่มีการใช้หมู่ฟังก์ชันนัลของเอนไซม์ในการจับนิวคลีโอไฟล์ ยิ่งไปกว่านั้นจะไม่มีการสร้างโควาเลนต์ของตัวกลาง ระหว่างเอนไซม์และส่วนของสับสเตรท โดยปรากฏว่าการเร่งของ aspartic peptidase จะประกอบด้วยสายข้างของกรดแอสพาร์ติกทั้งสองด้าน ที่ค่า pH ต่ำจะเหมาะสมกับเอนไซม์กลุ่มนี้ซึ่งเชื่อว่าเป็นธรรมชาติของหมู่คาร์บอกซิลซึ่งจะส่งเสริมการเร่งโดยข้อมูลโครงสร้างจากการศึกษาผลึกด้วยรังสีเอกซ์ (X-ray crystallographic) ยืนยันว่าบริเวณสายข้างทั้งสองเป็นตำแหน่งที่เหมาะสมที่จะทำการตัดพันธะเปปไทด์ของสับสเตรท แสดงให้เห็นว่าหมู่คาร์บอกซิลทั้งสองจะอยู่ใกล้ชิดกันเพียงพอที่จะใช้พันธะไฮโดรเจนร่วมกันระหว่างออกซิเจนของกรดแอสพาร์ติกทั้งสอง มี pH ที่เหมาะสมสำหรับเกิดปฏิกิริยาที่ช่วง 2-4 ตัวอย่างเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ เรนิน (rennin) และเปปซิน (pepsin) เป็นต้น

2.4 Metallopeptidase (EC 3.4.24) ลิแกนด์โลหะใน metallopeptidase อยู่ที่ His, Glu, Asp และ Lys residues เอนไซม์กลุ่มนี้จะคล้ายกับ aspartic peptidase ซึ่งจะไม่มีการสร้างโควาลนต์ของตัวกลาง เป็นโปรติเอสที่มีไอออนของโลหะรวมในโมเลกุลเอนไซม์หรือรวมในปฏิกิริยาการย่อย กล่าวคืออยู่ในลักษณะของโคแฟกเตอร์ โดยปกติเป็นสังกะสี แต่อาจเป็น Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} และ Cu^{2+} เป็นต้น สามารถแบ่งแยกได้อีกขึ้นอยู่กับจำนวนไอออนโลหะที่ต้องการในการเร่งปฏิกิริยา metallopeptidase มากมายต้องการ Zn^{2+} เพียงตัวเดียว แต่บางแฟมิลีต้องการ 2 ไอออนโลหะเพื่อเป็น co-catalytic เช่นอาจต้องการ Co^{2+} หรือ Mn^{2+} 2 ไอออน มี pH ที่เหมาะสมสำหรับเกิดปฏิกิริยาที่ช่วง 7.0-9.0 ตัวอย่างเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ Sepia proteinase และ collagenase เป็นต้น

2.5. โปรติเอสชนิดที่ยังไม่รู้ถึงกลไกการเร่งปฏิกิริยา (EC 3.4.99)

ตารางที่ 1 สารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

Inhibitor	Specificity of inhibition	Suggested starting concentrations
AEBSF or (4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride)	Serine proteases: trypsin, chymotrypsin, plasmin, plasma kalikrein and thrombin	0.10-1.00 mg/ml
Antipain-dihydrochloride	Papain, trypsin, cathepsin A and B	50.00 $\mu\text{g/ml}$
Aprotinin	Serine proteases: trypsin, chymotrypsin, plasmin and kalikrein	0.06-2.00 $\mu\text{g/ml}$

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Inhibitor	Specificity of inhibition	Suggested starting concentrations
Benzamidine, hydrochloride	Arginine-selective enzymes like trypsin, kallikrein and thrombin	0.10-0.60 µg/ml
Bestatin	Amino peptidases	40.00 µg/ml
Chymostatin	a-, b-, g- and d-chymotrypsin	6.00-60.00 µg/ml
E-64	Cysteine protease	0.50-10.00 g/ml
EDTA or (ethylenediamine tetraacetic acid)	Metalloproteases	0.20-0.50 mg/ml
Leupeptin	Serine and cysteine proteases including plasmin, trypsin, papain and cathepsin B	0.50 µg/ml
Pepstatin	Aspartic proteases	0.70 µg/ml
1,10-phenanthroline	Metalloprotease inhibitor for chelating iron and divalent metals	4.00 g/ml
PMSF or (phenylmethyl sulphonyl fluoride)	Serine and cysteine proteases like trypsin, chymotrypsin, kallikrein, subtilisin and thrombin	17.00-170.00 g/ml

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Inhibitor	Specificity of inhibition	Suggested starting concentrations
Phosphoramidon	Collagenase, thermolysin and metalloendoproteinases	4.00-330.00 µg/ml
Trypsin Inhibitor, Soybean	Serine proteases specific to trypsin/ trypsin-like proteases	Use at equimolar concentration

ที่มา: Amresco® (2003-2004)

2. เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

อัลคาไลน์โปรติเอสพบว่ามีทั้งในพืช สัตว์ และโดยเฉพาะในจุลินทรีย์ซึ่งมีทั้งแบคทีเรีย (bacteria), เชื้อรา (fungi) แอคติโนมัยซีท (actinomycetes) และยีสต์ (yeast)

Miyaji *et al.* (2005) ได้แยกแบคทีเรียจากดินของ Abashiri ประเทศญี่ปุ่นเพื่อหาแบคทีเรียซึ่งผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส สำหรับการทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติของโปรติเอสพบแบคทีเรียสายพันธุ์ *Stenotrophomonas maltophilia* และให้ชื่อว่า S-1 แบคทีเรียนี้สามารถเจริญบนเคซีนซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนได้ โปรติเอสที่บริสุทธิ์ กำหนดชื่อให้เป็น *S. maltophilia* Protease-1 (SmP-1) มีอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมสำหรับทำปฏิกิริยาก็คือ 50°C และ 12 ตามลำดับ ได้มวลโมเลกุลที่หาโดย SDS-PAGE เท่ากับ 40 kDa SmP-1 สามารถย่อยสลายโดยออกซิไดซ์สายอินซูลิน B ได้เป็น Leu6-Cys7, Cys7-Gly8, Tyr16-Leu17 และ Leu17-Val18 มีลำดับกรดอะมิโนที่ N-terminal ของอัลคาไลน์โปรติเอสที่บริสุทธิ์คือ NH₂-SASAPMVSGVAALVLE เป็นที่น่าพอใจว่า pH ที่เหมาะสมนั้นมีความเป็นด่างสูงมาก และเอนไซม์คงตัวต่อความร้อนทำให้ประยุกต์ใช้ได้กว้างสำหรับอุตสาหกรรมอาหารและอื่นๆ

Mehta *et al.* (2006) ได้ศึกษาการแสดงออกของการสังเคราะห์เอนไซม์อัลคาไลน์ โปรติเอสจากเชื้อแอคติโนมัยซีทในกลุ่มที่มีความเป็นด่าง โดยใช้ glucose, peptone, yeast extract, KH_2PO_4 และ amino acids; tyrosine, tryptophan, lysine, และ arginine. โดยการกระตุ้นการผลิต เอนไซม์มีการจำกัดด้วยองค์ประกอบเหล่านี้ นอกจากนี้พบว่าองค์ประกอบของ crude เช่น molasses, wheat Xour, และ wheat bran มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ การผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมระดับสูงโดยผลิตเป็นการค้า ต้องมีราคาถูกและหาได้จากแหล่งธรรมชาติ ในการพบเชื้อในอนาคตมีความเป็นไปได้ที่จะผลิต และสามารถควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ได้

Aftab *et al.* (2006) แยกแบคทีเรียที่ชอบด่างได้ 53 isolates จากทุ่งนาหลากหลายที่ของ เมือง Karashi ซึ่งประกอบด้วยหลายเชื้อชาติ และพบว่า 25 isolates ที่สามารถผลิตอัลคาไลน์ โปรติเอสโดยมี *Bacillus brevis* SSA1 ผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเท่ากับ 800 AU/ml จึงถูกเลือกเพื่อการศึกษาต่อไป

ได้มีการศึกษาเชื้อราจากชายฝั่งทะเลอย่างกว้างขวาง ซึ่งคาดหวังว่าจะผลิตสาร เมแทบอลิซึมระดับสอง และใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ lignocellulolytic ทางไบโอเทคโนโลยี่ แต่มีการศึกษาเพียงเล็กน้อยของเชื้อราในตะกอนใต้ทะเลลึก โดยรายงานฉบับนี้ทำการศึกษาโปรติเอสที่ทนสภาวะเป็นด่าง และความเย็นได้ แยกได้ 221 เชื้อจาก 5,000 m ในศูนย์กลาง Basin ของอินเดีย เชื้อรามากมายเจริญ และผลิตเอนไซม์ อัลคาไลน์โปรติเอสที่ 5°C และ 30°C และความดัน 1 atm *Aspergillus ustus* (NIOCC #20) ผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดเท่ากับ 1,639 ACU/ml จึงถูกเลือกมาใช้ในการศึกษาต่อไป (Damare *et al.*, 2006)

Alam *et al.* (2006) ในสภาวะที่ไร้อากาศ แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนแยกได้จาก ตะกอนของทะเลสาบของ Leh, India เมื่อศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา, ชีวเคมี และ 16S rRNA และจำแนกได้เป็น *Clostridium* species ซึ่งคล้ายกับ *Clostridium subterminale* ผลิตอัลคาไลน์ โปรติเอสออกนอกเซลล์ และพบว่าเอนไซม์ที่ผลิตมีทั้ง serine และ metalloprotease

Chu (2007) พบแบคทีเรีย 35 สายพันธุ์ที่สามารถปลดปล่อยอัลคาไลน์โปรติเอสซึ่งแยกได้จากดินและน้ำเสียที่อยู่ใกล้โรงงานนม โดยสายพันธุ์ APP1 พบ yield ของอัลคาไลน์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 2,560 U/ml ซึ่งสามารถจำแนกได้เป็น *Bacillus* sp.

ตารางที่ 2 สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

แบคทีเรีย	แอคติโนมัยซีท	เชื้อรา	ยีสต์
<i>Bacillus alcalophilus</i> ATCC 21522	<i>Dermatophilus congolensis</i>	<i>Aspergillus candidus</i>	<i>Candida lipolytica</i>
<i>B. circulans</i>	<i>Nocardiosis</i> sp.	<i>A. flavus</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>
<i>B. firmus</i>	<i>N. dassonvillei</i>	<i>A. niger</i>	<i>Oerskovia xanthineolytica</i>
<i>B. lentus</i>	<i>Streptomyces moderatus</i>	<i>A. sojai</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>
<i>B. pumilus</i>	<i>S. diastaticus</i>	<i>Cephalosporium</i> sp. KSM 388	
<i>B. sphaericus</i>	<i>S. griseus</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	
<i>B. subtilis</i>	<i>S. corchorusii</i> ST36	<i>Paecilomyces marquandii</i>	
<i>Bacillus</i> sp.	<i>S. fradiae</i>	<i>Penicillium griseofulvin</i>	
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>S. pactum</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>	
<i>Thermus aquaticus</i>	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	<i>Scedosporium apiospermum</i>	
<i>Staphylothermus marinus</i>		<i>Malbranchea pulchella</i>	
<i>Tolula thermophila</i>		<i>Tritirachium album</i>	
<i>Vibrio metschnikovi</i>		<i>Chrysosporium keratinophilum</i>	

3. การประยุกต์ใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสในอุตสาหกรรม

ในปี 1983 มีการซื้อขายของอุตสาหกรรมเอนไซม์ทั้งหมดของโลกอยู่ที่ 400 ล้านดอลลาร์ และ 75% ของอุตสาหกรรมเอนไซม์ทั้งหมดเป็นเอนไซม์ชนิด hydrolytic ซึ่งใช้สำหรับ depolymerization ของสับสเตรทธรรมชาติ และในอนาคตปี 2005 การคาดคะเนมูลค่าสำหรับอุตสาหกรรมเอนไซม์อยู่ที่ 1.7 ถึง 2 พันล้านดอลลาร์ (Godfrey and West, 1996)

มีการใช้อัลคาไลน์โปรติเอสใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร, อาหารสัตว์, อุตสาหกรรมการฟอกหนัง, จุดประสงค์ทางยา และการบำบัดของเสีย ดังนี้

การใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

ได้มีการนำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมากมาย เช่นเอนไซม์ alcalase เป็นเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตเป็นการค้า สามารถย่อยโปรตีนที่ได้จากพืช เนื้อปลา หรือเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ โดยการสลายพันธะเปปไทด์ของสายโปรตีน อาจนำมาย่อยเนื้อสัตว์เพื่อให้ได้กลิ่นและรสชาติที่ดี นำไปเป็นซุปร้อนหรือซุปร้อนเข้มข้น โดยใช้กรดอะมิโนอิสระ, ไค หรือไตรเปปไทด์ที่สามารถตกตะกอนได้ในการผลิต เป็นต้น (Pedersen *et al.*, 1994) ปี 1989 นักวิชาการอเมริกันรายงานว่ามีการประยุกต์ใช้อัลคาไลน์โปรติเอสในการย่อยโปรตีนที่มีสารที่ทำให้เกิดภูมิแพ้ในเด็กจากเคซีน, เวย์โปรตีน และโปรตีนถั่วเหลือง

Godfrey and West (1996) โปรติเอสทำให้เกิดความนุ่มของ dough ซึ่งใช้ทำคุกกี้ (cookies), ขนมปังกรอบ (wafers) และ ขนมปังอบ (waffles) เป็นต้น ทำให้ได้ความกรอบ มีสีเปลือกขนมปังที่ดี และปรับปรุงรสชาติ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ดี และใช้ในกระบวนการทำให้เครื่องดื่มมีความใส (clarification) และทำให้นมเกิดการตกตะกอน (coagulating) เพื่อนำไปทำเนย (cheese)

นอกจากนี้ยังมีการใช้ protein hydrolysates ในอาหาร และผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ ซึ่งเปปไทด์สกัดได้จาก เคซีน, เนย, ถั่วเหลือง, เนื้อ และแหล่งอื่นๆอีกมากมาย โดยเอนไซม์ตัวอย่างเช่น นิวทราล หรืออัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตจาก *B. subtilis* โดยใช้ protein hydrolysates ผสมทำเป็นเครื่องดื่มสำหรับนักกีฬา, เครื่องดื่มที่มีสารอาหารสำหรับผู้สูงอายุ, ใช้ในจุดประสงค์ของการลดความอ้วน และเพิ่มความแข็งแรงของร่างกาย

การใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสในอุตสาหกรรมฟอกหนัง

ในการกำจัดขนออกจากหนังสัตว์ (dehairing) โดยเอนไซม์จะไปทำลายโปรตีน เกิดการย่อยสลาย elastin และ keratin (Taylor *et al.*, 1987) ส่วนสภาวะที่เป็นด่างจะทำให้รากขนโป่งพอง ทำให้ง่ายต่อการกำจัดขนและเป็นวิธีที่ง่ายกว่าการใช้โซเดียมซัลไฟด์ ทำให้ได้สินค้าที่ดี และหนังมีความนุ่ม (Malathi and Chakraborty, 1991)

การใช้ในอุตสาหกรรมยา

Sjodahl *et al.* (2002) พบว่าเอนไซม์ย่อยโปรตีนสนับสนุนกระบวนการรักษาโดยธรรมชาติ ซึ่งประสบความสำเร็จในการจัดการกับแผลเปื่อย โดยมีประสิทธิภาพในการกำจัด necrotic material

Godfrey and West (1996) รายงานว่าเปปไทด์ของการบำบัดโรคสำหรับยุโรป และสหรัฐอเมริกา มีมูลค่าประมาณ 400 ล้านดอลลาร์ในปี 1994 ใช้เกี่ยวกับการบำบัดโรค และทดสอบเกี่ยวกับคลินิก เป็นยาของอนาคต และปริมาณการสังเคราะห์จะเจริญก้าวหน้าไปอีก 20 ปี มีความเป็นไปได้ที่จะรักษาโรคอัมพาต (paralysis), โรคจิตเวชที่มีจิตเสื่อม (dementias), โรคเรื้อรัง (chronic), โรคประสาทเสื่อมอย่างรุนแรง (acute neurodegenerative) ความผิดปกติทางกาย, ใจ (disorders) เช่น โรคของ Alzheimer และโรคความบกพร่องของกล้ามเนื้อ (muscular dystrophies)

การบำบัดของเสีย เพื่อเพิ่มคุณค่าของเหลือทิ้งประเภทโปรตีนให้เป็นประโยชน์

พวกเคสตีว ขนนก และขนสัตว์ เป็น fibrous proteins เป็นสิ่งที่แทบใช้ประโยชน์ไม่ได้ แต่ปัจจุบันสามารถนำกลับมาใช้ประโยชน์ได้ เช่น Dalev (1994) ได้ศึกษาการใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *B.subtilis* มาย่อยขนสัตว์จากโรงงานฟอกหนังสัตว์ ซึ่งขนสัตว์มีประมาณ 5% ของมวลตัวของสัตว์ปีก และสามารถเป็นแหล่งโปรตีนสูงสำหรับอาหารสัตว์

Wang *et al.* (2006) ศึกษาโรงงานที่ฆ่าส่วนหัว, เปลือก และหางของกุ้งถูกกำจัดระหว่างกระบวนการผลิต และมีประมาณ 50% ของกุ้งที่จับได้ ดังนั้นการผลิตที่เพิ่มขึ้นทำให้ส่วนของกุ้งเป็นปัญหากับสิ่งแวดล้อม ไม่สามารถควบคุมการทิ้งได้ He *et al.* (2006) จึงใช้ประโยชน์จากไคติน และองค์ประกอบของโปรตีนในเปลือกกุ้งเหลือทิ้ง ซึ่งวิธีดั้งเดิมจะใช้สารเคมี NaOH ในการย่อยสิ่งเหล่านี้ ปัจจุบันใช้วิธีทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตโปรติเอส หรือเอนไซม์ย่อยโปรตีน เพื่อนำ

โปรตีนกลับมาใช้ใหม่สำหรับการผลิตองค์ประกอบทางชีววิทยา (Gagne and Simpson, 1993; Oh *et al.*, 2000)

Godfrey and West (1996) ในอุตสาหกรรมอาหาร และเครื่องดื่ม ส่วนใหญ่จะมีโปรตีนที่มากมาย ได้จากการฆ่าสัตว์, จากโรงงานปลา และจากอุตสาหกรรมผลิตนม เป็นต้น ซึ่งจะปล่อยของเสียออกมา เราสามารถพัฒนาในการประยุกต์ใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสในการบำบัดน้ำเสีย และอาจนำไปเป็นอาหารสัตว์ได้ เนื่องจากการย่อยสลายโปรตีนจะได้กรดอะมิโน และเปปไทด์ นอกจากนี้โรงงานส่วนใหญ่มีการนำไปพัฒนาสำหรับการผลิต yeast extracts

การนำไปใช้ประโยชน์อื่นๆ

Najafi *et al.* (2005) ศึกษาพบว่ามียางงานการนำอัลคาไลน์โปรติเอสไปใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ โดยกำจัดชั้นของ sericin จากเส้นใยของไหมดิบ เพื่อปรับปรุงความเงางาม และความนุ่มของเส้นไหม และรายงานของ สิริรัตน์ (ม.ป.ป.) กล่าวถึงการลอกกาไหมด้วยเอนไซม์ (Enzymatic degumming) ซึ่งเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะต่อเส้นใยหรือสับสเตรท ทำให้ไม่เป็นอันตรายต่อเส้นใย ภาวะที่ใช้ก็ไม่รุนแรง สามารถนำมาใช้ทำแทนสารเคมี ปริมาณที่ใช้ไม่สูงมากนัก สามารถประหยัดน้ำ และพลังงาน ที่สำคัญสามารถตอบสนองต่อความต้องการในปัจจุบันที่ต้องการกระบวนการที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมจึงทำให้เอนไซม์เป็นทางเลือกหนึ่งที่มีก่นำมาศึกษาหรือใช้ในกระบวนการสิ่งทอ

ดวงกมล และเปรมวดี (2548) ได้ทำงานวิจัยคัดเลือกแบคทีเรียที่คาดว่าผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อย sericin โดยไม่ย่อย fibroin โดยวิธี RD-TEA โดยใช้หลักการซึมผ่านวุ้นของเอนไซม์ไปยังพื้นผิวที่ฉาบไว้ด้วยโปรตีน และตรวจสอบบริเวณที่เอนไซม์ย่อย พบแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์คือ GR_5_4, 4TS9_001 และ HIC_13_8 สามารถย่อย sericin ได้ดี โดยจะศึกษาความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ลอกกาไหม

มียางงานว่าใช้อัลคาไลน์โปรติเอสย่อยสลาย gelatinous ที่coat อยู่บน X-ray films ซึ่งสามารถนำ silver กลับมาได้ และโปรติเอสใช้ประโยชน์สำคัญ เป็นองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์เภสัชกรรม เช่นตัวทำความสะอาดคอนแทคเลนส์ (Anwar and Saleemuddin, 2000)

4. จุลินทรีย์ที่ผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสที่ใช้ในการค้า

ตารางที่ 3 เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ใช้ในทางการค้า

Organism	Trade name	Manufacturer
<i>Bacillus licheniformis</i>	Alcalase	Novo Nordisk, Denmark
Alkalophilic <i>Bacillus sp.</i>	Savinase, Esperase	Novo Nordisk, Denmark
Alkalophilic <i>Bacillus sp.</i>	Maxacal, Maxatase	Gist-brocades, The Netherlands
Alkalophilic <i>Bacillus sp.</i>	Opticlean, Optimase	Solvay Enzymes GmbH, Germany
Alkalophilic <i>Bacillus sp.</i>	Proleather	Amano Pharmaceuticals Ltd., Japan
<i>Aspergillus sp.</i>	Protease P	Amano Pharmaceuticals Ltd., Japan
Protein engineered variant of Savinase [®]	Durazym	Novo Nordisk, Denmark
Protein engineered variant of alkalophilic <i>Bacillus sp</i>	Maxapem	Solvay Enzymes GmbH, Germany
Genetic engineered Donor- <i>B. Lentus</i> Expressed in <i>Bacillus sp</i>	Purafect	Genecor International, Inc., USA

ที่มา: Kumar (1999)

5. การปรับปรุงสายพันธุ์

Gupta (2002) ได้ศึกษาว่ามีการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์โดยการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagenesis; UV, chemical) หรือ recombinant DNA technology โดยคัดเลือกที่แสดงการผลิตโปรตีนที่สูง โดยทำการแยกและ cloning ยีนที่ encoded ยีนอัลคาไลน์โปรตีนเอส ทำให้แสดง ออกใน host ใหม่ ซึ่ง host ที่ใช้คือ *Escherichia coli* และ *B. subtilis* c172-14 มีรายงานว่า rDNA technology ใช้ในการพัฒนาทางพันธุวิศวกรรมของสายพันธุ์ *B. pumilis* โดยนำ pBX 96 plasmid (carrying α -amylase *amy* gene) เข้าสู่ host สายพันธุ์ของ *B. pumilis* c172 ที่ชอบความเป็นด่าง โดย transformation พบว่าระดับของอัลคาไลน์โปรตีนเอสในสายพันธุ์ใหม่เพิ่มขึ้น 43% เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ นอกจากนี้ยังมีการทำ protein engineering โดยการเปลี่ยนสมบัติของโปรตีน ซึ่งเปลี่ยนที่โครงสร้างปฐมภูมิของโปรตีน เทคนิคนี้จะทำให้โปรตีนทนต่อ pH และอุณหภูมิสูง

อัลคาไลน์โปรตีนเอสชนิด serine ซึ่งมีกิจกรรมการย่อย เคซีน สร้างโดย *Penicillium citrinum* strain 52-5 เป็นสารที่ทำให้เกิดโรคภูมิแพ้ ทำให้บริสุทธิ์โดย DEAE-Sepharose และ carboxymethyl (CM)-Sepharose มีค่า pI เท่ากับ 7.1 กิจกรรมของเอนไซม์นี้ศึกษาได้โดยโปรตีนจะมีความจำเพาะกับซีรัม IgE ของผู้ป่วยที่เป็นภูมิแพ้กับ *Penicillium citrinum* โดยสารที่ทำให้เกิดโรคภูมิแพ้ encoded โดยยีน Pen c 1 แสดงออกใน *Escherichia coli* เป็น recombinant Pen c 1 ทำให้ผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่มาก นำมาใช้ประโยชน์เป็นสารมาตรฐานที่ทำให้เกิดโรคภูมิแพ้ ซึ่งจำเพาะสำหรับการตรวจโรคทางภูมิคุ้มกันของความผิดปกติขั้นสูง (Su *et al.*, 1999)

6. การทำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนเอสที่ได้จากจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์

แบคทีเรีย

Thangam and Rajkumar (2002) ได้ศึกษาอัลคาไลน์โปรตีนเอสที่ผลิตออกมานอกเซลล์จากแบคทีเรีย *Alcaligenes faecalis* ที่ชอบสภาพที่เป็นด่าง ซึ่งถูกทำให้บริสุทธิ์โดยโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ และ size-exclusion เอนไซม์ที่บริสุทธิ์มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 563.8 $\mu\text{mol tyrosine/min/mg protein}$ ให้แถบโปรตีนเดียวบน native PAGE และ SDS-PAGE มวลโมเลกุล 67 kDa เมื่อทำ gelatin zymogram เห็นวงใสรอบบริเวณเป็นแถบโปรตีน pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 9.0 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดที่ 55°C ถูกยับยั้งโดย PMSF ที่ serine residues ที่บริเวณ active มีค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 1.66 mg/ml และ 526 U/min/mg protein ตามลำดับ ซึ่งมีเคซีนเป็นสับสเตรท

Adinarayana *et al.* (2003) ได้ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติบางประการของอัลคาไลน์ serine protease พบว่ามีความคงตัวที่อุณหภูมิสูง จาก *Bacillus subtilis* PE-11 ที่แยกได้ใหม่ โดยทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ 2 ขั้นตอน คือการตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และโครมาโตกราฟี Sephadex G-200 หามวลโมเลกุลโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบ SDS-PAGE ได้ 15 kDa ซึ่งเป็นมวลโมเลกุลที่ต่ำ กิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่ 60°C pH 10.0 ซึ่งมีเคซีนเป็นสับสเตรท ได้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์ 21 เท่า และมี yield 7.5% เอนไซม์นี้คงตัว 100% ที่ 60°C หลังจากบ่มเป็นเวลา 350 min ส่วนความคงตัวของ pH อยู่ระหว่าง 8-10 สามารถกระตุ้นด้วยไอออนของโลหะ เช่น Ca^{+2} , Mg^{+2} , และ Mn^{+2} กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งโดย PMSF และ DFP แต่ไม่ถูกยับยั้งอย่างรุนแรงโดย EDTA ส่วน pCMB และ beta-ME มีการยับยั้งน้อย การใช้เอนไซม์ร่วมกับ detergents ที่ใช้ทางการค้าซึ่งมี 10 mM CaCl_2 และ 1M glycine เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย พบว่าจะปรับปรุงประสิทธิภาพความคงตัวของเอนไซม์ซึ่งทำให้คงเหลือกิจกรรม 52% ของกิจกรรมเอนไซม์ หลังจากผ่านไป 3 h และทำให้เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการทำความสะดวกร่วมกับ detergents หลายชนิด สามารถกำจัดเลือดที่ใช้เป็นสีย้อมกับผ้าได้อย่างสมบูรณ์

มีรายงานโปรตีนที่ผลิตโดย *Aeromonas caviae* ถูกทำให้บริสุทธิ์ และนำไปศึกษาคุณสมบัติ พบว่ามวลโมเลกุลของ AP19 ที่วิเคราะห์โดย SDS-PAGE มีประมาณ 19 kDa และกิจกรรมของโปรตีนไม่ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ด้วยความร้อน 100°C สำหรับ 15 min แต่ยับยั้งได้โดยสารยับยั้ง metalloprotease (Nakasone *et al.*, 2004)

Mei and Jiang (2005) ได้ศึกษาอัลคาไลน์โปรตีนจาก *Vibrio metschnikovii* DL 33–51 ซึ่งทนต่อการออกซิเดชัน และสารลดแรงตึงผิว ทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยอะซิโตน, Q-sepharose และ Sephacryl S-100 เจลฟิลเตรชัน โครมาโตกราฟี เอนไซม์มีมวลโมเลกุล 29.5 kDa ซึ่งหาได้จากวิธี SDS-PAGE พบว่าอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมคือ 60°C และ 12.0 ตามลำดับ โปรตีนมีความคงตัวในช่วง pH 9.0–11.0 ครึ่งชีวิตของเอนไซม์อยู่ที่ 50°C และ 60°C ที่ 7.5 h และ 30 min ตามลำดับ กิจกรรมของเอนไซม์สามารถกระตุ้นโดยสาร surfactants ที่ขายเป็นการค้า เช่น Triton X-100, Tween-80 และ bleaches (H_2O_2 , sodium hypochlorite) นอกจากนี้สามารถกระตุ้นกิจกรรมโดย Mn^{2+} และ Ba^{2+} ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 19 และ 18% ตามลำดับ

Gupta *et al.* (2005) ได้ศึกษาสายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* PseA ที่แยกได้จากดิน ปลดปล่อยอัลคาไลน์โปรตีนชนิดใหม่ ซึ่งมีความคงตัว และมีกิจกรรมเมื่ออยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ ทนต่อ detergents, surfactants และ solvents มีความเป็นไปได้ที่จะใช้ในการเร่งปฏิกิริยาในสารละลายที่ไม่ใช้น้ำ ทำให้บริสุทธิ์ 11.6 เท่า ได้ yield 60% โดยใช้โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยน

เปลี่ยนประจุ Q-Sepharose และโครมาโตกราฟีที่ใช้แรงระหว่างไฮโครโฟบิก (Phenyl Sepharose) ร่วมกัน ส่วนมวลโมเลกุลจาก SDS-PAGE ได้ประมาณ 35 kDa เอนไซม์คงตัวในช่วง pH 6.0–9.0 และ pH ที่เหมาะสมเริ่มที่ 8.0 Km และ Vmax ตามกิจกรรมการย่อยสลายเคซีน พบว่าเท่ากับ 2.7 mg/ml และ 3 mol/min ตามลำดับ โปรติเอสโดยมากมีกิจกรรมที่ 60°C ได้ พบว่าเอนไซม์มีสมบัติเป็น metalloprotease เนื่องจากมีความไวต่อ EDTA และ 1,10-phenanthroline

แอคติโนมัยซีท

อัลคาไลน์โปรติเอสใหม่จาก *Nocardiosis sp.* แยกจากตัวอย่างดินที่เก็บทางตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศบราซิล crude extract (CE) ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน partially purified extract (PPE) โดยตกตะกอน 0-20% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ Sephadex G-75 ได้ความบริสุทธิ์ 26 เท่า และ 34 % yield พบว่า pH ที่เหมาะสมของกิจกรรมเอนไซม์อยู่ที่ pH 10.5 และ 8.0 สำหรับ CE และ PPE ตามลำดับ จะเห็นว่าเอนไซม์มีคงตัวที่ pH เป็นต่าง และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 50°C เหมือนกัน พบว่าหลังจากบ่ม 120 min เหลือกิจกรรมของเอนไซม์มากกว่า 75% เมื่อใช้สารยับยั้งที่จำเพาะทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะแสดงว่าเอนไซม์อยู่ในกลุ่ม serine protease มีกิจกรรมของโปรติเอส 50 U/mg สำหรับ CE และ 1260 U/mg สำหรับ PPE (Moreira *et al.*, 2003)

