บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

1. เมื่อทำการคัดแยกแบคทีเรียทนร้อนที่สามารถสร้างโปรติเอสจากตัวอย่างดินและน้ำ จำนวน 23 ตัวอย่าง พบว่ามีแบคทีเรีย 42 ไอโซเลตที่สร้างโปรติเอส และมีเพียง 12 ไอโซเลตเท่านั้นที่มีความกว้างของวงใสตั้งแต่ 0.25 ซม. ขึ้นไป

2. นำแบคทีเรียที่มีแอคติวิตีสูงที่สุด 3 ไอโซเลต มาจำแนกสกุลของแบคทีเรียด้วยวิธีทางอนุกรมวิธาน อ้างอิงจาก Bergey's manual of Determinative Bacteriology (9^{th} edttion) (1994), Practical handbook of Microbiology (1989) และ Bergey's manual of Systematic Bacteriology (1986) ดังแสดงในตารางที่ 4.5 และ 4.6 พบว่าทั้งสามไอโซเลตน่าจะเป็น *Bacillus stearothermophilus*

3. ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรติเอสนั้น คัดเลือกไอโซเลตที่มีแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุดคือ RW60-6 ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรติเอสคือที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ pH เริ่มต้นคือ 7.0 จากรูปที่ 4.6-4.9 ลักษณะของการสร้างโปรติเอสเป็น primary metabolite เพราะเริ่มสร้างตั้งแต่เซลล์มีการเจริญแต่จะสร้างได้น้อย เซลล์จะสร้างโปรติเอสออกมามากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 8 – 10 ชม. สามารถวัดแอคติวิตีของโปรติเอสได้มากที่สุด ณ ช่วงปลายของการเจริญแบบทวีคูณ (late log phase) ใช้เวลาทั้งหมดประมาณ 14 ชม. ซึ่งลักษณะการสร้างโปรติเอสนี้คล้ายกับการสร้าง Aqualysin จาก *Thermus aquaticus* YT-1 (Matsuzawa และคณะ, 1983) สันนิษฐานว่าช่วงแรกเซลล์อาศัยโปรตีนขนาดเล็กที่อยู่ในอาหารเป็นแหล่งพลังงานทำให้เจริญได้ และเมื่อใช้โปรตีนขนาดเล็กหมดแล้วจึงสร้างโปรติเอสออกมามากขึ้นเพื่อใช้ย่อยโปรตีนขนาดใหญ่

4. ในการทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์บางส่วนแบ่งเป็นสองขั้นตอนคือการตกตะกอนโปรติเอสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นอิ่มตัว 20-40 % โปรติเอสที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.87 เท่า และยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 20.20 % ของ crude เอนไซม์ และเมื่อนำโปรติเอสที่ได้จากขั้นตอนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีบนดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ซึ่งพบว่าเอนไซม์จะถูกแยกออกมาเป็นสองชนิดดังรูปที่ 4.10 โดยชนิดที่หนึ่งคือ โปรติเอส U มี

ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 13.16 เท่า และยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 10.68 % ของ crude เอนไซม์ และชนิดที่สองคือโปรติเอส B มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4.77 เท่า และยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 8.28 % ของ crude เอนไซม์

5. เมื่อนำโปรติเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมาตรวจสอบความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักมวลโมเลกุลของโปรติเอสโดยใช้ SDS-PAGE และ ย้อมแอคติวิตีตามข้อ3.5 ซึ่งย้อมเห็นตำแหน่งที่เกิดแอคติวิตีได้ แสดงว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้หลังจากสัมผัสโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตแล้ว

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีสามารถกำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการออกได้บางส่วน และพบแถบโปรติเอสแอคติวิตี 2 ช่วงและตรงกับแถบโปรตีนหลัก แบ่งโปรติเอสออกเป็น 2 กลุ่มตามลักษณะการเกิดแถบแอคติวิตีที่มี 2 ช่วง คือ ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง และชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ

เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล ได้ผลว่า โปรติเอสจากแถบโปรตีนหลักด้านบน(ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง) ในแถวของโปรติเอส U มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200,000 ดาลตัน และ ในแถวของโปรติเอส B มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 197,000 ดาลตัน ส่วนโปรติเอสจากแถบโปรตีนหลักด้านล่าง(ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ) ในแถวของโปรติเอส U มีค่าน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 33,000 ดาลตัน และในแถวของโปรติเอส B มีค่าน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35,000 ดาลตัน

จากการสังเกตความเข้มของแถบแอคติวิตี พบว่าในแถวของโปรติเอส U นั้นมีความเข้มของแถบแอคติวิตีทางด้านบนมากกว่าแถวของโปรติเอส B และในทางกลับกันเมื่อสังเกตที่แถบแอคติวิตีทางด้านล่าง แถวของโปรติเอส B นั้นมีความเข้มของแถบแอคติวิตีมากกว่าแถวของโปรติเอส U จึงอาจจะสรุปได้ว่า โปรติเอส U ส่วนใหญ่น่าจะเป็นโปรติเอสชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง และ โปรติเอส B ส่วนใหญ่น่าจะเป็นโปรติเอสชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ

6. จากการศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของโปรติเอสพบว่า ทั้งโปรติเอส U และโปรติเอส B มีลักษณะที่ใกล้เคียงกันคือ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ 65 องศาเซลเซียส, เสถียรต่ออุณหภูมิได้ถึง 65 องศาเซลเซียสในเวลา 30 นาที, มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 7.0 และทนต่อค่าความเป็นกรดด่างระหว่าง 7.0-8.5 นอกจากนี้ โปรติเอส U ถูกยับยั้งได้ด้วย EDTA แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วย PMSF ส่วนการศึกษาถึงอิทธิพลของไอออนโลหะนั้นพบว่า ไอออนโคบอลท์, คอปเปอร์, แมงกานีส, นิเกิล และ แบเรียม มีผลยับยั้งแอคติวิตีของโปรติเอส U และไม่พบไอออนโลหะที่เร่งปฏิกิริยาโปรติเอสจากไอออนโลหะทั้งหมดที่นำมาทดสอบ 10 ชนิด

ตารางที่ 5.1 สมบัติบางประการของโปรติเอสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากเชื้อแบคทีเรีย RW60-6

สมบัติของโปรติเอส	โปรติเอส	
	โปรติเอส U (unbound)	โปรติเอส B (bound)
น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE	200,000 และ 33,000 ดาลตัน	197,000 และ 35,000 ดาลตัน
อุณหภูมิที่เหมาะสม	65 องศาเซลเซียส	65 องศาเซลเซียส
ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	7.0	7.0
ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	65 องศาเซลเซียส 30 นาที	65 องศาเซลเซียส 30นาที
ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	7.0-8.5 30 นาที	7.0-8.5 30 นาที
ชนิดของโปรติเอส	เมทัลโลโปรติเอส	-

อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

1. ในการจำแนกสกุลของแบคทีเรียด้วยวิธีทางอนุกรมวิธาน ซึ่งอ้างอิงจาก Bergey's manual of Determinative Bacteriology (9^{th} edttion) (1994), Practical handbook of Microbiology (1989) และ Bergey's Systematic of Determinative Bacteriology (1986) พบว่าทั้งสามไอโซเลตอยู่ในจีนัส *Bacillus* และน่าจะเป็น *Bacillus stearothermophilus* ซึ่งควรนำไอโซเลตเหล่านี้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ16S rDNA เพื่อยืนยันว่าเป็น *Bacillus stearothermophilus*

