หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อบาซิลลัส

จากการวิเคราะห์เอกสารที่มีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรมที่มีรายงานไว้ พบว่าเอนไซม์โปรตีเอสส่วนใหญ่ผลิตได้โดยกลุ่มจุลินทรีย์บาซิลลัสซึ่งมีทั้งกลุ่มที่เป็น neutrophilic และ alkalophilic organisms การวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาลักษณะรูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสใน Bacillus subtilis TISTR 25 ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ในดินที่แยกได้ในประเทศไทย

จากผลการเลี้ยงเชื้อ B. subtilis TISTR 25 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี NH_4Cl ดังแสดงในรูปที่ 2 พบว่าเชื้อจะเจริญได้ดีในอาหารที่เสริมด้วยกลูโคสกับกลูตาเมทโดยมีค่าการดูดกลืนแสง(absorbance) ที่ 420 นาโนเมตร ในระยะการเจริญคงที่ ประมาณ 0.75 และเริ่มสร้างเอนไซม์โปรตีเอสหลังจากเลี้ยงเชื้อ 16 ชม. ส่วนในอาหารเสริมที่มีกลูตาเมทเพียงอย่างเดียวเชื้อจะเจริญได้ช้ากว่าเล็กน้อย แต่สร้างเอนไซม์โปรตีเอสได้สูงกว่าและเร็วกว่า โดยจะเริ่มสร้างหลังจากเลี้ยงเชื้อเพียง 8 ชม. การเติมกลูโคสเป็นอาหารเสริมเพียงอย่างเดียวเชื้อจะเจริญได้ไม่ดี (มีค่าการดูดกลืนแสง ที่ ระยะการเจริญคงที่ ประมาณ 0.5) และไม่สร้างเอนไซม์ จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า กลูตาเมทสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส ขณะที่กลูโคสมีผลทำให้การเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์โดยกลูตาเมทเกิดช้าลง ผลนี้แสดงได้ชัดในรูปที่ 4 ซึ่งจะเห็นว่าในอาหารที่มีกลูโคสกับกลูตา-เมท เชื้อจะสร้างเอนไซม์ได้ต่อเมื่อได้ใช้กลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อหมดแล้ว แสดงว่าสายพันธุ์ TISTR 25 นี้ มีการควบคุมการสร้างเอนไซม์ด้วยระบบ catabolite repression โดยกลูโคส ผลนี้เป็นเช่นเดียวกับที่ Laishley และ Bernlohr(1968) รายงานไว้ในการศึกษาเชื้อ B. licheniformis A-5 ซึ่งพบว่า เมื่อเติมกลูตาเมท(เป็นทั้งแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอน) ลงในอาหารสูตรปรับต่ำ จะทำให้เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอสได้ แต่

เมื่อเติมน้ำตาลกลูโคสลงไปในชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ จะทำให้เชื้อลดการสร้างเอนไซม์ นอกจากนี้ ใน B. subtilis 168 มีรายงานว่าในแหล่งต้นตอคาร์บอนต่างชนิดคือ กลูโคส กลูตาเมท หรือแลคเตท เชื้อจะเจริญเร็วที่สุดในกลูโคส แต่กลับเป็นสารอาหารที่ทำให้เกิดอัตราการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสต่ำที่สุด (Schaeffer, 1965)

นอกจากกลูตาเมทแล้วยังได้ทดลองใช้กรดอะมิโนชนิดอื่น เช่น กลูตามีน อะลานีน อาร์จินีน และฮิสติดีน อีกด้วย(ผลการทดลองไม่ได้รายงาน) พบว่ากลูตามีนให้ผลใกล้เคียงกับกลูตาเมท ในขณะที่กรดอะมิโนชนิดอื่นเหนี่ยวนำให้สายพันธุ์ B. subtilis TISTR 25 สร้างโปรตีเอสได้ต่ำกว่า การศึกษาเรื่องการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอสในบาซิลลัสด้วยคะตาบอไลท์ของคาร์บอนและไนโตรเจน มีผู้รายงานไว้มากมาย ตัวอย่างเช่น Maurizi และ Switzer (1980) พบว่าการเติม casamino acids ในอาหารเลี้ยงเชื้อใน B. subtilis จะเพิ่มการสร้างแอลคาไลน์โปรตีเอสเป็น 2 เท่า แต่หน่วงเวลาในการสร้างสปอร์ ในขณะที่ไม่มีผลในการสร้างนิวทรัลโปรตีเอส แต่เมื่อเติมกรดอะมิโนในอาหารเลี้ยงเชื้อ sporulation medium จะเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ และไม่มีผลในการเกิดสปอร์ Neumark และ Citri (1962) ศึกษาการเกิดโปรตีเอสที่อยู่นอกเซลล์ใน B. cereus NRRL 569 พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ลดความเข้มข้นของ casein acid hydrolysate จาก 2 เป็น 1 เปอร์เซนต์ จะทำให้การเกิดโปรตีเอสที่อยู่นอกเซลล์ เพิ่มขึ้น 20 เท่า แต่ถ้าเติมกรดอะมิโน 7 ตัวคือ ส่วนผสมของ ไกลซีน อะลานีน ลูซีน ไอโซลูซีน เวลีน แอสปาร์ติค และ กลูตามิค ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ จะกดดันการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส ในขณะที่จะเร่งการเจริญของเชื้อ และการเติมกรดอะมิโนเพียงตัวเดียวในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะยับยั้งการสร้างเอนไซม์ได้น้อยกว่าการเติมกรดอะมิโนหลายตัวเช่น เมื่อเติมกรดอะมิโนธรีโอนีน หรือฮิสติดีน จะยับยั้งการเกิดโปรตีเอสได้น้อยกว่าการเติม ธรีโอนีนกับฮิสติดีน และจากการศึกษาเบื้องต้นของสายพันธุ์ TISTR 25 (เตติวัฒน์ และคณะ, 1986) พบว่าอาหารเสริมกลีเซอรอล หรือแลคเตท เมื่อเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ มีผลเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีเอสได้น้อยกว่ากลูตาเมท