เชื้อรา

Barata *et al.* (2002) ได้ศึกษาอัลคาไลน์โปรติเอสชนิด serine ปลดปล่อยโดย *Fusarium oxysporum* var. *lini* เชื้อราสามารถเจริญในที่มืดและดินเป็นแหล่งไนโตรเจน และแหล่งคาร์บอน โปรติเอสทำให้บริสุทธิ์ใน 3 ขั้นตอนคือ ใช้โครมาโตกราฟี Q Sepharose, Mnity และ MonoQ ส่วนการวิเคราะห์ SDS-PAGE ของโปรตีนบริสุทธิ์พบว่ามวลโมเลกุล 41 kDa โปรติเอสมีกิจกรรมเหมาะสมที่ 45°C และแสดงการลดลงของกิจกรรมอย่างรวดเร็วที่ 48°C และมี pH ที่เหมาะสมประมาณ 8.0 สมบัติของโปรติเอสแสดงว่าไอออนบวก Ca^{2+} และ Mg^{2+} เพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ เมื่อใช้ Nu- benzoyl-DL arginine p-nitroanilide เป็นสับสเตรททดสอบสารยับยั้งของเอนไซม์พบว่าถูกยับยั้งโดย 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride, p-aminobenzamidinium dihydrochloride, aprotinin, 3-4 dichloroisocoumarin และ IV- tosyl-L-lysine chloromethyl ketone ไม่ถูกยับยั้งโดย EDTA หรือ 1,10-phenanthroline โปรติเอสมีค่าคงที่ของ Michaelis-Menten เป็น 0.16 mM และ Vmax เท่ากับ 0.6 $\mu\text{mol product/min.mg}$ เมื่อวิเคราะห์การยับยั้งของเอนไซม์พบว่าเป็นการยับยั้งแบบแข่งขัน โดย p-aminobenzamidinium dihydrochloride ค่า K_i ที่ได้คือ 0.04 mM

Tunga *et al.* (2003) อัดคาไลน์ serine protease ผลิตออกมานอกเซลล์ โดยเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* ด้วยการหมักแบบ solid state ถูกทำให้บริสุทธิ์จากการตกตะกอนด้วย อะซิโตน, โครมาโตรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน และเจลฟิเลตรชัน โดยใช้เครื่อง FPLC มีความบริสุทธิ์ 200 เท่า และศึกษาคุณสมบัติพบว่ามียวโมเลกุลคือ 23 kDa ซึ่งหาได้จาก SDS-PAGE เอนไซม์นี้มีความคงตัวในช่วง pH ที่กว้าง 6.0-10.0 และอุณหภูมิ 4°C -40°C แสดงกิจกรรมสูงสุดที่ pH 8.0 และ 40°C เอนไซม์ยังคงเหลือกิจกรรมเมื่ออยู่ในที่มี oxidizing และ reducing agents มีความคงตัวใน detergents ที่หลากหลาย โลหะหนัก Hg^{2+} , Co^{2+} and Sn^{2+} ไม่มีผลต่อกิจกรรมของโปรติเอส ยับยั้งโดยสารยับยั้งโปรติเอสชนิด serine คือ PMSF มันเป็นการยืนยันว่าโปรติเอสบริสุทธิ์อยู่ใน serine family

เชื้อรากับกิจกรรมของโปรติเอส และโคติเนสซึ่งแยกได้จากดิน จำแนกได้เป็นเชื้อรา *Aspergillus fumigatus* Fresenius TKU003 ซึ่งผลิตโปรติเอส และโคติเนส โดยสามารถเจริญในอาหารที่มีผงของเปลือกกุ้งและปู (SCSP) จากของทะเลที่เหลือทิ้งแล้ว โปรติเอสที่ผลิตออกมานอกเซลล์ถูกทำให้บริสุทธิ์ มวลโมเลกุลของโปรติเอส TKU003 เป็น 124 kDa โดยวิธี SDS-PAGE ซึ่งมีมวลโมเลกุลสูง ค่า pI สำหรับ TKU003 คือ 8.3 มีสถานะที่เป็นต่าง pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 8.0 และ 40°C ตามลำดับ ส่วนความคงตัวของ pH และอุณหภูมิคือ 6.0-10.0 และ 50°C ตามลำดับ กิจกรรมของเอนไซม์สามารถถูกยับยั้งอย่างรุนแรงโดย PMSF จึงเป็นโปรติเอสชนิด serine (Wanga *et al.*, 2005)

ยีสต์

อัดคาไลน์โปรติเอสจาก *Oerskovia xanthineolytica* TK-1 ทำให้บริสุทธิ์โดย phenyl-sepharose CL-4B และ DEAE-sephacel ผ่านเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส มีมวลโมเลกุลของเอนไซม์ คือ 20 kDa โดย SDS-PAGE เอนไซม์โดยมากมีกิจกรรมที่ pH 9.5 ถึง 10.0 และ 50°C ยับยั้งโดยสารยับยั้ง serine protease นอกจากนี้เอนไซม์ยังสามารถย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ของ phenylalanine among *N*-CBZ amino acid *p*-nitrophenol esters อย่างสมบูรณ์ (Saeki *et al.*, 1994)

7. ข้อมูลการศึกษา *Bacillus* sp. A39 ที่นำมาผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส ซึ่งนำมาใช้ในการทำให้บริสุทธิ์ครั้งนี้

สุทธิดา (2548) ได้แยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยโปรตีนในสภาวะที่เป็นด่างจำนวน 61 สายพันธุ์ จากตัวอย่างดิน 30 ตัวอย่าง โดยใช้อาหาร basal medium agar (BMSM) ที่เติม 1% skim milk pH 11.0 และคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสสูง โดยเปรียบเทียบอัตราส่วนและผลต่างระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสและเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี และนำมาคัดเลือกโดยการเปรียบเทียบกิจกรรมของ crude enzyme ที่ผลิตในอาหารเหลว BMSM pH 11.0 พบว่าเชื้อสายพันธุ์ A39 สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสได้สูงสุดที่เวลา 36 h และเป็นแบคทีเรียในجنس *Bacillus* sp. (ภาคผนวกที่ 1) ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดินสวนลำไย จ.จันทบุรี ดินบนต้นที่ 5 ไม่ราดสาร $KClO_3$ จากการศึกษาเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว BMSM ที่มี skim milk 2.5 g/l พบว่า *Bacillus* sp. A39 สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสได้สูงสุดถึง 2.58 U/ml และสันนิษฐานว่า เเคซีนเป็นโปรตีนที่สำคัญในการเป็นตัวเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียสร้างเอนไซม์ และได้มีการศึกษาคุณสมบัติของ crude enzyme (ตารางที่ 4)

8. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

การทำให้โปรตีนเข้มข้น

วิธีการตกตะกอนโปรตีนตาม Roe (2001) แบ่งออกเป็น

1. การตกตะกอนที่ค่าจุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric pH; pI) เรียกวิธีการนี้ว่า Isoelectric precipitation โดยโปรตีนแต่ละชนิดมีค่า pH ที่ทำให้สมดุลของประจุสุทธิบนโมเลกุลเป็นศูนย์ เรียกค่านี้ว่าจุดไอโซอิเล็กทริก เป็นค่าเฉพาะตัวของโปรตีนแต่ละชนิด เมื่อใดที่มีการปรับค่า pH ของสารละลายโปรตีนผสมจนกระทั่งมีค่าเท่ากับค่า pI ของโปรตีน โปรตีนจะรวมตัวกันตกตะกอนเนื่องจากประจุสุทธิเป็นศูนย์ไม่มีแรงผลักทางไฟฟ้าสถิตย์

ตารางที่ 4 คุณสมบัติของ crude enzyme จากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. A39

การศึกษา	คุณสมบัติ
1. สภาพที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส - อุณหภูมิ - pH	55°C 11.0
2. ความคงตัวของเอนไซม์ในสภาวะ ต่างๆ - อุณหภูมิ - pH	30-50°C 7.5-12.0
3. อีออนของโลหะ และสารเคมีที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ - อีออนของโลหะ - สารลดแรงตึงผิว (surfactants) และสารออกซิไดซ์ (oxidizing agent) - สารยับยั้ง (inhibitor)	ที่ความเข้มข้น 10 mM Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} และ Cu^{2+} มีผลกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ ขณะที่ Ni^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Mn^{2+} และ Hg^{2+} มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ทนต่อสารลดแรงตึงผิวประเภท non ionic เช่น tritonX-100 1% และ tween 80 1% แต่ไม่มีผลต่อสาร SDS 10 mM และ hydrogen peroxide 1% ถูกยับยั้งด้วย EDTA และ 1,10-phenanthroline
4. จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์เมื่อใช้เคซีนเป็นสับสเตรท	Km = 14.68 mg/ml และ Vmax = 0.73 $\mu\text{mol/ml.min}$

2. การตกตะกอนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ที่อุณหภูมิต่ำ (Organic solvent precipitation) ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อะซีโตน (acetone), เอทานอล (ethanol) จะไปลดค่ากิจกรรมของน้ำโดยมีผลต่อค่าคงที่ไดอิเล็กตริก (dielectric constant) ของสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย ทำให้ความสามารถในการเป็นตัวทำละลายของน้ำลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์มากขึ้นเรื่อยๆ จนถึงจุดที่แรงกระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีนในส่วนของพลังงานไฟฟ้าสถิตบนโมเลกุลโปรตีนมีแรงกระทำที่สูงกว่าแรงกระทำระหว่างโปรตีนกับน้ำ จะเกิดการรวมตัวกันตกตะกอน แต่ต้องทำในที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อป้องกันการเสียสภาพของโปรตีน (-20 ถึง 4 °C)

3. การตกตะกอนโปรตีนโดยการเพิ่มความแรงไอออน (Ionic strength) ซึ่งเป็นการตกตะกอนโปรตีนโดยใช้เกลือที่มีความเข้มข้นสูง เรียกวิธีนี้ว่า “Salting Out” เป็นการเติมเกลือลงไปในสารละลายโปรตีนผสม เพื่อเพิ่มความแรงของไอออนของสารละลายให้สูงขึ้น จนกระทั่งไอออนของเกลือไปแย่งโมเลกุลของน้ำ ที่ล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีนให้ออกมาล้อมรอบโมเลกุลของเกลือเอง เมื่อใดก็ตามที่แรงกระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับน้ำมีค่าเหลือน้อยกว่าแรงกระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับโปรตีน โปรตีนก็จะจับตัวกันเป็นก้อนตกลงมา เกลือที่นิยมใช้คือ แอมโมเนียมซัลเฟต $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ เนื่องจากเกลือชนิดนี้มีค่าการละลายน้ำสูงมาก และมีค่าสัมประสิทธิ์อุณหภูมิของการละลายค่อนข้างต่ำ (temperature coefficient of solubility) สามารถตกตะกอนโปรตีนที่อุณหภูมิต่ำได้ โดยไม่เกิดการสลายตัว นอกจากนี้ยังมีเกลือชนิดอื่นที่นิยมคือ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO_4) เป็นต้น (Harris and Angal, 1990)

ไดอะไลซิส (dialysis)

เป็นวิธีการแยกสารโมเลกุลใหญ่ และสารโมเลกุลเล็กออกจากกัน โดยอาศัยคุณสมบัติด้านความสามารถในการผ่านเยื่อบางซึ่งปล่อยให้สารโมเลกุลเล็กแทรกผ่านได้ (semipermeable membrane) ซึ่งจะนำเอาโซลไปใส่ในถุงไดอะไลซิส (ถุงเซลโลเฟน; cellophane) สารโมเลกุลใหญ่ที่อยู่ในลักษณะสารละลายคอลลอยด์ ไม่สามารถแทรกผ่านเยื่อบางประเภทนี้ได้ มีการกระจายตัวจากที่มีความเข้มข้นสูงไปสู่ความเข้มข้นต่ำ ถ้าเปลี่ยน buffer ภายนอกถุงอยู่เสมอให้มีความเข้มข้นต่ำ สารโมเลกุลเล็กจะออกมาจนเกือบหมด เป็นเทคนิคที่ใช้กันอยู่เสมอในระหว่างกระบวนการทำให้บริสุทธิ์โดยกำจัดเกลือ, สารละลายอินทรีย์ หรือตัวยับยั้งออก ปรับใช้ได้ดีกับตัวอย่างที่มีปริมาณมาก แต่ในกรณีนี้สามารถแยกขนาดโมเลกุลออกเป็นสองกลุ่มเท่านั้นคือขนาดเล็กกับใหญ่ แต่ไม่สามารถแยกโปรตีนจากโปรตีนอื่นได้ ยกเว้นโปรตีนนั้นมีขนาดเล็กมากจนผ่านเยื่อเลือกผ่านได้ จึงมีข้อจำกัดในการใช้มากกว่าการทำเจลฟิเดรชัน (Price and Stevens, 1989)

อัลตราฟิเตรชัน (Ultrafiltration)

คือ การแยกสารด้วยการกรองผ่านเยื่อแผ่นสังเคราะห์ (membrane) โดยใช้ความดันเป็น driving force (โดยทั่วไปจะใช้แก๊ส ไนโตรเจน ด้วยแรงดันประมาณ 4 atm) ใช้หลักการของ ออสโมซิสย้อนกลับ (reverse Osmosis) โดยแรงดันที่มีค่าสูงกว่าแรงดันออสโมซิสมากระทำต่อต้าน ที่มีสารละลายเข้มข้นทำให้น้ำไหลย้อนกลับ ซึ่งเป็นการต้านการไหลตามธรรมชาติ จะแยกโมเลกุลของสารตั้งแต่ 20-100,000 Å โดยของเหลวที่มีอนุภาคขนาดเล็กที่ละลายอยู่จะถูกกรองผ่านรูของเยื่อแผ่นสังเคราะห์ เยื่อแผ่นสังเคราะห์อาจเป็นชนิด sartocon slice ทำด้วย polysulfone อนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่ารูของเยื่อแผ่นสังเคราะห์ จะติดค้างอยู่บนผิวของเยื่อแผ่นสังเคราะห์ เรียกว่า retentate ส่วนอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่ารูของเยื่อแผ่นสังเคราะห์ จะไหลผ่านออกมา เรียกว่า permeate จะเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเอนไซม์โดยทำให้ปริมาตรของตัวอย่างลดลง โดยสามารถนำวิธีนี้ไปใช้ระหว่างกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ (ชาญวิทย์, ม.ป.ป.)

การทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-drying)

กระบวนการ freeze-drying เป็นกระบวนการทำให้แห้งโดยการ freezing สารละลายให้เป็นน้ำแข็ง โดยทั่วไปใช้ vials ซึ่งจะวางลงบน shelves ที่มีการควบคุมอุณหภูมิภายใน chamber ประมาณ -40°C ผลิตภัณฑ์จะถูกเปลี่ยนรูปไปเป็นของแข็ง ระบบจะทำให้ระเหิดโดยใช้ vacuum pump ภายใต้อากาศต่ำๆ ที่อุณหภูมิต่ำ ต่อมาอุณหภูมิของ shelves จะถูกทำให้เพิ่มขึ้น เรียกกระบวนการนี้ว่า primary drying และไอน้ำที่เกิดจากการระเหิดจะถูกส่งผ่านไป แล้วเกิดการกลั่นตัวใน condense chamber ที่มีอุณหภูมิประมาณ -60°C หลังจากนั้นน้ำแข็งทั้งหมดจะถูกนำออกโดยการระเหิด ผลิตภัณฑ์ยังคงมีปริมาณน้ำอยู่ประมาณ 20-50% ที่ยังละลายอยู่ภายใน amorphous portion ของ solid ที่เรียกว่า dissolved water และน้ำที่ยังหลงเหลืออยู่จะถูกนำออกไปในขั้นตอนที่เรียกว่า secondary drying stage โดยทั่วไปขั้นตอนนี้จะใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการนำน้ำออกไปให้มากขึ้น การทำให้เข้มข้นโดยวิธีนี้จะเสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง แต่มีข้อดีคือ ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความคงตัวดี เนื่องจากการ freezing ทำให้ปฏิกิริยาทางเคมีเกิดช้าลง และกระบวนการเกิดภายใต้อุญญากาศ ทำให้ไม่มี oxygen ที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยา oxidation รวมทั้งกระบวนการใช้อุณหภูมิที่ต่ำมาก ทำให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ และแบคทีเรียไม่สามารถเกิดได้ (วิภาพรรณ, ม.ป.ป.)

วิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion exchange chromatograph)

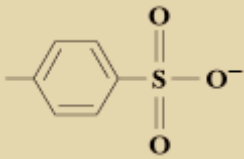
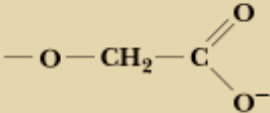
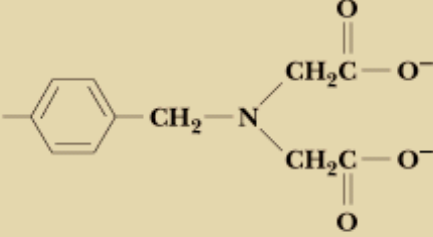
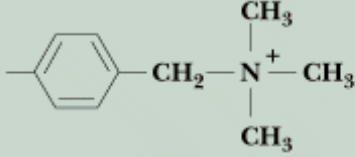
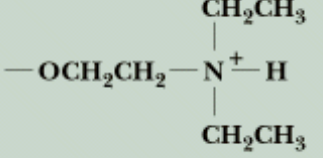
Scope (1994) โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุเป็นเทคนิคทางโครมาโตกราฟีที่ใช้สำหรับการแยกสารที่มีประจุ หรือสารที่สามารถแตกตัวได้ หรือสารที่สามารถเกิด interaction กับหมู่ไอออนได้ แรงยึดเหนี่ยวของสารกับ stationary phase เป็นแรงไฟฟ้าสถิตที่เกิดขึ้นระหว่างประจุที่ต่างชนิดกัน เอนไซม์ที่ใช้กับวิธีนี้ต้องมีปริมาณโปรตีนไม่มากไปกว่า capacity ที่ resin จะรับได้ ไม่อยู่ในสารละลายที่มีเกลือ การแลกเปลี่ยนไอออนมี 2 แบบคือ

1. แลกเปลี่ยนประจุบวก (cation exchange)
2. แลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchange)

สารที่นิยมใช้เป็นตัวกลางหรือโครงสร้างของตัวแลกเปลี่ยนประจุที่เรียกว่า matrix แบ่งเป็น 1.) เรซิน เช่น polystyrene เชื่อมไขว้ด้วย divinylbenzene 2.) เซลลูโลส 3.) cross linked polyacrylamide หรือเจล polydextran การเลือกชนิดของตัวแลกเปลี่ยนประจุต้องพิจารณา ความคงตัวเมื่ออยู่ในสารละลายผสมของตัวอย่างที่ต้องการแยก ต้องไม่ทำปฏิกิริยาใดๆที่ทำให้สารตัวอย่างที่ต้องการแยกเกิดการเสียสภาพ พิจารณานาโมเลกุลของสารผสมในสารละลายตัวอย่าง และพิจารณาการใช้งานที่จำเพาะกับประเภทของงานที่ใช้ เช่น ต้องการแยก หรือทำให้บริสุทธิ์ เป็นต้น

ตารางที่ 5 บัฟเฟอร์ที่ใช้สำหรับโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ

ชนิดของตัวแลกเปลี่ยนประจุ	ชนิดของไอออนในบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้
ตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ	ไอออนบวก เช่น alkylamines, aminoethyl, alcohol, ammonium ethylenediamine, imidazole, Tris, pyridine เป็นต้น
ตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก	ไอออนลบ เช่น acetate, barbiturate, citrate, glycine, phosphate เป็นต้น

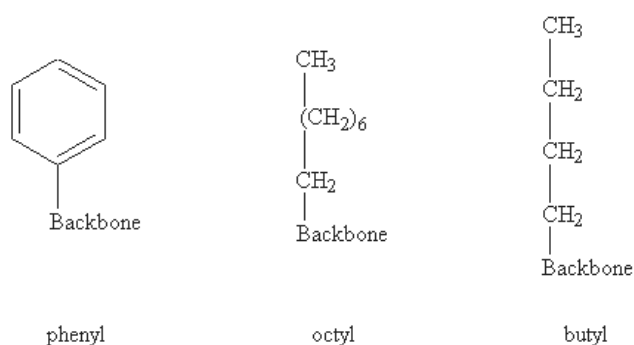
(a) Cation Exchange Media	Structure
Strongly acidic, polystyrene resin (Dowex-50)	 <chem>*c1ccc(cc1)S(=O)(=O)[O-]</chem>
Weakly acidic, carboxymethyl (CM) cellulose	 <chem>*OCH2C(=O)[O-]</chem>
Weakly acidic, chelating, polystyrene resin (Chelex-100)	 <chem>*c1ccc(cc1)CN(CC[NH3+])CC[NH3+]</chem>
(b) Anion Exchange Media	Structure
Strongly basic, polystyrene resin (Dowex-1)	 <chem>*c1ccc(cc1)CN(C)(C)[NH3+]</chem>
Weakly basic, diethylaminoethyl (DEAE) cellulose	 <chem>*OCH2CH2N(CC)[NH3+]</chem>

ภาพที่ 3 โครงสร้างของการแลกเปลี่ยนประจุบวก และประจุลบ

ที่มา: Mari (2006)

ไฮโดรโฟบิก อินเทอร์แอคชัน โครมาโทกราฟี (Hydrophobic interaction chromatography)

เป็นการอาศัยความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ของโปรตีนในการแยก วิธีนี้มีเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เป็นพวกมีขั้ว (polar) และ มีเฟสคงที่ (stationary phase) เป็นพวกไม่มีขั้ว (non-polar) คือ matrix ที่ถูกยึดด้วยกลุ่มของสารอินทรีย์ซึ่งมักใช้เป็น aliphatic chain ขนาด C_8 หลักการคือ โปรตีนมักอยู่ในลักษณะที่มีส่วนของชั้นนอกที่ชอบน้ำ (hydrophilic outer shell) ล้อมรอบแกนที่เป็นพวกไม่ชอบน้ำ (hydro-phobic core) จะไปเกาะกับ ligand บน matrix โปรตีนสามารถมีส่วนที่ไม่ชอบน้ำเป็นช่วงๆที่พื้นผิวได้ เนื่องจากกรดอะมิโนบางตัวที่ไม่มีขั้ว ได้แก่ alanine, methionine, tryptophane และ phenylalanine ในกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ matrix ที่ใช้กันทั่วไปมีหลายชนิด ส่วนใหญ่เป็น agarose แต่ให้เลือกใช้ตามความเหมาะสมเช่น Octyl จะมีความไม่ชอบน้ำสูงกว่า Phenyl ถ้ามีความไม่ชอบน้ำสูงไม่ควรนำไปแยกด้วย Octyl เพราะจะทำให้ชะโปรตีนออกมาได้ยาก จึงควรใช้ Phenyl ถ้าความไม่ชอบน้ำต่ำควรใช้ Octyl เป็นต้น เมื่อโปรตีนเข้าเกาะกับ ligand บน matrix แล้วจะต้องมีการชะเอาโปรตีนนั้นๆออก ทำได้โดยลด ionic strength หรือใช้วิธีแทนที่โดยใช้สารที่มีความสามารถในการจับ matrix ได้ดีกว่า สารเหล่านั้นได้แก่ 1.) Aliphatic alcohols เช่น propanol, butanol และ ethylene glycol ซึ่งจะปลดความมีขั้วของสารละลาย 2.) Aliphatic amines เช่น butylamine สารพวกนี้จะจับกับโปรตีน และจับกับกลุ่มไฮโดรโฟบิกของ matrix ทำให้ลดความมีขั้ว มีผลทำให้โปรตีนหลุดออก (Roe, 2001; Chaykin, 1970)



ภาพที่ 4 องค์ประกอบของเฟสคงที่เป็นกลุ่มที่ไม่มีขั้วขนาดเล็กเช่น (butyl, octyl or phenyl)

ซึ่งจะยึดเกาะกับ โพลีเมอร์ที่ชอบน้ำเช่น cross-linked dextran หรือ agarose

ที่มา: Craig (n.d.)

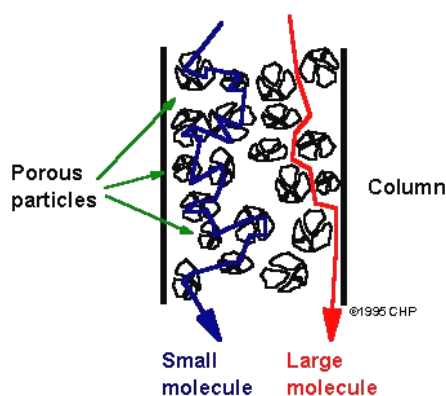
เจลฟิเตรชันโครมาโตกราฟี (gel filtration chromatography)

Price and Stevens (1989) หลักการของเจลฟิเตรชันโครมาโตกราฟี คือใช้เจล ที่มีลักษณะเป็นโมเลกุลสามมิติโครงสร้างตาข่าย open-cross-linked มีรูปร่างเป็น bead แยกระหว่างโมเลกุลของโปรตีนที่มีขนาดแตกต่างกัน โดยเม็ด bead จะแยกแ่การ pack คอลัมน์ และมีรูขนาดต่างๆอยู่ภายในโครงสร้างที่ยอมให้สารโมเลกุลเล็ก เช่น โปรตีนผ่านเข้าออกได้ รูที่เป็นโครงสร้างในเจลจะมีขนาดไม่เท่ากัน โปรตีนโมเลกุลเล็กมากกว่าก็จะเคลื่อนที่เข้าไปในโครงสร้างได้ระยะทางมากกว่า ส่วนโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่ารูที่ผิวเจลจะไม่สามารถผ่านเข้าไปในโครงสร้างของเจลได้ ก็จะไหลผ่านตามช่องว่างระหว่าง bead ดังนั้นสารที่มีโมเลกุลใหญ่กว่าก็จะออกมาจากคอลัมน์ก่อนสารโมเลกุลเล็ก เราสามารถควบคุมระดับของ cross-linked ในการเตรียมเม็ด bead เพื่อให้ได้ขนาดของรูที่หลากหลายทำให้สามารถเปลี่ยนช่วงของมวลโมเลกุลของโปรตีนจึงสามารถแยกโปรตีนต่างกันได้ ตัวอย่าง Sephadex G 100 แยกขนาดของโปรตีนในช่วง 4,000-150,000 เป็นต้น ชนิดของเจลที่ใช้อย่างกว้างขวางมีดังตารางที่ 5

เอนไซม์ที่ใช้ต้องมีปริมาณน้อยที่สุดที่จะทำได้ เนื่องจากเกิดการแพร่ขึ้นภายในคอลัมน์ได้ถ้ามีปริมาณมาก แต่มีกิจกรรมและมีปริมาณโปรตีนมากพอที่จะวัดได้ วิธีนี้ไม่จำเป็นต้องเอาเกลือออกจากเอนไซม์ ดังนั้นประสิทธิภาพของการแยกสารด้วยวิธีนี้ขึ้นกับ ปริมาณสารตัวอย่าง ขนาดของคอลัมน์ควรมีขนาดเล็กและยาวจะดี และการเตรียมคอลัมน์ต้องมีการจัดเรียงตัวของเม็ดเจลสม่ำเสมอ (Scope, 1994)

ตารางที่ 6 ชนิดของเจลฟิเตรชันโครมาโตกราฟีซึ่งมี cross-linked ต่างๆกัน

ชนิดของเจล	cross-linked
Sephasex	Dextrans
Bio-Gel P	Polymers of acrylamide
Sephacryl	Polymer of dextran, acrylamide
Sepharose	agarose



ภาพที่ 5 การแยกสาร โมเลกุลใหญ่ และ โมเลกุลเล็กในคอลัมน์เจลฟิลเตรชัน

ที่มา: Kwak (n.d.)

โครมาโตกราฟีแบบไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง (iso-electric focusing chromatography)

เป็นการแยกสารตามความแตกต่างกันของประจุในการเคลื่อนที่บนสนามไฟฟ้า โดยใช้สารผสมที่มีคุณสมบัติในการทำให้เกิดความแตกต่างของความเข้มข้นประจุ หรือ pH (gradients) หรือเรียกสารนี้ว่า Ampholytes เป็นสารประเภท polyamino acids ภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้าโปรตีนที่มีประจุสุทธิเป็นลบ (ที่ $pH > pI$) เกิดการเคลื่อนที่บนสนามไฟฟ้าจากขั้วลบไปยังขั้วบวกตามความแรงของประจุบนโมเลกุล จนกระทั่งเคลื่อนที่ไปถึงตำแหน่งที่ pH มีค่าเท่ากับ pI ของโปรตีนนั้นๆก็จะหยุดการเคลื่อนที่ เนื่องจากประจุสุทธิบนโมเลกุลของโปรตีนมีสภาพเป็นกลางทางไฟฟ้า วิธีการนี้สามารถแยกความแตกต่างของสารที่มีค่า pI ได้แม้มีค่าใกล้เคียงกันเพียง 0.01 หน่วย pH หลักการของไอโซอิเล็กโตรโฟกัสซิง การทำไอโซอิเล็กโตรโฟกัสซิงสามารถทำได้ทั้งในรูปแบบ horizontal slab คือเป็นการเคลื่อนที่ของโปรตีนในสนามไฟฟ้าบนตัวกลางในแนวระนาบ หรือทำได้ในลักษณะของ disc หรือ column electrophoresis เป็นการเคลื่อนที่บนตัวกลางตามแนวตั้งฉากกับแรงโน้มถ่วงของโลกก็ได้ ข้อสำคัญของการแยกเอนไซม์โดยเทคนิคนี้คือ เอนไซม์ต้องมีความเสถียรภายใต้สภาพที่เกิดความแตกต่างของความเข้มข้นประจุ หรือ pH โดยเฉพาะที่ค่าไอโซอิเล็กทริก (pI) ของเอนไซม์เอง (Price and Stevens, 1984)

โครมาโตกราฟีแบบโฟกัสซิง (chromato focusing chromatography)

เป็นการแยกสารตามคุณสมบัติของค่าไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point ; pI) โดยเทคนิคนี้ให้ประสิทธิภาพการแยกสารสูงมากกว่าทุกวิธีที่ได้กล่าวมาทั้งหมด เนื่องจากเป็นวิธีที่อาศัยความแตกต่างของค่า pI และความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุ เปรียบเสมือนรวมข้อเด่นของเทคนิคไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง และโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุเข้าด้วยกัน โดยสามารถใช้แยกสารที่มีความแตกต่างของค่า pI ได้ถึงระดับ 0.04 - 0.06 หน่วย pH และสามารถใช้กับปริมาณสารตัวอย่างที่มากได้ หลักการของโครมาโตโฟกัสซิง ถูกคิดค้นขึ้นในปี 1977 โดยการทดลองทำให้เกิดความแตกต่างของ pH ภายในคอลัมน์ของการแลกเปลี่ยนประจุ พบว่าโมเลกุลของโปรตีนแสดงค่าประจุสุทธิต่างกันไปตามค่า pH ภายในคอลัมน์ ที่ค่า pH สูงกว่าค่า pI ประจุสุทธิบนโมเลกุลโปรตีนแสดงว่าประจุลบ และที่ pH ต่ำแสดงค่าเป็นบวก ดังนั้นโปรตีนเกิดการเคลื่อนที่ไปเรื่อยๆ ลงมาตามความยาวของคอลัมน์จนกระทั่งเลขจุดที่ pH เท่ากับค่า pI ของโปรตีน ประจุสุทธิก็กลายเป็นประจุตรงกันข้ามกับตอนเริ่มต้น สามารถเกิดการแลกเปลี่ยนประจุจับกับตัวแลกเปลี่ยนประจุในคอลัมน์ได้ ดังนั้นตำแหน่งของการเกิดแรงกระทำระหว่างโปรตีน และตัวแลกเปลี่ยนประจุของโปรตีนแต่ละชนิด ย่อมแตกต่างกันไปทำให้สามารถแยกสารออกจากกันได้ (Scopes ,1988 and Pharmacia,1991a)

โครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ (affinity chromatography)