มีรายงานมากมายที่เกี่ยวกับโปรติเอสที่เสถียรต่อความร้อนซึ่งสร้างโดยแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* ได้แก่ Chopra และ Mathur (1985), Gey และ Unger (1995), Ohta และคณะ (1995), Boonyaras และ คณะ (2000)และ Chung และ คณะ (2002) ศึกษาเกี่ยวกับโปรติเอสจาก *Bacillus stearothermophilus* ส่วน Prescott และคณะ (1995), Ferrero และคณะ (1996), Matta และ Punj (1998), Jung และคณะ (1999) และ Nongporn และคณะ (1999) ศึกษาเกี่ยวกับโปรติเอสจาก *Bacillus* สปีชีส์อื่นๆ

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรติเอส ในการวิจัยนี้ได้ทดลองเกี่ยวแฟกเตอร์ที่ผู้วิจัยคาดว่าน่าจะมีความสำคัญอย่างมากต่อการผลิตโปรติเอส 3 แฟกเตอร์คือ อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง, ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหาร และเวลาในการเก็บเกี่ยว ดังนั้นถ้าจะนำโปรติเอสนี้ไปใช้ในเชิงอุตสาหกรรมก็ควรหาสภาวะอื่นๆด้วย ตัวอย่างเช่น สูตรอาหารที่เหมาะสม โดยในการวิจัยครั้งนี้ได้สูตรอาหาร BY ซึ่งง่ายต่อการเตรียมและสามารถช่วยให้เชื้อสร้างโปรติเอสได้มากเนื่องจากมีวิตามินจากสิ่งสกัดจากยีสต์ และโปรตีนจากสิ่งสกัดจากเนื้อและสกิมมิลค์จำนวนมาก โดย Ferrero และคณะ (1996) รายงานว่า เคซีนเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีสำหรับเชื้อที่สร้างโปรติเอสทนร้อนที่ส่งออกนอกเซลล์ และน่าจะเป็น inducer ในการสังเคราะห์โปรติเอสอีกด้วย

3. เมื่อนำโปรติเอสมาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีบนดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ พบว่าเอนไซม์จะถูกแยกออกมาเป็นสองส่วน คือ โปรติเอส U และโปรติเอส B โปรติเอส U คือโปรติเอสที่ไม่เกาะกับตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุคอลัมน์โครมาโทรกราฟีเป็นส่วนที่มีแอคติวิตีมากกว่าโปรติเอส B ซึ่งเป็นส่วนที่เกาะกับตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ รูปแบบของแอคติวิตีที่ชะออกมาจากคอลัมน์คล้ายคลึงกับผลการวิจัยของ Kim และคณะ (1999) ซึ่งใช้คอลัมน์ DEAE-Sepharose ทำโปรติเอสจาก *Thermoactinomyces* sp.E79 .ให้บริสุทธิ์ ได้โปรติเอส 2 ชนิด

4. จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล ได้ผลว่าโปรติเอสจากแถบโปรตีนหลักด้านบน(ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง) ในแถวของโปรติเอส U มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200,000 ดาลตัน และ ในแถวของโปรติเอส B มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 197,000 ดาลตัน ใกล้เคียงกันกับโปรติเอสทนร้อนจาก *Bacillus* sp. MO-1 ซึ่งมีขนาด 210,000 ดาลตัน (Okamoto และคณะ, 2001)

ส่วนโปรติเอสจากแถบโปรตีนหลักด้านล่าง(ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ) ในแถวของโปรติเอส U มีค่าน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 33,000 ดาลตัน และในแถวของโปรติเอส B มีค่าน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35,000 ดาลตัน ใกล้เคียงกับเทอร์โมไลซิน ที่มีขนาด 34 กิโลดาลตันสร้างจาก*Bacillus stearothermophilus* (Rao และคณะ, 1998), โปรติเอสที่ได้จาก *Thermoactinomyces* sp.E79 ซึ่งมีขนาด 31 และ 36 กิโลดาลตัน (Lee และคณะ ,1992), เมทัลโลโปรติเอสจาก *Bacillus* sp. JH 108 ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 36 กิโลดาลตัน (Jung และคณะ ,1999), อัลคาไลน์โปรติเอส ขนาด 33,500 ดาลตัน ซึ่งได้จาก *Bacillus stearothermophilus* F1 (Rahman และคณะ 1994) และเท่ากับโปรติเอสทนร้อนที่ได้จาก *Thermomicrobium* sp. KN-22 ซึ่งมีขนาด 35 กิโลดาลตัน (Murao และคณะ 1991)

การที่น้ำหนักโมเลกุลของโปรติเอสที่คำนวณจาก SDS-PAGE มีค่าไม่เท่ากันแต่ใกล้เคียงกันอาจเกิดจาก post-translational modification ซึ่งเป็นส่วนที่มีผลต่อการเสถียรต่อความร้อนของเอนไซม์ ดังเช่นที่เกิดกับโปรติเอสจาก *Sulfolobus acidocaldarius* (Fusek และคณะ, 1990 อ้างถึงใน Voorhorst และคณะ, 1996)

นอกจากนี้ควรนำโปรติเอส U และ โปรติเอส B ไปทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยใช้วิธีเจลฟิล-เทรชั่น ซึ่งจะทำให้คำนวณน้ำหนักโมเลกุลมาเปรียบเทียบกับน้ำหนักโมเลกุลที่ได้จาก SDS-PAGE ก็จะทำให้ทราบหน่วยย่อยของโปรติเอส

5. จากการศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโปรติเอส คาดว่าโปรติเอส U และ โปรติเอส B มีลักษณะสมบัติเหมือนกัน โดยโปรติเอสทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ใกล้เคียงกับโปรติเอสจาก *Pseudomonas aeruginosa* CCRC 15541 ซึ่งทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (Lu และ Chang, 1996), เมทัลโลโปรติเอสจาก *Bacillus* sp. JH 108 ซึ่งทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (Jung และคณะ, 1999)

ค่าความเป็นกรดด่างที่โปรติเอสทำงานได้ดีคือ 7.0 ใกล้เคียงกับโปรติเอสจาก *Bacillus polymyxa* B-17 ซึ่งเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 7.5 (Matta และ Punj, 1998), โปรติเอสเอ็น และ บี จาก *Bacillus stearothermophilus* TLS33 ซึ่งเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่าง 7.5 และ7.0 ตามลำดับ (Boonyaras และ คณะ, 2000) และเท่ากับโปรติเอสจาก *Pseudomonas aeruginosa* CCRC 15541 ซึ่งเร่งปฏิกิริยาได้ดีค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 (Lu และ Chang, 1996)

โปรติเอสจาก ไอโซเลต RW60-6 เสถียรต่ออุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสในเวลา 30 นาที ใกล้เคียงกันกับโปรติเอสจาก *Pseudomonas aeruginosa* CCRC 15541 ซึ่งเสถียรต่ออุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสในเวลา 60 นาที (Lu และ Chang, 1996), โปรติเอสทนร้อนที่ได้จาก *Thermomicrobium* sp. KN-22 ซึ่งเสถียรต่ออุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสในเวลา 10 นาที (Murao และคณะ 1991), โปรติเอสจาก *Thermoactinomyces* sp.E79 ซึ่งเสถียรต่ออุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสในเวลา 10 นาที (Kim และคณะ ,1999), โปรติเอสจาก *Thermoactinomyces* sp.HS682 ซึ่งเสถียรต่ออุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสในเวลา 10 นาที (Tsuchiya และคณะ ,1992)

จากการศึกษาถึงอิทธิพลของตัวยับยั้งพบว่าโปรติเอส U จากไอโซเลต RW60-6ถูกยับยั้งได้ด้วย EDTA ซึ่งเป็นตัวยับยั้งของเมทัลโลโปรติเอส แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วย PMSF ซึ่งเป็นตัวยับยั้งของซีรีนโปรติเอส และโปรติเอส U ทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 ดังนั้นอาศัยลักษณะเบื้องต้นดังกล่าวจัดโปรติเอสนี้เป็น นิวทรัลเมทัลโลโปรติเอส