ผลการเลี้ยง B. subtilis TISTR 25 และ B. licheniformis ATCC 21415 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำเสริมด้วยกลูตาเมท พบว่าการเจริญและการผลิตเอนไซม์ในที่มี

และไม่มี 0.1 เปอร์เซนต์ NH_4Cl ให้ผลเหมือนกันดังแสดงในรูปที่ 6 จากการทดลองนี้แสดงว่ากลูตาเมท สามารถเป็นทั้งสารต้นตอคาร์บอนและไนโตรเจน และการเติมหรือไม่เติม NH_4Cl ไม่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสในสภาวะนี้ Bernlohr และ Clark (1971) พบว่าเชื้อ B. licheniformis A-5 สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้เมื่อเติม NH_4Cl กับกลูโคส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารต้นตอคาร์บอนที่ไม่ดี (poor carbon source) เมื่อเติมกรดอะมิโนแทนแอมโมเนียมจะกดดันการสร้างโปรตีเอสที่อยู่นอกเซลล์อีกด้วย

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของแบคทีเรียกับการสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอส จากการทดลองพบว่าไม่มีความสัมพันธ์เป็นรูปแบบที่แน่นอนดังจะเห็นได้ว่า ทั้งที่อัตราการเจริญใกล้เคียงกันในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างชนิดกัน แต่ B. subtilis TISTR 25 จะผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ดีในอาหารเสริมกลูตาเมทเท่านั้น (รูปที่ 2) เมื่อพิจารณาสายพันธุ์มาตรฐาน B. licheniformis ATCC 21415 ก็ไม่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญของแบคทีเรียกับการสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอสเช่นกัน(รูปที่ 3) ผลที่ได้น่าจะวิเคราะห์ได้ว่าชนิดของสารอาหารเป็นปัจจัยสำคัญในการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส ซึ่งอาจมีการควบคุมที่ระดับยีน และไม่เกี่ยวข้องกับความเหมาะสมในการใช้เป็นสารอาหารเพื่อการเจริญของแบคทีเรีย

จากการศึกษาข้างต้น สรุปได้ว่า สารอาหาร สภาวะในการเลี้ยง และสายพันธุ์ของแบคทีเรีย มีผลต่อปริมาณเอนไซม์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้น สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยง B. subtilis TISTR 25 คือในอาหารสูตรปรับต่ำเสริมด้วย 0.1 เปอร์เซนต์ กลูตาเมท ที่อุณหภูมิ 30 °ซ และที่สภาวะนี้จะสร้างเอนไซม์โปรตีเอสสูงกว่า B. licheniformis ATCC 21415 (รูปที่ 5ข) Markkanen และ Bailey (1974) ได้รายงานไว้ว่าส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะการเลี้ยง และสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ยังเป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดอัตราส่วนของชนิดของเอนไซม์โปรตีเอสที่แบคทีเรียสร้างอีกด้วย ผลการจำแนกชนิดของเอนไซม์โปรตีเอสใน crude enzyme (โดยใช้สารยับยั้งเอนไซม์ EDTA และ PMSF) จากเชื้อ B. subtilis TISTR 25 และ B. licheniformis ATCC 21415 แสดงให้เห็นในรูปที่ 8ก และ 8ข พบว่าเชื้อ TISTR 25 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ทั้งนิวทรัลและแอลคาไลน์โปรตีเอสในอัตราส่วนประมาณ 1:3 ในขณะที่ B. licheniformis ATCC

21415 ผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสได้เพียงชนิดเดียว ผลนี้สอดคล้องกับรายงานที่ว่า B. licheniformis ส่วนใหญ่จะผลิตโปรตีเอสชนิดแอลคาไลน์ ขณะที่ B. amyoliquefaciens ซึ่งเป็น variety หนึ่งของ B. subtilis ผลิตโปรตีเอสทั้งชนิดแอลคาไลน์และนิวทรัล (Aunstrup , 1980) และเป็นบาซิลลัสในกลุ่ม B ตามคำจำกัดความของ Keay(Keay และ Moser, 1969 ; Keay, 1972) ซึ่งแบ่งบาซิลลัสออกเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่ม A, B และ C แต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันในชนิดของเอนไซม์โปรตีเอสที่สร้าง บาซิลลัสกลุ่ม A จะสร้างนิวทรัลโปรตีเอสเพียงเล็กน้อย หรือไม่สร้างเลย แต่จะสร้างแอลคาไลน์โปรตีเอส (เช่น Subtilisin Carlsberg) เป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ B. licheniformis และ B. pumilus กลุ่ม B จะสร้างนิวทรัลและแอลคาไลน์โปรตีเอส โดยจะสร้างแอลคาไลน์โปรตีเอสเป็นส่วนใหญ่ อัตราส่วนของแอลคาไลน์ต่อนิวทรัลโปรตีเอสไม่แน่นอนเช่น 4:1 หรือ 13:1 เป็นต้น ขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะของการเลี้ยงเชื้อ กลุ่มนี้ได้แก่ B. subtilis, B. amyoliquefaciens และ B. stearothermophilus เป็นต้น กลุ่ม C บาซิลลัสกลุ่มนี้จะสร้างนิวทรัลโปรตีเอส 90 - 100 เปอร์เซนต์ ในระยะ early stationary phase ได้แก่ B. cereus, B. megaterium , B. polymyxa , B. thermoproteolyticus และ B. thuringiensis ในระยะหลังได้มีการค้นพบจุลินทรีย์ทนด่าง(alkalophilic bacilli)ซึ่งเป็นกลุ่มที่สร้างแอลคาไลน์โปรตีเอสปริมาณสูง และเป็นชนิดที่แตกต่างจาก Subtilisin โดยเฉพาะมีความสามารถเร่งปฏิกิริยาในสภาวะเป็นด่างได้ดี(Horikoshi และ Akiba,1982)