พัฒนาขึ้นในระหว่างปี ค.ศ.1960-1970 โดยการสร้างกลุ่มสารที่จำเพาะกับโปรตีนหรือสารที่ต้องการแยก เพื่อให้เกิดการยึดจับกันไว้ด้วยแรงดึงดูดใดๆ สารอื่นที่ไม่จำเพาะจะเคลื่อนที่ผ่านลงมาตามคอลัมน์ คงเหลือแต่สารที่ต้องการแยกอยู่ในคอลัมน์ จากนั้นจึงทำการไล่ออกมาในภายหลัง หลักการของโครมาโตกราฟีแบบจำเพาะ ประสิทธิภาพในการแยกโปรตีนที่ต้องการขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารจำเพาะที่เรียกว่า ลิแกนด์ (biospecific ligand ; L) ถูกเหนี่ยวนำให้ติดอยู่บนเฟสคงที่ (stationary phase) ด้วยพันธะโควาเลนต์เฟสคงที่นี้เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า เมทริกซ์ (matrix) กลุ่มลิแกนด์ที่ยึดติดกับเมทริกซ์นี้เรียกว่า ลิแกนด์ตรึง (immobilized ligand) มีความจำเพาะในการจับกับสารที่สนใจ (S) หลังจากที่จะไล่สารอื่นที่ไม่จำเพาะกับลิแกนด์ออกไปจากคอลัมน์แล้ว จึงทำการปรับสภาวะเพื่อให้สารที่สนใจหลุดออกจากการจับยึดโดยลิแกนด์

ตารางที่ 7 กลุ่มสารที่ต้องการแยก และชนิดของลิแกนด์ที่จำเพาะกัน

สารที่สนใจ	ลิแกนด์
เอนไซม์	- Substrate analogue , Inhibitor , Cofactor
แอนติบอดี	- Antigen , Virus , Cell
เลคติน	- Polysaccharide , Glycoprotein , Cell surface receptor , Cell
กรดนิวคลีอิก	- Complementary base sequence , Histone , Nucleic acid Polymerase , Binding protein
ฮอร์โมน , วิตามิน	- Receptor , Carrier protein
เซลล์	- Cell surface specific protein , Lectin

ที่มา : Pharmacia (1991b) and Dean *et al.* (1991)

อิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis)

เทคนิควิธีการแยกโมเลกุลให้บริสุทธิ์นี้ใช้หลักการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีนผ่านสนามไฟฟ้า โปรตีนที่มีประจุ และขนาดของโมเลกุลต่าง ๆ กันจะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วต่างกัน ทำให้สามารถแยกสารออกจากกันได้ โปรตีนที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่ไปที่ขั้วลบ โปรตีนที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปที่ขั้วบวก โปรตีนที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าโปรตีนที่มีขนาดเล็ก แต่เทคนิคนี้ไม่เหมาะสมกับการแยกสารละลายเอนไซม์ที่ยังมีโปรตีนปนเปื้อนอยู่หลายชนิด เนื่องจากโปรตีนจะเกิดการแพร่กระจายเข้ามาซ้อนทับกัน ทำให้ไม่สามารถแยกให้บริสุทธิ์ได้โดยง่าย วิธีที่นิยมคือ sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE)

Andrews (1986) บอกถึงการ form โครงสร้างของเจล polyacrylamide โดย form vinyl polymerization ของ monomers ที่เป็น acrylamide $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ กลายเป็นสายยาวของ polyacrylamide และมี cross-linking โดย $\text{N,N}'$ -methylene-bis-acrylamide $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ เกิดโครงสร้างตาข่ายแบบ 3 มิติ ปฏิกิริยา polymerization เกิดสายแบบสุ่มในการรวม polyacrylamide กับโมเลกุลของ Bis โดยมี catalyst เป็น $\text{N,N,N}',\text{N}'$ -tetra methylethylene diamine (TEMED) ส่วน initiator อาจเป็น ammonium persulphate หรือ riboflavine ความเข้มข้นของ acrylamide ใช้กำหนดความยาวเฉลี่ยของสาย polymer ขณะที่ความเข้มข้นของ Bis กำหนดการ form cross-link

เจล acrylamide มีคุณสมบัติ 2 ค่า เป็นตัวกำหนดขนาดรูของเจล ดังนี้ %T คือ มวลทั้งหมดของ monomer (acrylamide + bisacrylamide cross-linker) และ %C คือสัดส่วนของ cross-linker เป็น % ของ monomer สาร SDS นั้นมีคุณสมบัติเป็น detergent จะทำปฏิกิริยาตัดพันธะไฮโดรเจนของโปรตีน แยกโปรตีนออกเป็นแต่ละสายโพลีเปปไทด์ หรือ subunit และเนื่องจาก SDS เป็นประจุลบที่แรงจึงดึงดูดโปรตีนให้เป็นประจุลบทั้งหมด ดังนั้นโปรตีนจะเคลื่อนที่ด้วยขนาดของโมเลกุลเพียงอย่างเดียวจากขั้วลบไปขั้วบวก โดยไม่มีผลจากประจุของโปรตีนมาเกี่ยวข้อง สามารถเปรียบเทียบระยะทางการเคลื่อนที่กับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุลที่แน่นอน จะทำให้สามารถคำนวณหามวลโมเลกุลของแถบโปรตีนที่ศึกษาได้ (ปริมาณโปรตีนที่ใช้ใส่ลงในช่อง (well) ไม่น้อยกว่า 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ถ้าน้อยกว่าต้องทำให้เข้มข้นขึ้น)

การวัดปริมาณโปรตีน

ทำการวัดปริมาณโปรตีนในสารละลายตามวิธีการของ Lowry *et al.* (1951) ซึ่งวิธีนี้มีความไวของการตรวจวัดอยู่ในช่วง 20-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ โดยโปรตีนทำปฏิกิริยาสารเคมี ซึ่งทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินขึ้น โดยปฏิกิริยาเกิดสองขั้นตอนดังนี้ ขั้นที่ 1 พันธะเปปไทด์ในโปรตีนทำปฏิกิริยากับ CuSO_4 ในด่างเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ Cu^{2+} ที่เกิดพันธะ coordination กับอิเล็กตรอนคู่อิสระของไนโตรเจนในพันธะเปปไทด์ 4 คู่ และของออกซิเจนในน้ำอีก 2 คู่ ขั้นที่ 2 สารเชิงซ้อนที่ได้และหมู่ alkyl ของกรดอะมิโนชนิด tryptophan และ tyrosine ในโปรตีนช่วยกันรีดิวซ์สารละลาย Folin ซึ่งมีส่วนประกอบเป็น phospho-molybdic acid ($24 \text{ MoO}_3 \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) ผสมกับ phosphotungstic acid ($24 \text{ WO}_3 \cdot 2\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 48\text{H}_2\text{O}$) ให้เป็นสารละลายสีน้ำเงินซึ่งดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 650 nm

9. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์แล้ว

แบ่งออกเป็นการศึกษามวลโมเลกุล และหน่วยย่อย, อุณหภูมิที่เหมาะสม, ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์, pH ที่เหมาะสม, ผลของ pH ต่อความคงตัวของเอนไซม์, ผลของอิออนโลหะ, สารยับยั้งเอนไซม์, ความจำเพาะกับสับสเตรท, เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์กับเอนไซม์ทางการค้า และ จลนพลศาสตร์

9.1 การศึกษามวลโมเลกุลของเอนไซม์ และหน่วยย่อยของเอนไซม์

มี 3 วิธีคือเจลฟิเตรชัน, และ SDS-PAGE และ MALDI-MS

9.1.1 การศึกษาหามวลโมเลกุลของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์เจลฟิเตรชัน

Dutta and Banerjee (2006) ได้ศึกษาแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสออกมานอกเซลล์ ซึ่งจำแนกได้ว่าเป็น *Pseudomonas sp.* RAJR 044 และ mutant ของเชื้อสายพันธุ์นี้คือ JNGR 242 พบแถบโปรตีนเดี่ยวที่เหมือนกันทั้ง 2 สายพันธุ์ (parent and mutant) มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 14.4 kDa บน SDS-PAGE แสดงว่าโปรตีนที่บริสุทธิ์แล้วมีความเหมือนกัน มีรายงานว่าโปรติเอสอื่นที่ผลิตออกมานอกเซลล์จาก *pseudomonas fluorescens* 22F ซึ่งทำให้บริสุทธิ์แล้วมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 52 kDa และ 47 kDa ตามลำดับ หาได้โดย SDS-PAGE และเจลฟิเตรชัน (Schokker and Boekel, 1997) และอัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Pimelobacter sp.* Z-483 มีมวลโมเลกุล 23 kDa และ 27 kDa สามารถวิเคราะห์โดย SDS-PAGE และเจลฟิเตรชันเช่นกัน (Oyama, *et al.* 1997)

Wanga *et al.* (2006) ได้ศึกษามวลโมเลกุลของอัลคาไลน์โปรติเอส 2 ชนิด *Vibrio fluvialis* TKU005 ในรูปที่โปรตีนไม่เสียสภาพ ด้วยวิธีเจลฟิเตรชัน (คอลัมน์ Sephacryl S-100; 1.5 cm × 1.5 cm, Amersham Pharmacia) equilibrated คอลัมน์ด้วย 50 mM phosphate buffer, pH 7 โปรตีนมาตรฐานที่ใช้คือ Bovine serum albumin (67 kDa), amylase (50 kDa), และ hen egg white lysozyme (14 kDa) พบว่ามวลโมเลกุลของโปรติเอส FI เท่ากับ 41 kDa และ 42 kDa ได้จาก SDS-PAGE และ Sephacryl S-100 ตามลำดับ ส่วนมวลโมเลกุลของโปรติเอส FII เท่ากับ 39 kDa จาก SDS-PAGE แต่ในทางตรงกันข้ามมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 8 kDa บน Sephacryl S-100 การที่มีมวลโมเลกุลน้อยกว่าอาจอธิบายได้ว่าโปรติเอส FII มีความจำเพาะกับ Sephacryl S-100 จึงชะโปรตีนออกมาได้ไม่หมด

9.1.2 การศึกษาหามวลโมเลกุลและหน่วยย่อยของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์ โดยวิธี SDS-PAGE

Irwin *et al.* (2001) ใช้อุปกรณ์ขนาดเล็กยี่ห้อ (Bio-Rad) ทำอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วย 10% SDS-PAGE เพื่อดูความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ และดู subunit ของเอนไซม์ โปรตีนที่ใช้ทำโปรตีนมาตรฐานได้แก่ phosphorylase b, 97.4 kDa; BSA, 66.2 kDa; aldolase, 39.2 kDa; triose phosphate isomerase, 26.6 kDa; trypsin inhibitor, 21.5 kDa และ lysozyme, 14.4 kDa ได้โปรติเอสของแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (psychrophilic bacterium) สายพันธุ์ PA-43 มีขนาด 24 kDa

Mei and Jiang (2005) ใช้ SDS-PAGE ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ และหามวลโมเลกุลของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Vibrio metschnikovii* DL33-51 โดยใช้ markers ของ Pharmacia: Sweden เห็นแถบของโปรตีนโดยย้อมสี Coomassie Blue R-250 พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ขนาด 29.5 kDa

9.1.3 การศึกษาหามวลโมเลกุลเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์โดยใช้เครื่อง MALDI-MS

Fricke *et al.* (1999) ในการศึกษาอัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Pseudomonas aeruginosa* ได้ใช้เครื่อง MALDI mass spectrophotometry หามวลโมเลกุลของเปปไทด์ ซึ่งมี α -cyano-4-hydroxycinnamic acid และ nitrocellulose เป็น matrix และยิงด้วย N_2 -laser ซึ่งดูดกลืนแสงที่ 337 nm ใช้พลังงาน 28.5 kV ได้มวลโมเลกุลเท่ากับ 44.6 ± 0.5 kDa

Pekkarinen (2002) ได้ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์ และคุณสมบัติของอัลคาไลน์ serine protease ของ *Fusarium culmorum* พบว่ามีมวลโมเลกุลของเอนไซม์จาก mass spectrophotometry เท่ากับ $28,663 \pm 50$ Da ขณะที่มวลโมเลกุลที่ได้จาก SDS-PAGE มีค่าประมาณ 26.8 kDa

9.2 ศึกษาหาค่าอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์ และผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส บริสุทธิ์

ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรม และความคงตัวของโปรตีนจาก *Bacillus* sp. JB-99 เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของโปรตีนที่อุณหภูมิแตกต่างกันช่วง 30°C-90°C ที่ pH 7.5 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นในช่วงอุณหภูมิ 30°C- 60°C และลดลงที่อุณหภูมิสูงกว่า 60°C อุณหภูมิที่เหมาะสมของอยู่ที่ 60°C ซึ่งเหมือนกับโปรตีนของ *Bacillus* อื่นๆ ส่วนความคงตัวของเอนไซม์สูงทำโดยวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือที่ 60°C หลังจากบ่มเอนไซม์ โดยใช้อุณหภูมิระหว่าง 30°C และ 90°C สำหรับ 2 h ซึ่งให้เห็นว่าเอนไซม์มีความคงตัวที่ 30°C สำหรับ 2 h ขณะที่ 40°C และ 80°C กิจกรรมของเอนไซม์สูญเสียไป 14% และ 84% จากเดิมตามลำดับ และเมื่อทำการบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 1 h ที่ 70°C และ 80°C เอนไซม์รักษากิจกรรมไว้ได้ 63 และ 25% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อมี 10 mM Ca^{2+} , สามารถรักษากิจกรรมไว้ได้ 83 และ 74% ตามลำดับ (Nascimento and Martins, 2004)

ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิจาก *Pseudomonas aeruginosa*: strain K เอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมีความคงตัว และมีกิจกรรมอยู่ที่ 100% หลังจากบ่ม 30 min ณ อุณหภูมิ 37°C -50°C แต่กิจกรรมลดลง 75% ที่อุณหภูมิ 60°C และกิจกรรมลดลงอย่างรวดเร็วที่ 70°C และ 80°C มีกิจกรรมเหลือเพียง 38 และ 2% ตามลำดับ (Rahman *et al.*, 2006)

9.3 ศึกษาหาค่า pH ที่เหมาะสม (optimum pH) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนเอสบริสุทธิ และผลของ pH ต่อความคงตัวของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนเอสบริสุทธิ

Banik and Prakash (2004) ทดลองหา pH ที่เหมาะสมของโปรตีนที่ผลิตโดย *B. cereus* โดยวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน ที่ pH แตกต่างกันดังนี้ (pH 7.5, 8.5, 9.5, 10.5 และ 11.5) โดยใช้ Phosphate buffer, Tris-HCl buffer และ $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaOH}$ buffer บ่มที่ 50°C พบว่าส่วนใหญ่มีกิจกรรมที่ pH 10.5 กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อ pH เพิ่มขึ้นจนถึง 10.5 และเมื่อเพิ่ม pH ขึ้นไปอีกแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ที่ลดลง ที่ pH 7.5 กิจกรรมของเอนไซม์ได้เพียง 18% เพิ่มขึ้นเป็น 81.7-86% ที่ pH 8.5 และ 9.5 ตามลำดับ และมีกิจกรรมสูงสุดที่ pH 10.5 ซึ่งเป็นลักษณะที่จำเป็นสำหรับการใช้อัลคาไลน์โปรตีนที่ใช้เป็นสารเติมไปในผงซักฟอก มีรายงานแสดง pH ที่เหมาะสม 10.0-10.5 สำหรับโปรตีนจาก *B. brevis* (Banerjee *et al.*, 1999), *Xanthomonas maltophilia* (Debette, 1991) และ *Vibrio metschnikovii* (Kwon *et al.*, 1994)

รายงานการศึกษาอัลคาไลน์โปรตีนจาก haloalkaliphilic bacterium (Vel) พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมอยู่ในช่วง 8.5-12.0 pH ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง pH 10.0 ถึง 11.0 ส่วนผลของ pH

กับความคงตัวของเอนไซม์พบว่ามีความคงตัวสูงที่ pH 9.0-10.0 มากกว่า 30 min ขณะที่ pH 7.0 กิจกรรมเหลือเพียง 60% (Patel, 2006)

9.4 ศึกษาอิออนโลหะที่มีผลกระทบต่อการทำกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์

Towatana *et al.* (1999) ได้ศึกษาอัลคาไลน์โปรติเอสให้บริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. PS719 ซึ่งชอบความเป็นด่างและอุณหภูมิสูง แยกได้จากดินบริเวณน้ำพุร้อน ทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติพบว่าโปรติเอสพบกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อใช้ azocasein เป็นสับสเตรท ที่ pH 9.0 อุณหภูมิ 75°C กิจกรรมของเอนไซม์ถูกกระตุ้นด้วย Ca^{2+} แต่ยับยั้งโดย Fe^{2+} และ Cu^{2+}

กิจกรรมอัลคาไลน์โปรติเอสของ *Penicillium* sp. ที่แยกได้จากดิน เพื่อการย่อยโปรตีน ถั่วเหลืองหมักภายใต้สภาวะ solid substrate fermentation (SSF) ทำการบ่มเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสใน 0.1 M borate buffer, pH 9.0 ที่อุณหภูมิ 45°C ก่อนกับ Fe^{3+} , Hg^{2+} และ Cu^{2+} พบว่ามีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ในทางตรงกันข้าม Ca^{2+} , Mg^{2+} และ Mn^{2+} เพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ *Penicillium* sp. เจริญที่ 28°C 3 วัน บนรำข้าวสาลี 1 g ผสมกับ 25 mg โปรตีนถั่วเหลือง ทำให้ขึ้นด้วยสารละลายเกลือ (1 ml/g), บ่มกับ 1×10^{10} spore/g และสกัดด้วย 0.1 M borate buffer พบการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสที่สูง 8,907 U/g IDS (Agrawal *et al.*, 2004)

9.5 ศึกษาการยับยั้งของตัวยับยั้งเอนไซม์ต่อการทำกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์

Karadzic *et al.* (2004) ได้ศึกษาผลของสารยับยั้งต่อกิจกรรมของโปรติเอสที่ผลิตจาก *P. aeruginosa* พบว่ากิจกรรมของโปรติเอสถูกยับยั้งอย่างรุนแรงโดย 1,10-phenanthroline, EDTA ซึ่งให้เห็นว่าเป็น metalloenzyme และ ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์โดย DTT ดังนั้นเอนไซม์ต้องประกอบไปด้วยพันธะ disulfide ในส่วนโครงสร้างหน่วยย่อย ผลจากองค์ประกอบนี้ทำให้เอนไซม์มีความคงตัวต่ออุณหภูมิ ส่วนสารยับยั้ง serine protease คือ PMSF ไม่มีผลยับยั้งเอนไซม์

Genckal and Tari (2006) พบว่าเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสมีกิจกรรมคงเหลือ 93% หลังจากบ่ม 1 h กับ EDTA แสดงว่าไม่ถูกยับยั้ง แต่ถูกยับยั้งโดย 0.01 M PMSF เป็นที่รู้กันว่า EDTA เป็นสารยับยั้งที่จำเพาะของ metalloprotease และ PMSF มีความจำเพาะกับ sulphonate ที่จำเอนกับ

serine residue ใน active site ของโปรติเอส จากผลการยับยั้งแสดงว่าอัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. L21 อยู่ใน serine protease families

9.6 ศึกษาความจำเพาะของสับสเตรตกับเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์

Kumar *et al.* (1999) ได้ศึกษาอัลคาไลน์โปรติเอส 2 ชนิดที่ผลิตออกมานอกเซลล์ โดย *Bacillus* ที่ชอบความเป็นด่าง ทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์โดย SDS-PAGE ทั้งโปรติเอส AP-1 และ AP-2 มีมวลโมเลกุลประมาณ 28 และ 29 kDa ตามลำดับ โปรติเอสที่บริสุทธิ์สามารถย่อยสลายทั้งสับสเตรตที่เป็นโปรตีนธรรมชาติเช่น เคซีน, elastin, keratin, albumin และสับสเตรตสังเคราะห์ที่เป็น chromogenic peptide; Glu-Gly-Ala-Phe-pNA และ Glu-Ala-Ala-Ala-pNA มีค่า K_m สำหรับ Glu-Gly-Ala-Phe-pNA เท่ากับ 1.05 mM และ 1.29 mM ตามลำดับ สำหรับ Glu-Ala-Ala-Ala-pNA เท่ากับ 3.81 mM และ 4.79 mM ตามลำดับ ข้อมูลทางจลนพลศาสตร์แสดงให้เห็นว่าโปรติเอสทั้งคู่ชอบกรดอะมิโนที่เป็น aromatic ที่ตำแหน่ง P_1 มากกว่า small aliphatic

Singh *et al.* (2001) ได้ศึกษาความจำเพาะของสับสเตรตต่อโปรติเอส A และ B พบว่ามีความจำเพาะกับสับสเตรตเหมือนกันแม้ว่าจะมีความแตกต่างของความไม่ชอบน้ำ และมวลโมเลกุลของสับสเตรตที่เป็นโปรตีนธรรมชาติได้แก่ hemoglobin ซึ่งโปรติเอสทั้งคู่สามารถย่อยได้มีประสิทธิภาพมากที่สุด ตามด้วยเคซีน และ BSA ส่วน azoprotein ทั้ง azoalbumin และ azocasein เอนไซม์ทั้งคู่ก็สามารถย่อยได้ ส่วนสับสเตรตสังเคราะห์ p-nitroanilides มีกิจกรรมมากที่สุดโดย N-Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA เป็นสับสเตรต สำหรับโปรติเอสที่เป็น chymotrypsin-like serine ในทางตรงกันข้ามสำหรับ N-Cbz-Ala-Ala-Leu-pNa และ N-Cbz-Gly-Gly-Leu-pNa มีกิจกรรมการย่อยน้อย ซึ่งเป็นสับสเตรตที่ดีสำหรับ subtilisins ดังนั้นเอนไซม์ A และ B เป็นโปรติเอสที่เป็น chymotrypsin-like serine

9.7 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ทางการค้า

Takami *et al.* (1990) ได้ศึกษาอัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. no. AH-101 แสดงกิจกรรมการย่อยโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ (fibrous proteins เช่น elastin และ keratin) ที่ pH 13.0 เท่ากับ 3,970 U/mg protein ซึ่งสูงกว่าเป็น 3 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับ Proteinase K ซึ่งได้จากเชื้อรา *Tritirachium album* เป็นที่รู้จักดีว่าเป็นเอนไซม์ย่อย keratin (Ebeling *et al.*, 1974) มีกิจกรรมการย่อย

keratin เท่ากับ 1,414 U/mg protein ดังนั้นเอนไซม์นี้จึงเหมาะสำหรับการใช้ในอุตสาหกรรมการฟอกหนัง ส่วนกิจกรรมจำเพาะของการย่อย elastin ของเอนไซม์จาก *Bacillus* sp. no. AH-101 นี้ เท่ากับ 495 U/mg protein ที่ pH 10.5 ซึ่งมีค่าต่ำกว่า subtilisins; elastase ของ Ya-B ซึ่งมีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 2,440 U/mg protein ภายใต้สภาวะที่เหมือนกัน

9.8 ศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ (kinetic)

มีรายงานของ Thangum and Rajkumar (2002) ได้ศึกษาจลนพลศาสตร์ของอัลคาไลน์โปรติเอสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วจากแบคทีเรีย *Alcaligenes faecalis* ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ 55°C pH ที่เหมาะสมอยู่ที่ 9.0 พบว่ามีค่า Km เท่ากับ 1.66 mg/ml และ Vmax เท่ากับ 526 U/min /mg protein โดยใช้ เคซีนเป็นสับสเตรท

Sousa *et al.* (2006) ได้ศึกษาโปรติเอสชนิดใหม่ที่ผลิตโดย *Bacillus cereus* ซึ่งเจริญบนไม้ที่เป็นแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน ทำให้บริสุทธิ์ และมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 45.6 kDa เป็น neutral metalloprotease กิจกรรมที่เหมาะสมอยู่ที่อุณหภูมิ 45°C และ pH 7.0 สับสเตรท furyl-acryloyl peptides ซึ่งเป็นสับสเตรทสำหรับ thermolysin เอนไซม์แสดงกิจกรรมการย่อยสูงโดยมีค่า Km เท่ากับ 0.858 mM และ 2.363 mM สำหรับ N-(3-[2-Furyl]acryloyl)-Ala-Phe amide และ N-(3-[2-Furyl]acryloyl)-Gly-Leu amide ตามลำดับ โปรติเอสสามารถย่อยสับสเตรทที่เป็นโปรตีนเช่น azocasein, azocoll, keratin azure และไม้ ส่วนการศึกษาอัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Pseudomonas aeruginosa* PseA ที่แยกได้จากดินเมื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของ เคซีน มีอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมอยู่ที่ 60°C และ 8.0 คำนวณโดยใช้ Leonora software program พบว่าค่า Km เท่ากับ 2.69 mg/ml และค่า Vmax เท่ากับ 3.03 $\mu\text{mol/min}$ (Gupta *et al.*, 2005)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

- 1.1 ชุดอุปกรณ์อิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis equipment) (Hoefer, USA)
- 1.2 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง UV/Vis (spectrophotometer) (Labquip, England)
- 1.3 เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมความเย็น (refrigerated centrifuge) (Jouan, USA)
- 1.4 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH-meter) (Denver, USA)
- 1.5 เครื่องแยกเก็บสารอัตโนมัติ (fraction collector) (Akta, Sweden)
- 1.6 ปั๊ม (peristaltic pump) (Bio-rad, USA)
- 1.7 เครื่อง FPLC (fast flow protein liquid chromatography) (Akta, Sweden)
- 1.8 เครื่องป้อนพลังงาน (power supply) (Wealtec, USA)
- 1.9 ปิเปตต์อัตโนมัติ (autopipette: Pipetteman, Gilson, France)
- 1.10 เครื่องชั่งวิเคราะห์ (analytical balance) (Denver, USA)
- 1.11 เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer) (Fisher scientific, USA)
- 1.12 เครื่องผสมสาร (vortex mixer) (Fisher scientific, USA)
- 1.13 เครื่องบด (Hammer mill) (IKA, Germany)
- 1.14 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) (Grant, England)
- 1.15 ถุงไดอะไลซิส (dialysis bag, MWCO 10,000) (Cell.Sep, USA)
- 1.16 เซนตริคอน (centricon, MWCO 10,000) (Amicon, USA)

2. สารเคมี

- 2.1 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์
 - Ammonium sulphate, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (AR grade) (Carlo erba, France)
 - Agua sorb (BML, Thailand)
 - Mono QTM HR 5/5 column (Pharmacia biotech, Sweden)
 - Phenyl Sepharose 6 Fast flow (high sub) (Pharmacia biotech, Sweden)
 - Glycine (AR grade) (Sigma, USA)
 - Sodium hydroxide (AR grade) (Merck, Germany)

Sodium chloride (AR grade) (Carlo erba, France)

Sephacryl S-200 (Phamacia Biotech, Sweden)

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการวัดปริมาณโปรตีนและวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

Copper (II) sulphate 5-hydrate (AR grade) (BDH, UK)

Folin-Ciocalteu's phenol reagent (AR grade) (Fluka, Switzerland)

Glycine (AR grade) (Sigma, USA)

Potassium sodium tartrate (AR grade) (UNILAB, Australia)

Sodium carbonate (AR grade) (BDH, Germany)

Sodium hydroxide (AR grade) (Merck, Germany)

2.3 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเจลพอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide gel)

Acrylamide (AR grade) (Plusone, Sweden)

Ammonium persulphate (AR grade) (Fluka, Switzerland)

Bromophenolblue (AR grade) (Merck, Germany)

Coomassie brilliant blue R-250 (AR grade) (Sigma, USA)

Glycerol (AR grade) (BDH, UK)

N,N'-methylenebis acrylamide, BIS (AR grade) (Plusone, Sweden)

β -mercaptoethanol (AR grade) (Sigma, USA)

Sodium dodecyl sulfate, SDS (AR grade) (Merck, Germany)

Sodium hydroxide (AR grade) (BDH, UK)

N,N,N',N'-tertramethylethylene diamine, TEMED (AR grade) (Plusone, Sweden)

Tris(hydroxymethyl)amionomethane, Tris (AR grade) (Merck, Germany)

2.4 โปรตีนมาตรฐานสำหรับคอลัมน์เจลฟิเตรชัน และ SDS-PAGE (Sigma, USA)

4.1 โปรตีนมาตรฐานสำหรับคอลัมน์เจลฟิเตรชัน

Blue dextran	มวลโมเลกุล 2,000 kDa
α -amylase	มวลโมเลกุล 200 kDa
Alcohol dehydrogenase	มวลโมเลกุล 150 kDa
Bovine serum albumin (BSA)	มวลโมเลกุล 66 kDa

Carbonic anhydrase	มวลโมเลกุล 29 kDa
riboflavin	มวลโมเลกุล 376 kDa

4.2 โปรตีนมาตรฐานสำหรับ SDS-PAGE (Recombinant proteins) (rainbow, USA)

1	มวลโมเลกุล 250 kDa
2	มวลโมเลกุล 160 kDa
3	มวลโมเลกุล 105 kDa
4	มวลโมเลกุล 75 kDa
5	มวลโมเลกุล 50 kDa
6	มวลโมเลกุล 35 kDa
7	มวลโมเลกุล 30 kDa
8	มวลโมเลกุล 25 kDa
9	มวลโมเลกุล 15 kDa
10	มวลโมเลกุล 10 kDa

วิธีการ

1. การเลี้ยงเชื้อ

การผลิตเอนไซม์ทำตามที่ได้ศึกษาไว้แล้ว (กฤษดากร, 2549) โดยนำเชื้อ *Bacillus* sp. A39 มาเลี้ยงบน BSM agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 h เชื้อเชื้อ 4 loop ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 500 ml ที่มีอาหาร BSM broth pH 11.0 ปริมาตร 50 ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 rpm 12 h เพื่อทำเป็นกล้าเชื้อ ทำการวัดค่าความขุ่น (Optical density; OD) แล้วเจือจางให้ได้เท่ากับ 0.6 จากนั้นเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 7 l โดยใช้กล้าเชื้อ 2% ของปริมาตรอาหาร เผลวเริ่มต้นในถังหมัก (2 l) เพาะเลี้ยงโดยการเติมอาหารแบบคงที่ (constantly fed- batch culture) (2.5 l) ความเร็วรอบที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง 300-550 rpm. อุณหภูมิ 30°C ค่าการละลายออกซิเจน (Dissolved oxygen concentration; DO) เท่ากับ 70 % ของอากาศอิ่มตัว และ air flow rate 1 vvm โดยมีการเติมก๊าซออกซิเจนเมื่อจำเป็น

2. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส ทำโดยการวัดปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นภายหลังจากการย่อยโปรตีนโดยเอนไซม์ ในการทดลองนี้ใช้ 4% เคซีน (ภาคผนวก ข. ข้อ 1) ที่ละลายใน 50 mM glycine-NaOH buffer pH 11.0 เป็นสับสเตรท จากนั้นนำมา 125 μ l เติม 1 M glycine-NaOH buffer 25 μ l และเติมน้ำกลั่น 100 μ l ทำปฏิกิริยากับ crude enzyme ที่มีความเจือจางเหมาะสม 250 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 10 min หยุดปฏิกิริยาด้วย 10% trichloroacetic acid (TCA) (ภาคผนวก ข. ข้อ 1) ปริมาตร 500 μ l ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,386 $\times$ g เป็นเวลา 10 min นำส่วนใสมาวัดปริมาณไทโรซีนด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Ferrero *et al.* (1996) (ภาคผนวก ข. ข้อ 2)

กำหนดให้ 1 U ของเอนไซม์ เท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่สามารถย่อยเคซีน แล้วเกิดไทโรซีน 1 μ mol ในเวลา 1 min

3. การวัดปริมาณโปรตีน

ทำการวัดปริมาณโปรตีนในสารละลายตามวิธีการของ Lowry *et al.* (1951) และคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) (ภาคผนวก ข. ข้อ 3)

4. ศึกษาวิธีการทำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสให้บริสุทธิ์ และสังเกตความคงตัวของเอนไซม์ขณะเก็บรักษา

ศึกษาวิธีการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยทำการเจือจางเอนไซม์ด้วยวิธี dialysis และโดยการทำเอนไซม์ให้เข้มข้น 3 วิธี ด้วยการตกตะกอน 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, วิธี lyophilization (Freeze dry) และ ultrafiltration นำเอนไซม์ที่ได้หลังจากผ่านการทำให้เข้มข้นแต่ละวิธีมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีน เพื่อคำนวณกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ และสังเกตค่ากิจกรรมจำเพาะที่เปลี่ยนแปลงไปทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 1 เดือน

5. การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

นำเอนไซม์มาทำการตกตะกอนโปรตีนด้วย 80 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

