

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การทำให้บริสุทธิ์และการหาลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ โปรตีนนอกเซลล์ที่ผลิตโดยเทอร์โมฟิลิคแบคทีเรียสายพันธุ์ ทีแอลเอส 33	
ชื่อผู้เขียน	นายศุภโชค สินไชยกุล	
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต	สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ :	รศ.ดร.สุรีย์ พุตระกูล	ประธานกรรมการ
	อาจารย์ ดร.ดารารัตน์ ทองขาว	กรรมการ
	อาจารย์ ดร.มณี ผู้กาญจนทวีป	กรรมการ

บทคัดย่อ

แบคทีเรียทนความร้อนสายพันธุ์ ทีแอลเอส33 เป็นแบคทีเรียที่ผลิตโปรตีนที่ส่งออกนอกเซลล์ ซึ่งแยกได้จากน้ำพุร้อนเทพพนม จังหวัดเชียงใหม่ แบคทีเรียนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีและผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณสูงเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย 0.1% w/v yeast extract และ 0.25% w/v skim milk ใน 80% v/v base mixture ที่อุณหภูมิ 65°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โปรตีนสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 5.0-8.0 และ 70-80°ซ ตามลำดับ และเสถียรในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 เมื่อต้มที่ 75°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นอกจากนี้ CaCl_2 จะช่วยทำให้ความคงทนต่อความร้อนของทั้งสารละลายเอนไซม์ที่มีและไม่มีสารประกอบที่ไวต่ออนุมูลเพิ่มขึ้น โปรตีนสามารถคงทนต่อความร้อนได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ Diisopropyl ether, Cyclohexane และ Hexane และโปรตีนสามารถย่อยสลายโปรตีนได้หลายชนิดดังนี้ casein, lysozyme, skim milk, ovalbumin, hemoglobin, BSA, soybean, azocasein, creatinine และ gelatin นอกจากนี้แอกติวิตีของโปรตีนจะหมดไปเมื่อมี 40 mM EDTA อยู่ในสารละลายซึ่งทำให้จัดประเภทเอนไซม์เป็นพวกนิวคลีเอสและโปรตีนเอสและการเติมแคทไอออนที่มีความเข้มข้นต่ำ (< 10mM) ได้แก่ Mg^{2+} , Ca^{2+} และ K^+ จะช่วยทำให้แอกติวิตีของโปรตีนเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะการเติม 1 mM Zn^{2+} นอกจากนี้จะทำให้แอกติวิตีเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนแล้ว ยังช่วยทำให้แอกติวิตีของ

apoenzyme กลับคืนมา 64.94% จึงสรุปได้ว่าโลหะที่อยู่ในโมเลกุลของโปรตีนคือ Zn^{2+} โปรตีนได้ถูกทำให้เข้มข้นและบริสุทธิ์ขึ้นบางส่วน โดยการทำให้แห้งด้วยวิธี freeze-dry, ไดอะไลซิส, โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน และเจลฟิลเตรชัน ในการตรวจหามวลโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน พบว่ามีค่าประมาณ 21,843 ดาลตัน และเมื่อนำมาศึกษาลักษณะเฉพาะต่าง ๆ พบว่าจะใกล้เคียงกับผลการศึกษาโดยใช้ crude enzyme คือสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 5.0-8.0 และ 70-80°C ตามลำดับ และจะเสถียรที่อุณหภูมิ 70°C โปรตีนสามารถทนต่อความร้อนได้ดีเมื่ออยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ Diisopropyl ether, Cyclohexane และ Hexane ส่วนการศึกษาผลของตัวยับยั้งและแคทไอออนพบว่า EDTA ในความเข้มข้นต่ำเพียง 5 mM ก็สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนได้เกือบสมบูรณ์ และการเติมแคทไอออนที่มีความเข้มข้นต่ำ (1 mM) ได้แก่ Mg^{2+} , Ca^{2+} และ K^+ จะทำให้แอกติวิตีของโปรตีนเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะการเติม Zn^{2+} นอกจากนี้ยังพบว่าโลหะที่เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนที่แยกบริสุทธิ์บางส่วนนี้คือ Zn^{2+} และโปรตีนนี้จะมีค่า K_m และ V_{max} เมื่อใช้ azocasein เป็นสับสเตรทเท่ากับ 0.14 %w/v และ 0.108 U/ml/min ตามลำดับ