การเตรียมเอนไซม์โปรตีเอสปริมาณมากจาก B. subtilis TISTR 25 สามารถเตรียมได้โดยการเลี้ยงเชื้อในขวดแบบเขย่าขนาด 1 ลิตร พบว่าเอนไซม์โปรตีเอสจะมีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 16 - 28 ของการเลี้ยงเชื้อ(รูปที่ 9) รูปแบบของการเจริญและการสังเคราะห์โปรตีเอส ไม่ต่างจากเมื่อเลี้ยงในขวดขนาด 250 มล.(รูปที่ 6)มากนัก ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน(ตารางที่ 3) เมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีน พบว่าไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก (0.38 และ 0.34 มก./มล.) เอนไซม์แอคติวิตีไม่แตกต่างกัน (0.48 และ 0.35 หน่วย/มล.) แสดงว่าสภาวะการเลี้ยงในขวด 1 ลิตร เหมาะสมที่เชื้อจะสร้างเอนไซม์ได้ดีเหมือนในขวด 250 มล. เมื่อเปรียบเทียบการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry's

และ Bradford พบว่าการหาปริมาณโปรตีนใน crude enzyme โดยวิธี Bradford ได้ค่าต่ำกว่าโดยวิธี Lowry's เนื่องจากการตรวจวัดโดยวิธี Lowry's จะตรวจวัดได้ทั้งกรดอะมิโน เพปไทด์สายสั้น และโปรตีน ทำให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะ ของ crude enzyme ที่คำนวณได้จากการหาโปรตีน 2 วิธีแตกต่างกัน

ในการหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสโดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรตในช่วงการทดลองต้นๆ ใช้ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์บ่มกับเอนไซม์ แต่หลังจากการศึกษา pH ที่เหมาะสมในการทำงานของ crude enzyme พบว่าฟอสเฟตบัฟเฟอร์สามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ ดังนั้นตั้งแต่การทดลองเลี้ยงเชื้อในขวดขนาด 1 ลิตร(รูปที่ 9)เป็นต้นไป การหาแอคติวิตี จึงใช้ Tris-HCl buffer บ่มกับเอนไซม์ McConn, และคณะ(1964) ได้รายงานไว้ว่าเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก B. subtilis ถูกยับยั้งโดยอนุมูลฟอสเฟตเช่นกัน

5.2 การทำให้เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจาก B. subtilis TISTR 25 บริสุทธิ์

เมื่อนำ crude enzyme จากเชื้อ B. subtilis TISTR 25 มาทำให้บริสุทธิ์โดยเริ่มต้นจากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-80 เปอร์เซนต์ โดยการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแฟรคชันละ 10 เปอร์เซนต์(ตารางที่ 4) พบว่าการตกตะกอนโปรตีนจะเกิดมากที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-60 เปอร์เซนต์ และจะลดน้อยลงเมื่อมีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 60 - 70 และ 70 -80 เปอร์เซนต์ตามลำดับ ซึ่งเมื่อวัดแอคติวิตีในส่วนตะกอนก็พบว่ามีแอคติวิตีมากที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0 - 60 เปอร์เซนต์ และลดลงเมื่อมีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 60 - 70 และ 70 - 80 เปอร์เซนต์ตามลำดับ ในการทดลองจึงเลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 70 เปอร์เซนต์ในการตกตะกอนโปรตีน โดยสรุปแล้ววิธีนี้จะช่วยกำจัดโปรตีนที่ไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ประมาณ 80 เปอร์เซนต์ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่มีอยู่ในสารละลาย crude enzyme โดยยังมีแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสเหลืออยู่ประมาณ 45 เปอร์เซนต์ จากนั้นนำโปรตีนที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสไปแยกให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยวิธีคอลัมน์โครมาโตรกราฟี

การทำเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์โครมา

โตรกราฟีมีรายงานไว้มากมาย ขั้นตอนส่วนใหญ่ใช้คอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ และแอฟฟินิตี ตัวอย่างเช่น การใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose แยกเอนไซม์จากสายพันธุ์ B. subtilis YY88 (Mantsala และ Zalkin, 1980) การใช้คอลัมน์ DEAE-Sephadex A 50 แยกเอนไซม์จาก B. subtilis 6160 (Uehara และคณะ, 1974) การใช้คอลัมน์ CM-cellulose แยกเอนไซม์จาก B. subtilis NRRL B3411 (Keay และ Wildi, 1970b) การใช้คอลัมน์ Hemoglobin-Sepharose 4B แยกเอนไซม์จาก B. subtilis 168 (Nakayama และคณะ, 1977) การใช้คอลัมน์ Benzamidine-Sepharose 6B แยกเอนไซม์จาก Escherichia coli K-12 strain A33 (Palmer และ St. John, 1987) และการใช้คอลัมน์ Gramicidin S-Sepharose 4B แยกเอนไซม์โปรตีเอสที่อยู่ในเซลล์ B. subtilis Marburg 168 (Strongin และคณะ, 1979) ในการทดลองทำแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก B. subtilis TISTR 25 ให้บริสุทธิ์ในขั้นแรกได้ทดลองใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose พบว่าที่ pH 7.5 สามารถแยกเอนไซม์นิวทรัลและแอลคาไลน์โปรตีเอสออกจากกันได้ แต่เมื่อเติมสารที่ช่วยให้เอนไซม์เสถียรคือ 2 มิลลิโมล/ลิตร $CaCl_2$ พบว่า DEAE-cellulose คอลัมน์เดิม ไม่สามารถแยกเอนไซม์ออกจากกันได้ (อาจเนื่องมาจากไอออนของ Ca ไปรบกวนการจับระหว่างโมเลกุลของโปรตีเอสกับ DEAE-cellulose) จึงทดลองใช้คอลัมน์ DEAE-Sephadex A 50 ซึ่งพบปัญหาเม็ดเจลปริมาตรลดลงเมื่อใช้เกลือความเข้มข้นเพิ่มขึ้น จึงได้เปลี่ยนมาทดลองใช้คอลัมน์ CM-cellulose พบว่าสามารถได้สภาวะที่ทำให้เอนไซม์แยกออกจากกันได้ จากผลการทดลองแยกเอนไซม์ดังรูปที่ 10 จะเห็นได้ว่า โดยอาศัยความแตกต่างของประจุ สามารถกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่เอนไซม์โปรตีเอสออกได้ประมาณครึ่งหนึ่งของโปรตีนที่บรรจุลงคอลัมน์ และสามารถแยกเอนไซม์นิวทรัลและแอลคาไลน์โปรตีเอสออกจากกันได้ ผลการจำแนกชนิดของเอนไซม์โดยใช้สารยับยั้ง พบว่าเอนไซม์ที่ออกมาจากคอลัมน์ก่อนเป็นนิวทรัลโปรตีเอส เนื่องจากถูกยับยั้งแอคติวิตีด้วยสารยับยั้ง EDTA และเอนไซม์ที่ออกมาทีหลังเป็นแอลคาไลน์โปรตีเอส เพราะถูกยับยั้งแอคติวิตีด้วย PMSF (ตารางที่ 6) และจากการคำนวณปริมาณโปรตีนที่ได้ในแต่ละพีคพบว่า อัตราส่วนของนิวทรัลต่อแอลคาไลน์โปรตีเอสมีค่าเท่ากับ 1 : 2.8 คอลัมน์ CM-cellulose นี้สามารถแยกเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.3 เท่า เมื่อนำเอนไซม์ส่วนนี้ไปแยกโปรตีนโดยวิธี เจล