5.1 วัดปริมาตรเอนไซม์ที่นำมาตกตะกอนโปรตีน คำนวณปริมาณที่จะเติมลงไปในช่วงความเข้มข้นอิ่มตัวของ 0 ถึง 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (จากตารางผนวกที่ ค1) เริ่มทำการตกตะกอนโปรตีนโดยเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ลงในเอนไซม์อย่างช้าๆ พร้อมทั้งคนเบาๆ ด้วยเครื่องกวนแท่งแม่เหล็กที่อุณหภูมิประมาณ 4°C จนเกลือละลายหมด ทิ้งไว้ข้ามคืนหลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็วรอบ 12,520 ×g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 min แยกส่วนใสออกจากตะกอน

5.2 นำตะกอนที่ได้มาละลายด้วย 50 mM glycine-NaOH buffer, pH 11.0 และนำไปไดอะไลส์ (dialyzed) เพื่อแยกเอา $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ออก ใน 50 mM glycine-NaOH buffer, pH 11.0 ที่อุณหภูมิ 4°C จนเกลือออกหมด หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออกอีกครั้ง ที่ความเร็วรอบ 12,520 ×g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 min เก็บเฉพาะส่วนใส วัดปริมาตรของสารละลาย ตรวจวัดปริมาณโปรตีน และกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรติเอส คำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ของแต่ละส่วน ซึ่งจะนำเฉพาะส่วนที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะ สูงที่สุดไปทำให้บริสุทธิ์ต่อไปโดยคอลัมน์โครมาโตกราฟี

6. การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดย Fast Flow Protein Liquid Chromatography (FPLC) ด้วยคอลัมน์ Phenyl Sepharose 6 Fast flow (high sub)

นำสารละลายเอนไซม์จากข้อ 5.2 มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วย aqua sorb จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์มาเติม 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ก่อนนำมาผ่านคอลัมน์ Phenyl sepharose (ขนาด 0.5 × 5 cm) โดยใช้เครื่อง FPLC จะโปรตีนส่วนที่ไม่จับคอลัมน์ออกด้วย 50 mM glycine-NaOH buffer, pH 11.0 ที่มี 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และจะโปรตีนส่วนที่จับคอลัมน์ออกโดยค่อยๆ ลดความเข้มข้นของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ละลายอยู่ใน 50 mM glycine-NaOH buffer, pH 11.0 ดังนี้คือ 0.6, 0.4, 0.2 และ 0 M ตามลำดับ แล้วทำการชะโปรตีนส่วนที่เหลือด้วย 50 mM glycine-NaOH buffer, pH 11.0 โดยใช้อัตราการไหลคงที่ 60 ml/h แยกเก็บส่วนสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 2.5 ml ติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน นำสารละลายที่ได้มาวัดปริมาณโปรตีน โดยวัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 280 nm และวัดกิจกรรมเอนไซม์ รวมหลอดที่มีกิจกรรมเอนไซม์เข้าด้วยกัน วัดปริมาตรของสารละลาย ตรวจวัดปริมาณโปรตีน และกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรติเอส คำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะ

7. การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดย FPLC ด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5

นำสารละลายเอนไซม์จากข้อ 5.2 มาไดอะไลต์ใน 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้ aqua sorb ก่อนผ่านสารละลายเอนไซม์ลงในคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 (ขนาด 0.5 x 5 cm) ซึ่งเป็นคอลัมน์ anion-exchanger โดยใช้เครื่อง FPLC จะโปรตีนส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ออกด้วย 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 และทำการชะโปรตีนส่วนที่จับกับคอลัมน์ออกด้วย NaCl ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0 ถึง 0.5 M ซึ่งละลายอยู่ใน 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 โดยใช้อัตราการไหลคงที่ 12 ml/h แยกเก็บส่วนสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 1 ml ติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน แล้วนำสารละลายที่ได้มาวัดปริมาณโปรตีนโดยวัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 280 nm และวัดกิจกรรมเอนไซม์ รวมหลอดที่มีกิจกรรมเอนไซม์เข้าด้วยกัน นำมาไดอะไลต์ด้วย 50 mM glycine-NaOH buffer, pH 11.0 วัดปริมาตรของสารละลาย ตรวจวัดปริมาณโปรตีน และกิจกรรมอัลคาไลน์โปรติเอส คำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะ

8. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสด้วยวิธี SDS-PAGE

เตรียมเครื่องมือโดย เช็ดแผ่นกระจกทั้ง 2 แผ่นให้สะอาดด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 70 % วาง spacer ลงที่ขอบแผ่นกระจก ทำการประกบกระจกทั้ง 2 แผ่นเข้าด้วยกัน หนีบกระจกให้แน่นด้วยตัวหนีบ เตรียมเจล running ให้มีปริมาตรเป็น 3 ใน 4 ส่วนของกระจก แล้วเทลงในช่องว่างระหว่างกระจกทั้ง 2 แผ่น เติมน้ำเล็กน้อยที่ผิวหน้าของเจล running เพื่อให้ผิวหน้าเรียบ ตั้งทิ้งไว้ 30 min ให้เจลแข็งตัว และเตรียมเจล stacking ให้มีปริมาตร 1 ใน 4 ส่วนของแผ่นกระจก เอียงกระจกเพื่อเทน้ำออก จากนั้นเทเจล stacking ทับผิวหน้าของเจล running ที่แข็งตัวแล้ว และทำช่อง (well) สำหรับใส่สารตัวอย่าง โดยใช้หวี (template comb) กดลงในเจล stacking ตั้งทิ้งไว้ 15 ถึง 30 min ให้เจลแข็งตัว แล้วดึงหวีออก นำแผ่นกระจกที่เตรียมได้ไปไว้ใน chamber เท electrode buffer ที่เตรียมไว้เทใน chamber ชั้นนอก และเทให้ท่วมถึง well ใน chamber ชั้นใน

นำเอนไซม์ที่ต้องการตรวจสอบความบริสุทธิ์มา 25 µl ผสมกับ sample dye 100 µl ต้มเดือดเป็นเวลา 5 min ใส่ลงในช่อง จากนั้นต่อกระแสไฟฟ้าให้กระแสเคลื่อนที่จากขั้วลบไปขั้วบวก โดยใช้กระแสไฟฟ้า 20 mA ต่อ 1 แผ่น เมื่อตัวอย่างเคลื่อนที่เกือบถึงปลายสุดของ running gel ทำการแกะแผ่นเจลออกจากกระจกอย่างระมัดระวัง แล้วย้อมแผ่นเจลด้วย coomassie brilliant blue R-250 (ภาคผนวก ก. ข้อ 4) ล้างสีออกด้วย destaining solution (ภาคผนวก ก. ข้อ 4) จนแผ่นเจลใส และเห็นแถบของโปรตีนชัดเจน

9. ศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์

แบ่งออกเป็น การศึกษามวลโมเลกุล และหน่วยย่อย, อุณหภูมิที่เหมาะสม, ผลของอุณหภูมิ ต่อความคงตัวของเอนไซม์, pH ที่เหมาะสม, ผลของ pH ต่อความคงตัวของเอนไซม์, ผลของอิออน โลหะ, สารยับยั้งเอนไซม์, ความจำเพาะกับสับสเตรท, เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์กับเอนไซม์ทางการค้า และจลนพลศาสตร์

9.1 การศึกษามวลโมเลกุลของเอนไซม์ และหน่วยย่อยของเอนไซม์

ทำได้ด้วยกัน 3 วิธีคือ sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), gel filtration (คอลัมน์ Sephacryl S-200) และ Matrix Assisted Laser Desorption Mass Spectrophotometry (MALDI-MS)

9.1.1 การศึกษาหามวลโมเลกุลและหน่วยย่อยของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์ โดยวิธี SDS-PAGE

การหามวลโมเลกุลของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส ในวิธีนี้เป็นการเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบนแผ่นเจล polyacrylamide กับ โปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล ทำได้โดยวัดระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่และระยะทางที่แถบสี sample buffer เคลื่อนที่ในแผ่นเจล แล้วนำมาคำนวณหาระยะทางสัมพัทธ์ (relative mobility) ดังนี้

$$\text{ระยะทางสัมพัทธ์ (relative mobility)} = \frac{\text{ระยะทางที่แถบโปรตีนเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่แถบสี sample buffer เคลื่อนที่}}$$

สร้างกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐานโดยที่ให้แกน X เป็นค่าระยะทางสัมพัทธ์ ส่วน แกน Y เป็นค่า log ของมวลโมเลกุล

มวลโมเลกุลของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส หาได้จากการนำค่าระยะทางสัมพัทธ์ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสอัลคาไลน์โปรติเอสที่เคลื่อนที่บนแผ่นเจล polyacrylamide เดียวกับโปรตีนมาตรฐาน มาเทียบหามวลโมเลกุลกับกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน

9.1.2 การศึกษาหามวลโมเลกุลของเอนไซม์เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ Sephacryl S-200

นำสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุล แต่ละชนิดมาแยกผ่านคอลัมน์ Sephacryl S-200 โดยชะด้วย 50 mM glycine-NaOH buffer, pH 11.0 ที่มี 0.15 M NaCl ด้วยอัตราการไหลคงที่ 60 ml/h แยกเก็บส่วนสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 2 ml ติดต่อกันด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน วัดปริมาณโปรตีนที่ออกมาจากคอลัมน์ ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm

$$\text{คำนวณหา } K_{av} \text{ ตามสูตร } K_{av} = \frac{(V_e - V_o)}{(V_t - V_o)} \text{ ของโปรตีนมาตรฐานแต่ละชนิด}$$

ซึ่ง V_e (elution volume) คือ ปริมาตรที่โปรตีนแต่ละชนิดถูกชะออกมา ส่วน V_o (void volume) คือ ปริมาตรที่ blue dextran ถูกชะออกมา และ V_t (total volume) คือ ปริมาตรที่ riboflavin ถูกชะออกมา นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานโดยที่ให้แกน X เป็นค่า K_{av} ส่วนแกน Y เป็นค่า $\log$ ของมวลโมเลกุล

มวลโมเลกุลของเอนไซม์เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส หาได้จากการนำค่า K_{av} ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ผ่านคอลัมน์ Sephacryl S-200 ในข้อ 8.1.1 มาเทียบหามวลโมเลกุลกับกราฟมาตรฐานของโปรตีนมาตรฐาน

9.1.3 ศึกษาหามวลโมเลกุลของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์โดยวิธี MALDI-MS

ส่งวิเคราะห์หามวลโมเลกุลที่ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC) ภายใต้สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ด้วยเครื่อง MALDI-MS ยี่ห้อ BRUKER DALTONICS โดยเตรียมตัวอย่างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. A39 ที่ไม่ได้ทำการเจือจาง และที่เจือจางด้วย 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) อัตราส่วน 1:10, 1:100 มาผสมกับสารละลาย sinapinic acid (SA) ความเข้มข้น 10 mg/ml ในอัตราส่วน 1:1 แล้ว spot 1 μ L ลงบน stainless steel target MALDI plate ทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศ ยิ่งด้วย UV-laser ความยาวคลื่น 337 nm ใช้กระแสไฟฟ้า 20 kV ใช้ Program flex analysis และ flex

control version 1.1 ในการวิเคราะห์ กราฟที่ได้แกน Y เป็นความสัมพัทธ์ของพลังงาน (relative intensity; a.u) และแกน X เป็นอัตราส่วนมวลต่อประจุ (m/z)

9.2 ศึกษาหาค่าอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์

เจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย 50 mM glycine-NaOH buffer, pH 11.0 และนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ pH 11.0 ณ อุณหภูมิต่างๆดังนี้คือ 30°C, 40°C, 50°C, 55°C, 60°C, 70°C และ 80°C ตามลำดับ

9.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์

ทำการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30°C, 40°C, 50°C, 55°C, 60°C, 70°C และ 80°C ตามลำดับ เป็นเวลา 30 min ก่อน เมื่อครบเวลาทำเอนไซม์ให้เย็นโดยแช่ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 55°C และ pH 11.0

9.4 ศึกษาหาค่า pH ที่เหมาะสม (optimum pH) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์

เจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลาย buffer ที่มีค่า pH ต่างๆ ดังนี้คือ 50 mM acetate buffer, pH 6.0, 7.0; 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, 8.0 ; 50 mM glycine-NaOH buffer, pH 8.0, 9.0, 10.0 และ 11.0 และ 50 mM hydroxide-chloride buffer, pH 11.0, 12.0 และ 13.0 แล้วนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ pH ของ buffer นั้นๆ ณ อุณหภูมิ 55°C

9.5 ศึกษาผลของ pH ต่อความคงตัวของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์

บ่มเอนไซม์ในสารละลาย buffer ที่มีค่า pH ต่างๆ ดังนี้คือ 50 mM acetate buffer, pH 6.0, 7.0 ; 50 mM phosphate buffer, pH 7.0, 8.0 ; 50 mM glycine-NaOH buffer, pH 8.0, 9.0, 10.0 และ 11.0 และ 50 mM hydroxide-chloride buffer, pH 11.0, 12.0 และ 13.0 ทิ้งไว้ 30 min จากนั้นค่อยนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 55°C และ pH 11.0

9.6 ศึกษาอิออนโลหะที่มีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์

บ่มเอนไซม์กับสับสเตรทในสารละลาย glycine-NaOH buffer 50 mM, pH 11.0 และเติมอิออนโลหะแต่ละชนิด คือ MnCl_2 , CoCl_2 , ZnSO_4 , CdCl_2 , CuSO_4 , FeCl_2 , NiSO_4 , MnCl_2 และ CaCl_2 โดยมีความเข้มข้นสุดท้าย 1 mM ทิ้งไว้ 1 h ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 55°C และ pH 11.0 เปรียบเทียบกับที่ไม่มีการเติมอิออน จากนั้นเลือกอิออนโลหะตัวที่ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นมาทดสอบโดยเปลี่ยนความเข้มข้นเป็น 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 และทำการทดลองเหมือนข้างต้น

9.7 ศึกษาผลของตัวยับยั้งเอนไซม์ต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์

เจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย 50 mM glycine-NaOH buffer, pH 11.0 และเติมสารยับยั้งชนิดต่างๆ (EDTA, PMSF, 1,10-phenanthroline, iodoacetate และ pepstatin) โดยมีความเข้มข้นสุดท้าย 1 และ 10 mM เขย่าให้เข้ากันเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 min จากนั้นนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ อุณหภูมิ 55°C และ pH 11.0 เปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ไม่มีการเติมตัวยับยั้ง

9.8 ศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์กับสับสเตรท

เจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย 50 mM glycine-NaOH buffer, pH 11.0 จากนั้นวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสอุณหภูมิ 55°C และ pH 11.0 กับสับสเตรทต่างๆ ดังนี้ เคซีน, keratin, bovin serum albumin (BSA), sericin และ fibroin โดยใช้ความเข้มข้นของสับสเตรทแต่ละตัวเท่ากับ 4%

9.9 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ทางการค้า

วัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 55°C และ pH 11.0 เปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ทางการค้า ได้แก่ Thermolysin (metalloprotease) และ Proteinase K (serine

protease) ที่ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสม (pH 8.0 และอุณหภูมิ 70°C, 65°C ตามลำดับ) โดยใช้ เเคซีนเป็นสับสเตรท

9.10 ศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ (kinetic)

ปิเปตต์สารละลายเคซีนที่ละลายใน 50 mM glycine-NaOH buffer, pH 11.0 ความเข้มข้น 2 mg/ml ลงในหลอดทดลอง จำนวน 8 หลอด หลอดละ 125 μ l เติม 1 M glycine-NaOH buffer, 25 μ l และเติมน้ำกลั่น 100 μ l แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55°C จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ ความเข้มข้นที่เหมาะสมลงในแต่ละหลอด หลอดละ 250 μ l หยุดปฏิกิริยาหลอดที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15 และ 20 min ตามลำดับ ด้วยสารละลาย 10 % trichloroacetic acid ปริมาตร 500 μ l ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ เป็นเวลา 10 min แล้วนำส่วนใสมาวัดปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Lowry method (1951) (ภาคผนวก ข. ข้อ 2)

เปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายเคซีน จาก 2 mg/ml เป็น 4, 6, 8, 10 และ 12 mg/ml ตามลำดับ คำนวณปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นที่เวลาต่าง ๆ กัน แล้วนำไปเขียนกราฟระหว่างปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นเทียบกับเวลา เพื่อหาความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (initial velocity; V_o) ที่ความเข้มข้นต่างๆของสารละลายเคซีน จากนั้นนำค่าความเข้มข้นของสารละลายเคซีน และความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (V_o) มาเขียนกราฟ Lineweaver-Burk ระหว่าง $1/[S]$ และ $1/V$ เพื่อหาค่า K_m และ V_{max}

9.11 ศึกษาการประยุกต์ใช้ crude enzyme ในการลอกกา sericin จากเส้นไหมดิบ

9.11.1 นำขดแก้ว 3 ขดไปอบที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 2-3 h จากนั้นนำไปใส่ไว้ใน desicator เพื่อลดความชื้น เป็นเวลา 3-5 h ทดลองชั่งน้ำหนักของขดแก้วด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ทำซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่ บันทึกไว้

9.11.2 ชั่งเส้นไหมดิบ น้ำหนักแห้ง (ที่ได้จากเปลือกไหม) ขดละ 100 mg ใส่ขดแก้วที่ได้ชั่งแล้ว จากนั้นทำซ้ำในข้อ 8.11.1 ซึ่งขดแก้วจะมีเส้นไหมดิบอยู่ด้วย

9.11.3 ลอกกา sericin ครั้งที่ 1 จากเส้นไหมดิบที่อยู่ในขดแก้ว (อัตราส่วนระหว่างเส้นไหม : เอนไซม์เท่ากับ 1:20 w/v) ใช้ crude enzyme 2 ml บ่มที่ อุณหภูมิ 55°C และ pH 11.0 เป็น

เวลา 1 h จากนั้นเทส่วนที่เป็นของเหลวออกมาด้วยการกรอง ล้างเส้นไหมด้วยน้ำกลั่น 4 ml 2 ครั้ง เทน้ำออก แล้วจึงลอกกาวยังเป็นครั้งที่ 2 โดยใช้ crude enzyme ทำเหมือนเดิม

9.11.4 ทำซ้ำในข้อ 8.11.1 ซึ่งขณะนี้ขวดแก้วมีเส้นไหมดิบที่ลอกกาวยแล้วอยู่

9.11.5 นำมาคำนวณน้ำหนักที่หายไปของเส้นไหมดังสูตร

น้ำหนักที่หายไป (น้ำหนัก sericin) = (น้ำหนักขวดกับเส้นไหมก่อนลอกกาวย) - (น้ำหนักขวดกับเส้นไหมหลังลอกกาวย)

9.11.6 จากนั้นคิดเป็น sericin yield (%) ดังสูตร

$$\text{sericin yield (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักที่หายไป}}{\text{น้ำหนักเส้นไหมก่อนลอกกาวย}} \times 100$$

หมายเหตุ น้ำหนักเส้นไหมก่อนลอกกาวย = น้ำหนักขวดกับเส้นไหมก่อนลอกกาวย – น้ำหนักขวด

9.11.7 ทำซ้ำในข้อ 8.11.1 ถึง 8.11.6 โดยใช้ crude enzyme เจือจางในอัตราส่วน 1:20, 50 mM glycine-NaOH buffer, pH 11.0 และน้ำกลั่น แทน crude enzyme ในการลอกกาวย

ผลและวิจารณ์

1. การเลี้ยงเชื้อ

crude enzyme จาก *Bacillus* sp. A39 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักโดยการเติมอาหารแบบคงที่ เมื่อนำมาวัดปริมาณโปรตีนได้เท่ากับ 1.60 mg/ml และกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสเท่ากับ 2.78 U/ml คำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะได้เท่ากับ 0.87 U/mg

มีรายงานการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสโดยใช้ถังหมักเช่นเดียวกับการทดลอง โดยผลิตเอนไซม์จาก *Bacillus pumilus* สายพันธุ์ MK6-5 ด้วยการหมักแบบ batch ในถังหมักขนาด 2 l ทำการเลี้ยง 60 h ที่ 35°C ความเร็วรอบที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงคือ 250 rpm ให้อากาศ 1 vvm เพื่อให้บริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติ พบว่ามีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 11.6 U/mg (Kumar, 2002) ส่วนการผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus clausii* I-52 ทำโดยใช้สภาวะการหมักแบบ submerged ที่ 37°C เป็นเวลา 48 h โดยที่ความเร็วรอบ 700 rpm และให้อากาศ 1.5 vvm จะได้กิจกรรมจำเพาะสูงสุดเท่ากับ $106.8 \text{ U/mg} \times 10^{-3}$ (Joo and Chang, 2006)

2. ศึกษาวิธีการทำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสให้บริสุทธิ์ และสังเกตความคงตัวของเอนไซม์ขณะเก็บรักษา

จากตารางที่ 8 วิธีการทำให้บริสุทธิ์โดยการเจือจางเอนไซม์ด้วยวิธี dialysis พบว่ากิจกรรมจำเพาะเฉลี่ยของเอนไซม์เท่ากับ 3.81 เนื่องจากโปรตีนขนาดเล็ก ล้างปนเปื้อน หรือสารยับยั้ง (ถ้ามี) ออกไป จึงทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ส่วนวิธีการทำเอนไซม์ให้เข้มข้นด้วยการตกตะกอน 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, วิธี lyophilization (Freeze dry) และ ultrafiltration มีค่ากิจกรรมจำเพาะเฉลี่ยเท่ากับ 13.37, 2.05 และ 4.47 ตามลำดับ จะเห็นว่าวิธีการตกตะกอนด้วย 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงสุด แสดงให้เห็นว่าเป็นวิธีการที่ดีจึงเลือกใช้วิธีนี้ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

เมื่อสังเกตการเก็บรักษาเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่สภาวะต่างๆ เป็นเวลา 1 เดือนที่ 4°C พบว่าเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. A39 มีความคงตัว สังเกตได้จากค่ากิจกรรมจำเพาะในทุกสัปดาห์ (ตารางที่ 8) โดย crude enzyme มีความคงตัวมากที่สุด คือหลังจากเก็บไว้ 1 เดือน กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ลดลงเพียง 2.8% เท่านั้น ในขณะที่การทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธี

ultrafiltration มีแนวโน้มจะทำให้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นประมาณ 10% ซึ่งเกิดจากปริมาณโปรตีนลดลงขณะเก็บรักษามากกว่าการทดลองอื่นๆ ส่วนเอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ lyophilization กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ลดลง 10.1 และ 21.8% ตามลำดับ แต่เอนไซม์ที่ผ่านการไดอะไลส์ มีแนวโน้มว่ากิจกรรมจำเพาะจะลดลงอย่างมากในช่วงสัปดาห์แรกคือลดลง 28.8% และจากนั้นลดลงเพียงเล็กน้อย และเมื่อเก็บไว้นาน 1 เดือน กิจกรรมจำเพาะลดลง 38.2%

ตารางที่ 8 ความคงตัวของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสเฟสในสถานะต่างๆ ซึ่งเก็บไว้ที่ 4°C นาน 1 เดือน

Treatments	weeks	Specific activity (U/mg)	Specific activity reduction (%)
Crude enzyme	0	2.18	
	1	2.29	
	2	2.24	
	3	2.07	
	4	2.12	2.8
Dialyzed	0	5.24	
	1	3.73	
	2	3.46	
	3	3.37	
	4	3.24	38.2
80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation	0	13.93	
	1	14.23	
	2	13.36	
	3	12.83	
	4	12.52	10.1

ตารางที่ 8 (ต่อ)

Condition	weeks	Specific activity (U/mg)	Specific activity reduction (%)
Lyophilize (Freeze dry)	0	2.25	
	1	2.07	
	2	1.99	
	3	1.96	
	4	1.97	21.8
Ultrafiltration	0	4.30	
	1	4.39	
	2	4.52	
	3	4.45	
	4	4.71	+9.5

จากรายงานของ Pierce (2005) กล่าวถึงความคงตัวของโปรตีน และการเก็บรักษาว่า โดยทั่วไปเอนไซม์เก็บได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิน้อยกว่า หรือเท่ากับ 4°C ในที่สะอาด, ภาชนะแก้วที่ฆ่าเชื้อ และ หลอด polypropylene แต่การเก็บที่อุณหภูมิห้องจะทำให้เกิดการย่อยสลายของโปรตีน และ ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งปกติเป็นผลมาจากการเจริญของจุลินทรีย์ สำหรับการเก็บระยะสั้น (1 วัน ถึง 2 หรือ 3 สัปดาห์) อาจเก็บเอนไซม์ใน buffer ที่ 4°C แต่การเก็บที่ยาวนานกว่านี้คือตั้งแต่ 1 เดือนถึง 1 ปี มีงานวิจัยรายงานว่าควรเก็บใน liquid nitrogen ส่วนการเก็บที่ -20 หรือ -80°C อาจมีการเติม 50% glycerol หรือ ethylene glycol เพื่อปกป้องสารละลายจากความเย็น แต่การแช่เยือกแข็ง และ หลอมบ่อยๆจะทำให้ลดความคงตัวของเอนไซม์ นอกจากนี้ในการเก็บโดยการเติมสารรีดิวซ์ (reducing agent) พวกร 1-5 mM dithiothreitol (DTT) และ 2-mercaptoethanol (2-ME) จะช่วยรักษาเอนไซม์ได้ดี เนื่องจากสารเหล่านี้ป้องกันการออกซิไดซ์ของ cysteines

3. การแยกเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสให้บริสุทธิ์

โดยตกตะกอนด้วยเกลือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟี

3.1 การตกตะกอนที่ 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

นำ crude enzyme จากข้อ 1. มาตกตะกอนที่ 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ $12,520 \times g$ ละลายตะกอนโปรตีนที่ได้ด้วย 50 mM glycine-NaOH buffer, pH 11.0 นำไป dialysed วัดปริมาณโปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส ได้ค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 7.68 U/mg ซึ่งสูงกว่า crude enzyme และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 8.84 เท่า

พบรายงานของ Beg and Gupta (2003) ได้ศึกษาการทำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus mojavenis* ให้บริสุทธิ์ โดยตกตะกอนที่ 0-85% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และมีรายงานการตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ความเข้มข้นเดียวกันกับการทดลองนี้คือที่ 80% (Romero, 2001) และ 80% (Venugopal and Saramma, 2006) นอกจากนี้ยังพบการตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ความเข้มข้นอื่นๆ ดังนี้ 60%, 70% (Gessesse *et al.*, 2003) และ 40-80% (Kumar, 2002) เป็นต้น

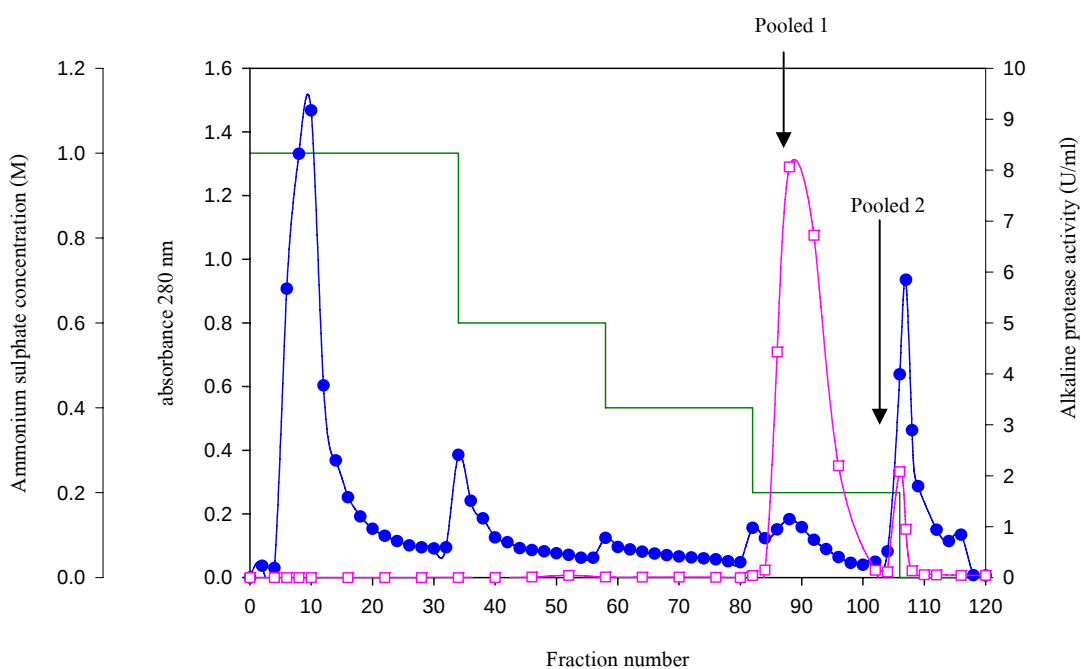
3.2 การแยกเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟี

3.2.1 การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดย FPLC ด้วยคอลัมน์ Phenyl Sepharose 6 Fast flow (high sub)

นำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จากการตกตะกอนที่ 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ มาทำให้บริสุทธิ์ต่อโดยใช้คอลัมน์ Phenyl Sepharose 6 Fast flow (high sub), ภาพที่ 6 หลังจากผ่าน Phenyl sepharose column นำไป dialysed เพื่อแยกเกลือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ออกจากนั้นวัดปริมาณโปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์ หากค่ากิจกรรมจำเพาะ จะเห็นว่ามี peak ของโปรตีนออกมาในทุกขั้นตอนของการชะด้วยเกลือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่มีความเข้มข้นลดลงเรื่อยๆ แต่มี peaks ที่ความเข้มข้น 0.2 M และ 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เท่านั้นที่พบกิจกรรมของเอนไซม์ โดยได้ทำการทดลองมาก่อนหน้านี้แล้วพบว่า pooled 1 จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ อัลคาไลน์โปรติเอสสูงกว่า pooled 2 และค่ากิจกรรมจำเพาะที่ได้คือ 38.45 และ 6.77 U/mg ตามลำดับ ส่วนความบริสุทธิ์ของ pooled 1 มี 22.34 เท่าซึ่งมากกว่า pooled 2 ที่มี 3.93 เท่า ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อมาจึงเลือกเฉพาะ pooled 1 (หลอดที่ 86-96) มาทำ

ให้บริสุทธิ์ในขั้นต่อไป พบว่ามีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 31.94 U/mg , yield เท่ากับ 28.05 % และความบริสุทธิ์เท่ากับ 36.76 เท่า ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นกว่าในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนที่ 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

จากรายงานของ Huang *et al.* (2003) ได้ทำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus pumilus* ให้บริสุทธิ์ โดยใช้คอลัมน์ HIC (1.5×10 cm) ซึ่งเป็นหนึ่งในขั้นตอนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ ทำการปรับสมดุลของคอลัมน์ด้วย 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ใน 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 โดยชะจากความเข้มข้น 1 M ถึง 0.1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่อยู่ใน buffer เดียวกัน ใช้อัตราการไหล 0.5 ml/min ทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 38.65 เท่า และมี yield เท่ากับ 0.88%



ภาพที่ 6 กราฟของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. A39 โดยโหลดโปรตีน 22.32 mg ผ่านเครื่อง FPLC ซึ่งใช้คอลัมน์ Phenyl Sepharose 6 Fast flow (high sub) ทำ Stepwise ด้วย 50 mM glycine-NaOH buffer, pH 11.0 ที่มีความเข้มข้นของ 1M, 0.6 M, 0.4 M, 0.2M และ 0M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ อัตราการไหล 60 ml/h เก็บ fractions ละ 2.5 ml (_____ ความเข้มข้นของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (M); ● OD 280 nm □ และกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส U/ml)

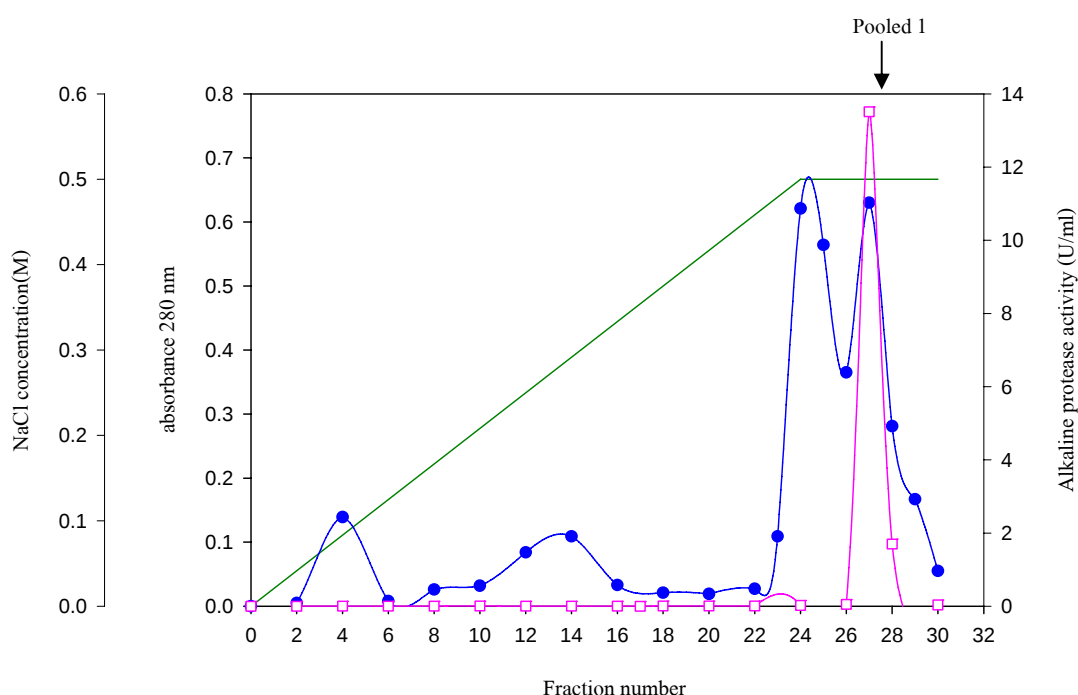
ส่วนรายงานของ Gupta *et al.* (2005) ได้ทำการแยกเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Pseudomonas aeruginosa* PseA ให้บริสุทธิ์โดยหลังจากผ่านคอลัมน์ Q-sepharose จึงใช้คอลัมน์ Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (1 cm × 5.5 cm) ซึ่งมีอัตราการไหล 4.8 ml/h ปรับสมดุลของคอลัมน์ด้วย 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.7 ที่มี NaCl 2.5 M พบว่าโปรตีนที่เกาะกับคอลัมน์ถูกชะออกมาด้วย 50% ethylene glycol ใน 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.7 หลังจากผ่านคอลัมน์เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 11.6 เท่า ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดลองที่ว่าเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสเกาะกับคอลัมน์ Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub) ได้ดีโปรตีนจึงถูกชะออกมาทีหลัง และในช่วงแรกของการชะ สามารถกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการให้หลุดออกมาก่อน ดังนั้นจึงทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น และเหมาะที่จะใช้คอลัมน์นี้ในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

3.2.2 การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดย FPLC ด้วยคอลัมน์ Mono Q HR 5/5

นำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ได้หลังจากผ่านคอลัมน์ Phenyl Sepharose 6 Fast flow (high sub) และ dialysed แล้วจากข้อ 3.2.1 ไปทำให้เข้มข้นขึ้นเพื่อลดปริมาตรลงด้วย aqua sorb จากนั้นนำมาผ่านคอลัมน์ Mono Q HR 5/5 (ภาพที่ 7) หลังจากผ่านคอลัมน์โปรตีนจะถูกชะออกมาที่ 0.5M NaCl จะพบ peak ที่สูงขึ้นมาเพียง peak เดียว (หลอดที่ 27) ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสสูง เก็บ fraction นำไป dialysed เพื่อแยกเกลือ NaCl ออก จากนั้นนำไปวัดปริมาณโปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์ อัลคาไลน์โปรติเอส คำนวณหาค่ากิจกรรมจำเพาะได้เท่ากับ 58.10 U/mg และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 66.88 เท่า และมี yield เท่ากับ 3.52%

มีรายงานของ Koka and Weimer (2000) ได้ใช้คอลัมน์ anion exchange (Mono Q HR 5/5) ในขั้นตอนการทำเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* RO98 ให้บริสุทธิ์ พบว่ามี peak ของกิจกรรมเอนไซม์ออกมาในตอนแรกของการทำ gradient ซึ่งชะด้วยเกลือ NaCl โดยใช้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1 mol/l ซึ่งเห็นว่าโปรตีนไม่เกาะกับคอลัมน์แต่ก็ยังมีกิจกรรมเพิ่มขึ้น เนื่องจากสามารถกำจัดโปรตีนบางส่วนที่ไม่ต้องการออกไปได้ในขั้นตอนนี้ได้ค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 126.8 U/mg มี yield เท่ากับ 96.8% และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.1 เท่า ซึ่งตรงข้ามกับการทดลองนี้ที่ใช้คอลัมน์ Mono Q ในการทำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. A39 ให้บริสุทธิ์ โดยพบว่า peak ของกิจกรรมเอนไซม์จะออกมาสุดท้าย แสดงว่าโปรตีนเกาะกับคอลัมน์นี้ได้ดี จึงต้องชะด้วยเกลือความเข้มข้นสูงถึงจะทำให้โปรตีนหลุดออกมา แต่ก็สามารถทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นได้เหมือนกัน

ส่วน Oda *et al.* (2004) ได้ใช้โครมาโตกราฟีคอลัมน์ Mono Q ที่เชื่อมต่อกับระบบของ FPLC ในการทำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *Rubrivivax gelatinosus* KDD51 ให้บริสุทธิ์ ใช้อัตราการไหล 0.25 ml/min ทำ linear gradient ของ 1 M NaCl เอนไซม์ถูกชะออกมาที่ 0.2 M NaCl มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 83.3 U/mg และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นประมาณ 1,000 เท่า แสดงว่าเอนไซม์นี้มีประสิทธิภาพเกาะกับคอลัมน์ได้น้อยกว่าเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. A39 ซึ่งจะถูกชะออกมาที่ 0.5 M NaCl



ภาพที่ 7 กราฟของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. A39 โดยโหลดโปรตีน 11.16 mg ผ่านเครื่อง FPLC ซึ่งใช้คอลัมน์ Mono Q HR 5/5 (0.5 x 5 cm.) ทำ gradient ชะด้วย 20 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 ตั้งแต่ 0 ถึง 0.5 M NaCl อัตราการไหล 12 ml/h เก็บ fractions ละ 1 ml (_____ ความเข้มข้นของ NaCl (M); ● OD 280 nm และ □ กิจกรรมของ เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส U/ml)

ตารางที่ 9 การทำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. A39 ให้บริสุทธิ์

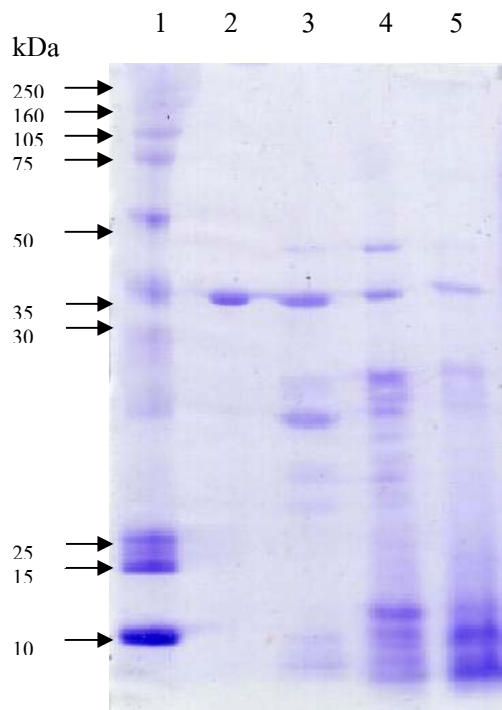
Purification step	volume (ml)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude enzyme	914.1	1,270.60	1,462.56	0.87	1.00	100.00
80% (NH ₄) ₂ SO ₄	40.0	571.20	74.40	7.68	8.84	44.96
Phynyl sepharose	12.0	356.40	11.16	31.94	36.76	28.05
Mono Q	1.0	44.74	0.77	58.10	66.88	3.52

จากตารางที่ 9 การทำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสให้บริสุทธิ์พบว่าเมื่อผ่านขั้นตอนต่างๆ เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจะมีความบริสุทธิ์มากขึ้นในแต่ละขั้นตอน และมีการสูญเสียโปรตีนอื่นในขั้นตอนต่างๆ เนื่องจากการที่กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนที่ปนอยู่รวมกันใน crude enzyme นั้นมีความแตกต่างกันที่จำนวนของกลุ่มที่ไม่มีขบ่น้ำ, กลุ่มที่มีขบ่น้ำ และ ประจุ (charged) ทำให้โปรตีนแต่ละชนิดมีการละลายที่ต่างกัน ที่ความอิ่มตัว 80% (NH₄)₂SO₄ ได้ทำให้โปรตีนบางส่วนตกตะกอน แต่มีบางส่วนยังสามารถละลายน้ำได้ และส่วนสาเหตุที่ yield หายไปถึง 56% หลังจากการตกตะกอนด้วย (NH₄)₂SO₄ อาจเกิดจาก (NH₄)₂SO₄ ซึ่งเป็นเกลือกรด pH อาจทำให้การละลายของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป อีกสาเหตุหนึ่งมาจากเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส ที่สามารถเกิด autolysis คือย่อยตัวของมันเองได้ จึงเกิดการสูญเสียโปรตีนไป ในขั้นสุดท้ายเอนไซม์มีความบริสุทธิ์มาก มีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 58.10 U/mg มีค่าความบริสุทธิ์เท่ากับ 66.88 เท่า และ yield เท่ากับ 3.52%

3.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

หลังจากทำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสให้บริสุทธิ์ด้วยขั้นตอนต่างๆ แล้วแบ่งตัวอย่างเอนไซม์ในแต่ละขั้นตอนมาตรวจสอบความบริสุทธิ์อีกครั้งหนึ่งด้วยวิธี SDS-PAGE ดังแสดงในภาพที่ 8 แถบของโปรตีนลดลงในแต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์โดยการเปรียบเทียบแต่ละ lane ดังนี้ เมื่อนำ crude enzyme มาผ่านการตกตะกอนด้วย (NH₄)₂SO₄ (27.9 μg) พบแถบโปรตีนมากกว่า 10 แถบ แต่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 8.84 เท่า จากนั้นนำมาผ่านคอลัมน์ Phenyl sepharose (9.3 μg) พบแถบโปรตีนที่เห็นได้ชัด 2 แถบ และแถบบางๆ ประมาณ 6 แถบ พบว่าเอนไซม์มีความ

บริสุทธิ์ 36.76 เท่า และเมื่อผ่านคอลัมน์ Mono Q (15.4 μg) พบแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว เอนไซม์มีความบริสุทธิ์สูงสุดเท่ากับ 66.88 เท่า



ภาพที่ 8 SDS-PAGE ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. A39; โดยใช้กระแสไฟฟ้า 20 mA **lane 1:** โปรตีนมาตรฐาน, **lane 2:** โปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ Mono Q (15.4 μg), **lane 3:** โปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ Phenyl sepharose (9.3 μg), **lane 4:** โปรตีนที่ผ่านการตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (27.9 μg) และ **lane 5:** โปรตีนของ crude enzyme (40 μg)

4. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์

แบ่งออกเป็นการศึกษาโมเลกุล และหน่วยย่อย, อุณหภูมิที่เหมาะสม, ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์, pH ที่เหมาะสม, ผลของ pH ต่อความคงตัวของเอนไซม์, ผลของอิออนโลหะ, สารยับยั้งเอนไซม์, ความจำเพาะกับสับสเตรท, เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์กับเอนไซม์ทางการค้า และ จลนพลศาสตร์

4.1 การศึกษามวลโมเลกุลของเอนไซม์ และหน่วยย่อยของเอนไซม์

ทำ 3 วิธีคือ SDS-PAGE, เจลฟิเตรชัน (คอลัมน์ Sephacryl S-200) และ MALDI-MS

4.1.1 การศึกษาหามวลโมเลกุลและหน่วยย่อยของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์ โดยวิธี SDS-PAGE

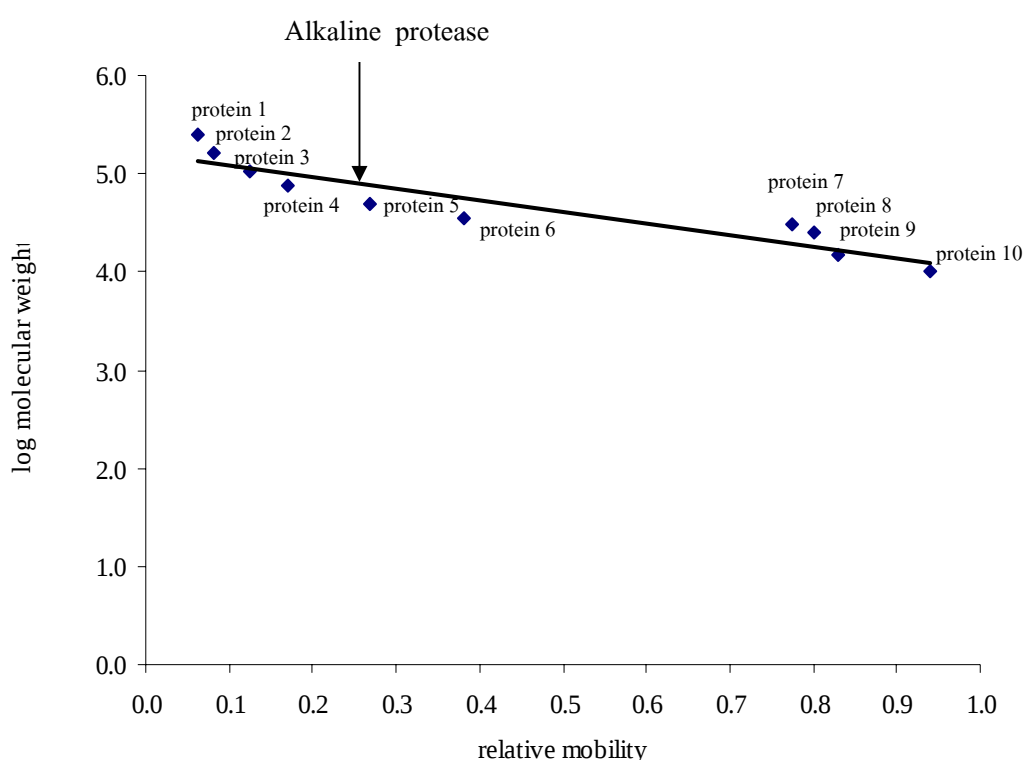
นำตัวอย่างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่บริสุทธิ์แล้วมาหามวลโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธี SDS-PAGE ได้ค่า R_f เท่ากับ 0.3824 และเมื่อเปรียบเทียบกับมวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานตามตารางที่ 10

ตารางที่ 10 มวลโมเลกุล, ระยะทาง และ relative mobility (R_f) ของโปรตีนมาตรฐานที่ได้จากวิธี SDS-PAGE

Standard protein (recombinant protein)	molecular weight		distance (cm.)	relative mobility (R_f)
	kDa	log		
1	250	5.3979	0.43	0.0625
2	160	5.2041	0.55	0.0809
3	105	5.0212	0.85	0.1250
4	75	4.8751	1.15	0.1691
5	50	4.6990	1.83	0.2684
6	35	4.5441	2.60	0.3824
7	30	4.4771	5.28	0.7757
8	25	4.3979	5.45	0.8015
9	15	4.1761	5.65	0.8309
10	10	4.0000	6.40	0.9412

โดยนำค่า R_f กับค่า log ของมวลโมเลกุลไปพล็อตกราฟตามภาพที่ 9 ได้มวลโมเลกุลของเอนไซม์ อัลคาไลน์โปรติเอสเท่ากับ 35 kDa

Bhaskar *et al.* (2006) ได้ศึกษามวลโมเลกุลของ *Bacillus proteolyticus* CFR3001 ซึ่งถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วน และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์โปรตีนเพียงแถบเดียว มีมวลโมเลกุล 29 kDa และมวลโมเลกุลของอัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตในแบคทีเรียมากมายรวมทั้ง *Bacillus* จะอยู่ในช่วงจาก 15 kDa ถึง 30 kDa อย่างอัลคาไลน์ serine proteases จาก *Bacillus* spp. พบว่ามีมวลโมเลกุลของ AP-1 และ AP-2 เท่ากับ 28 และ 29 kDa ตามลำดับ (Kumar *et al.*, 1999) แต่ก็มีบางรายงานที่ระบุว่ามวลโมเลกุลของเอนไซม์สูงเช่น 33 kDa (Samal *et al.*, 1991), 36 kDa (Tsujiro *et al.*, 1990) และ 45 kDa (Kwon *et al.*, 1994)



ภาพที่ 9 การหามวลโมเลกุลของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. A39 โดยวิธี SDS-PAGE

4.1.2 การศึกษาหามวลโมเลกุลของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ Sephacryl S-200

นำเอนไซม์ที่ได้จากคอลัมน์ Mono Q มาทำให้เข้มข้นโดยใช้ aqua sorb จากนั้นนำมาผ่านคอลัมน์ Sephacryl S-200 พบว่า peak ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจะออกมาที่ V_e เท่ากับ 62 ml ดังนั้นเมื่อนำมาคำนวณตามสูตร $K_{av} = \frac{(V_e - V_0)}{(V_t - V_0)}$

เมื่อ	V_e (elution volume)	=	62 ml.
	V_t (total volume)	=	144 ml.
	V_0 (void volume)	=	36 ml.

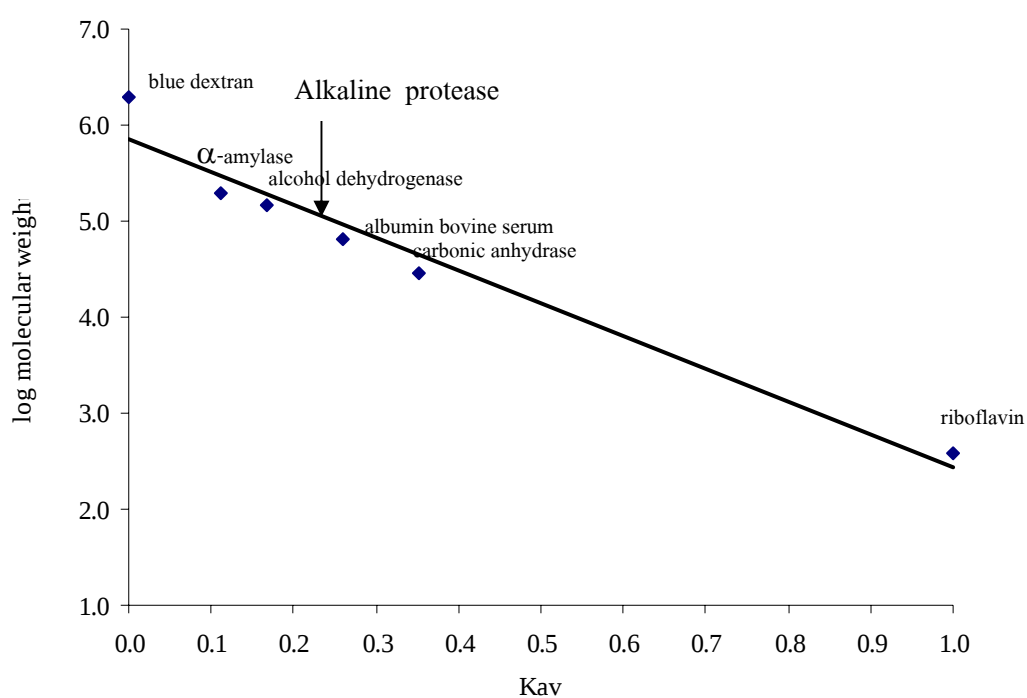
ดังนั้น	$K_{av} = \frac{(62 - 36)}{(144 - 36)}$	=	0.2407
---------	---	---	--------

ได้ค่า K_{av} เท่ากับ 0.2407 ค่า V_e และค่า K_{av} ของสารละลายมาตรฐานมีค่าดังตารางที่ 11 และนำไปหามวลโมเลกุลของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสโดยเทียบกับค่า K_{av} ที่คำนวณได้จากสารละลายโปรตีนมาตรฐานดังกล่าว (ภาพที่ 10) ซึ่งได้มวลโมเลกุลของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสเท่ากับ 79 kDa ซึ่งมีค่าเป็น 2.24 เท่าของมวลโมเลกุลที่ได้จาก SDS-PAGE แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์นี้มี 2 subunits หรือเป็น dimer

พบรายงานอัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตโดยจุลินทรีย์มีทั้งมวลโมเลกุล 84 kDa ซึ่งเป็น tetramer ของ 21 kDa, 49 kDa และ 46 kDa ซึ่งเป็น dimer ของ 23 kDa (Fukasawa *et al.*, 1988a, 1988b) ส่วน Singh *et al.* (2001) ได้ศึกษาการทำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *B. sphaericus* ให้บริสุทธิ์ พบอัลคาไลน์โปรติเอส 2 ชนิด โดยโปรติเอสที่มีมวลโมเลกุล 28.7 kDa ซึ่งพบว่าเป็น monomeric enzyme ในขณะที่โปรติเอสที่มีมวลโมเลกุล 68 kDa และประกอบไปด้วย subunits ที่มีขนาดเล็กกว่า

ตารางที่ 11 มวลโมเลกุล, V_e และ K_{av} ของโปรตีนมาตรฐานต่างๆที่ผ่านคอลัมน์
Sephacryl S-200

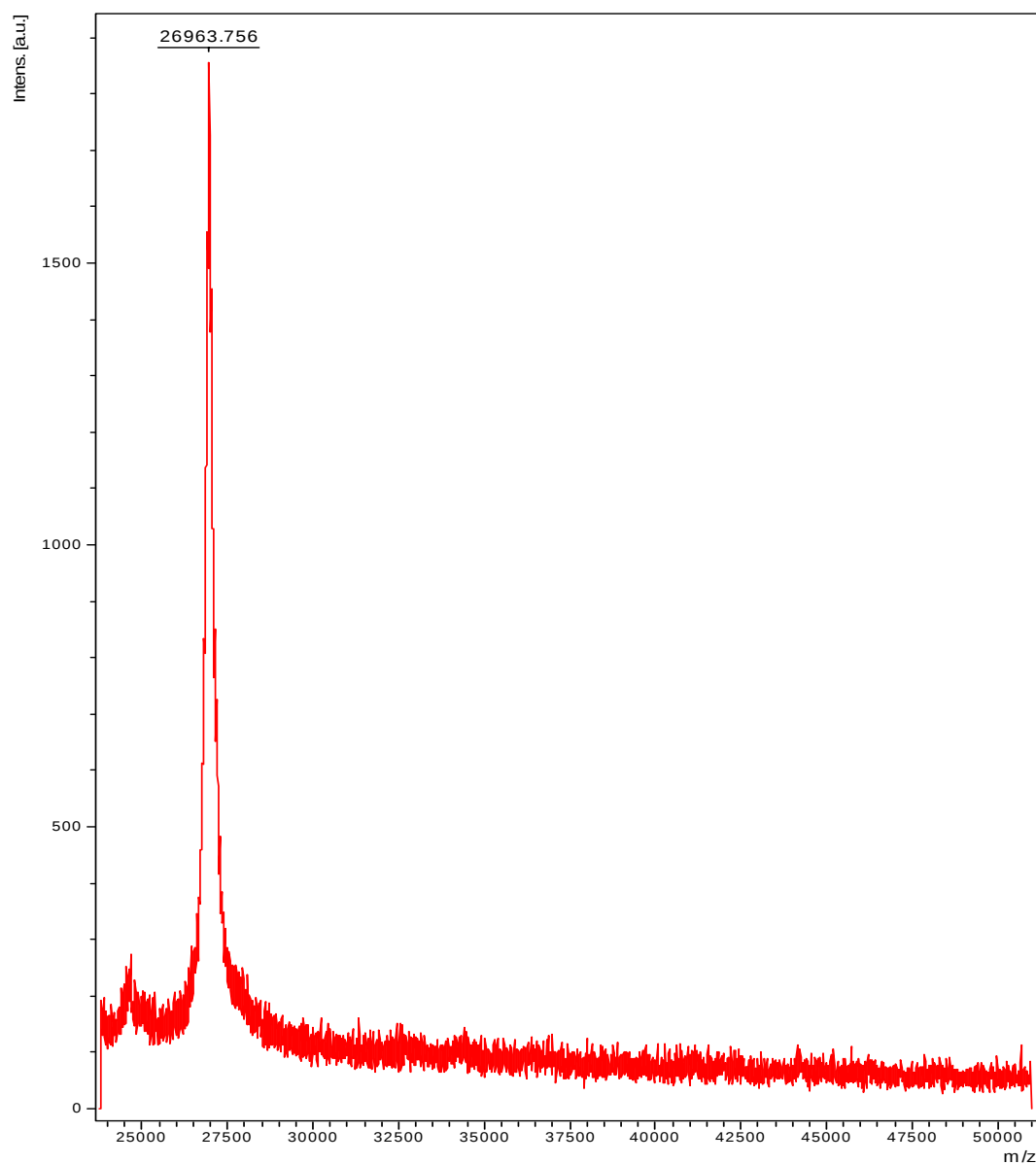
Standard protein	molecular weight		V_e (ml)	K_{av}
	kDa	log		
blue dextran	2,000	6.3010	36	0.0000
α -amylase	200	5.3010	48	0.1111
alcohol dehydrogenase	150	5.1761	54	0.1667
albumin bovine serum	66	4.8195	64	0.2593
carbonic anhydrase	29	4.4624	74	0.3519
riboflavin	0.376	2.5752	144	1.0000



ภาพที่ 10 การหามวลโมเลกุลของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. A39 โดย
ผ่านคอลัมน์ Sephacryl S-200

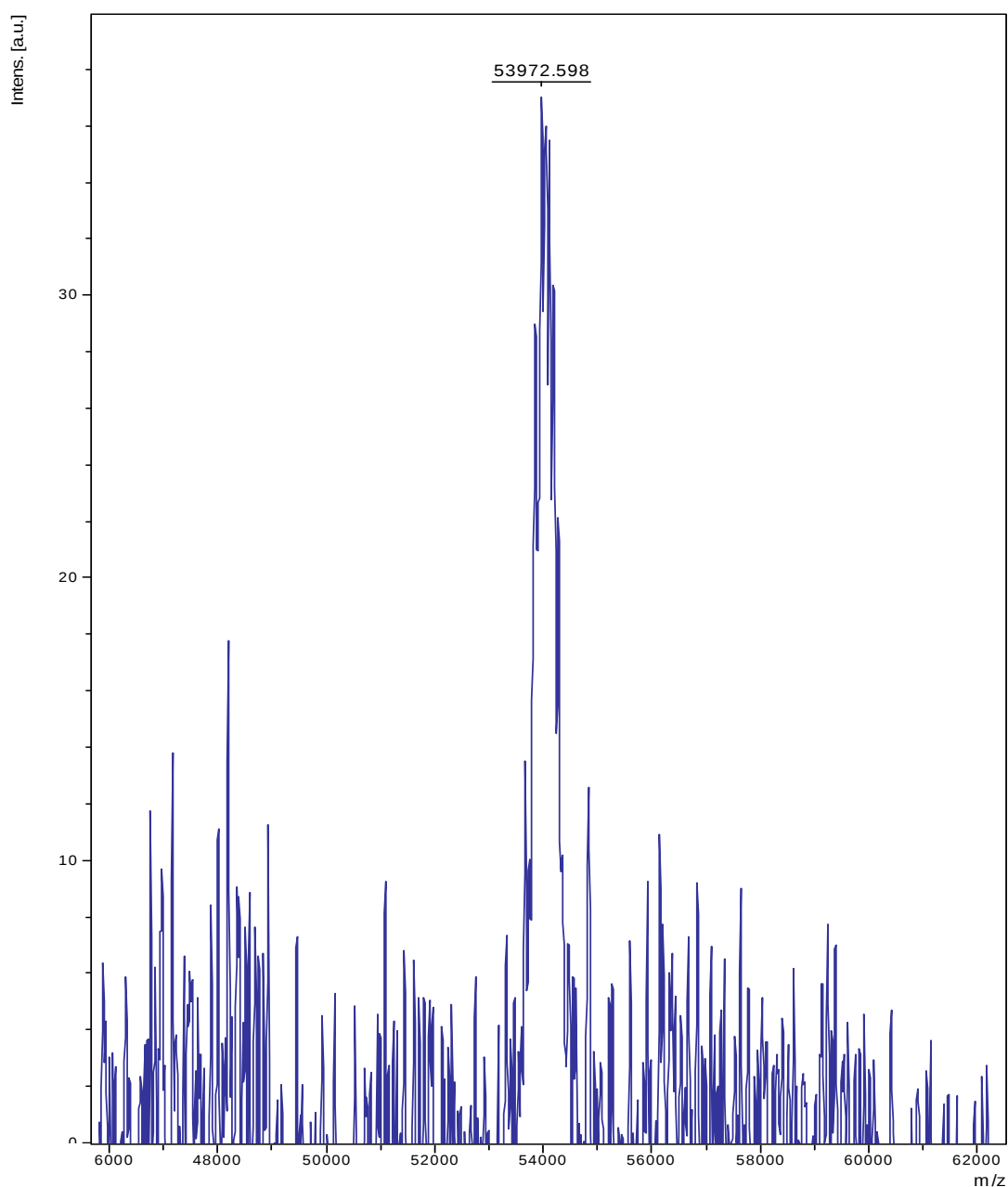
4.1.3 การศึกษาหามวลโมเลกุลของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์โดยวิธี MALDI-MS

ผลการส่งวิเคราะห์หามวลโมเลกุลของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสพบว่า monomer มีมวลโมเลกุล 26,964 Da และ dimer มีมวลโมเลกุล 53,973 Da (ภาพที่ 11 และ 12)



ภาพที่ 11 แสดงมวลโมเลกุลของ monomer ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์
จาก *Bacillus* sp. A39 โดยเครื่อง MALDI-MS

โดยผลที่ได้แตกต่างจากการหามวลโมเลกุลโดยวิธีเจลฟิเลตรชัน และ SDS-PAGE ซึ่งมีความผิดพลาดได้มากกว่าวิธี MALDI-MS ซึ่งมีการ calibration เครื่องให้ได้มาตรฐาน และมี resolution สูง โดยมีค่าเท่ากับ 10^{-5} หมายถึงเครื่องสามารถแยกความแตกต่างของมวลโมเลกุลที่ต่างกัน 0.00001 Da ได้ ซึ่งจะให้ผลที่น่าเชื่อถือ

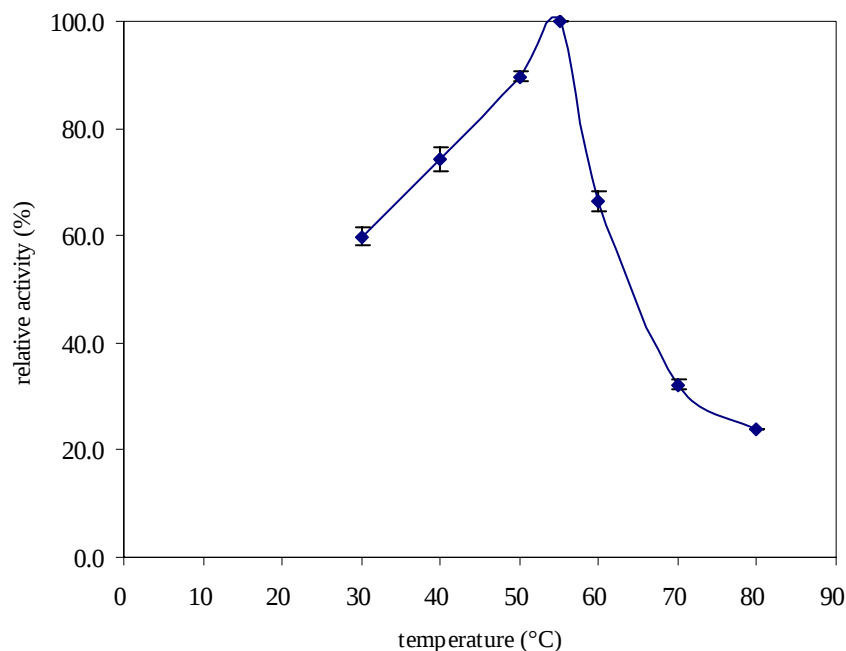


ภาพที่ 12 แสดงมวลโมเลกุลของ dimer ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์
จาก *Bacillus* sp. A39 โดยเครื่อง MALDI-MS