อีเลคโตรโฟรีซิส พบโปรตีนเข้ม 1 แถบและแถบจาง 1 แถบ(รูปที่ 11) แต่เมื่อนำไปแยกโปรตีนด้วยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อี เลคโตรโฟริซิส พบโปรตีนแถบใหญ่ 1 แถบ และแถบย่อยอีกอย่างน้อย 4 แถบ จึงทดลองนำแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ออกจากคอลัมน์ CM-cellulose แยกด้วยคอลัมน์แอฟฟินีตีเพื่อให้เอนไซม์บริสุทธิ์ขึ้น คอลัมน์แอฟฟินีตีที่ใช้คือ Agarose-hemoglobin ผลการทดลองพบว่าคอลัมน์นี้ไม่สามารถช่วยให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น เนื่องจากพบว่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ไม่เพิ่มขึ้น (ผลการทดลองนี้ไม่ได้รายงานไว้) นอกจากนี้ยังได้ลองนำแอลคาไลน์โปรตีเอสไปแยกด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-75 แล้วนำพีคของเอนไซม์ที่แยกได้(รูปที่ 12) ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟริซิส พบว่าได้รูปแบบของโปรตีนเหมือนกับก่อนแยกด้วยคอลัมน์ เซฟาเดกซ์ ดังนั้นในการทำแอลคาไลน์โปรตีเอสให้บริสุทธิ์ จึงกระทำจนถึงขั้นตอนที่แยกด้วยคอลัมน์ CM-cellulose ซึ่งทำให้เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่แยกได้บริสุทธิ์บางส่วน การเกิดโปรตีนหลายแถบในเอสดีเอส เจล น่าจะเกิดจากการย่อยตัวเองของเอนไซม์ (autolysis) รูปแบบของแถบโปรตีนของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่มีและไม่มีสาร PMSF โดยการวิเคราะห์ด้วยเอสดีเอส เจล อีเลคโตรโฟริซิส(รูปที่ 14) เป็นข้อสนับสนุนว่าเอนไซม์อาจย่อยตัวเองได้ในสภาวะของการทดลอง ในการแยกเอนไซม์แอลคาไลน์โปตีเอสที่เคยมีผู้ศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ก็มีรายงานการเกิด autolysis เช่นกรณีเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจาก B. subtilis WB 746 และ WB746ts-5 (Leighton และ Doi, 1973) และจาก B. subtilis NRRL B3411 (Keay และ Moser, 1969) อย่างไรก็ดี Verbruggen และคณะ(1974) เสนอความเห็นที่ต่างออกไปจากนักวิจัยส่วนใหญ่ โดยการแยกแถบโปรตีนของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสชนิด Subtilisin Carlsberg ด้วยอีเลคโตรโฟริซิสบนอะกาโรส ได้แถบของโปรตีน 6 - 7 แถบ ซึ่งมีระยะห่างบนแท่งเจลสม่ำเสมอทุกครั้งที่ทำการทดลอง ประกอบกับการที่ทุกแถบมีเอนไซม์แอคติวิตีที่สามารถไฮโดรไลส์เจลาตินได้ จึงเชื่อว่าโปรตีเอสอาจมีหลาย isozymes อย่างไรก็ดีในกรณีแอลคาไลน์โปรตีเอสของ B. subtilis TISTR 25 ในการศึกษาครั้งนี้เกิดโปรตีนหลายแถบเฉพาะในระบบเอสดีเอส-เจล ส่วนในระบบอะไครลาไมด์ เจล ไม่เกิด และผลจากรูปที่ 14(ช่อง 3 และ 4) สนับสนุนการเกิดการย่อยตัวเองของเอนไซม์

5.3 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจาก B. subtilis TISTR 25 ที่มีความบริสุทธิ์บางส่วน

จากผลการทดลองพบว่า เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสมีน้ำหนักโมเลกุล 27,000 ดาลตัน โดยวิธี เจล ฟิลเตรชัน(รูปที่ 12) และ 26,800 ดาลตัน โดยวิธีเอสดีเอส เจล อีเลคโตร-โฟริซิส(รูปที่ 15) แสดงว่าแอลคาไลน์โปรตีเอสของ B. subtilis TISTR 25 เป็นโพลีเพปไทด์สายเดี่ยว ไม่มีหน่วยย่อย ขนาดของเอนไซม์นี้ใกล้เคียงกับ Subtilisin Carlsberg และ Nagarse ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 27,200 และ 27,600 ดาลตันตามลำดับ (Markland และ Smith, 1971)