มีรายงานการศึกษาคุณสมบัติอัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Aspergillus tamari* พบว่าเอนไซม์นี้มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 35,154 Da โดยใช้เครื่อง MALDI-TOF ในการยืนยันการหามวลโมเลกุลของเอนไซม์นอกเหนือจาก SDS-PAGE เช่นเดียวกับการทดลองนี้ (Anandan, 2007)

4.2 ศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์

การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่สร้างจาก *Bacillus* sp. A39 ที่อุณหภูมิระหว่าง 30°C-80°C พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์มีค่าสูงขึ้น ในช่วง 30°C-50°C จะมีค่า relative activity เท่ากับ 59.83, 74.23 และ 89.73% ตามลำดับ ส่วนที่ 55°C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) โดยเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดซึ่งให้ค่า relative activity เท่ากับ 100% (ภาพที่ 13) แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 60°C กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือ 66.45% และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นมากกว่า 60°C กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว



ภาพที่ 13 ผลของอุณหภูมิต่อค่า relative activity (%) ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. A39

สำหรับปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งนั้นพบว่าอุณหภูมิสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาได้เร็วในช่วงแคบๆ เท่านั้น เพราะในตอนแรกจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มเพราะโมเลกุลของสารอยู่ในสภาวะกระตุ้นมากขึ้นสามารถกลายเป็นผลผลิตได้มากขึ้น แต่หากใช้อุณหภูมิสูงเกินไปจะเกิดปฏิกิริยาลดลงและหยุดชะงักไปในที่สุด ทั้งนี้เพราะอุณหภูมิจะทำให้เอนไซม์เสียสภาพทางธรรมชาติ ยังผลให้บริเวณเร่งของเอนไซม์มีลักษณะผิดไปทำให้ไม่สามารถทำงานได้ดีเหมือนเดิม (วัลลภ, 2532)

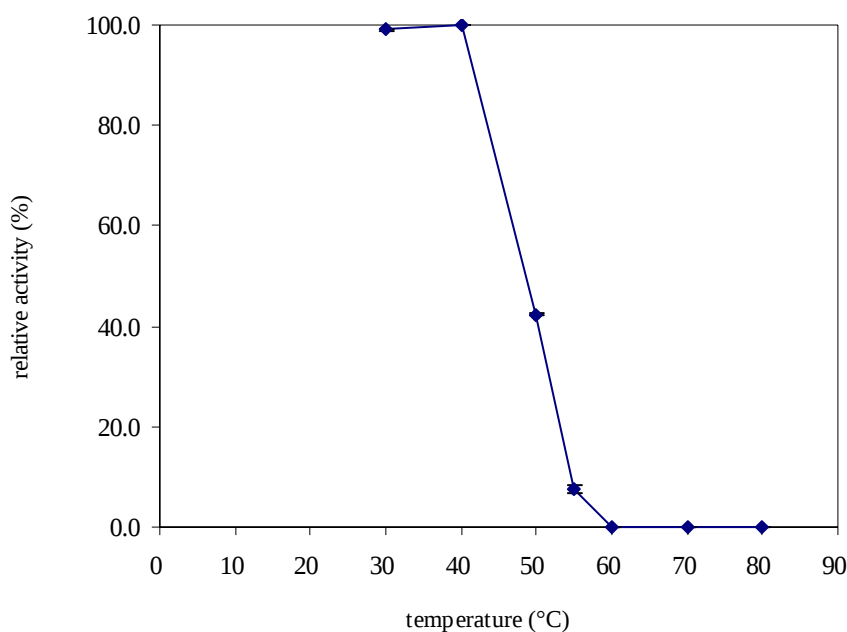
เมื่อเทียบกับการศึกษาใน crude enzyme พบว่ามีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 55°C เหมือนกัน และจากการศึกษาคูสมบัติของเอนไซม์ อัลคาไลน์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Vibrio fluvialis* ของ Venugopal and Saramma (2006) พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมในช่วงอุณหภูมิที่กว้างในช่วงอุณหภูมิ 30-75°C มีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 55°C เช่นเดียวกับเอนไซม์ อัลคาไลน์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. A39 ในการทดลองนี้

4.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์

การศึกษาคูสมบัติของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่สร้างจาก *Bacillus* sp. A39 พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวในช่วง 30°C-40°C (ภาพที่ 14) โดยมีค่า relative activity 99.02, 100% ตามลำดับ แต่เมื่อต้มเอนไซม์ที่ 50°C พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงมากกว่าครึ่งหนึ่งของค่า relative activity และเมื่อต้มเอนไซม์ที่ 55°C กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็วเหลือเพียง 7.63% ถ้าต้มเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงกว่า 55°C จะไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เลย เมื่อเทียบกับการศึกษาใน crude enzyme พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวในช่วง 30°C-50°C ซึ่งมีความคงตัวในช่วงกว้างกว่าเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่าเอนไซม์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำที่ประกอบ ด้วยหน่วยย่อยเพียงหน่วยเดียวที่มีพันธะไดซัลไฟด์ภายในโมเลกุลจะทนความร้อนได้ดีกว่าเอนไซม์ที่มีมวลโมเลกุลสูงๆที่ประกอบด้วยหลายหน่วยย่อย และเอนไซม์ที่อยู่ในสภาพที่ยังไม่ได้ถูกทำให้บริสุทธิ์จะทนต่อความร้อนได้ดีกว่าเอนไซม์ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้ว สำหรับอิทธิพลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์นั้นจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการได้แก่ pH, ionic strength หรือการมีไลแกนด์จับอยู่ด้วยหรือไม่ โดยทั่วไปพบว่าสัณสเทรท สามารถป้องกันการเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์โดยการเพิ่มอุณหภูมิได้ (พัชรา, 2543)

จากรายงานการศึกษาของ Ferero (1996) พบว่าความคงตัวของโปรติโอไลติกซึ่งวัดโดยการให้ความร้อนระหว่าง 30°C-70°C เอนไซม์มีความคงตัว 100% ไปจนถึงอุณหภูมิที่ 60°C

แต่ที่ 70°C สูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ ส่วน Nascimento and Martins (2004) ทดลองวัดกิจกรรมของเอนไซม์หลังจากบ่มเอนไซม์ที่ปราศจากสับสเตรท ณ อุณหภูมิต่างๆกัน พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวที่ 30°C เมื่อบ่มเป็นเวลา 2 h ขณะที่ 40°C และ 80°C กิจกรรมของเอนไซม์สูญเสียไป 14 และ 84% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสส่วนใหญ่มีความคงตัวอยู่ในช่วง 30°C-60°C



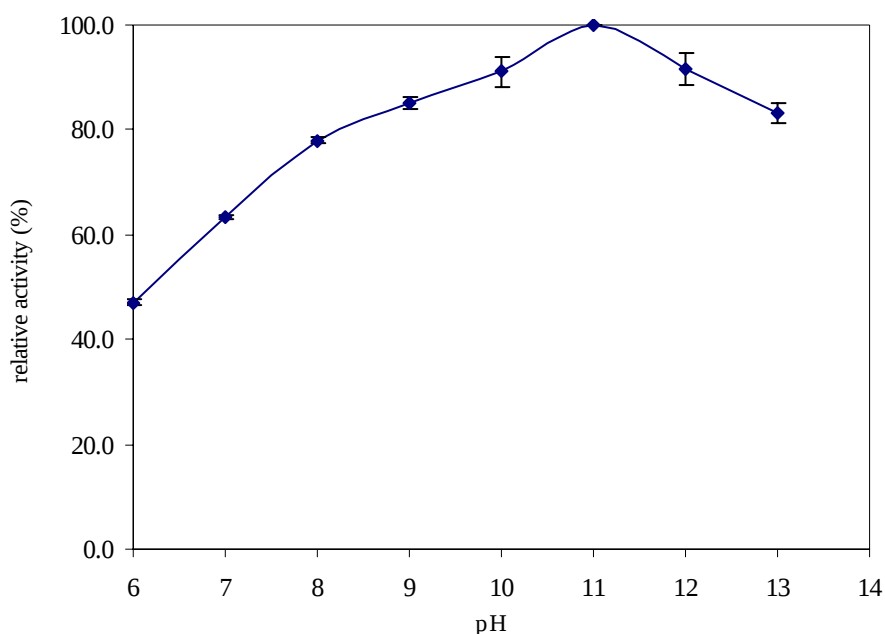
ภาพที่ 14 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์

จาก *Bacillus* sp. A39

4.4 ศึกษาหา pH ที่เหมาะสม (optimum pH) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์

การศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการทำกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ pH ตั้งแต่ 6.0-13.0 พบว่าในช่วงแรก pH 6.0 และ 7.0 มีค่า relative activity น้อย คือ 47.04, 67.43% ส่วน pH 8.0 และ 9.0 เอนไซม์มีค่า relative activity 78.03 และ 85.07% และ pH ที่เหมาะสม (optimum pH) อยู่ที่ 11.0 ซึ่งทำให้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสมีกิจกรรมสูงสุด (ภาพที่ 15) ส่วนที่ pH 10.0 และ 12.0 เอนไซม์ยังสามารถทำงานได้ดี และมีค่า relative activity เท่ากับ 91.16 และ 91.61 % ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับที่ pH 11.0 ซึ่งให้ค่า relative activity เท่ากับ 100% เมื่อ pH มาก ขึ้นถึง 13.0 กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งมีค่า relative activity 83.13% แสดงให้เห็นว่า

เอนไซม์มี pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วงที่ค่อนข้างเป็นด่าง ซึ่งเอนไซม์โดยทั่วไปจะทำงานได้ดีที่ pH ช่วงหนึ่ง ในสถานะที่มี pH ต่างๆกันมีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกัน เนื่องจาก pH ทำให้เอนไซม์มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา แต่ pH บางช่วงจะทำให้เอนไซม์ถูกยับยั้งอย่างถาวรเพราะเอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติไป เนื่องจากโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีนถูกทำลาย (พัชรา, 2543)

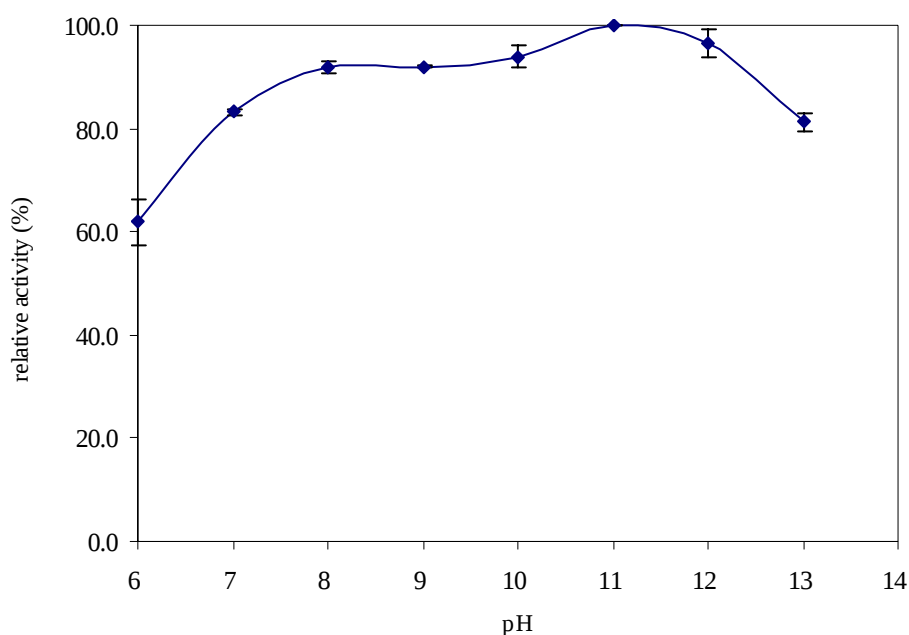


ภาพที่ 15 ผลของ pH ต่อ relative activity (%) ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. A39

เมื่อเทียบกับการศึกษาใน crude enzyme พบว่ามี pH ที่เหมาะสมอยู่ที่ 11.0 เช่นเดียวกับกับเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว และจากรายงานการศึกษาของ Patel *et al.* (2006) pH ที่เหมาะสมต่อการทำกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ผ่านคอลัมน์ DEAE cellulose และผ่านคอลัมน์ Sephadex-200 พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมอยู่ในช่วง pH 8.5-12.0 และ pH ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง pH 10.0 และ 11.0 ซึ่งอยู่ในช่วงที่เป็นด่างเหมือนกับอัลคาไลน์โปรติเอสที่สร้างจาก *Bacillus* sp. A39

4.5 ศึกษาผลของ pH ต่อความคงตัวของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์

การศึกษาผลของ pH ต่อความคงตัวของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่สร้างจาก *Bacillus* sp. A39 พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวดีที่ pH กว้างตั้งแต่ 7.0 ถึง 12.0 (ภาพที่ 16) โดยมีค่า relative activity มากกว่า 80 ไปจนถึง 100% และมีความคงตัวค่อนข้างดีที่ pH ที่เป็นด่าง แต่เมื่อบ่มเอนไซม์ร่วมกับสารละลาย buffer ที่มี pH 13.0 นาน 30 นาที กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง และถ้าบ่มที่ pH มากกว่านี้กิจกรรมของเอนไซม์มีแนวโน้มจะลดลง เมื่อเทียบกับการศึกษาใน crude enzyme พบว่ามีความคงตัวในช่วงที่คล้ายกันคือ 7.5 ถึง 12.0



ภาพที่ 16 ผลของ pH ต่อความคงตัวของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. A39

สำหรับความคงตัวของเอนไซม์ที่ pH ต่างๆ นั้น จะขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น อุณหภูมิ ionic strength ชนิดของ buffer ความเข้มข้นของ glycerol และ sulfhydryl ความเข้มข้นของออกซิเจนของโลหะที่เจือปนอยู่ และความเข้มข้นของสับสเตรท และ โคแฟกเตอร์ พบว่าบางกรณีสับสเตรทจะเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ทำให้ได้โครงสร้างที่ถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติโดยการเปลี่ยน pH ได้ยากขึ้นหรือง่ายขึ้นก็ได้ นอกจากนี้ในการเก็บเอนไซม์ไว้ใช้นานๆ จะต้องคำนึงถึงว่าเอนไซม์บางชนิดอาจมีความเสถียรมาก เมื่อเก็บที่ pH ที่แตกต่างไปจาก pH ที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์นั้น (พัชรา, 2543)

ในปี 2006, Rahman *et al.* ได้ศึกษาเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* มีความคงตัวระหว่าง pH 6.0 และ 11.0 ซึ่งมีกิจกรรมมากกว่า 90% ซึ่งเอนไซม์มีความคงตัวอยู่ในช่วงกว้างเช่นเดียวกับเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus sp.* A39 ในการทดลองนี้

4.6 ศึกษาอิออนโลหะที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์

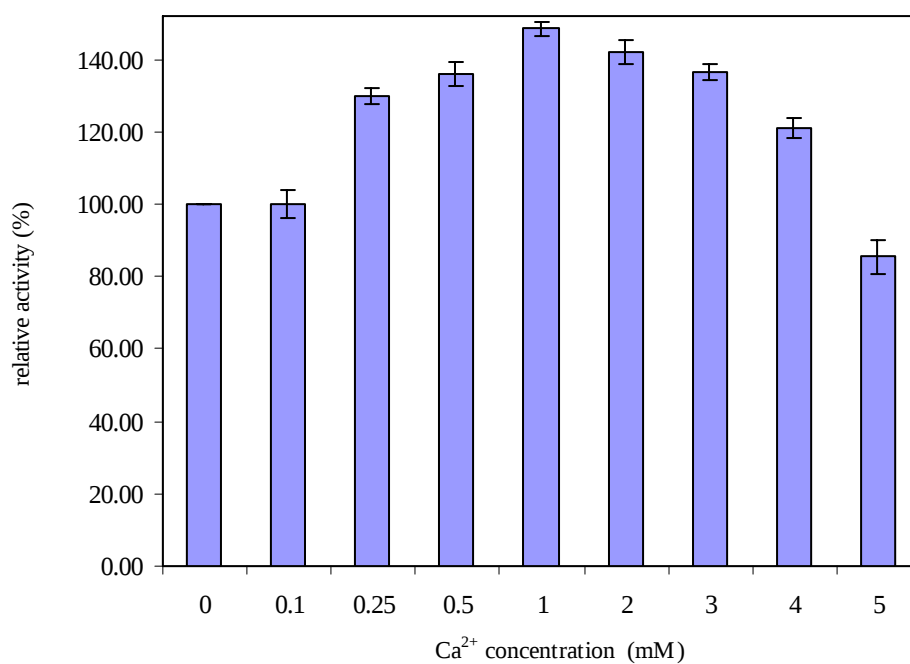
การศึกษาอิออนโลหะที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์ที่สร้างจาก *Bacillus sp.* A39 (ตารางที่ 12) พบว่าที่ความเข้มข้น 1 mM Ca^{2+} และ Cu^{2+} สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ได้ทำให้มีกิจกรรมสูงกว่า 100% เมื่อเปรียบเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่ได้ใส่อิออนโลหะลงไป และ Mg^{2+} กระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 108.31% ส่วน Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} และ Mn^{2+} มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่เท่ากับ 83.16, 67.09, 96.81, 94.89 และ 36.71% ตามลำดับ ซึ่ง Mn^{2+} มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุด

จากการที่อิออนบางพวกมีผลทำให้เกิดการกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ทำให้เอนไซม์ทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดีขึ้นด้วยรายงานของ Banerjee *et al.* (1999) พบว่าเกลือ Ca^{2+} และ Na^{2+} มีผลทำให้เอนไซม์ทนต่ออุณหภูมิสูงได้มากขึ้น และป้องกัน autolysis จึงทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นสังเกตได้จากการทดลองเติม 10 mM CaCl_2 และ 1 M glycine พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เหลือมากกว่า 50% ของกิจกรรมสูงสุด และจากการศึกษาของ Kumar *et al.* (1999) พบว่า Ca^{2+} 10 mM ทำให้เอนไซม์ AP1 มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 115% และ Ca^{2+} 1 mM ทำให้เอนไซม์ AP2 มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 130% จะเห็นว่า Ca^{2+} เป็นอิออนโลหะที่กระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสรวมทั้งเอนไซม์จาก *Bacillus sp.* A39 ที่ทำการทดลองในครั้งนี้ด้วยอีกทั้งยังทำให้เอนไซม์มีเสถียรภาพอีกด้วย

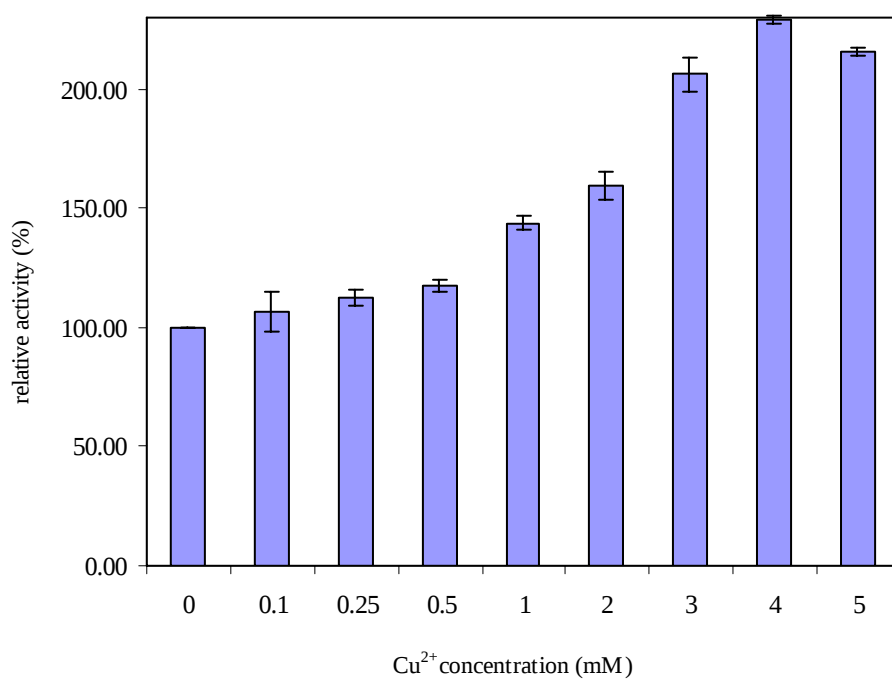
ตารางที่ 12 ผลของไอออนโลหะที่ความเข้มข้น 1 mM ต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส
บริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. A39

Metal ion	Relative activity (%)
Control	100.00
Ca ²⁺	149.14
Fe ²⁺	83.16
Mg ²⁺	108.31
Co ²⁺	67.09
Ni ²⁺	96.81
Zn ²⁺	94.89
Cu ²⁺	143.77
Mn ²⁺	36.71

เมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไอออน 2 ชนิด ที่มีการกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์คือ Ca²⁺ และ Cu²⁺ พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Ca²⁺ ในช่วง 0.1-0.5 mM (ภาพที่ 17) เอนไซม์จะมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ คือมีกิจกรรมของเอนไซม์ 100.23, 129.72 และ 136.10% ตามลำดับ และสามารถกระตุ้นกิจกรรมได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 1 mM ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ 148.43% แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 2 ถึง 5 mM มีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงคือ มีกิจกรรมของเอนไซม์ 141.91, 136.76, 121.05 และ 85.42% ตามลำดับ ส่วน Cu²⁺ (ภาพที่ 18) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเอนไซม์จะมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นในช่วง Cu²⁺ 0.1 ถึง 3 mM คือมีกิจกรรมของเอนไซม์ 106.80, 112.51, 117.31, 143.89, 159.47 และ 206.18 ตามลำดับ แต่สามารถกระตุ้นกิจกรรมได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 4 mM ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ 229.07% แต่ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของ Cu²⁺ มากกว่านี้กิจกรรมของเอนไซม์เริ่มลดลง ที่ความเข้มข้น 5 mM มีกิจกรรมของเอนไซม์ 215.83%



ภาพที่ 17 ผลของ Ca^{2+} ต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. A39



ภาพที่ 18 ผลของ Cu^{2+} ต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. A39

4.7 ศึกษาผลของสารยับยั้งเอนไซม์ (enzyme inhibitor) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์

การศึกษาผลของสารยับยั้งที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่สร้างจาก *Bacillus* sp. A39 Romero *et al.* (2001) มีรายงานว่าแบคทีเรียสังเคราะห์โปรติเอสซึ่งมีทั้งหมด 4 classes และไม่พบ aspartic protease ที่สังเคราะห์จากแบคทีเรีย ซึ่งการแยกแยะชนิดของโปรติเอสสามารถทำได้โดย class-specific inhibitor โดยโปรติเอสที่ถูกยับยั้งด้วย PMSF จัดเป็น serine protease ในขณะที่ pepstatin A สามารถยับยั้ง aspartic protease สาร Iodoacetate ยับยั้ง cysteine protease และสาร EDTA, 1,10 phenanthroline และ EGTA ยับยั้ง metallo protease จากตารางที่ 13 พบว่าอัลคาไลน์โปรติเอสจาก A39 ถูกยับยั้งอย่างรุนแรงด้วย 1 และ 10 mM EDTA มีค่า relative activity เพียง 4.77 และ 1.13% ตามลำดับ ส่วน 1,10-phenanthroline ความเข้มข้น 1 mM สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10 mM สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้มากขึ้น ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือ 41.05% นอกจากนี้ 1 และ 10 mM EGTA ยังสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้ดีอีกด้วยคือมีค่า relative activity เท่ากับ 5.22 และ 3.87% ตามลำดับ จึงจัดอัลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus* sp. A39 เป็น metalloprotease ซึ่งมี Ca^{2+} เป็นองค์ประกอบ เนื่องจากสาร EDTA สามารถ chelate อีออนโลหะทั่วไปที่เป็น divalent cations และ EGTA จะ chelate อีออนโลหะที่จำเพาะคือ Ca^{2+} ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนแปลง และสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ ดังนั้น Ca^{2+} จึงจำเป็นสำหรับบริเวณเร่งของเอนไซม์ ส่วนสาร PMSF และ pepstatin A ไม่มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์

จากรายงานของ Secades *et al.* (2001) ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ metalloprotease จาก *Flavobacterium psychrophilum* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ก่อโรคของปลา พบว่าสาร EGTA ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ metalloprotease โดยมีการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 mM เหลือกิจกรรมเพียง 12.3% และ 8.7% ตามลำดับ ซึ่งสารนี้จำเพาะกับ Ca^{2+} โดยจะไปจับกับ Ca^{2+} แล้วมีผลไปยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์

มีรายงานการยับยั้งในลักษณะเดียวกันในการศึกษาของ Gupta *et al.* (2005) พบว่า EDTA 25 mM ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ เหลือเพียง 25% และถูกยับยั้งด้วย 1,10-phenanthroline 5 mM 100 % และ PMSF ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ จึงสรุปว่าอัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Pseudomonas aeruginosa* PseA เป็น metalloprotease

ตารางที่ 13 ผลของสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์
จาก *Bacillus* sp. A39

Inhibitors	Concentration	Relative activity (%)
Control	-	100.00
PMSF	1 mM	94.15
	10 mM	90.78
EDTA	1 mM	4.77
	10 mM	1.13
EGTA	1 mM	5.22
	10 mM	3.87
Iodoacetate	1 mM	73.50
	10 mM	70.85
1,10 phenanthroline	1 mM	69.56
	10 mM	41.05
Pepstatin A	10 μ M	93.70
	100 μ M	90.33

PMSF, Phenylmethylsulphonyl fluoride; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EGTA, ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

และจากรายงานของ Karadzic *et al* (2004) กิจกรรมของโปรติเอสถูกยับยั้งอย่างรุนแรง โดย 1,10-phenanthroline, EDTA, and DTT or mercaptoethanol แสดงว่าโปรติเอสเป็น metallo-enzyme และกิจกรรมของโปรติเอสนี้ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์โดย DTT อีกด้วย ดังนั้นเอนไซม์นี้ต้องมีพันธะ disulfide (S-S bond) ในส่วนของโครงสร้างที่เป็น monomer แต่โดยทั่วไปสารยับยั้งเช่น β -mercaptoethanol, cysteine, N-ethyl-maleimide, Iodoacetamine เป็นสารยับยั้ง thiol protease หรือ cysteine protease (Bachrach *et al.*, 2004) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองการยับยั้งเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่สร้างจาก *Bacillus* sp. A39 จึงคาดว่าเป็น metallo protease ที่มี 2 subunits ที่เชื่อมด้วยพันธะไดซัลไฟด์ เนื่องจากถูกยับยั้งได้เล็กน้อยด้วยสาร Iodoacetate (ตารางที่ 13)

4.8 ศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสกับสับสเตรท

การศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่สร้างจาก *Bacillus* sp. A39 กับสับสเตรทต่างๆ ซึ่งเป็น natural protein พบว่าเอนไซม์มีความจำเพาะกับเคซีนซึ่งเป็นสับสเตรทที่สามารถย่อยได้มากที่สุด และมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด จากรายงานในปี 2002, Thangam and Rajkumar ได้ทำการศึกษา alkaline proteases จาก *Bacillus stearothermophilus* F1 และ *Bacillus* sp. KSM-K16 มีความจำเพาะกับเคซีนซึ่งเป็นสับสเตรทเหมือนกับในการทดลองนี้

ตารางที่ 14 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. A39 ต่อสับสเตรทที่แตกต่างกัน

Protein	activity (U/ml)	relative activity (%)
Casein	9.37	100.00
BSA	1.74	18.56
Sericin	0.29	3.06
Fibroin	0.19	2.03
keratin	0.10	1.07

BSA indicates bovine serum albumin.