ผลการศึกษา pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา(รูปที่ 16) พบว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจาก B. subtilis TISTR 25 มีแอคติวิตีซึ่งมีเคซีนเป็นสับสเตรตได้ดีในช่วง pH ที่ค่อนข้างเป็นด่างคือ pH ประมาณ 8.0 - 9.0 ที่ pH < 5 และ pH > 11.5 จะมีแอคติวิตีเหลืออยู่น้อยมากประมาณ 5 และ 10 เปอร์เซนต์ตามลำดับ ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากโมเลกุลมีโครงสร้างไม่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาเพราะการเปลี่ยนแปลงประจุในโมเลกุล เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ Subtilisin Carlsberg ซึ่งทำการทดลองในสภาวะเดียวกัน พบว่ามี pH ที่เหมาะสมประมาณ 9.0 - 10.5 แสดงว่าแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก TISTR 25 เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลส์เคซีนได้ดีในสภาวะสารละลายเป็นด่าง แต่ได้ไม่ดีเท่า Subtilisin ในกรณีสารละลายเป็นด่างมาก สำหรับผลของการศึกษาอิทธิพลของ pH ต่อความเสถียร(รูปที่ 18) พบว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจาก TISTR 25 มีความเสถียรดีที่ pH เป็นกลาง และค่อนไปทางด่าง(6.5 และ 8.3) แต่ไม่เสถียรที่ pH ค่อนไปทางกรด(pH 4.3) รูปแบบความเสถียรในช่วง pH เช่นนี้เหมือนกับรายงานในแอลคาไลน์โปรตีเอสจากสายพันธุ์อื่น(Boyer และ Carlton, 1968) เมื่อศึกษา crude enzyme ที่แยกได้ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาคือ 45 °ซ(ไม่ได้รายงานผลการทดลอง) แต่หลังจากทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้ว อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็น 55 °ซ ในขณะที่เอนไซม์มาตรฐาน Subtilisin มีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 60 °ซ(รูปที่ 17) การทดลองเรื่องสมบัติของเอนไซม์ในช่วงหลังจากนี้ จึงวัดเอนไซม์แอคติวิตีที่สภาวะเหมาะสมที่สุดคือ pH 8.5 และอุณหภูมิ 55 °ซ

การศึกษาผลของความเข้มข้นของสับสเตรตธรรมชาติต่อการทำงานของเอนไซม์แอล-คาไลน์โปรตีเอสจาก TISTR 25 เปรียบเทียบกับเอนไซม์ Subtilisin Carlsberg โดยมีสับสเตรตชนิดต่างๆคือ casein, azocasein, azocoll, hemoglobin (รูปที่ 21 - 24) และได้สรุปค่า K_m และ V_{max} ไว้ในตารางที่ 7 จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ทั้งสองสามารถไฮโดร-ไลส์สับเตรตได้ทุกชนิดที่ทำการทดลอง และเมื่อเปรียบเทียบในระหว่างสับสเตรต 4 ชนิดนี้ พบว่าเอนไซม์ทั้งสองมีแอฟฟินิตีต่อ casein > hemoglobin แสดงว่าโมเลกุลของ casein มีโครงสร้างเหมาะกับบริเวณเร่งของเอนไซม์มากกว่า hemoglobin และเนื่องจากไม่ทราบค่าน้ำหนักโมเลกุลที่แน่นอนของ azocasein และ azocoll จึงไม่สามารถเปรียบเทียบค่า K_m กับของ casein และ hemoglobin ได้ แต่ถ้าประมาณว่า azocasein มีน้ำหนักโมเลกุลไม่ต่างจาก casein มากนัก ค่า K_m 3.03 และ 0.67 มก./มล. ของ azocasein สำหรับเอนไซม์ทั้งสองจะเท่ากับ 0.01 และ 0.002 มิลลิโมล/ลิตรตามลำดับ ซึ่งเมื่อเทียบกับ casein แล้วจะเห็นว่า azocasein มีแอฟฟินิตีดีกว่า casein แสดงว่า azo group ช่วยเพิ่มแอฟฟินิตีของเอนไซม์ต่อ casein นอกจากนี้จากการทดลองนี้ยังสรุปได้ว่าแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก TISTR 25 และ Subtilisin มีความสามารถยึดจับ hemoglobin และ azocoll ไม่ต่างกัน แต่ Subtilisin ยึดจับทั้ง casein และ azocasein ได้ดีกว่าเอนไซม์จาก TISTR 25 แต่มีอัตราเร็วในการเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลส์โปรตีนนี้(V_{max}) ต่ำกว่า

นอกจากสับสเตรตธรรมชาติที่กล่าวมาแล้ว มีรายงานว่าแอลคาไลน์โปรตีเอสส่วนใหญ่ทำหน้าที่เป็นเอสเทอเรส(esterase) คือไฮโดรไลส์พันธะเอสเทอร์ได้อีกด้วย(Hall, 1966 ; Millet, 1970 ; Prestidge และคณะ, 1971) จึงมักใช้หน่วยการไฮโดรไลส์เอสเทอร์สังเคราะห์เป็นตัวเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของแอลคาไลน์โปรตีเอสชนิดต่างๆ เอสเทอร์ที่นิยมใช้เหล่านี้ได้แก่ acetyl tyrosine ethyl ester (ATEE), acetyl phenylalanine ethyl ester (APEE), benzoyl arginine ethyl ester (BAEE) และ benzoyl tyrosine ethyl ester (BTEE) เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ทดลองเปรียบเทียบความสามารถในการไฮโดรไลส์ BTEE พบว่าแอฟฟินิตีของ BTEE ต่อ Subtilisin Carlsberg ดีกว่าเอนไซม์จาก TISTR 25 ประมาณ 7 เท่า แต่

Subtilisin Carlsberg เร่งการไฮโดรไลส์พันธะเอสเทอร์ได้ช้ากว่า จากผลการศึกษาความสามารถในการไฮโดรไลส์สับสเตรตต่างชนิดนี้ แสดงว่าแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก TISTR 25 น่าจะมีบริเวณเร่ง(catalytic site) ไม่ต่างจาก Subtilisin Carlsberg เนื่องจากไฮโดรไลส์สับสเตรตประเภทเดียวกันได้ แต่อาจมีสภาพแวดล้อมในบริเวณเร่ง เช่นกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องช่วยในการยึดจับ(binding site) ต่างกัน จึงทำให้แอฟฟินิตี และอัตราเร็วในการไฮโดไลส์สับสเตรตต่างชนิดต่างกัน

ผลการศึกษาไอออนของโลหะต่อแอคติวิตีของเอนไซม์แสดงให้เห็นในตารางที่ 8 พบว่าไอออนส่วนใหญ่ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมล/ลิตร ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้งในแง่ยับยั้งและกระตุ้น Boyer และ Carlton (1968) รายงานว่า $CaCl_2$ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมล/ลิตร ยับยั้งแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสของ B. subtilis 168 (indole) ประมาณ 30 เปอร์เซนต์ ซึ่งไม่สอดคล้องกับรายงานของ Markland และ Smith (1971) ที่ว่า Ca^{++} (1 มิลลิโมล/ลิตร) สามารถทำให้เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจากสายพันธุ์ B. subtilis N'เสถียรมากขึ้น อย่างไรก็ดีจากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่าแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก TISTR 25 ไม่ต้องการหมู่ไอออนของโลหะเหล่านี้ในการแสดงแอคติวิตี นอกจากนี้ยังได้ศึกษาอิทธิพลของสารเคมีที่มีผลต่อกรดอะมิโนต่างชนิดต่อแอคติวิตีของเอนไซม์(ตารางที่ 9) พบว่า PMSF 10 มิลลิโมล/ลิตร สามารถยับยั้งแอคติวิตีเอนไซม์ได้ถึง 98 เปอร์เซนต์ และ 1,10-Phenanthroline 2.5 มิลลิโมล/ลิตร ไม่ยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ แสดงว่าเอนไซม์จาก TISTR 25 มีกรดอะมิโนเซรีนซึ่งจำเป็นต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ และไม่มีหมู่ไอออนของโลหะใน apoenzyme (1,10-Phenanthroline เป็นสาร chelating agent ชนิดหนึ่ง) สารที่เป็น reducing agent เช่น L-Cysteine , DL-Dithiothreitol และ Mercaptoethanol รวมทั้งสาร alkylating agent คือ Iodoacetamide ไม่ยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ แสดงว่าพันธะไดซัลไฟด์และหมู่ซัลไฟดริล ไม่สำคัญสำหรับเอนไซม์แอคติวิตี ซึ่งสอดคล้องกับ Markland และ Smith (1971) ซึ่งสรุปว่า Subtilisin ไม่มีกรดอะมิโน ซีสเตอีน หรือ ซิสไตน์ ซึ่งแตกต่างจาก pancreatic proteases ที่มีพันธะไดซัลไฟด์ในบริเวณเร่ง เมื่อใช้สาร p-Chloromercuribenzoic acid พบว่าไม่ยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์จาก TISTR 25 จึงสนับสนุนว่าเอนไซม์นี้ไม่มีหมู่ซัลไฟดริล ที่สำคัญ

สำหรับแอคติวิตี เมื่อใช้สาร Soybean trypsin inhibitor ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 มก./มล. พบว่าไม่มีผลยับยั้ง แสดงว่าเอนไซม์นี้มีบริเวณเร่งที่ต่างจากเอนไซม์ trypsin ซึ่งเป็นแอลคาไลน์โปรตีเอสจากสัตว์ การที่เห็นผลกระตุ้นเอนไซม์แอคติวิตีซึ่งเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสาร น่าจะเป็นเพราะ trypsin inhibitor นี้เป็นโปรตีน ดังนั้นจึงรบกวนการหาแอคติวิตีของเอนไซม์โดยวิธีไฮโดรไลส์เคซีน โดยเอนไซม์เองอาจไฮโดรไลส์ trypsin inhibitor ได้ด้วย จากการศึกษาอิทธิพลของสารเคมีเหล่านี้ต่อเอนไซม์แอคติวิตีสนับสนุนว่าแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก TISTR 25 มีส่วนประกอบบริเวณเร่งที่สำคัญเหมือนกับแอลคาไลน์โปรตีเอสจากบาซิลลัสสายพันธุ์อื่นๆ Horikoshi และ Akiba (1982) ได้จัดประเภทแอลคาไลน์โปรตีเอสตามบริเวณเร่งเป็น 2 ชนิดคือ กลุ่มจุลินทรีย์ จะมีบริเวณเร่งเป็น Thr-Ser-Met-Ala ขณะที่เอนไซม์จากกลุ่มสัตว์จะมีบริเวณเร่งเป็น Asp-Ser-Gly-Gly

จากผลการศึกษาการไฮโดรไลส์ของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจาก TISTR 25 ต่อเพปไทด์สังเคราะห์ที่มีปลายอะมิโนอิสระ และเป็น aliphatic ดังแสดงในตารางที่ 11 พบว่าเอนไซม์ไม่สามารถไฮโดรไลส์สับสเตรตได้เลย อาจเนื่องมาจากสับสเตรตไม่มีหมู่ที่จะยึดเกาะที่ binding site ของเอนไซม์ได้ เพปไทด์ที่ใช้ศึกษาทุกตัวมีแต่กรดอะมิโนไกลซีนอยู่ทางด้านปลายอะมิโน Barel และ Glazer(1968) เคยรายงานไว้ว่าเอนไซม์ Subtilisin Carlsberg และ Novo สามารถไฮโดรไลส์พันธะทางด้านปลายคาร์บอกซิลของไทโรซีน และ เฟนิลอะลานีน เอนไซม์ทั้งสองไฮโดรไลส์เพบไทด์สังเคราะห์ Tyr-Tyr-Tyr ให้เป็นกรดอะมิโน Tyr กับ Tyr-Tyr ได้ดี(โดยจะไม่ไฮโดรไลส์ Tyr-Tyr ต่อไป) ในขณะที่จะไฮโดรไลส์ Gly-Phe-Ala ให้เป็นกรดอะมิโน Ala กับ Gly-Phe ได้ไม่เกิน 5 เปอร์เซนต์ เมื่อพิจารณาข้อแตกต่างสำคัญของสับสเตรตทั้งสองตัวที่อาจมีผลต่อการยึดจับเอนไซม์ คือกรดอะมิโนที่ปลายอะมิโน คาดว่าไทโรซีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดอะโรแมติคควรยึดเกาะเอนไซม์ที่บริเวณ binding site ได้ดีกว่าไกลซีน ดังนั้นการที่เอนไซม์จาก TISTR 25 ไม่สามารถไฮโดรไลส์เพบไทด์สังเคราะห์ที่มีกรดอะมิโน ไกลซีน ทางด้านปลายอะมิโน จึงเหมือนกับเอนไซม์ Subtilisin ดังกล่าว ในการศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์โปรตีเอสต่อชนิดของกรดอะมิโน สามารถติดตามอัตราเร็วของการไฮโดรไลส์สับสเตรต (kinetics measurement) ได้อีกด้วย เช่นวัดความสามารถของเอนไซม์ในการไฮโดรไลส์