นอกจากนี้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสสามารถย่อยสับสเตรทอื่นๆ จากมากไปน้อย ดังนี้ BSA 18.56 % > sericin 3.06 % > fibroin 2.03 % > keratin 1.07 % ดังแสดงในตารางที่ 14 โดยเฉพาะ keratin เอนไซม์ย่อยได้น้อยที่สุด อธิบายได้จากรายงานของ Kumar *et al.* (1999) ว่า

อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus* spp. ย่อย keratin ได้น้อยเพราะ keratin มีโครงสร้างของเปปไทด์ที่แข็งแรง และการจับระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทบนพื้นผิวของ keratin นั้นจำกัด

นอกจากนี้ในการศึกษาความจำเพาะของสับสเตรทพบว่า เอนไซม์มีความคงตัวดี เนื่องจากตัวอย่างเอนไซม์บริสุทธิ์ที่นำมาทดลองนั้นได้จาก crude enzyme ที่เก็บไว้ที่ -20°C เป็นเวลานานถึง 10 เดือน ซึ่งยังตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ แม้ว่ากิจกรรมในการย่อยสับสเตรทของเอนไซม์จะลดลงกว่าเดิมประมาณเกือบครึ่งหนึ่ง

4.9 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์เปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ทางการค้า

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์ที่สร้างจาก *Bacillus* sp. A39 เปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ทางการค้า พบว่าเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสมีกิจกรรมเท่ากับ 15.44 U/ml และมีค่ากิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 35.91 U/mg ซึ่งน้อยกว่าเอนไซม์ทางการค้าที่ชื่อว่า Thermolysin โดยมีกิจกรรม และกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 18.07 U/ml และ 62.31 U/mg ตามลำดับ ซึ่ง Thermolysin เป็นเอนไซม์ที่ถูกทำให้มีความบริสุทธิ์ และมีกิจกรรมที่สูงเพื่อนำไปใช้ในการค้า แต่เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสมีกิจกรรมจำเพาะมากกว่า protease K ซึ่งมีกิจกรรม และกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 16.45 U/ml และ 25.31 U/mg ตามลำดับ เนื่องจาก protease K มีโปรตีนอื่นปนอยู่มากกว่า ดังตารางที่ 15

มีรายงานการศึกษาของ Rahman *et al.* (2006) ได้ทำการเปรียบเทียบอัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Pseudomonas aeruginosa* strain K กับโปรติเอสที่รู้จักดีเช่น thermolysin, papain และ chymotrypsin ซึ่งถูกใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพของเปปไทด์สังเคราะห์ในที่มีสารละลายอินทรีย์ อย่างไรก็ตามโปรติเอสเหล่านี้ไม่คงตัวเพียงพอในที่มีสารละลายอินทรีย์ แต่โปรติเอส strain K ทนต่อสารละลายอินทรีย์

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. A39 กับเอนไซม์ทางการค้า

enzymes	enzyme activity (U/ml)	Protein (mg/ml)	specific enzyme activity (U/mg)
Alkaline protease (metalloprotease)	15.44	0.43	35.91
Thermolysin (metalloprotease)	18.07	0.29	62.31
Proteinase K	16.45	0.65	25.31

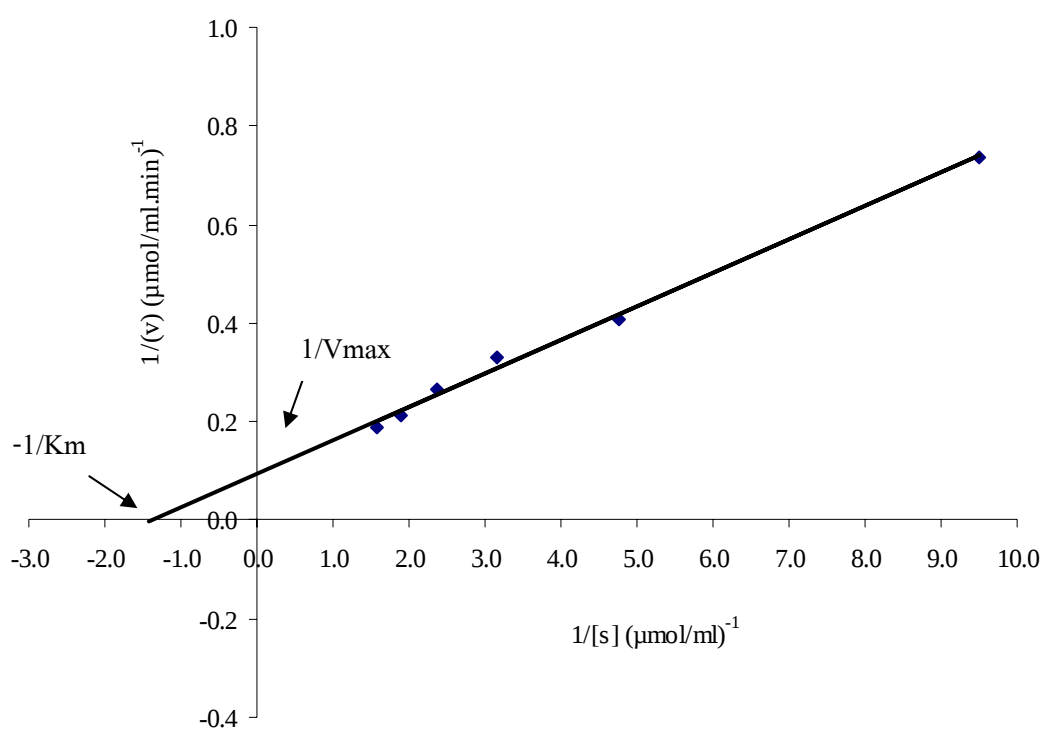
4.10 ศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์

จากการศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วโดยทำการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเคซีน และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ณ เวลาต่าง ๆ กัน (ตารางที่ 16) พบว่ามีค่า K_m (Michaelis-Menten constant) เท่ากับ $0.73 \mu\text{mol/ml}$ และค่า V_{max} (maximum velocity) เท่ากับ $10.71 \mu\text{mol/ml.min}$ ซึ่งได้จากการเขียนกราฟระหว่างค่า $1/V$ และ $1/S$ (ภาพที่ 19) เมื่อเทียบกับการหาค่าทางจลนพลศาสตร์ของ crude enzyme ที่มีค่า K_m เท่ากับ $0.76 \mu\text{mol/ml}$ พบว่าค่า K_m ที่ได้จากเอนไซม์บริสุทธิ์มีค่าใกล้เคียงกัน เนื่องจากมีเอนไซม์ตัวเดียวกันมีความความจำเพาะกับสับสเตรท หรือความชอบต่อสับสเตรทเหมือนกัน และค่า V_{max} สูงกว่า crude enzyme ที่มีค่า $0.72 \mu\text{mol/ml.min}$ อธิบายได้ว่าเอนไซม์ที่บริสุทธิ์แล้วจะมีความเร็วของปฏิกิริยาสูง ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาสูง เกิดปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว (พัชรา, 2543)

รายงานการศึกษาคุณสมบัติของ metalloprotease จาก *Pseudomonas fluorescens* RO98 มีค่า K_m เท่ากับ 144.28, 18.73, 110.20 and 35.23 mmol ซึ่งได้จากเคซีน a-, b- และ k- ส่วนค่า V_{max} เท่ากับ 8.26, 0.09, 0.42 and $0.70 \text{ mmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ตามลำดับ (Koka and Weimer, 2000) และมีการศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Serratia marcescens* ซึ่งใช้ Na-benzoyl-DL-arginine *p*-nitroanilide hydrochloride เป็นสับสเตรท ได้ค่า K_m เท่ากับ 849.9 mM และ V_{max} เท่ากับ $505.64 \text{ mmol/mg protein/min}$ (Romero *et al.*, 2001)

ตารางที่ 16 Initial velocity (V_o) ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. A39 และ $1/V$ ที่ความเข้มข้นของเคซีนที่แตกต่างกัน

Casein concentration [S] ($\mu\text{mol/ml}$)	Initial velocity (V_o) ($\mu\text{mol/min}$)	1/S ($\mu\text{mol/ml}$) ⁻¹	1/V ($\mu\text{mol/min}$) ⁻¹
0.105	1.358	9.497	0.737
0.211	2.443	4.751	0.409
0.316	3.039	3.167	0.329
0.421	3.783	2.375	0.264
0.526	4.692	1.900	0.213
0.632	5.290	1.583	0.189



ภาพที่ 19 กราฟ Lineweaver-Burk ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. A39

ส่วนอัลคาไลน์โปรตีนจากแบคทีเรีย *Bacillus pantotheneticus* ที่กลายพันธุ์ (mutant) กิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทเคซีน 2.5 ถึง 15 mg/ml ตาม (Lineweaver–Burk) plot ค่า K_m ของเอนไซม์นี้คำนวณได้เท่ากับ 11 mg/ml และ V_{max} เท่ากับ 380 g tyrosine/ml/min (Shikha *et al.*, 2006)

4.11 ศึกษาการประยุกต์ใช้ crude enzyme ในการลอกกาวย sericin จากเส้นไหมดิบ

จากตารางที่ 17 พบว่าการประยุกต์ใช้ crude enzyme เพื่อลอกกาวย sericin จากเส้นไหมดิบ สามารถทำได้โดยลอกกาวยได้ปริมาณ sericin 27.71% เมื่อทำการเจือจางเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 1:20 สามารถลอกกาวยได้น้อยลงมา ได้ปริมาณ sericin เท่ากับ 13.82 % แสดงว่าเอนไซม์มีผลในการลอกกาวย และเมื่อเปรียบเทียบกับ control ซึ่งเป็นการลอกกาวยโดย buffer และน้ำกลั่นพบว่าลอกกาวยได้น้อยกว่าการใช้ crude enzyme และมีผลในการลอกกาวยเพียงเล็กน้อย เมื่อคุณลักษณะเส้นไหมหลังจากลอกกาวยแล้วจะเห็นว่ามีผลสอดคล้องกับการลอกกาวย ซึ่งลอกกาวยได้จากน้อยไปหามากตามลำดับดังนี้

น้ำกลั่น < buffer < crude enzyme ความเข้มข้น 1:20 < crude enzyme เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นไหมปกติ ลักษณะเส้นไหมที่ลอกกาวยแล้วจะฟูขึ้น (ภาพที่ 20)

ตารางที่ 17 การลอกกาวยเส้นไหมดิบโดยเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนจาก *Bacillus* sp. A39

Treatments	Sericin yield (%)
Crude enzyme	27.71
Crude enzyme (dilute 1:20)	13.82
50 mM glycine-NaOH buffer, pH 11.0	5.42
Distill water	3.53



ภาพที่ 20 การเปรียบเทียบการลอกกาว sericin จากเส้นไหมดิบด้วยน้ำกลั่น, glycine-NaOH buffer 50 mM, crude enzyme (ที่ความเจือจาง 1:20) and crude enzyme

เอนไซม์อะไลโดไรส์ sericin ซึ่งเป็นกาวไหมที่มีองค์ประกอบหลักทางเคมีเป็นโปรตีน เกาะติดที่พันธะระหว่างเพปไทด์สั้นๆ และกรดอะมิโน ความสามารถในการลอกกาวไหมของ proteolytic enzymes ขึ้นกับ pH และเอนไซม์ที่แตกต่างกันก็จะมีกิจกรรมสูงสุด (optimum activity) แตกต่างกันไปสำหรับ pH ที่แตกต่างกัน และพบว่าเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการลอกกาวไหมได้ดีกว่า neutral และ acidic protease โดยสามารถกำจัดกาวไหมออกได้อย่างสมบูรณ์ และสม่ำเสมอ อีกทั้งเส้นไหมยังคงมีความแข็งแรง พื้นผิวเรียบ นุ่มนวล และมีความเงามัน เส้นไหมที่ผ่านการลอกกาวด้วยเอนไซม์นอกจากจะมีความเรียบมากกว่า ใช้สับแล้วยังปรับปรุงให้เส้นไหมมีความสามารถในการดูดซับสีมากขึ้นอีกด้วย (สิริรัตน์, ม.ป.ป.)

สรุป

เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. A39 สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้โดยการตกตะกอนด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่อิ่มตัว 80 % แล้วผ่านคอลัมน์ phenyl sepharose และคอลัมน์ Mono Q ตามลำดับ ได้กิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 58.10 U/mg มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 66.88 เท่า แต่ได้ yield เท่ากับ 3.82 % เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยวิธี SDS-PAGE พบแถบโปรตีนเดี่ยว และมวลโมเลกุลซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีนี้มีค่าประมาณ 35 kDa แต่การวิเคราะห์โดย sephacryl S-200 ได้มวลโมเลกุลเท่ากับ 79 kDa แสดงว่าเอนไซม์มี 2 subunits หรือเป็น dimer ที่มีขนาดโมเลกุลเท่ากัน เมื่อยืนยันการหามวลโมเลกุลอีกครั้งด้วยวิธี MALDI-MS สรุปได้ว่ามวลโมเลกุลของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่แท้จริงคือ 26,964 Da และในรูปของ dimer มีขนาดเท่ากับ 53,973 Da

การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์พบว่ามีความทนทานต่ออุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมอยู่ที่ 55°C, 11.0 ตามลำดับ มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 30°C ถึง 40°C และความคงตัวต่อ pH ในช่วงกว้าง ซึ่งค่อนข้างต่ำ คือ 7.0 ถึง 12.0 จึงเหมาะสำหรับการใช้ประโยชน์กับอุตสาหกรรม หรือกระบวนการผลิตที่มีสถานะเป็นด่าง ในการศึกษาผลของไอออนต่อกิจกรรมของเอนไซม์พบว่าไอออนของโลหะที่เข้มข้น 1 mM Ca^{2+} และ Cu^{2+} กระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์อย่างเห็นได้ชัด ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่า 100% โดยมีค่าเท่ากับ 149.14 และ 143.77% ตามลำดับ เนื่องจากไอออนช่วยทำให้เอนไซม์ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ และเมื่อเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไอออนทั้งสองพบว่า Ca^{2+} และ Cu^{2+} กระตุ้นกิจกรรมสูงสุดที่ 1 และ 4 mM ตามลำดับ นอกจากนี้สารยับยั้ง EDTA และ 1,10-phenanthroline มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ขณะที่สาร EGTA ซึ่งมีความจำเพาะกับ Ca^{2+} ก็มีการยับยั้งเอนไซม์อย่างรุนแรงเช่นกัน แต่เนื่องจากสาร Iodoacetate ก็มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้เล็กน้อยด้วย จึงคาดว่าเอนไซม์นี้เป็น metalloprotease ที่มี 2 subunits ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ และมี Ca^{2+} เป็นไอออนที่จำเป็นในบริเวณเร่งของเอนไซม์ ส่วนสารยับยั้งตัวอื่นๆ ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ การศึกษาความจำเพาะของสับสเตรทพบว่าเอนไซม์สามารถย่อยเคซีนได้ดีที่สุด จึงเป็นสับสเตรทที่เหมาะสมกับเอนไซม์นี้ ส่วนสับสเตรทอื่นๆ ย่อยได้น้อยกว่า เนื่องมาจากโครงสร้างที่ย่อยได้ยากของสับสเตรทนั้นๆ นอกจากนี้จากการศึกษาความจำเพาะของสับสเตรทชี้ให้เห็นว่าสามารถเก็บเอนไซม์ที่ -20°C ได้นานถึง 1 เดือน ในการเปรียบเทียบเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสกับเอนไซม์ทางการค้า พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์และกิจกรรมจำเพาะน้อยกว่าเอนไซม์ทางการค้าที่ชื่อว่า Thermolysin 1.74 เท่า (ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ถูกทำให้มีความบริสุทธิ์ และมี

กิจกรรมจำเพาะสูงเพื่อนำไปใช้ในการค้า) แต่เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสมีกิจกรรมจำเพาะมากกว่า protenase K 1.42 เท่า (proteinas K มีโปรตีนอื่นปนอยู่มากกว่า) ในการศึกษาจลนพลศาสตร์ของ เอนไซม์อัลคาไลน์ โปรติเอสพบว่าค่า K_m เท่ากับ $0.73 \mu\text{mol/ml}$ และค่า V_{max} เท่ากับ $10.71 \mu\text{mol/ml.min}$ ซึ่งแสดงว่ามีความจำเพาะกับสับสเตรทมาก และมีอัตราเร็วในการทำปฏิกิริยาสูง สามารถทำปฏิกิริยาได้อย่างรวดเร็ว

การวิจัยนี้ได้ทดลองประยุกต์ใช้ crude enzyme เพื่อลอกกาว sericin จากเส้นไหมดิบ ผลปรากฏว่าสามารถทำได้โดยมีปริมาณ sericin ที่ลอกออกมาได้ประมาณ 27.71% แต่การลอกกาวต้องคำนึงว่าเอนไซม์จะไม่ย่อยส่วนของเส้นใยที่เรียกว่า fibroin เพราะจะทำลายเส้นไหม จากการทดลองข้างต้นพบว่าเมื่อนำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์แล้วไปย่อย fibroin สามารถย่อยได้เพียงแค่ 2% เท่านั้น จึงอาจเป็นไปได้ว่าเอนไซม์นี้ไม่ทำลายเส้นใยไหม

ข้อเสนอแนะ

1. ถ้าต้องการจะนำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสไปใช้ประโยชน์จริง และแข่งขันกับเอนไซม์ทางการค้า ในอนาคตอาจต้องทำการปรับปรุงสภาวะในการเลี้ยงในถังหมัก (fermentor) หรือทำการโคลนยีนเพื่อให้ได้ปริมาณเอนไซม์ที่มาก หรือทำให้กิจกรรมสูงขึ้นโดยใช้ อีออน โลหะเป็นตัวกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ เป็นต้น

2. อาจทำการทดลองเพิ่มเติมในการประยุกต์ใช้ crude enzyme เพื่อลอกกา sericin จากเส้นไหมดิบ โดยเปรียบเทียบปริมาณ sericin จากการลอกกาโดยทั่วไปที่ใช้ 0.05% Na_2CO_3 หรือตรวจเส้นใยด้วยกล้องจุลทรรศน์ scanning electron microscopoe (SEM) เพื่อดูลักษณะของเส้นใยว่าถูกทำลายหรือไม่ หรือประยุกต์ใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ทำการเจือจางที่ความเข้มข้นเหมาะสมก่อนแล้วจึงทำการลอกกา เป็นต้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กฤษดากร จริโมภาส. 2549. การผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสโดย *Bacillus* sp. ที่ชอบด่างในอาหารเหลว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 142 น.

จุฑาทพร แสงแก้ว. 2543. การคัดเลือก และปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 129 น.

ดวงกมล เสนาธรรม และเปรมวดี วงษ์แสงจันทร์. 2548. การตรวจลักษณะเฉพาะเบื้องต้นของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อแบคทีเรีย GR_5_4, 4TS9_001 และ HIC_13_8. งานประชุมวิชาการครั้งที่ 31 สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ดวงพร วรสุนทรโรสถ. 2548. คู่มือปฏิบัติการชีวเคมี1. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 122 น.

ชาญวิทย์ ตรีเดช. ม.ป.ป. คลินิกเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. แหล่งที่มา: www.clinictech.most.go.th, 9 เมษายน 2550

มนตรี จุฬาววัฒนทล. 2543. ชีวเคมี. ภาควิชาชีวเคมี. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. ศ.ศ. การพิมพ์, กรุงเทพฯ. 589 น.

เยาวพา สุวัทธิ. ม.ป.ป. เอนไซม์ในอุตสาหกรรมอาหาร. สถาบันวิจัยและพัฒนาองค์การเกษตรกรรม. แหล่งที่มา: <http://www.gpo.or.th/rdi/html/enzyme.html>, 20 ธันวาคม 2549

วิภาพรรณ ผจงวิริยาทร. ม.ป.ป. เทคโนโลยี Freeze-Drying. วิจัยมาตรฐานสมุนไพร. แหล่งที่มา: www.lyophilizationtechnology.com, 9 เมษายน 2550

พัชรา วีระกะลัส. 2543. เอนไซม์. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 344 น.

พวงชมพู ชูเกียรติวัฒนา. 2545. การเพิ่มความบริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้จากเหพาโทแพนเคเรียของกุ่มกลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์. 77 น.

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2542. จุลชีววิทยาปฏิบัติการ. พิมพ์ครั้งที่ 3. เจ้าพระยาระบบการพิมพ์ จำกัด, กรุงเทพฯ. 330 น.

รุ่งทิวา วันสุขศรี. 2543. การสกัดโปรตีนในปลายข้าวหอมมะลิเพื่อทำแป้งข้าวเจ้าบริสุทธิ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 166 น.

วัลลี สุวจิตตานนท์. 2532. ชีวเคมีคำนวณ. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 240 น.

ศิริพงศ์ ตั้งประเสริฐกิจ. 2548. การแยกเอนไซม์ไฟโบรอินจากน้ำย่อยของหนอนไหม (*Bombyx mori*) ให้บริสุทธิ์บางส่วน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 88 น.

สิริรัตน์ จารุจินดา. ม.ป.ป. ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
แหล่งที่มา: <http://www.moac.go.th/builder/mu/index.php>, 1 เมษายน 2550

เสาวนีย์ ธรรมสถิตติ. 2545. การทดลองการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์. สถาบันวิจัยและพัฒนา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล. โรงพิมพ์สถาบันพัฒนาสาธารณสุขอาเซียน, นครปฐม. 104 น.

สุดธิดา แสงยนต์. 2548. สมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 127 น.

Adinarayana, K., P. Ellaiah and D.S. Prasad. 2003. Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. **Pharm. Sci. Tech.** 4(4): E56.

- Aftab, S., S. Ahmed, S. Saeed and S.A. Rasool. 2006. Screening, isolation and characterization of alkaline protease producing bacteria from soil. **Park. J. Biol. Sci.** 9(11): 2122-2126.
- Agrawal, D., P. Patidar, T. Banerjee and S. Patil. 2004. Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. **Process Biochem.** 39: 977–981.
- Alam, S.I., S. Dube, M.K. Agarwal, and L. Singh. 2006. Purification and characterization of an extracellular protease produced by psychrotolerant *Clostridium* sp. LP3 from lake sediment of Leh, India. **Can. J. Microbiol.** 52(12): 1238–1246.
- Amresco[®]. 2003-2004. **Products for Life Science Research**. Cleveland, USA. 244 p.
- Anandan, D., W. N. Marmer and R.L. Dudley. 2007. Isolation, characterization and optimization of culture parameters for production of an alkaline protease isolated from *Aspergillus tamari*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**
- Andrews, A. T. 1986. Electrophoresis : Theory, **Techniques and Clinical Applications**. Clarendon Press, Oxford. 452 p.
- Bachrach, G., G. Rosen, M. Bellalou, R. Naor, M.N. Sela. 2004. Identification of a *Fusobacterium nucleatum* 65 kDa serine protease. **Oral Microbiol. Immunol.** 19: 155-159
- Anwar, A. and M. Saleemuddin. 2000. Alkaline protease from *Spilosoma obliqua*: potential applications in bioformulation. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 31: 85-89.
- Banerjee, U.C., R.K. Sani, W. Azmi and R. Sani. 1999. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterisation as a laundry detergent additive. **Process Biochem.** 35: 213–219.

- Banik, R.M. and M. Prakash. 2004. Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. **Microbiol. Res.** 159: 135–140.
- Barata, R.A., M.H.G. Andrade, R.D. Rodrigues and I. Miranda. 2002. Purification and characterization of an extracellular trypsin-like protease of *Fusarium oxysporum* var. *Lini*. **J. Biosci. Bioeng.** 94(4): 304-308.
- Barrett, G.C. 1985. **Chemistry and Biochemistry of The Amino Acids**. Chapman and Hall, London. 684 p.
- Barrett, A.J., N. D. Rawlings and J. F. Woessner. 2003. **Handbook of Proteolytic Enzymes**. 2nd ed . Academic Press, San Diego, Calif. 1,666 p.
- Beg, Q.K., R. Gupta. 2003. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavenensis*. **Enz. Microb. Technol.** 32: 294–304
- Bhaskar, N., E.S. Sudeepa, H.N. Rashmi and A.T. Selvi. 2006. Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. **Bioresour. Technol.** 98(14): 2758-64
- Chaykin, S. 1970. **Biochemistry Laboratory Techniques**. Wiley Eastern Private Ltd., India. 169 p.
- Chu, W.H. 2007. Optimization of extracellular alkaline protease production from species of *Bacillus*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 34: 241–245
- Clark, D.J., S.J. Hawrylik, E. Kavanagh, and D.J. Opheim. 2000. Purification and characterization of a unique alkaline elastase from *Micrococcus luteus*. **Protein Exp. Purif.** 18: 46–55.

- Craig, P.A. n.d. **Chromatography**. Rochester Institute of Technology, NY. Source: <http://www.rit.edu/~pac8612/webionex/website/images/hic.gif>, January 12, 2007
- Dalev, PG. 1994. Utilisation of waste feathers from poultry slaughter for production of a protein concentrate. **Bioresour. Technol.** 48: 256-67.
- Damare, S., C. Raghukumar, U.D. Muraleedharan and S. Raghukumar. 2006. Deep-sea fungi as a source of alkaline and cold-tolerant proteases. **Enz. Microb. Technol.** 39: 172-181.
- Dawson, R.M., D.C. Elliott, W.H. Elliott and K.M. Jones. 1986. **Data for Biochemical Research**. 3rd ed. Oxford: Clarendon Press, New York. 580 p.
- Dean, P.D.G., W.S. Johnson and F.A. Middle. 1991. **Affinity Chromatography** ; A practical approach. OIRL Press, Oxford. 215 p.
- Debette, J. 1991. Isolation and characterisation of an extracellular protease produced by a soil strain of *Xanthomonas maltophila*. **Curr. Microbiol.** 22: 85–90.
- Deutscher, M.P. 1990. **Methods in Enzymology: Guide to Protein Purification**. Academic Press, London. 182: 894 p.
- Dixon, M. and E.C. Webb. 1979. **Enzyme**. 3rd., Longman, London. 1116 p.
- Dutta, J.R. and R. Banerjee. 2006. Isolation and characterization of a newly isolated *Pseudomonas* mutant for protease production. **Braz. Arch. Biol. Technol. J.** , 49: 37-47.
- Ebeling, W., N. Hennrich, M. Klockow, H. Metz, H.D. Orth and H. Lang. 1974. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. **Eur. J. Biochem.** 47: 91-97.

- Ferrero, M.A., G.R. Castro, C.M. Abate, M.D. Baigorñ and F. Sineriz. 1996. Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 45: 327-332.
- Fricke, B., O. Parchmann, K. Kruse, P. Rußknägel, A. Schierhorn and S. Menge. 1999. Characterization and purification of an outer membrane metalloproteinase from *Pseudomonas aeruginosa* with fibrinogenolytic activity. **Biochim. Biophys. Acta.** 1454: 236-250.
- Fukasawa, S., K. Nakamura, A. Kamii, Y. Ohyama and M. Osumi. 1988a. Purification and properties of a proteinase from a marine luminous bacterium, *Vibrio harveyi* strain FLA-11. **Agric. Biol. Chem.** 52: 435-441.
- _____, _____, M. Miyahira, M. Kurata. 1988b. Some properties of two proteinases from a luminous bacterium, *Vibrio harveyi* strain FLN-108. **Agric. Biol. Chem.** 52: 3009-3014.
- Gagne, N. and B.K. Simpson. 1993. Use of proteolytic enzymes to facilitate recovery of chitin from shrimp wastes. **Food Biotechnol.** 7: 253-63.
- Genckal, H. and C. Tari. 2006. Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp isolated from natural habitats. **Enz. Microb. Technol.** 39: 703-710.
- Gessesse, A., R.H. Kaul, B.A. Gashe, B. Mattiasson. 2003. Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. **Enz. Microb. Technol.** 32: 519-524
- Godfrey, T., S. West. 1996. **Enzymology**. 2nd, Stockton Press, New York. 609 p.
- Gupta, A., I. Roy, S.K. Khare and M.N. Gupta. 2005. Purification and characterization of a solvent stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PseA. **J. Chromatogr A.** 155-161.

- Gupta, R., Q.K. Beg and P. Lorenzyme 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 59: 15-32.
- Harris, E.L.V. and S. Angal. 1990. **Protein Purification Application: A Practical Approach.** IRL Press, N.Y. 179 p.
- He, H., X. Chen, C. Sun, Y. Zhang, P. Gao. 2006. Preparation and functional evaluation of oligopeptide-enriched hydrolysate from shrimp (*Acetes chinensis*) treated with crude protease from *Bacillus* sp. SM98011. **Bioresour. Technol.** 97: 385-90.
- Hodgson, J. 1994. The changing bulk biocatalyst market. **Biotechnology.** 12: 798-90.
- Horikoshi, K. 1996. Alkaliphiles from an industrial point of view. **FEMS Microbiol.** 18: 259-70.
- _____, 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. **Am. Soc. Microbiology.** 63(4): 735-750
- Huang, Q., Y. Peng, X.Li, H. Wang and Y. Zhang. 2003. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*. **Curr. Microbiol.** 46 : 169-173.
- Irwin, J.A., G.A. Alfredsson, A.J. Lanzetti, H.M. Gudmundsson and P.C. Engel. 2001. Purification and characterisation of a serine peptidase from the marine psychrophile strain PA-43. **FEMS Microbiol. Lett.** 201: 285-290
- Joo, H.S., C.S. Chang. 2006. Production of an oxidant and SDS-stable alkaline protease from an alkaphilic *Bacillus clausii* I-52 by submerged fermentation: Feasibility as a laundry detergent additive. **Enz. Microb. Technol.** 38: 176-183.
- Kalisz, H.M. Microbial proteinases. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** 36: 1-65.

- Karadzic, I., A. Masui and N. Fujiwara. 2004. Purification and characterization of a protease from *Pseudomonas aeruginosa* grown in cutting oil. **J. Biosci Bioeng.** 98: 145-152.
- Koka, R. and B.C. Weimer. 2000. Isolation and characterization of a protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98. **J. Appl. Microbiol.** 89: 280-288
- Kumar, C.G., M.P. Tiwari and K.D. Jany. 1999. Novel alkaline serine proteases from alkalophilic *Bacillus* spp. purification and some properties. **Process Biochem.** 34: 441-449.
- _____ and H. Takagi. 1999. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. **Biotechnol. Adv.** 17: 561-594.
- _____. 2002. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*. **Lett. Appl. Microbiol.** 34: 13-17.
- Kwak, J. n.d. **Analytical chemistry and instrumentation.** Chemistry, KAIST. Source: <http://elchem.kaist.ac.kr/vt/chem-ed/sep/lc/graphics/size-exc.gif>, January 12, 2007
- Kwon, Y.T., J.O. Kim, S.Y. Moon, H.H. Lee and H.M. Rho. 1994. Extracellular alkaline protease from alkalophilic *Vibrio metschnikovi* strain RH 530. **Biotechnol. Lett.** 16: 413-418.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A.L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.
- Malathi, S. and R. Chakraborty. 1991. Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolate under solid-substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 712-16.

Mari, F. 2006. **Analytical Methods for Amino Acid Separation and Identification**. Department of chemistry and Biochemistry Florida Atlantic University. Source:

http://www.science.fau.edu/chemistry/Mari/biochemlab/manual_files/image002.jpg,

December 28, 2006

_____. 2006. **Analytical Methods for Amino Acid Separation and Identification**.

Department of chemistry and Biochemistry Florida Atlantic University. Source:

http://www.science.fau.edu/chemistry/Mari/biochemlab/manual_files/image004.jpg, 28

ธันวาคม 2549

Mehta, V.J., J.T. Thumar and S.P. Singh. 2006. Production of alkaline protease from an alkaliphilic actinomycete. **Bioresour. Technol.** 97: 1650-1654.

Mei, C. and X. Jiang. 2005. A novel surfactant- and oxidation-stable alkaline protease from *Vibrio metschnikovii* DL 33–5. **Process Biochem.** 40: 2167-2172.

Miyaji, T., Y. Otta, T. Shibata, K. Mitsui, T. Nakagawa, T. Watanabe, Y. Niimura and N. Tomizuka. 2005. Purification and characterization of extracellular alkaline serine protease from *Stenotrophomonas maltophilia* strain S-1. **Lett. Appl. Microbiol.** 41: 253-257.

Moreira, K.A., T.S. Porto, M.F.S. Teixeira , A.L.F Porto and J.L.L. Filho. 2003. New alkaline protease from *Nocardiopsis* sp.: partial purification and Characterization. **Process Biochem.** 39: 67-72.

Najafi, M.F., D. Deobagkar and D. Deobagkar. 2005. Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. **Electronic J. Biotechnol.** 8(2): 197-203

Nakasone, N., C. Toma, T. Song and M. Iwanaga. 2004. Purification and characterization of a novel metalloprotease isolated from *Aeromonas caviae*. **FEMS Microbiol. Lett.** 237: 127-132.

- Nascimento, C.A. and M.L.L. Martins. 2004. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus sp.* **Braz. J. Microbiol.** 35: 91-96.
- Oda, K., S. Tanskul, H. Oyama and N. Noparatnaraporn. 2004. Purification and characterization alkaline serine protease from photosynthetic bacterium, *Rubrivivax gelatinosus* KDD51. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 68(3): 650-655
- Oh, Y.S., I.L. Shih, Y.M. Tzeng, S.L. Wang. 2000. Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes. **Enz. Microb. Technol.** 27: 3-10.
- Oyama, H., M. Kinjoh, M. Watari and S. Murao. 1997. Purification and characterization of an alkaline proteinase produced by *Pimelobacter sp.* Z-483. **J. Ferment. Bioeng.** 84 (4): 351-353.
- Patel, R.K., M.S. Dodia, R.H. Joshi and S.P. Singh. 2006. Purification and characterization of alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus sp.* **Process Biochem.** 41: 2002-2009.
- Pedersen, H.H., H.S. Olsen and P.M. Nielsen. 1994. Method for production of meat hydrolyzate and a use of the meat hydrolyzate. **PCT Patent Appl. WO01003.** 20 p.
- Pharmacia Fine Chemicals. 1991a. **Chromatofocusing.** Pharmacia Fine Chemicals AB, Sweden.
- _____. 1991b. **Chromatofocusing.** Pharmacia Fine Chemicals AB, Sweden.
- Pierce. 2005. **Protein Stability and Storage.** Pierce Biotechnology, Inc., USA. 3 p.
- Price, N.C. and L. Stevens. 1984. **Fundamentals of Enzymology.** Oxford, New York. 15-43 p.
- _____, _____. 1989. **Fundamentals of Enzymology.** 2th ed. Oxford, New York. 526 p.