เพปไทด์สังเคราะห์ที่มีสี(chromogenic peptides) เช่นเพปไทด์ที่เติมหมู่ p-nitroaniline ซึ่งมีสีเหลืองเข้าที่ปลายคาร์บอกซิล โดยติดตามความเข้มของสี(คือหมู่ p-nitroaniline ซึ่งเป็น leaving group ที่ดี) วิธีนี้มีความสะดวก และรวดเร็ว โดยจะใช้เวลาในการวัดเพียง 3 - 5 นาที ภายใต้สภาวะของการทดลอง(แสดงให้เห็นในรูปที่ 26ก และ 26ข) Pozsgay และคณะ (1976) พบว่าวิธีการวัดทางไคเนติคส์นี้ ในสภาวะของการทดลองถ้าไม่มีเอนไซม์สับสเตรตจะไม่ปล่อยหมู่ p-Nitroaniline แต่ถ้ามีเอนไซม์อินคิวเบตกับสับสเตรต การดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตรจะเพิ่มขึ้นเป็นเส้นตรงในช่วง 3 - 5 นาที Strongin และคณะ (1979) ใช้หลักการเดียวกันในการหาความจำเพาะต่อกรดอะมิโนของเอนไซม์ intracellular serine protease ในการศึกษาเอนไซม์จาก TISTR 25 เมื่อติดตามการไฮโดรไลส์เพบไทด์สังเคราะห์โดยการใช้สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ได้ผลดังตารางที่ 10 ซึ่งจะเห็นว่าแอลคาไลน์โปรตีเอสจากแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดคือ TISTR 25 , Subtilisin Carlsberg และ Nagarse(Subtilisin BPN) ไม่ไฮโดรไลส์เพบไทด์สังเคราะห์สายสั้น(มีกรดอะมิโนตัวเดียว) แต่ Trypsin ซึ่งเป็นแอลคาไลน์โปรตีเอสจากสัตว์สามารถไฮโดรไลส์ได้ทั้ง NBz-Arg pNA และ NBz-Tyr pNA และยังสามารถไฮโดรไลส์เพปไทด์สายยาวขึ้นได้ แต่ไม่สามารถไฮโดรไลส์ Succ-Phe pNA และ Succ-Ala-Ala-Ala pNA เพราะ Trypsin ไม่จำเพาะต่อกรดอะมิโน Phe และ Ala ในขณะที่มีความจำเพาะสูงต่อ Tyr และ Arg (Bundy, 1963 ; Erlanger และ คณะ, 1966) จากตารางนี้จะเห็นได้ว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจาก TISTR 25 สามารถไฮโดรไลส์เพปไทด์ได้เหมือนกับ Subtilisin และ Nagarse ในการพิสูจน์ว่าเอนไซม์ทั้ง 3 ไฮโดรไลส์เพปไทด์ต่างๆตรงกรดอะมิโนใด ใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC ได้ผลดังตารางที่ 12 และ 13 ซึ่งสรุปได้ว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจากแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดคือ TISTR 25, Subtilisin และ Nagarse มีความจำเพาะในการไฮโดรไลส์กรดอะมิโนทางด้านคาร์-บอกซิลของกรดอะมิโน อาร์จินีน และกลุ่มไฮโดรโฟบิคเช่น อะลานีน ลูซีน เฟนิลอะลานีน และเวลีน และพบว่ากรณี Phe และ Val เอนไซม์อาจไฮโดรไลส์หรือไม่ไฮโดรไลส์ ขึ้นกับกรดอะมิโนใกล้เคียงด้วย เช่น ในเพปไทด์ NBz-Phe-Val-Arg pNA เอนไซม์ทั้ง 3 ตัวไม่ไฮโดรไลส์ Phe ขณะที่ Subtilisin และ Nagarse ไฮโดรไลส์ Val ได้ยากมาก เนื่อง