- Rahman, R.N.Z.R.A., L.P. Geok, M. Basri and A.B. Salleh. 2006. An organic solvent-stable alkaline protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K: Enzyme purification and characterization. **Enz. Microb. Technol.** 39(7): 1484-1491.
- Roe, S. 2001. **Protein Purification Techniques**. 2th ed. Oxford, New York. 262 p.
- Romero, F.J., L.A. Garcí, J.A. Salas, M. Dí'az and L.M. Quiro'. 2001. Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. **Process Biochem.** 36: 507–515.
- Saeki, K., J. Iwata, Y. Watanabe and Y. Tamai. 1994. Purification and characterization of an alkaline protease from *Oerskovia xanthineolytica* TK-1. **J. Ferment. Bioeng.** 77(5): 554-556.
- Samal, B.B., B. Karan, C. Parker and Y. Stabinsky. 1991. Isolation and thermal stability studies of two novel serine proteinases from the fungus *Tritirachium album limber*. **Enz. Microb. Technol.** 13: 66-70.
- Schokker, E.P. and V. Boekel, M.A.J. S. 1997. Production, purification and partial characterization of extracellular proteinase from *Pseudomonas fluorescens* 22 F. **Int. Dairy J.** 7(4): 265-271.
- Scopes, R.K. 1994. **Protein purification: Principles and Practice**. Narosa Publishing House. third edition. Narosa, New Delhi. 380 p.
- Secades, P., B. Alvarez and J.A. Guijarro. 2001. Purification and characterization of a psychrophilic, calcium-Induced, growth-phase-dependent metalloprotease from the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. **Appl. Environ. Microbiol.** 67 (6): 2436-2444

- Shikha, A. Sharan and N.S. Darmwal. 2006. Improved production of alkaline protease from a mutant of alkalophilic *Bacillus pantotheneticus* using molasses as a substrate. **Bioresour. Technol.** 98(4): 881-885.
- Singh, J., R.M. Vohra and D.K. Sahoo. 2001. Purification and characterization of two extracellular alkaline proteases from a newly isolated obligate alkalophilic *Bacillus sphaericus*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 26: 387–393.
- Sjodahl, J., A. Emmer, J. Vincent and J. Roeraade. 2002. Characterization of proteinases from *Antarctic krill (Euphausia superba)*. **Protein Exp. Purif.** 26: 153-161.
- Sousa, F., S. Jus, A. Erbel, V. Kokol, A.C. Paulo and G.M. Gubitz. 2006. A novel metalloprotease from *Bacillus cereus* for protein fibre processing. **Enzyme Microb. Technol.** 10 p.
- Su, N.Y., C.J. Yu, H.D. Shen, F.M. Pan and L.P. Chow. 1999. Pen c 1, a novel enzymic allergen protein from *Penicillium citrinum* Purification, characterization, cloning and expression. **Eur. J. Biochem.** 261: 115-123.
- Takami, H., T. Akiba and K. Horikoshi. 1990. Characterization of an alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 33: 519-523.
- Towatana, N.H., A. Painupomg and P. Suntimamalert. 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. PS7 19. **J. Biosci. Bioeng.** 87(5): 581-587.
- Taylor, M.M., D.G. Bailey and S.H. Fairheller. 1987. A review of the use of enzymes in the tannery. **J. Am Leather Chem. Assoc.** 82:153-65.
- Thangam, E.B. and G.S. Rajkumar. 2002. Purification and characterization of alkaline protease from *Alcaligenes faecalis*, **Biotechnol. Appl. Biochem.** 35: 149-154.

- Tsujibo, H., K. Miyamoto, T. Hasegawa, Y. Inamori. 1990. Purification and characterization of two types of alkaline serine proteases produced by an alkalophilic actinomycete. **J. Appl. Bacteriol.** 69: 520-529.
- Tunga, R., B. Shrivastava and R. Banerjee. 2003. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. **Process Biochem.** 38: 1553-1558.
- Venugopal, M. and A.V. Saramma. 2006. Characterization of alkaline protease from *Vibrio fluvialis* strain VM10 isolated from a mangrove sediment sample and its application as a laundry detergent additive. **Process Biochem.** 41: 1239-1243.
- Walton, A.G. 1981. **Polypeptides and Protein Structure**, Elsevier, New York. 150 p.
- Wang, S.L., C.L. wang, Y.H. Yen, Y.H. Chen and M.K. chern. 2005. Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. **Enz. Microb. Technol.** 36: 660-665.
- _____, _____, _____ and Y.H. Chio. 2006. Two novel surfactant-stable alkaline proteases from *Vibrio fluvialis* TKU005 and their applications. **Enz. Microb. Technol.** 40(5): 1213-1220.
- Ward, O.P. 1985. proteolytic enzymes. **Com. Biotechnol.** 3: 789-818.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Basal medium agar (BMSM agar) (ดัดแปลงจาก Horikoshi, 1999)

Glucose	10.0	g
yeast extract	5.0	g
K ₂ HPO ₄	1.0	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	g
skim milk	2.5	g
agar	15.0	g

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 950 ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 10 min แล้วจึงปรับ pH เป็น 11.0 ด้วย 20% Na₂CO₃ ที่
ปลอดเชื้อปริมาตร 50 ml ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่ 121°C เป็นเวลา 15 min

2. Basal medium broth (BMSM broth) (ดัดแปลงจาก Horikoshi, 1999)

Glucose	10.0	g
yeast extract	5.0	g
K ₂ HPO ₄	1.0	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	g
skim milk	2.5	g

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 950 ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 10 min แล้วจึงปรับ pH เป็น 11.0 ด้วย 20% Na₂CO₃ ที่
ปลอดเชื้อปริมาตร 50 ml ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วที่ 121°C เป็นเวลา 15 min

หมายเหตุ: สูตรอาหาร BSM agar ดัดแปลงจากสูตรเดิมของ Horikoshi (1999) โดยสูตรเดิมประกอบด้วยสารอาหารดังนี้

Glucose	10.0	g
yeast extract	5.0	g
K ₂ HPO ₄	1.0	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	g
Polypeptone	5.0	g
Na ₂ CO ₃	10.0	g
agar	20.0	g

ส่วนสูตรอาหาร BSM broth มีสูตรเหมือนกัน แต่ไม่เติม agar

3. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

3.1 การเตรียม acetate buffer (Deutscher, 1990)

สารละลาย A : 0.2M acetic acid (CH_3COOH 11.55 ml ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 ml)

สารละลาย B : 0.2M sodium acetate (CH_3COONa 16.4 g ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 ml)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และสารละลาย B ตาม pH ที่ต้องการ (ปรับด้วย pH meter อีกครั้ง)

A (ml)	B (ml)	pH
46.3	3.7	3.6
44.0	6.0	3.8
41.0	9.0	4.0
36.8	13.2	4.2
30.5	19.5	4.4
25.5	24.5	4.6
20.0	30.0	4.8
14.8	35.2	5.0
10.5	39.5	5.2
8.8	41.2	5.4
4.8	45.2	5.6

3.2 การเตรียม phosphate buffer (Deutscher, 1990)

สารละลาย A : 0.2M monobasic sodium phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 31.2 g ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 ml)

สารละลาย B : 0.2M dibasic sodium phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.65 g ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 ml)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และสารละลาย B ตาม pH ที่ต้องการ (ปรับด้วย pH meter อีกครั้ง)

A (ml)	B (ml)	pH	A (ml)	B (ml)	pH
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	46.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

3.3 การเตรียม Tris-HCl buffer (เสาวนีย์, 2545)

สารละลาย A : 0.1M Tris (M.W.121.14) : $C_4H_{11}NO_3$ 12.114 g/l

สารละลาย B : 0.1M HCl

เตรียมโดยผสมสารละลาย A 50 ml และสารละลาย B ตาม pH ที่ต้องการ
(ปรับด้วย pH meter อีกครั้ง) แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วยน้ำกลั่น

B (ml)	pH	B (ml)	pH
45.7	7.1	26.2	8.1
44.7	7.2	22.9	8.2
43.4	7.3	19.9	8.3
42.0	7.4	17.2	8.4
40.3	7.5	14.7	8.5
38.6	7.6	12.4	8.6
34.6	7.7	10.3	8.7
34.5	7.8	8.5	8.8
32.0	7.9	7.0	8.9
29.2	8.0		

3.4 การเตรียม glycine-NaOH buffer (Deutscher, 1990)

สารละลาย A : 0.2M glycine ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 15.01 g ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 ml)

สารละลาย B : 0.2M sodium hydroxide (NaOH 0.8 g ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 ml)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A 50 ml และสารละลาย B ตาม pH ที่ต้องการ (ปรับด้วย pH meter อีกครั้ง)

B (ml)	pH	B (ml)	pH
4.0	8.6	22.4	9.6
6.0	8.8	27.2	9.8
8.8	9.0	32.0	10.0
12.0	9.2	38.6	10.4
16.8	9.4	45.5	10.6

3.5 การเตรียม hydroxide-chloride buffer (Dawson *et al.*, 1986)

สารละลาย A : 0.2M potassium chloride (KCl 14.91 g ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 ml)

สารละลาย B : 0.2M sodium hydroxide (NaOH 8.0 g ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 ml)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และสารละลาย B ตาม pH ที่ต้องการ (ปรับด้วย pH meter อีกครั้ง)

B (ml)	pH	B (ml)	pH
6.0	12.0	25.6	12.6
8.0	12.1	32.2	12.7
10.2	12.2	41.2	12.8
12.8	12.3	53.0	12.9
16.2	12.4	66.0	13.9
20.4	12.5		

4. การเตรียมสารสำหรับการทำ electrophoresis

4.1 สารละลาย 30% acrylamide + 0.8% bis-acrylamide

ละลาย acrylamide 75 g กับ bis-acrylamide 2 g ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 250 ml
ทำการกรอง และเก็บไว้ในขวดสีชาใน 4°C

4.2 สารละลาย 1.5 M Tris-HCl /SDS pH 8.8

ละลาย tris(hydroxymethyl)-aminomethane 45.41 g และ SDS 1 g ในน้ำกลั่นแล้วปรับ
pH ด้วย 1 M HCl ให้ได้ pH 8.8 แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 250 ml

4.3 สารละลาย 0.5 M Tris-HCl /SDS pH 6.8

ละลาย tris(hydroxymethyl)-aminomethane 15.14 g และ SDS 1 g ในน้ำกลั่นแล้วปรับ
pH ด้วย 1 M HCl ให้ได้ pH 6.8 แล้วทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 250 ml

Separating gel

30% Acrylamide / 0.8% bisacry	X/3	ml
1.5 M Tris-HCl /0.4% SDS (pH8.8)	2.5	ml
distilled water	(7.5-X/3)	ml
10% ammonium persulfate	50	μl
TEMED	5	μl
Total	10	ml

หมายเหตุ X = gel (%) ที่ต้องการ เช่น 10%, 12% และ 15% เป็นต้น

Stacking gel (gel 5%)

30% Acrylamide / 0.8% bisacry	0.67	ml
0.5 M Tris-HCl /0.4% SDS (pH6.8)	1	ml
distilled water	2.3	ml
10% ammonium persulfate	30	μl
TEMED	5	μl
Total	4	ml

5 เท่า Electrophoresis buffer

Tris base	15.1	g
Glycine	72	g
SDS	5	g
distilled water	1,000	ml
pH 8.4		

เวลาใช้ต้องเจือจางเป็น 1 เท่า

5 เท่า Sample buffer

1M Tris-HCl (pH 6.8)	0.6	ml
50% Glycerol	5	ml
10% SDS	2	ml
β-mercaptoethanol	0.5	ml
1% bromophenol blue	1	ml

เวลาใช้ผสม sample buffer:enzyme (อัตราส่วน 1:4; v/v)

Staining solution

Coomassie Brilliant blue R-250	1	g
Methanol	450	ml
Glacial acetic acid	100	ml
distilled water	450	ml

Destaining solution

Methanol	100	ml
Glacial acetic acid	100	ml
distilled water	300	ml

หมายเหตุ : sodium dodecyl sulfate (SDS)

N,N,N',N'-tetra methylethylene diamine (TEMED)

ในกรณีที่ทำ native-PAGE ไม่มี SDS ในทุกสูตรของสารที่ต้องเตรียม

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

1. การหากิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส (ดัดแปลงจาก Ferrero *et al.*, 1996)

1.1 สารเคมี

1.1.1 สารละลายเคซีน (casein : MW.19,000 โดย 1 Da = 1 g/mol) จะใช้สารละลายเคซีนเข้มข้น 4% เป็นสับสเตรท เตรียมโดยชั่งเคซีน 4 g ต้มด้วย NaOH 0.1M 50 ml จนกระทั่งเคซีนละลายหมด ปรับ pH ให้เป็น 11.0 และปรับปริมาตรด้วย 50 mM glycine-NaOH buffer (ภาคผนวก ก) ให้เป็น 100 ml

1.1.2 สารละลาย 10%TCA ใช้เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ เตรียมโดยชั่ง TCA 10 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำที่กลั่น 2 ครั้ง (double distilled water) ให้เป็น 100 ml

1.2 การวิเคราะห์

1.2.1 นำสารละลายเอนไซม์มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย 50 mM glycine-NaOH buffer pH 11.0 (โดยส่วนใหญ่จะอยู่ที่ระดับความเจือจาง 1:10)

1.2.2 ปิเปตสารละลายเคซีนเข้มข้น 2% ปริมาตร 250 μ l ลงในหลอดทดลอง และอุ่นสารละลายเคซีนที่ 55°C เป็นเวลา 5 min

1.2.3 นำเอนไซม์ที่เจือจางมา 250 μ l เติมลงในสารละลายเคซีน ในข้อ 1.2.2 บ่มที่ 55°C เป็นเวลา 10 min หยุดปฏิกิริยาด้วย 10% TCA ปริมาตร 500 μ l ผสมให้เข้ากันด้วย vortex และแช่ไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 h เพื่อให้ตกตะกอนสมบูรณ์

1.2.4 ทำหลอดควบคุมโดยปิเปตสารละลาย 10% TCA 500 μ l จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ 250 μ l ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 55°C เป็นเวลา 10 min พร้อมกับหลอดตัวอย่าง จากนั้นค่อยเติมสารละลายเคซีน 250 μ l

1.2.5 นำสารละลายจากข้อ 1.2.3 และ 1.2.4 มาปั่นแยกตะกอนโปรตีนด้วยความเร็ว 9,386 ×g เป็นเวลา 10 min เป็นเวลา 10 min นำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการย่อยเคซีน โดยวัดปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นเทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซีน (standard curve) โดยใช้วิธีดัดแปลงจากของ Ferrero *et al.* (1996)

1.2.6 การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส (units/ml)} = \frac{(T_1 - T_2) \times 4 \times V \times D}{t}$$

T_1	คือ ปริมาณของไทโรซีนที่วัดได้จากหลอดตัวอย่าง (μmol)
T_2	คือ ปริมาณของไทโรซีนที่วัดได้จากหลอดควบคุม (μmol)
4	คือ คิดเทียบเป็นปริมาณเอนไซม์ต่อ 1 ml
V	คือ ปริมาตรทั้งหมดในหลอดทดลอง ซึ่งเท่ากับ 1 ml
D	คือ ความเจือจางของเอนไซม์
t	คือ เวลาที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์กับสับสเตรท ซึ่งเท่ากับ 10 min

กำหนดให้ 1 units ของเอนไซม์ เท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่สามารถย่อยเคซีนแล้วเกิดไทโรซีน 1 μmol ในเวลา 1 min

หมายเหตุ: การวิเคราะห์เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสดัดแปลงจาก Ferrero *et al.* (1996) โดยเปลี่ยน % ความเข้มข้นของเคซีนจาก 1% เป็น 4%, เปลี่ยนการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 เป็น 750 nm และเปลี่ยนการเจือจาง Folin reagent จาก 3 เท่า เป็น 2 เท่า

2. การวิเคราะห์หาปริมาณไทโรซีน (ดัดแปลงจาก Ferrero *et al.*, 1996)

2.1 สารเคมี

2.1.1 สารละลายไทโรซีนมาตรฐาน (tyrosine :MW. 181.2) ชั่งไทโรซีนด้วยเครื่องชั่งสารอย่างละเอียด 0.1000 g ละลายด้วยสารละลาย HCl 0.1M จนกระทั่งไทโรซีนละลายหมด จากนั้นเทลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 ml เก็บเป็น

stock solution จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้นของไทโรซีนตั้งแต่ 20 ถึง 100 $\mu\text{g/ml}$

2.1.2 การเตรียมสารละลาย Lowry

สาร A : copper sulfate 0.5 g + sodium citrate 1 g ในน้ำ 100 ml

สาร B : sodium carbonate 20 g + NaOH 4 g ในน้ำ 1 l

สาร C : สาร A 1 ml + สาร B 50 ml

สาร D : 1 N folin-ciocalteau (อัตราส่วนของ folin:water; 1:1, v/v)

2.2 วิธีการวิเคราะห์

2.2.1 หากกราฟมาตรฐานของไทโรซีนโดยเจือจางสารละลายมาตรฐานไทโรซีนให้มีความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 $\mu\text{g/ml}$

2.2.2 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง สารละลายในหลอดควบคุม และสารละลายมาตรฐาน ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 0.5 ml ตามลำดับ ส่วน blank จะใช้ 50 mM glycine-NaOH buffer แทน

2.2.3 เติมสารละลาย C หลอดละ 2.5 ml ลงในข้อ 2.2.2 ทิ้งไว้ 5 ถึง 10 min จากนั้นเติมสารละลาย D 0.25 ml ทิ้งไว้ 20 ถึง 30 min แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับปริมาณไทโรซีน แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของไทโรซีนจากกราฟมาตรฐาน และคำนวณหาปริมาณไทโรซีนที่มีในตัวอย่าง

3. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยใช้ BSA เป็นสารละลายมาตรฐาน

3.1 สารเคมี

3.1.1 ชั่งสารละลาย BSA ด้วยเครื่องชั่งสารอย่างละเอียด 0.2000 g ละลายด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเทลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 ml เก็บเป็น stock solution จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐาน ที่มีปริมาณ BSA ตั้งแต่ 20 ถึง 100 $\mu\text{g/ml}$

3.1.2 การเตรียมสารละลาย Lowry

สาร E : ละลาย sodium carbonate 20 g ในน้ำ 960 ml เติม NaOH 3M ลงไป 35 ml

สาร F : ละลาย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 g ในน้ำ 100 ml

สาร G : ละลาย potassium sodium tartrate 2 g ในน้ำ 100 ml

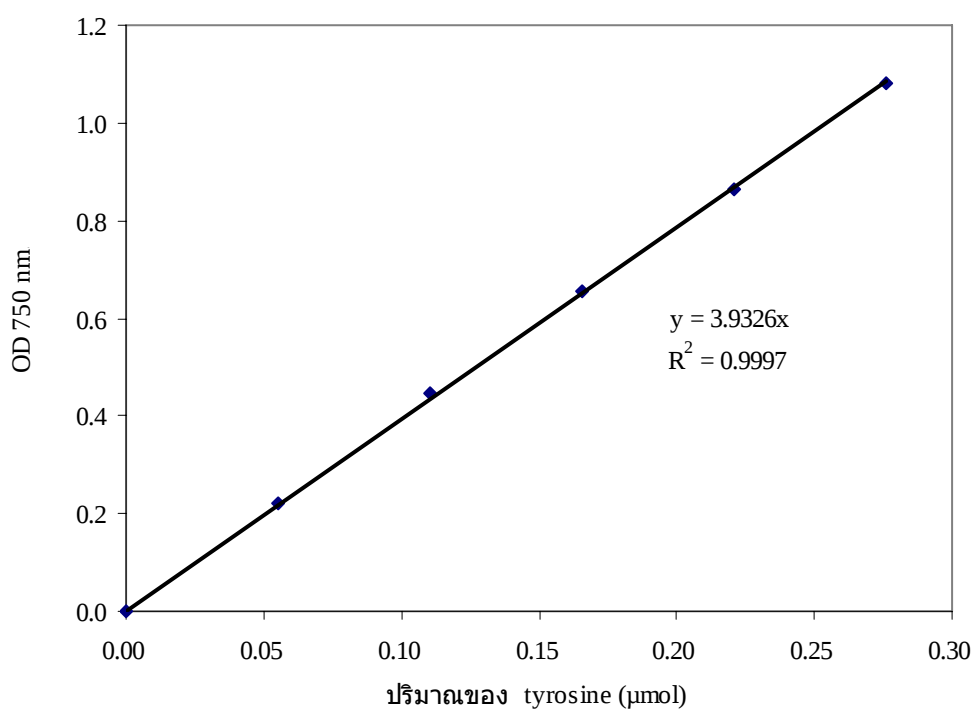
สาร H : (อัตราส่วนของสาร A:B:C; 100:1:1, v/v/v)

สาร I : 1 N folin-ciocalteu (อัตราส่วนของ folin:water; 1:1, v/v)

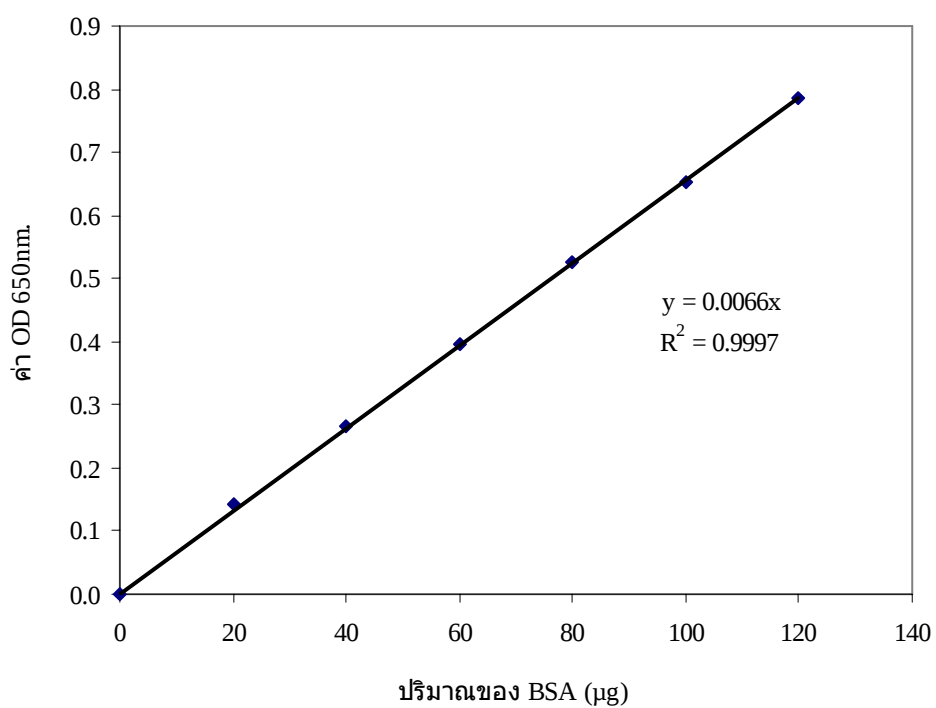
3.2 วิธีการวิเคราะห์

3.2.1 หากกราฟมาตรฐานของ BSA โดยเจือจางสารละลายมาตรฐาน BSA ให้มีความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, 100, และ 120 $\mu\text{g/ml}$ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน โดยให้แกน X เป็น μg โปรตีน ส่วนแกน Y เป็นค่าการดูดกลืนแสง

3.2.2 นำสารละลายตัวอย่าง 100 μl มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย H 2.5 ml ในหลอดทดลอง ผสมสารให้เข้ากัน บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 min จากนั้นเติมสาร I ปริมาตร 0.25 ml บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 min หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 nm โดยใช้ 50 mM glycine-NaOH buffer, pH 11.0 ซึ่งทำปฏิกิริยากับสารเคมีต่างๆ พร้อมกับสารตัวอย่างเป็นสารละลายเปล่า (blank) แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ BSA จากกราฟมาตรฐาน และคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่มีในตัวอย่าง



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานของไทโรซีน



ภาพผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumin

4. การวิเคราะห์หาปริมาณ Reducing Sugar โดยวิธี Nelson-Somogyi (1994)

4.1 สารเคมี

4.1.1 Somogyi reagent (copper reagent) = Solution J เตรียมโดยละลาย Somogyi reagent tartrate 12 g และ Anhydrous sodium carbonate 24 g ในน้ำกลั่น 250 ml เติม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4 g ที่ละลายในน้ำกลั่น 5 ml ผสมให้เข้ากัน เติม NaHCO_3 16 g คนให้ละลาย เติม Anhydrous Na_2SO_4 180 g ที่ละลายในน้ำกลั่น 500 ml ปรับปริมาตรให้ครบ 1 l เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ในขวดสีชา) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนนำไปใช้ (ถ้ามีตะกอนให้กรองออก)

4.1.2 Nelson reagent = Solution K เตรียมโดยละลาย Ammonium Molybdate 25 g ในน้ำกลั่น 450 ml เติม Conc. H_2SO_4 21 ml $\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 g ที่ละลายในน้ำกลั่น 25 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 l ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ที่ 37°C (ในขวดสีชา) ประมาณ 24 h ก่อนนำไปใช้

4.1.3 เตรียม stock 1% glucose นำมาเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 20-160 $\mu\text{g/ml}$

4.2 วิธีการวิเคราะห์

4.2.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล อยู่ในช่วง 20-160 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 1 ml ใส่ลงในหลอดทดลอง

4.2.2 เติมสารละลาย J 1 ml นำไปต้มในน้ำเดือด 10 min แล้วแช่ในน้ำเย็น เพื่อหยุดปฏิกิริยา

4.2.3 เติมสารละลาย K 1 ml ผสมให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 min

4.2.4 เติมน้ำกลั่น 10 ml ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm

ภาคผนวก ก

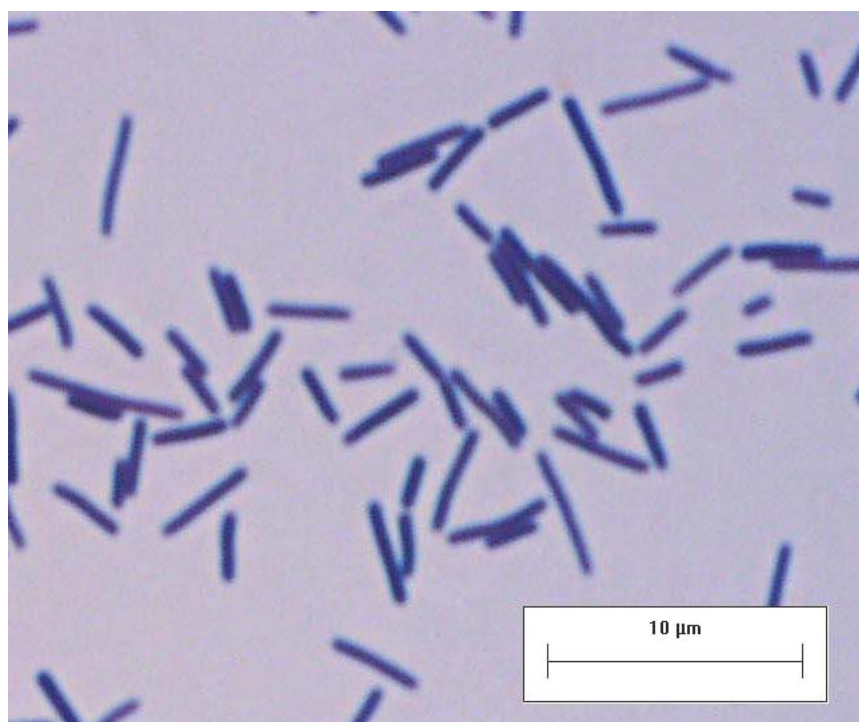
ตารางผนวก ก1 การชั่งแอมโมเนียมซัลเฟต (g/l)

Amounts of Solid Ammonium Sulfate Required to Change the Concentration of a Solution From a Given Starting Value to a Desired Target Value at 0°C

Initial percentage saturation at 0°C	Target percentage at 0°C ^a																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20		27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25			27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30				28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35					28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40						29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45							29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50								30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55									30	61	93	127	161	197	235	273	313
60										31	62	95	129	164	201	239	279
65											31	63	97	132	168	205	244
70												32	65	99	134	171	209
75													32	66	101	137	174
80														33	67	103	139
85															34	68	105
90																34	70
95																	35

^aGram of solid ammonium sulfate per liter of solution.

ภาพผนวก ง



ภาพผนวกที่ ง1 *Bacillus* sp. A39 ที่ติดสีแกรมบวก

ลักษณะแบคทีเรีย *Bacillus* sp. A39 คือติดสีแกรมบวก (Gram positive) สีม่วงน้ำเงิน มีรูปร่างเป็นท่อน (Rod) ขนาดกว้าง 1 μm ยาว 3 μm พบการเรียงต่อกันเป็นสาย โคโลนีรูปร่างกลม นูนโค้งจากผิวอาหาร (convex) มีสีเหลือง ทึบแสง (opaque) ผิวมัน (smooth) ขอบเรียบ (entire) เชื้อสร้างวงใสรอบโคโลนี เนื่องจากสร้างเอนไซม์ อัลคาไลน์โปรติเอสมาย่อยโปรตีน (skimmed milk) ในอาหาร BSM agar ที่มี pH 10.0

ตารางผนวกที่ ๑1 การลอกกาวของเส้นไหมดิบจากเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากแบคทีเรีย

Bacillus sp. A39

Trentments	ขวดที่	น.น. ขวด	น.น.ขวด+ เส้นไหม (ก่อนลอกกาว)	น.น.ขวด + เส้นไหม (หลังลอกกาว)	น.น.ที่ หายไป	Sericin yield (%)
Crude enzyme	1	11.1118	11.2122	11.1837	0.0285	27.71
	2	11.6485	11.7496	11.7213	0.0283	
	3	11.2012	11.3062	11.2781	0.0281	
Crude enzyme (dilute 1:20)	1	11.7080	11.8143	11.7995	0.0148	13.82
	2	11.5030	11.6093	11.5949	0.0144	
	3	11.3485	11.4508	11.4365	0.0143	
50 mM glycine-NaOH buffer, pH11.0	1	11.3646	11.4660	11.4611	0.0049	5.42
	2	11.4077	11.5074	11.5018	0.0056	
	3	11.6758	11.7754	11.7696	0.0058	
น้ำกลั่น	1	11.1446	11.2449	11.2410	0.0039	3.53
	2	11.4690	11.5691	11.5660	0.0031	
	3	11.4386	11.5387	11.5351	0.0036	

ตารางผนวกที่ ๖2 ความคงตัวของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสในสภาวะต่างๆซึ่งเก็บไว้ที่ 4°C
นาน 1 เดือน

Conditions	weeks	volume (ml)	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Specific activity reduction (%)
Crude enzyme	0	58.29	298.50	137.00	2.18	
	1	58.29	281.50	123.00	2.29	
	2	58.29	267.00	119.00	2.24	2.8
	3	58.29	235.50	114.00	2.07	
	4	58.29	239.50	113.00	2.12	
Dialyzed	0	13	19.76	3.77	5.24	
	1	13	12.61	3.38	3.73	
	2	13	11.57	3.34	3.46	38.2
	3	13	11.12	3.30	3.37	
	4	13	10.53	3.25	3.24	
80% (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	0	2.5	87.40	6.28	13.93	
	1	2.5	84.65	5.95	14.23	
	2	2.5	79.16	5.93	13.36	10.1
	3	2.5	75.04	5.85	12.83	
	4	2.5	72.29	5.78	12.52	
Lyophilize (Freeze dry)	0	58.29	902.25	400.42	2.25	
	1	58.29	832.31	402.75	2.07	
	2	58.29	792.97	398.67	1.99	21.8
	3	58.29	746.92	381.18	1.96	
	4	58.29	741.68	376.52	1.97	

ตารางผนวกที่ ๓2 (ต่อ)

Conditions	weeks	volume (ml)	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Specific activity reduction (%)
Ultrafiltration	0	50	996.00	231.50	4.30	
	1	50	965.75	220.00	4.39	
	2	50	951.00	210.50	4.52	+9.5
	3	50	923.50	207.50	4.45	
	4	50	898.75	191.00	4.71	

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวสิรินภา ช่วงโอภาส Miss Sirinapa Chungopast
ชื่อเรื่อง	การทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์ โปรติเอสจาก <i>Bacillus</i> sp. A39 Purification and Characterization of Alkaline Protease from <i>Bacillus</i> sp. A39
สถานที่ทำงาน	นิสิตปริญญาโท ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
โทรศัพท์	089-7724980 E-mail address: g4764202@ku.ac.th
ประวัติการศึกษา	- พ.ศ. 2547-2550 กำลังศึกษาระดับปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ - พ.ศ. 2543-2546 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ - พ.ศ. 2537-2542 สำเร็จระดับมัธยมศึกษาตอนต้น- ตอนปลาย โรงเรียนสารวิทยา จ.กรุงเทพฯ
ประสบการณ์หรือความเชี่ยวชาญพิเศษ	เทคนิคทางจุลชีววิทยา และการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์
ผลงาน	1) เสนอผลงานภาคโปสเตอร์ในการประชุมวิชาการ “1 st BMB Conference on Biochemistry and Molecular Biology for the Integration of Life” จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีพ.ศ. 2550

- 2) ได้เกียรติบัตรรางวัลดี ในการเสนอผลงานทางวิชาการภาคโปสเตอร์ หัวข้อเรื่อง “ผลของโคโคซานที่มีต่อเชื้อรา” ในการประชุมวิชาการครั้งที่ 5 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปีพ.ศ. 2547
- 3) เข้าร่วมกิจกรรมชมรมเห็ด ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยปฏิบัติหน้าที่เป็นเหรัญญิก และฝ่ายเพาะเลี้ยงหัวเชื้อเห็ด ปีพ.ศ. 2546