จาก spot ที่ได้จาก TLC เจือจางมากเมื่อเทียบกับ spot อื่นๆ (ผลการทดลองกล่าวในข้อ ข. หน้า 77 บทที่ 4) ส่วนเอนไซม์จาก TISTR 25 คาดว่าไฮโดรไลส์ Val ได้น้อยกว่าไปอีก ผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่ำกว่า sensitivity ของวิธี TLC แต่เมื่อวิเคราะห์เพปไทด์ NBz-Val-Gly-Arg pNA เอนไซม์ทั้ง 3 ไฮโดรไลส์ Val(ที่อยู่ใกล้กับ Gly) ได้ นอกจากนี้ยังอาจเป็นอิทธิพลของกรดอะมิโนตัวที่ 2 จากปลายคาร์บอกซิล Pozsgay และคณะ(1977) เคยรายงานไว้ว่า กรณี NBz-Phe-Val-Arg pNA เมื่อมีกรดอะมิโนเวลีนในตำแหน่งกรดอะมิโนตัวที่ 2 จากปลายคาร์บอกซิลเอนไซม์ Subtilisin Carlsberg และ Novo สามารถไฮโดรไลส์ได้ ซึ่งขัดแย้งกับข้อมูลจาก X-ray data ซึ่งชี้ว่าบริเวณ binding site ของเอนไซม์ที่จะยึดจับกรดอะมิโนตัวที่ 2 จากปลายคาร์บอกซิลมีที่พอสำหรับกรดอะมิโนขนาดเล็กเช่นไกลซีน หรือ อะลานีนเท่านั้น Pozsgay และคณะ(1977) ได้ให้ข้อสังเกตุว่าไตรเพปไทด์สังเคราะห์นี้ มีอิสระในการหมุนสูง ซึ่งอาจเป็นผลทำให้มีโอกาสเข้าไปยึดจับเอนไซม์ได้ ถึงแม้จะมีกรดอะมิโนเวลีน ซึ่งมีขนาดค่อนข้างใหญ่ ผลการทดลองหาความจำเพาะในการไฮโดรไลส์กรดอะมิโนต่างๆสอดคล้องกับที่เคยมีรายงานเช่น Morihara และ Tsuzuki (1969) ; Morihara และคณะ (1968) ได้ศึกษาการไฮโดรไลส์เพปไทด์สังเคราะห์โดยนิวทรัล และ แอลคาไลน์โปรตีเอสจากแบคทีเรียต่างๆ และรา พบว่านิวทรัลโปรตีเอสไฮโดรไลส์พันธะเพปไทด์ทางด้านปลายอะมิโนของกรดอะมิโนชนิดไฮโดรโฟบิค ส่วนแอลคาไลน์โปรตีเอส ไฮโดรไลส์พันธะเพปไทด์ทางด้านปลายคาร์บอกซิลของกรดอะมิโนกลุ่มไฮโดรโฟบิคเช่นกัน ขณะที่ Tsai (1984) รายงานว่าแอลคาไลน์โปรตีเอสจากจุลินทรีย์มีความจำเพาะต่อปลายคาร์บอกซิลของกรดอะมิโนชนิดอะโรแมติค หรือไฮโดรโฟบิค เช่น ไทโรซีน เฟนิลอะลานีน หรือ ลูซีน Pozsgay และคณะ(1977) พบว่าแอลคาไลน์โปรตีเอสมีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนชนิดเบสิก เช่น อาร์จินีน ด้วย และมีรายงานว่า Subtilisin BPN ไฮโดรไลส์เพปไทด์สังเคราะห์ ชนิดที่เป็น amide substrate เช่น Carbobenzoxyl (Cbz)-Gly-X-NH_2 หรือสับสเตรตเอสเทอร์เช่น acetyl-X-ethyl ester (X เป็นกลุ่มอะโรแมติกหรือไฮโดรโฟบิค เช่น อะลานีน ลูซีน เฟนิลอะลานีน ไทโรซีน เซรีน และทริปโตเฟน) ที่ปลายคาร์บอกซิลของ X (Markland และ Smith, 1971) นอกจากนี้ยังมีรายงานปัจจัยที่เกี่ยวข้องในการไฮโดรไลส์สับสเตรต เช่น stereospecificity ในกรณี

Cbz-Gly-Leu-NH_2 เมื่อแทนกรดอะมิโน L-Leucine ด้วยกรดอะมิโน D-Leucine จะไม่เกิดการไฮโดรไลส์(Markland และ Smith, 1971) ข้อมูลเหล่านี้ทำให้คาดได้ว่ามีปัจจัยอื่น ซึ่งอาจมีผลต่อความจำเพาะในการไฮโดรไลส์กรดอะมิโนในสับสเตรตในธรรมชาติได้หลายประการโดยสรุปคือ อิทธิพลจาก sidechain ในบริเวณพันธะเพปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลส์หรือกลุ่มในบริเวณใกล้เคียงในโครงสร้างตติยภูมิของเอนไซม์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลอง

1. เมื่อเลี้ยง B. subtilis TISTR 25 ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้สูงสุด คือในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วย 1% กลูตาเมท ที่ pH 6.0 อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อผลิตเอนไซม์โปรตีเอสที่มีแอคติวิตีจำเพาะ = 0.44 หน่วย/มก. โปรตีน

2. ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำที่เสริมกลูตาเมท B. subtilis TISTR 25 จะผลิตเอนไซม์นิวทรัลต่อแอลคาไลน์โปรตีเอสในอัตราส่วน 1 : 2.8 เปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐาน B. licheniformis ATCC 21415 ซึ่งจะผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสเพียงอย่างเดียว

3. เมื่อนำสารละลาย crude enzyme มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 70 เปอร์เซนต์ และผ่านคอลัมน์ CM-cellulose พบว่าสามารถแยกเอนไซม์แอลคาไลน์ออกจากนิวทรัลโปรตีเอสได้เป็นผลสำเร็จ เอนไซม์แอลคาไลน์ที่แยกได้เมื่อทดสอบด้วย เจล อีเลคโตรโฟริซิส พบว่ามีโปรตีน 1 แถบใหญ่และ 1 แถบย่อย แต่เมื่อทดสอบด้วย เอสดีเอส เจล อีเลคโตรโฟริซิส พบว่ามี 1 แถบใหญ่ และแถบย่อยประมาณ 4-5 แถบ

4. เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่แยกได้เป็นโพลีเพปไทด์สายเดี่ยวที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 27,000 ดาลตัน

5. แอลคาไลน์โปรตีเอสจาก B. subtilis TISTR 25 มี pH และอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 8.5 และ 55 °ซ เปรียบเทียบกับเอนไซม์ Subtilisin Carlsberg ที่มี pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 9.5 และ 60 °ซ ตามลำดับ

6. เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสมีความเสถียรต่อ pH ที่เป็นด่างได้ดีกว่า pH ที่เป็นกรด และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 50 °ซ ได้นาน 30 นาที โดยสูญเสียแอคติวิตีประมาณ 45 เปอร์เซนต์

6. เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสมีแอฟฟินิตีต่อ casein , azocasein และ BTEE น้อยกว่า Subtilisin Carlsberg แต่มีแอฟฟินิตีต่อ hemoglobin และ azocoll เท่ากับ Subtilisin

7. ไอออนของโลหะ สาร reducing agent, chelating agent, alkylating และ Soybean trypsin inhibitor ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสในขณะที่ PMSF ยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้เกือบ 100 เปอร์เซนต์

8. แอลคาไลน์โปรตีเอสจาก B. subtilis TISTR 25 มีความจำเพาะในการไฮโดรไลส์ที่ปลายคาร์บอกซิลของกรดอะมิโน อาร์จินีน อะลานีน ลูซีน เฟนิลอะลานีน และเวลีน คุณสมบัตินี้เหมือนกับเอนไซม์ Subtilisin Carlsberg และ BPN

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย