



บทที่ 4

## ผลการทดลอง

### 4.1 ผลการเตรียมเอนไซม์โปรตีเอส (crude enzyme)

จากการเลี้ยงเชื้อ B. subtilis TISTR 25 ในอาหารเหลวสูตรปรับด่างที่เสริมด้วย 0.1 % กรดกลูตามิก ที่ pH 7 อุณหภูมิ 30° ซ ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1 ลิตร โดยใส่อาหารเลี้ยงเชื้อขวดละ 375 มล. จำนวน 4 ขวดจะได้สารละลาย crude enzyme ในส่วนน้ำใส่ประมาณ 1.5 ลิตร ซึ่งมีแอกติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส 0.47 หน่วย/มล. ปริมาณโปรตีน 0.02 มก./มล และค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 21.5 หน่วย/มก. (ตารางที่ 2) นำ crude enzyme ที่ได้ไปทำไปหริสฤทธิ์ต่อไป

### 4.2 ผลการทำเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสให้บริสุทธิ์

#### 4.2.1 ผลการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว

นำ crude enzyme ที่เตรียมได้ มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 0-40% และ 40-70% พบว่าปริมาณเอนไซม์โปรตีเอสส่วนใหญ่ตกตะกอนที่ 40-70% ของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว ซึ่งได้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตเอนไซม์ (% yield) เท่ากับ 58% และเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2 เท่า (ตารางที่ 2) นำตะกอนของเอนไซม์ที่ได้ละลายในบัฟเฟอร์แล้วกำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกด้วยวิธีไดอะไลซิส หลังจากนั้นก็นำไปผ่านคอลัมน์ซีเอ็ม-เซลลูโลสเพื่อแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น

#### 4.2.2 ผลการแยกเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสด้วยคอลัมน์ ซีเอ็ม-เซลลูโลส

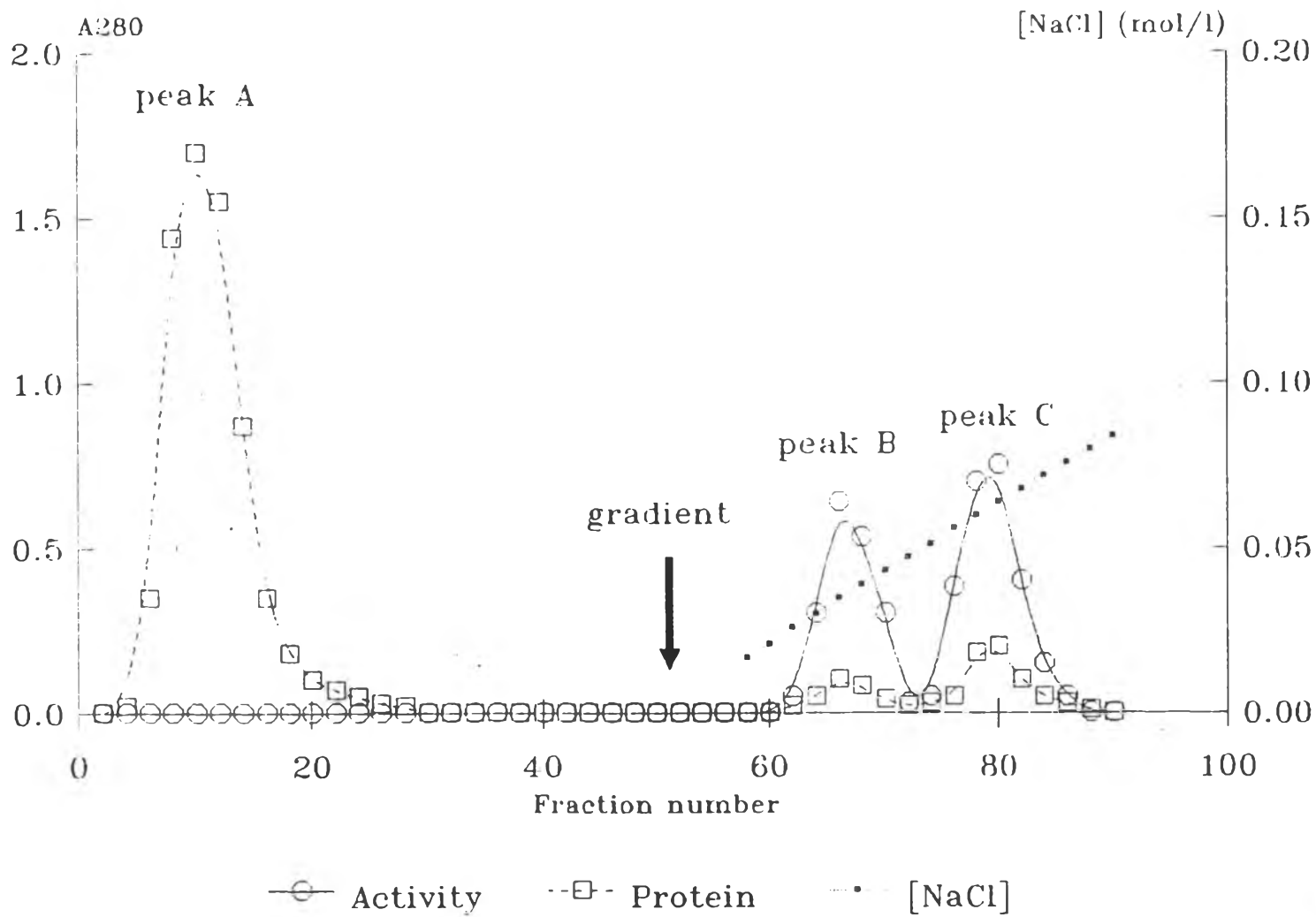
จากผลการทดลองแสดงในรูปที่ 2 พบว่าคอลัมน์ซีเอ็มสามารถแยกโปรตีนออกมาได้เป็น 3 peak โดยโปรตีนส่วนใหญ่จะออกมาใน peak แรก (peak A) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่ยึดจับกับเรซินถูกชะออกด้วย equilibrating buffer pH 6.5 และเป็นโปรตีนที่ไม่มีแอกติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส ส่วนโปรตีนอีก 2 กลุ่ม (peak B และ C) ชะออกโดย

รูปที่ 2

รูปแบบการแยกและทำโปรตีนจาก B.subtilis TISTR 25 ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ CM-cellulose

บรรจุโปรตีนจาก 40-70 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต แพรคชันที่ละลายอยู่ใน 40 มล. อิมิดาโซลีนเฟอ์ pH 6.5 ลงในคอลัมน์ CM-cellulose ขนาด 1.7 X 22 ซม. ะด้วยอิมิดาโซลีนเฟอ์ประมาณ 250 มล. แล้วตามด้วย linear salt gradient. (250 มล. อิมิดาโซลีนเฟอ์ pH 6.5 และ 250 มล. ของอิมิดาโซลีนเฟอ์ pH 6.5 ที่มี 0.2 โมล/ลิตร โซเดียมคลอไรด์) อัตราการไหล 30 มล./ชม. เก็บแยกส่วนหลอดละ 5 มล. (วิธีทดลองข้อ 3.5.4)

- peak A    แพรคชันของโปรตีนที่ไม่ม่แอกติวิตีของโปรตีนเอส
- peak B    แพรคชันของนิวคลีโพรตีนเอส
- peak C    แพรคชันของแอลคาไลน์โปรตีนเอส



ตารางที่ 2 ผลการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ โปรตีนเอนไซม์

ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	โปรตีนรวม (มิลลิกรัม)	แอกติวิตีรวม (หน่วย)*	แอกติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มิลลิกรัม)	Yield (%)	Purification fold
crude enzyme	1500	32.5	701	21.5	100	1
ตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต						
อิมัว 0-40%	10	0.7	5.4	7.7	0.8	0.4
40-70%	39.5	9.4	406	43.2	58.0	2.0
หลังคอลัมน์ CM-cellulose						
peak A	70	3.2	0	0	0	0
peak B	45	1.2	92	80.0	12.0	3.7
peak C	50	2.0	150	75.0	2.4	3.5
หลังคอลัมน์ Sephadex G-75						
peak 1	8	.04	0	0	0	0
peak 2	13	.74	73	98.6	10.4	4.6

\* 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณเปปไทด์หรือกรดอะมิโนที่เกิดจากการย่อยเคซีน 0.5% ที่ 45°C ในเวลา 1 นาที  
เปรียบเทียบเป็น ไมโครโมลของไทโรซีน

การทำ linear gradient ของโซเดียมคลอไรด์ (0-0.2 โมลาร์) โดยโปรตีน peak B และโปรตีน peak C ถูกชะออกด้วย 0.04 และ 0.07 โมลาร์โซเดียมคลอไรด์ตามลำดับ โปรตีนทั้ง 2 peak ที่มีแอกติวิตีของโปรตีนเอส เมื่อใช้สารยับยั้ง EDTA และ PMSF ทดสอบพบว่าโปรตีน peak B เป็นดีเอ็นเอโปรตีนเอส และโปรตีน peak C เป็นอัลคาไลน์โปรตีนเอส เอนไซม์ดีเอ็นเอโปรตีนเอสที่แยกได้จาก ซีเอ็ม-เซลลูโลสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.7 เท่า (ตารางที่ 2) เก็บรวบรวมแพรคชันโปรตีน peak B แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้วิธี ultrafiltration นำไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี โมลอะโครลาไมด์ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

#### 4.2.3 ผลการทำเอนไซม์ดีเอ็นเอโปรตีนเอสให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยวิธี เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส (เซฟาเด็กซ์ จี-75)

นำเอนไซม์โปรตีนเอส peak B จากคอลัมน์ซีเอ็ม-เซลลูโลส ที่ทำให้เข้มข้นขึ้นมาผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75 เมื่อชะออกด้วยอิมิดาโซล บัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ผสมอยู่ พบว่ามีโปรตีนออกมา 2 peak (รูปที่ 3) โปรตีน peak แรกออกที่ elution volume 81 มล.และเป็นโปรตีนที่ไม่มีโปรตีนเอสแอกติวิตี ส่วนโปรตีน peak ที่ 2 ถูกชะออกที่ elution volume 123 มล.มีโปรตีนเอสแอกติวิตี และบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4.6 เท่า (ตารางที่ 2) นำเอนไซม์ดีเอ็นเอโปรตีนเอสที่แยกได้จากคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-75 นี้ ไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยวิธี โมลอะโครลาไมด์ เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

#### 4.3 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ดีเอ็นเอโปรตีนเอสโดยวิธี โมลอะโครลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส

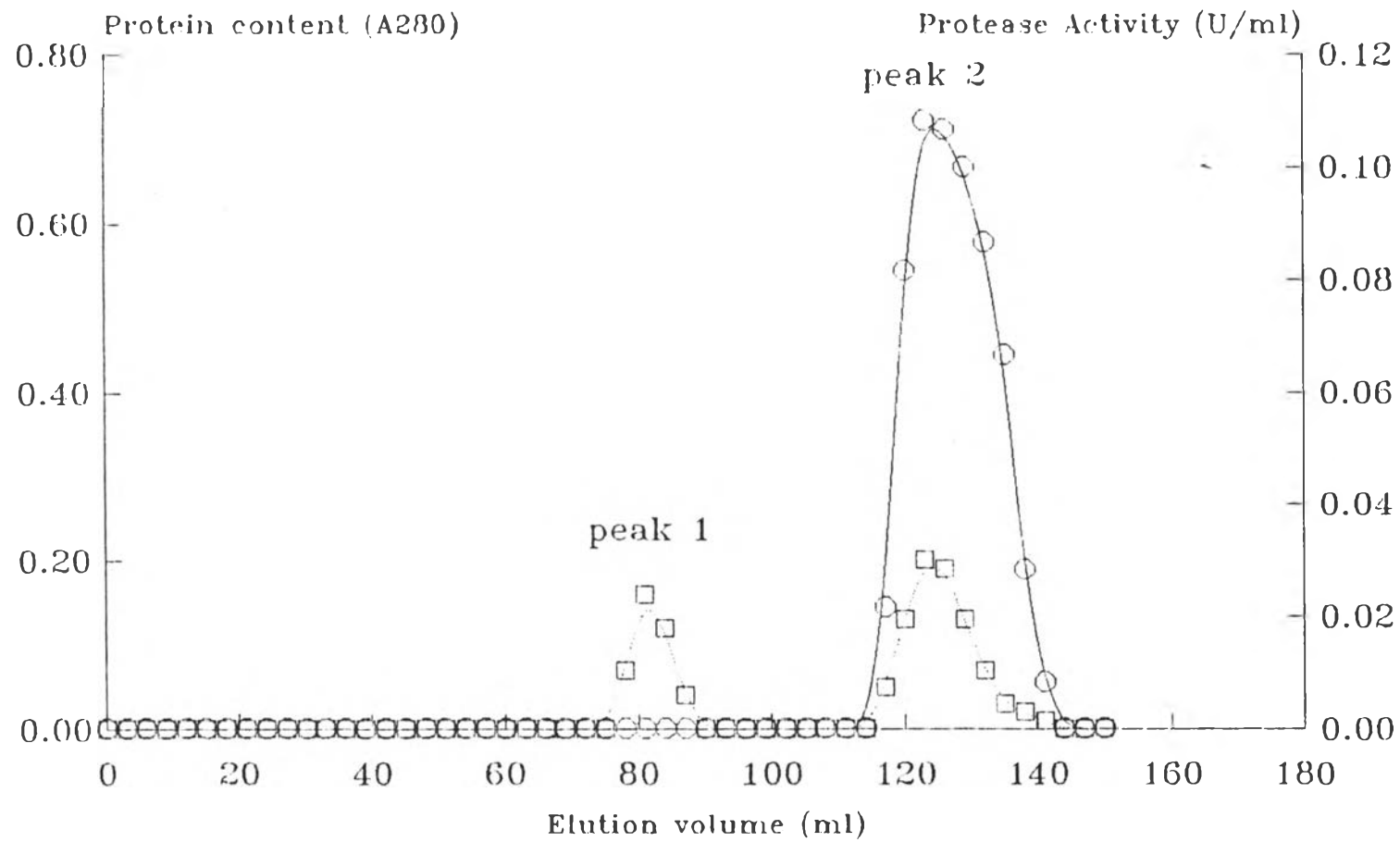
จากการตรวจสอบครั้งแรก โดยนำเอนไซม์ดีเอ็นเอโปรตีนเอสที่ได้จากคอลัมน์ ซีเอ็ม-เซลลูโลส มาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสเปรียบเทียบกับโปรตีนดิบ crude เอนไซม์ และในตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าจำนวนแถบโปรตีนหลังตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตน้อยกว่าโปรตีนดิบ crude เอนไซม์ และหลังจากผ่านคอลัมน์ ซีเอ็ม-เซลลูโลส แล้วยังพบโปรตีนเพียง 2-3 แถบ (รูปที่ 4) ที่ระยะ 1 และ 2 เช่นเดียวกับจากทาบอบทงเจล จึงตัดเจลส่วนบนที่ออก

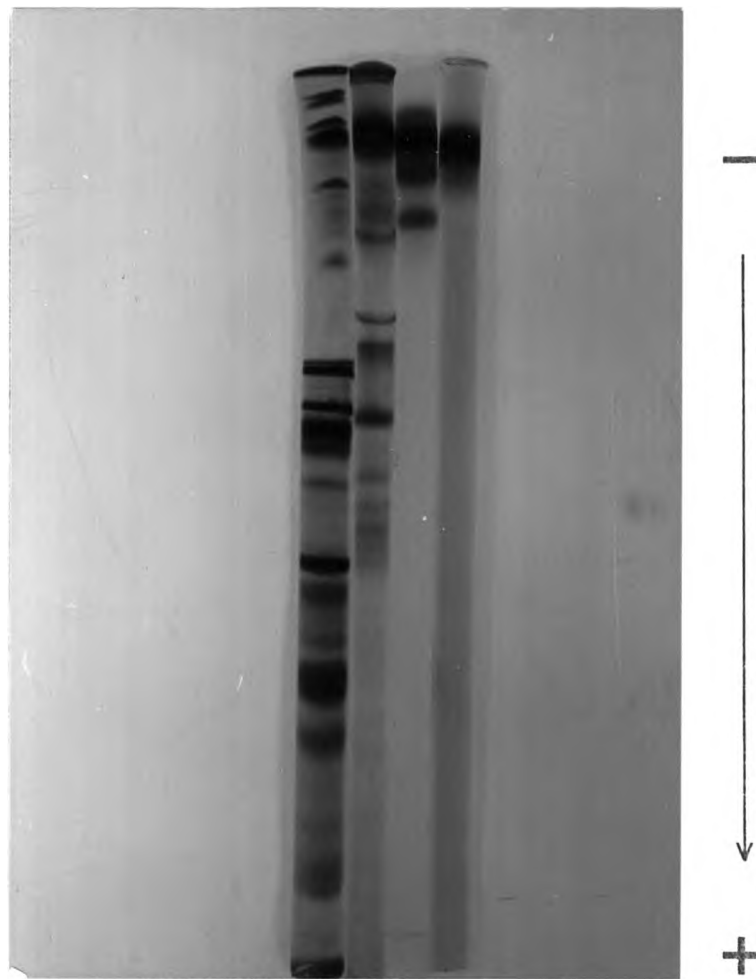
รูปที่ 3 รูปแบบการทำไมวรัลโปรตีนจาก B.subtilis TISTR 25 ให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-75

บรรจุโปรตีน peak B จากคอลัมน์ ทีเอ็ม-เซลลูโลส ลงในคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-75 ขนาด 1.7 X 85 ซม.  
ชะออกด้วย 10 มิลลิโมลาร์ ถิมีตาโซลบัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่มี 2 มิลลิโมลาร์แคลเซียมคลอไรด์ อัตราการไหล  
15 มล./ชม. เก็บแยกส่วนหลอดละ 1.5 มล. (วิธีทดลองข้อ 3.5.5)

peak 1 แปรคั้นของโปรตีนที่ไม่มีแอกติวิตีของโปรตีนเอส

peak 2 แปรคั้นของไมวรัลโปรตีนเอส





1 2 3 4

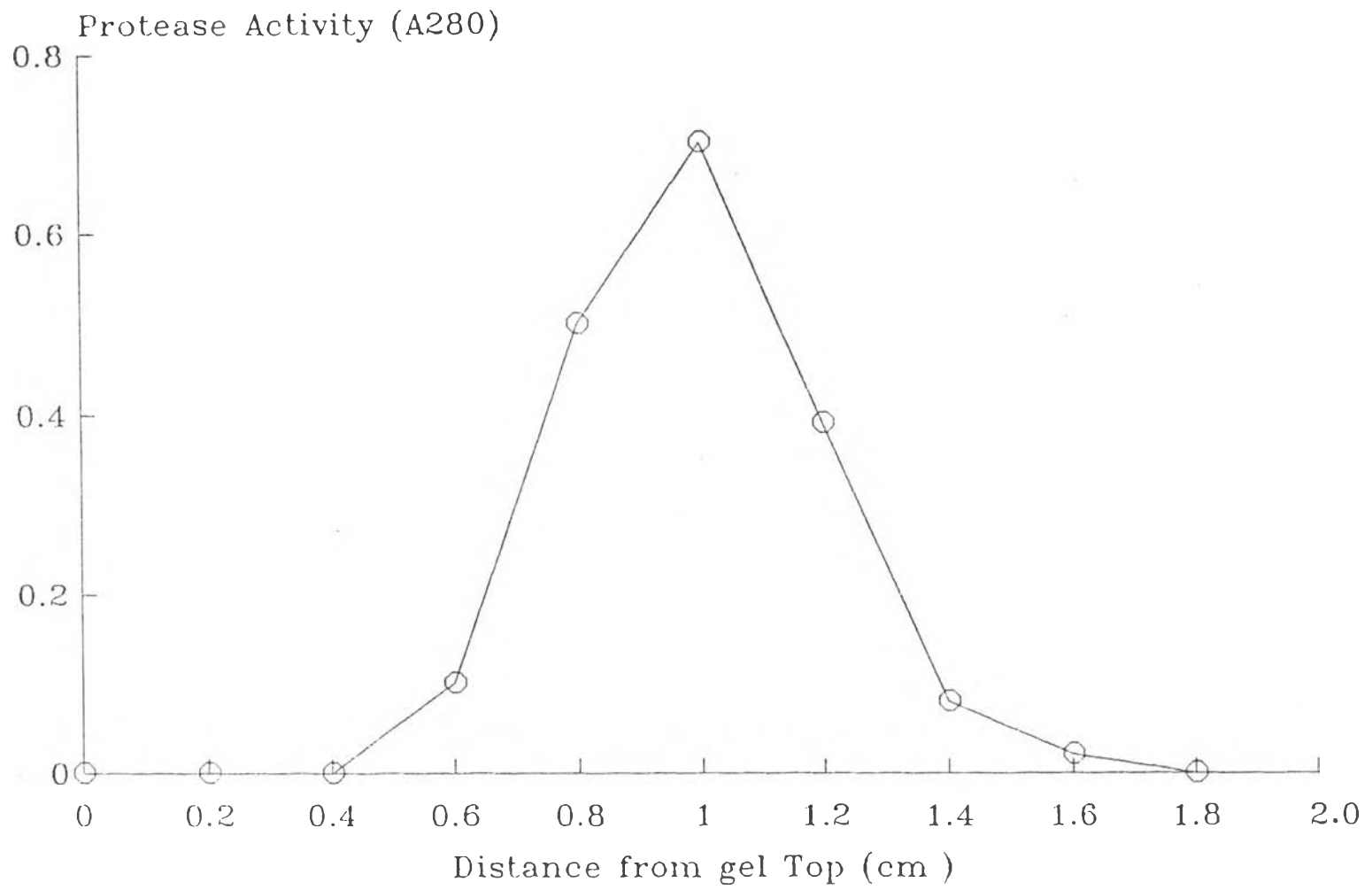
รูปที่ 4 รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆในการถนอมไขมันวัวที่สกัดโปรตีนจากไขมันวัวด้วยไตรคลอไรด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส pH 8.3

ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.6

1. crude enzyme แพร่ดชั้น ( 100 ไมโครกรัมโปรตีน )
2. 40-70% แอมโมเนียมซัลเฟตแพร่ดชั้น ( 100 ไมโครกรัมโปรตีน )
3. นีวทรัลโปรตีนเอส (peak B) จากคอลัมน์ ซีเอเอ็ม-เซลลูโลส ( 50 ไมโครกรัมโปรตีน )
4. นีวทรัลโปรตีนเอส (peak 2) จากคอลัมน์ เซฟาเดกซ์ G-75 ( 25 ไมโครกรัมโปรตีน )

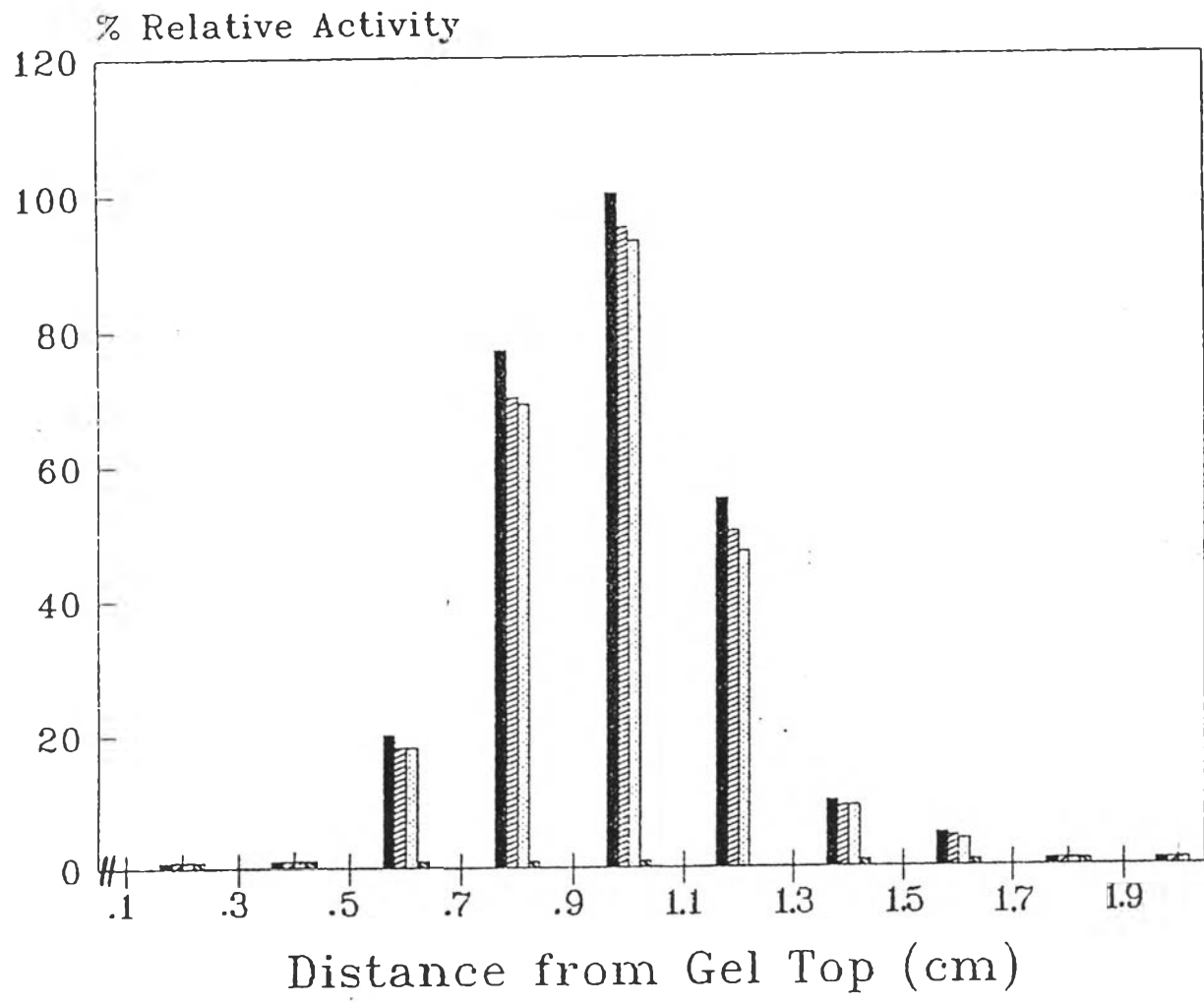


รูปที่ 5 แสดงตำแหน่งของแท่ง เจล โพลีอะคริลามิไดด์ ที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส (โดยการนำแท่งเจลที่ 3 จากรูปที่ 4 ที่ไม่ได้ย้อมสีโปรตีนมาตัดเป็นแถบย่อย แล้วสกัดแล้ววัด เอนไซม์แอกติวิตี)



รูปที่ 6 แสดงผลของ เอทานอล , PMSF และ Phenanthroline ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์  
โปรตีเอส จากแบคทีเรียแบ่ง เจล โพลีอะไครลาไมด์

- Control
- 10 % Ethanol
- 1mM PMSF
- 1mM Phenanthroline



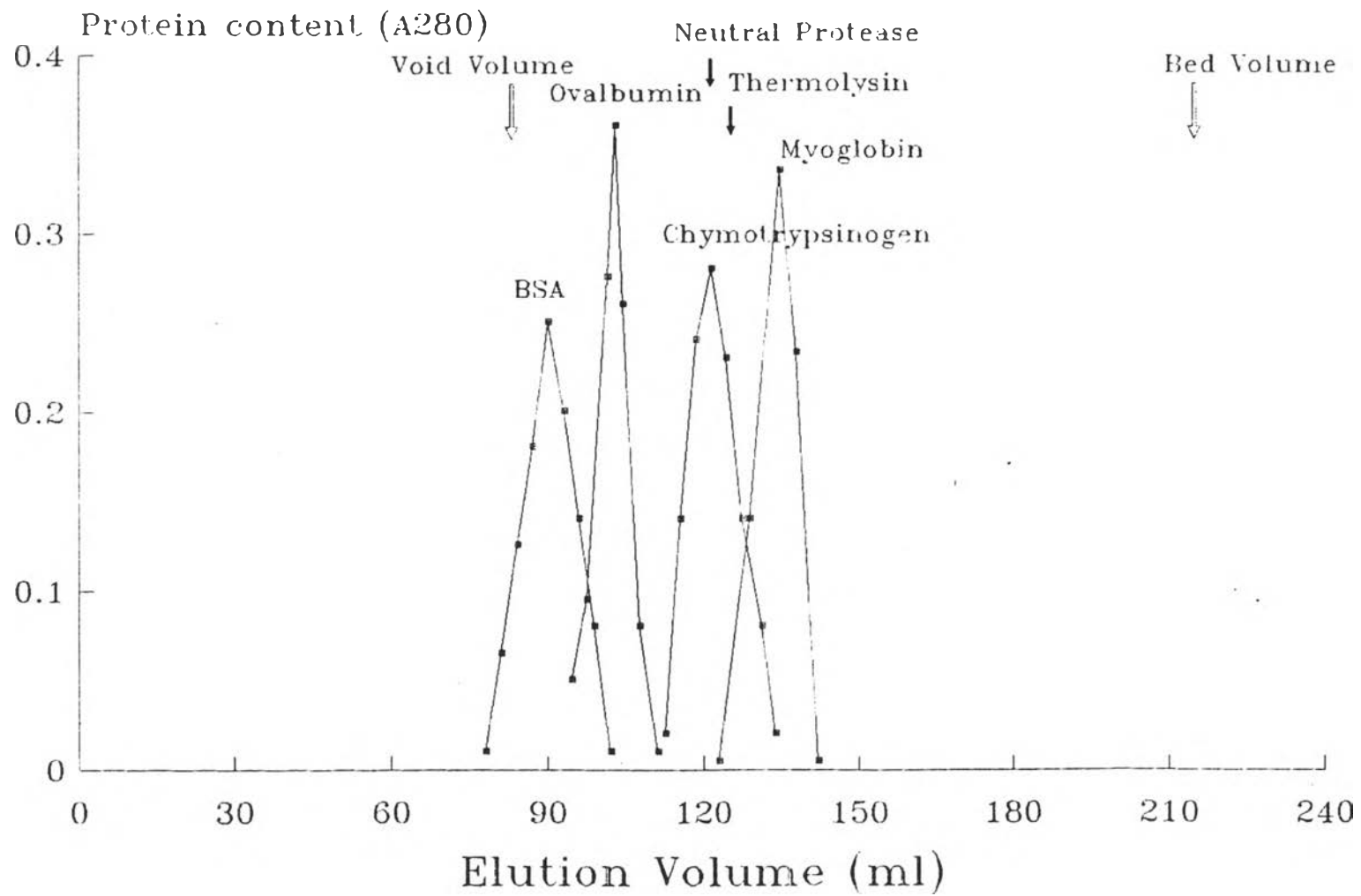
เป็น 10 ชั้นๆละ 2 มิลลิเมตร นำไปบดละลายในบัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่อุณหภูมิ 4 °C. ทั้งไว้ 10 ชั่วโมง เพื่อให้โปรตีนในแท่งเจลละลายออกมาในบัฟเฟอร์ แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ในแต่ละแฟรคชันออกมาวัดแอกติวิตีของโปรตีเอส ได้ผลการทดลองในรูปที่ 5 แสดงว่าโปรตีนแถบที่ระยะห่างจากขอบแท่งเจล 1 ซม. เท่านั้นที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส และเมื่อนำไปทดสอบชนิดของโปรตีเอสโดยใช้สารยับยั้ง PMSF และ O-Phenanthroline พบว่าในทุกแฟรคชันที่มีแอกติวิตีของโปรตีเอสถูกยับยั้งโดย O - Phenanthroline เท่านั้น ไม่ถูกยับยั้งด้วย PMSF (รูปที่ 6) จากผลที่ได้แถบโปรตีน 2-3 แถบ และมีแอกติวิตีของนิวทริลโปรตีเอสเพียงแถบเดียว แสดงว่าเอนไซม์ที่ได้ยังไม่บริสุทธิ์จึงนำโปรตีนจาก peak B หลังคอลัมน์ซีเอ็ม-เซลลูโลสไปทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75 ได้โปรตีนแยกออกเป็น 2 peak นำ peak ที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสมาตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับโปรตีนหลังคอลัมน์ซีเอ็ม-เซลลูโลส พบว่าเมื่อนำคอลัมน์เซฟาเด็กซ์แล้ว เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น เหลือแถบโปรตีนในเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเพียงแถบเดียว (รูปที่ 4) แสดงว่าด้วยขั้นตอนในข้อ 4.2 สามารถทำให้เอนไซม์นิวทริลโปรตีเอสมีความบริสุทธิ์สูง จึงนำเอนไซม์นี้ไปศึกษาสมบัติต่างๆในขั้นต่อไป

#### 4.4 ผลการศึกษาสมบัติของเอนไซม์นิวทริลโปรตีเอสที่มีความบริสุทธิ์สูง

##### 4.4.1 ผลการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี เจลฟิลเตรชัน

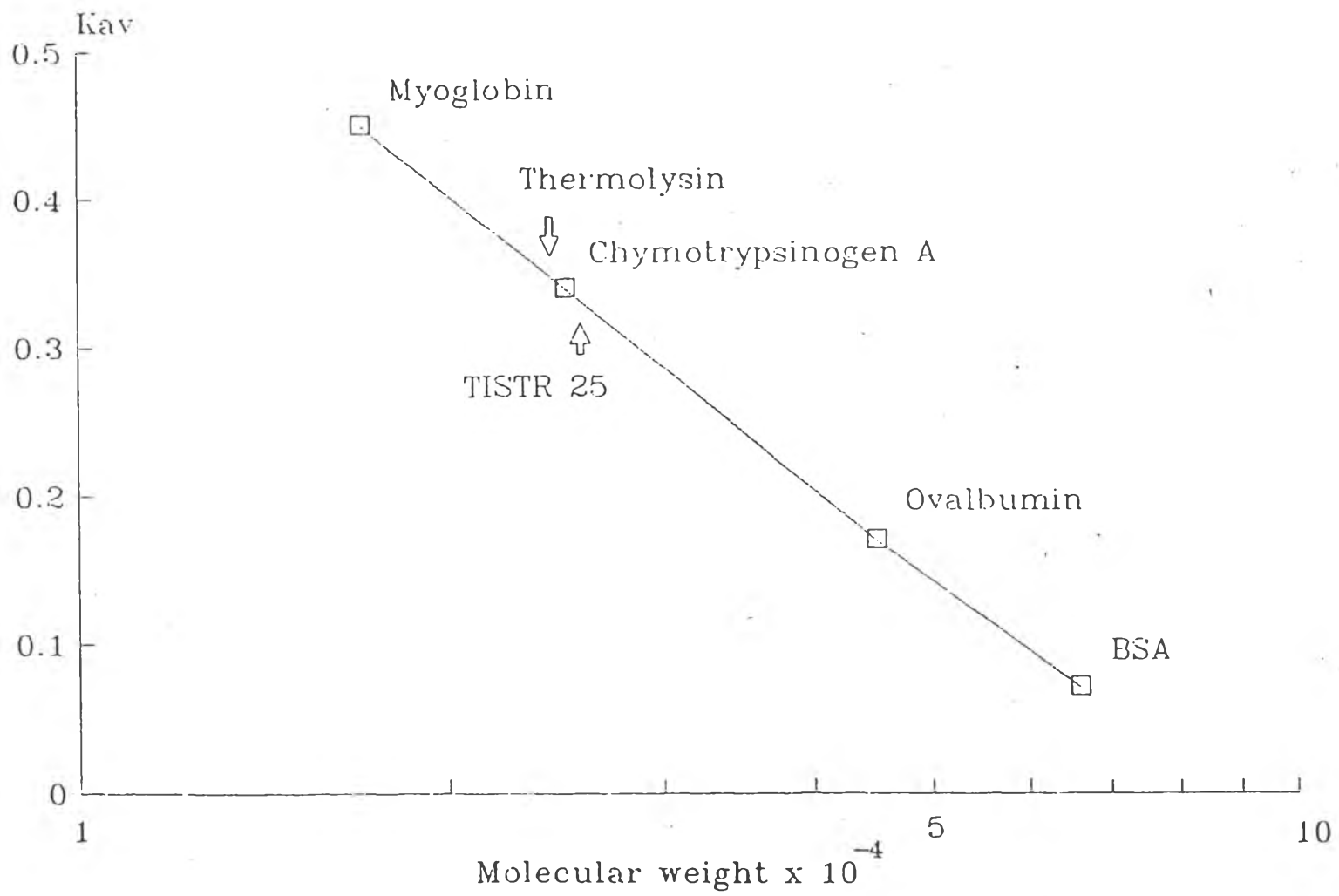
ผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐาน และสารละลายเอนไซม์นิวทริลโปรตีเอสที่แยกได้ลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75 แล้วชะออกด้วยอิมิตาโซลบัฟเฟอร์ (วิธีข้อ 3.7.1) ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 7 จะเห็นว่าโปรตีนมาตรฐาน BSA, Ovalbumin, Thermolysin, Chymotrypsinogen A และ Myoglobin ถูกชะออกจากคอลัมน์ด้วย elution volume 90, 103.5, 126, 124.5 และ 133.5 มล. ตามลำดับ ในขณะที่เอนไซม์นิวทริลโปรตีเอสจาก B.subtilis TISTR 25 ออกจากคอลัมน์ที่ elution volume 123 มล. เมื่อนำมาคำนวณค่า  $K_{av}$  เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 8) พบว่าเอนไซม์นิวทริลโปรตีเอสมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 27,000 วัตตัน

รูปที่ 7 รูปแบบการแยกโปรตีนในคอลัมน์เซฟาเด็คซ์ จี-75  
การหา elution volume ของโปรตีนมาตรฐาน และแกนไซม์นิวทริล โปรตีเอส  
เมื่อทาน้ำบัฟเฟอร์ของเอนไซม์ โดยคอลัมน์เซฟาเด็คซ์ จี-75 (ขนาด 1.7 X 85 ซม.)  
ตามวิธีทดลองในข้อ 3.7.1



รูปที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $K_{uv}$  และ  $\log$  ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน  
ในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของแอนไซม์เวทริลโปรตีนเอส โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี - 75  
(ขนาด 1.7 X 85 ซม.) ตามวิธีการทดลองข้อ 3.7.1



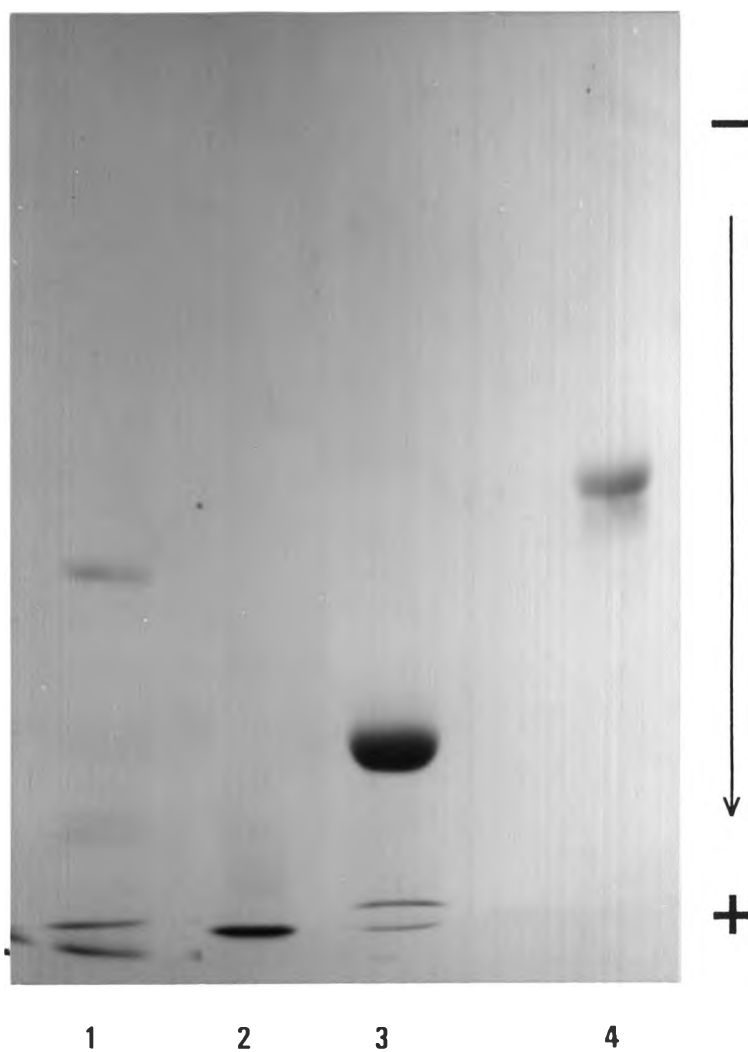


#### 4.4.2 ผลการศึกษาหน่วยย่อยและน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี เอสดีเอส โพลีอะครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส

นำนิวทรัลโปรตีเอสที่แยกได้บริสุทธิ์สูงจากข้อ 4.3 มาหาหน่วยย่อยและน้ำหนักโมเลกุล โดยวิธี เอสดีเอส-อีเลคโตรโฟรีซิส เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานได้ผลการทดลองในรูปที่ 9 พบว่ามีแถบโปรตีนขนาดใหญ่หนึ่งแถบ เคลื่อนที่อยู่ระหว่างโปรตีนมาตรฐาน Ovalbumin และ Chymotrypsinogen A และมีแถบโปรตีนย่อยขนาดเล็กเคลื่อนที่ใกล้เคียงกับ cytochrome C เห็นชัด 2 แถบ นอกจากนี้ยังมีแถบสีจางๆอีกหลายแถบในระหว่างกลาง ซึ่งน่าจะเป็นแถบโปรตีนที่เกิดจากการย่อยตัวเอง (autolysis) ของเอนไซม์ จึงทำการทดลองเพื่อพิสูจน์ข้อสันนิษฐานนี้ โดยเติม EDTA ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ลงในสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมเพื่อนำมาลงใน เอสดีเอส-อีเลคโตรโฟรีซิส ได้ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 10 ซึ่งพบว่าหลังเติม EDTA ได้แถบโปรตีนเพียงแถบเดียว และเคลื่อนที่ใน เอสดีเอส-โพลีอะครลาไมด์ เจล ด้วยค่า relative mobility ( $R_f$ ) เท่ากับ 0.54 เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $R_f$  กับน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน BSA, Ovalbumin, Chymotrypsinogen A, Thermolysin และ Myoglobin (รูปที่ 11) พบว่านิวทรัลโปรตีเอสจาก B.subtilis TISTR 25 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 37,000 ดาลตัน

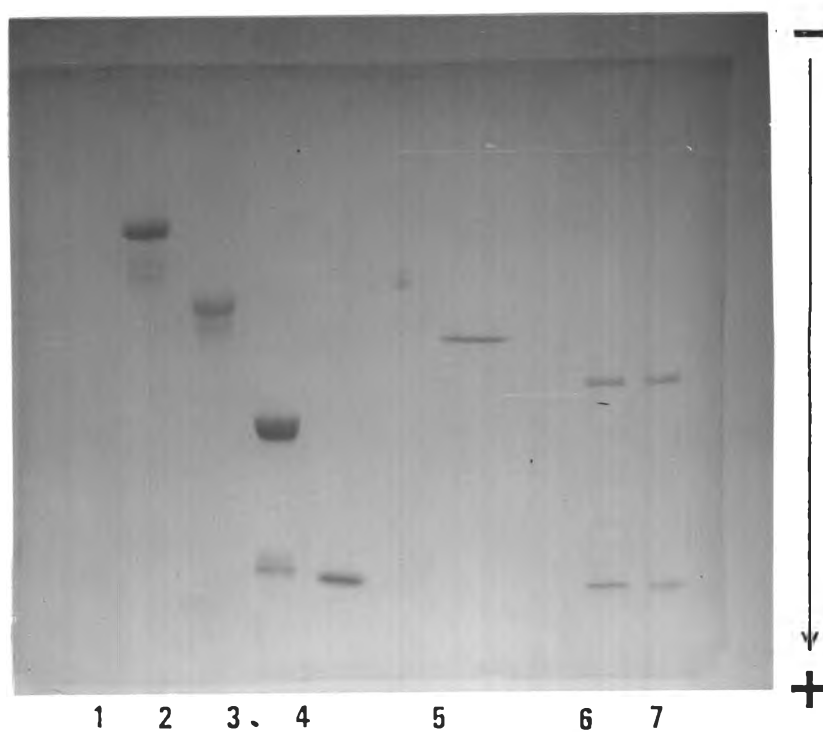
#### 4.4.3 ผลการศึกษา pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

ทำการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสที่ทำให้บริสุทธิ์จาก TISTR 25 และนิวทรัลโปรตีเอสที่มีผู้ศึกษาไว้แล้ว (commercial protease) จาก B.polymyxa และ Thermolysin จาก B.thermoproteolyticus โดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรท ในช่วง pH 4.5-10.0 ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 12 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า pH 7 เป็น pH ที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ทั้งสามชนิดในการเร่งปฏิกิริยาเมื่อใช้เคซีนเป็นสับสเตรท แต่ลักษณะ pH ที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์จาก B. polymyxa และ Thermolysin ค่อนข้างจะกว้างกว่าเอนไซม์จาก TISTR 25 คือ อยู่ในช่วง pH 6.5-8.5



รูปที่ 9 รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและเอนไซม์น้ำย่อยโปรตีน อส แยกโดย เอสดี เอส-โพลีอะคริลลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส วิธีทดลองข้อ 3.7.2)

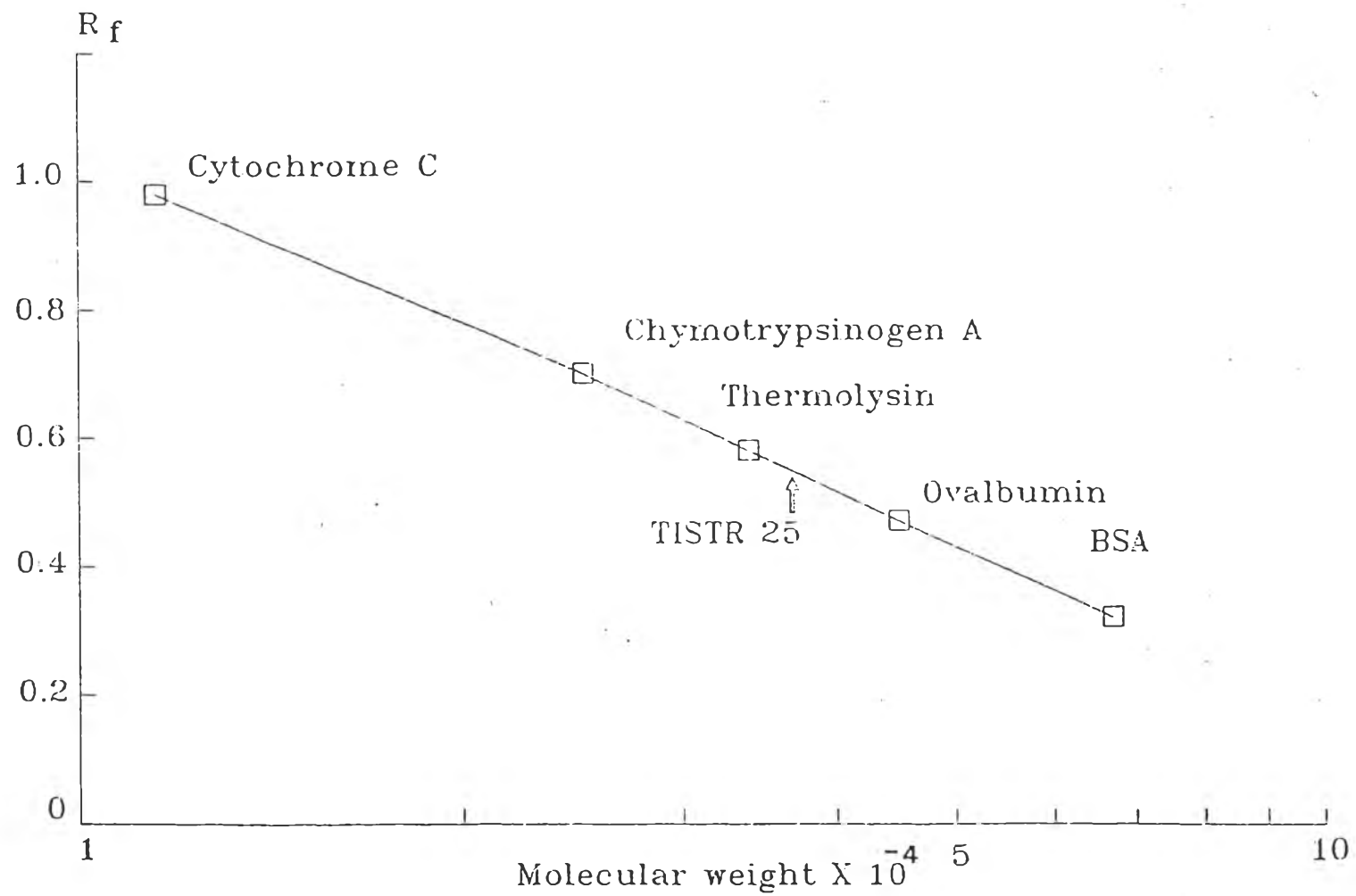
1. Neutral protease ที่ไม่มี EDTA ( 30 ไมโครกรัมโปรตีน)
2. Cytochrome C MW. 12,270 ดาลตัน ( 20 ไมโครกรัมโปรตีน)
3. Chymotrypsinogen A MW. 25,000 ดาลตัน ( 20 ไมโครกรัมโปรตีน)
4. Ovalbumin MW. 45,000 ดาลตัน ( 20 ไมโครกรัมโปรตีน)



รูปที่ 10 รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและเอนไซม์นิวทริลโปรตีเอส แยกโดย เอสดีเอส-โพลีอะคริลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส (วิธีทดลองข้อ 3.7.2)

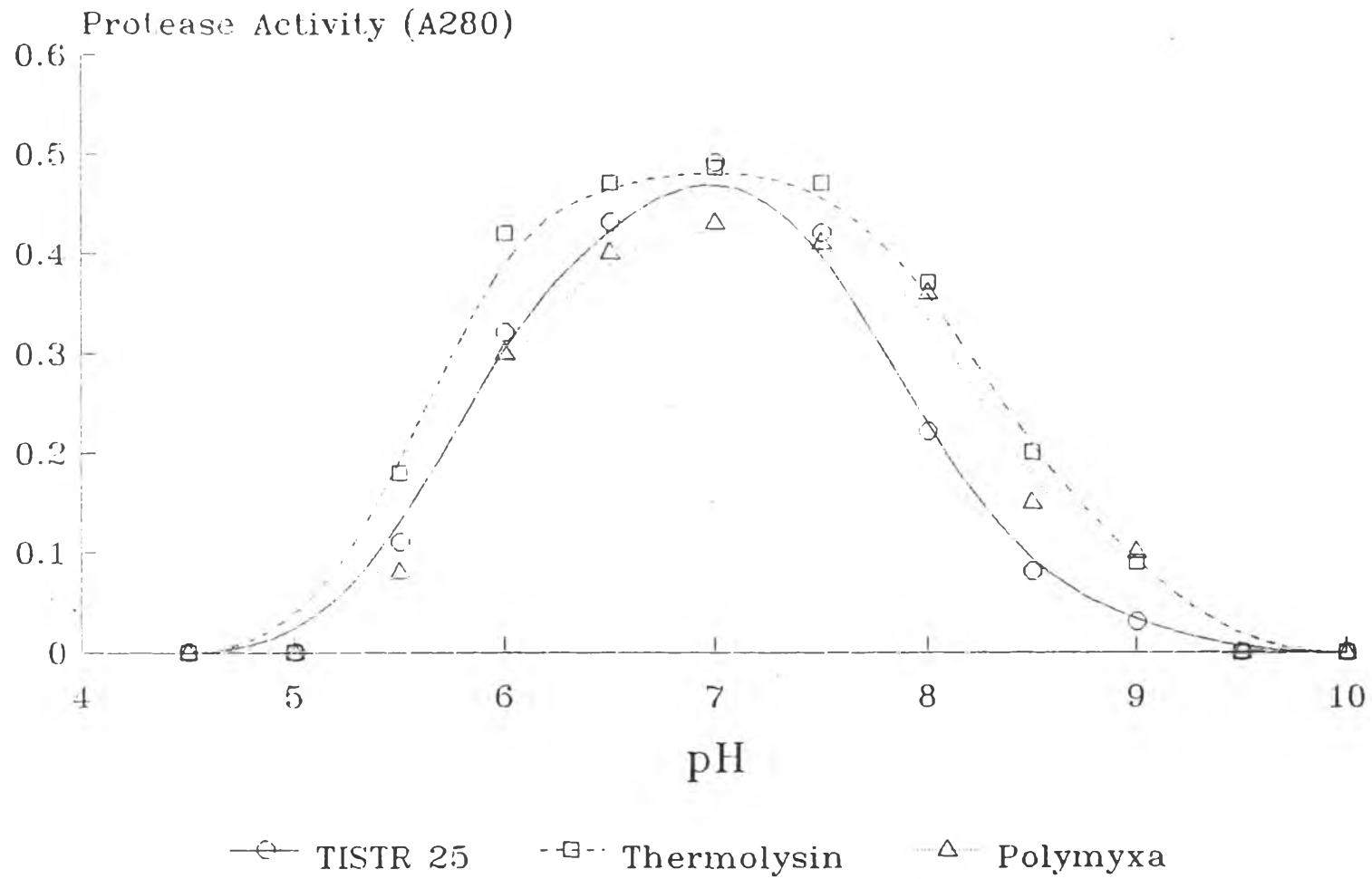
1. BSA MW.66,000 ดาลตัน ( 20 ไมโครกรัมโปรตีน)
2. Ovalbumin MW. 45,000 ดาลตัน ( 20 ไมโครกรัมโปรตีน)
3. Chymotrypsinogen A MW. 25,000 ดาลตัน ( 20 ไมโครกรัมโปรตีน)
4. Cytochrome C MW. 12,270 ดาลตัน ( 20 ไมโครกรัมโปรตีน)
5. Neutral protease ที่มี EDTA ( 30 ไมโครกรัมโปรตีน)
- 6,7 Thermolysin ( 30 ไมโครกรัมโปรตีน)

รูปที่ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Relative mobility และ  $\log$   
ของน้ำสกัดโมลกุลของโปรตีนมาตรฐาน ในการศึกษา น้ำสกัดโมลกุลของแอนไซม์วัวถั่ว  
โปรตีนเอส โดยวิธีเอสดีเอส-โกลีอะโครลาไมด์ เจล อีเลคโตรโฟรีซิส (วิธีทดลองข้อ 3.7.2)



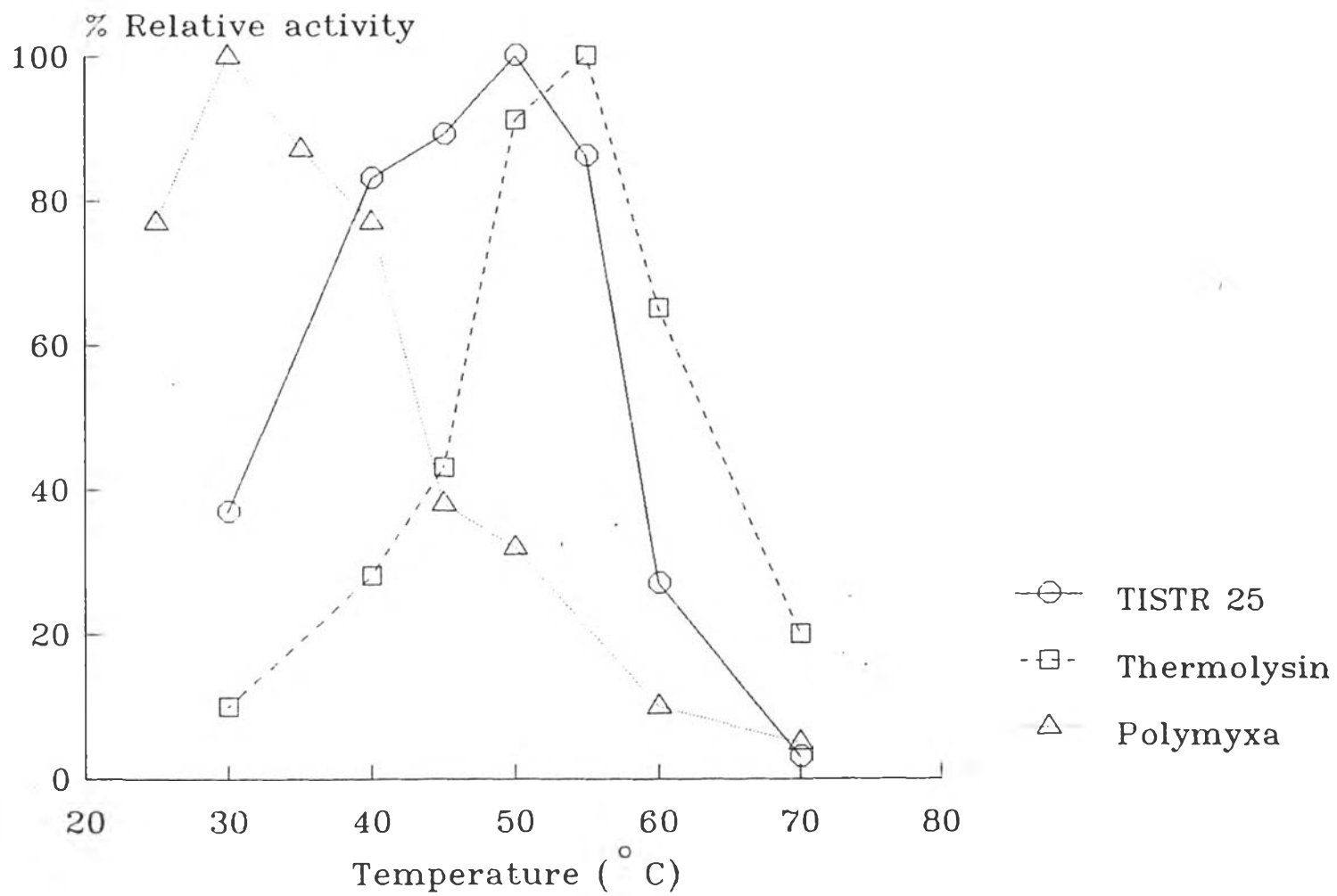
รูปที่ 12 ผลของ pH ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์นิวทริลโปรตีเอสจาก B.subtilis TISTR 25  
เปรียบเทียบกับเอนไซม์มาตรฐาน Thermolysin และนิวทริลโปรตีเอสจาก B.polymyxa  
วัดแอกติวิตีที่ pH ต่างๆตามวิธีในข้อ 3.3.2

<u>ชนิดของบัฟเฟอร์</u>	<u>pH</u>
อะซีเตต	4.5-5.5
อิมิดาโซล	5.5-7.5
คาโคไดเลต	7.0-8.5
คาร์บอเนต	8.5-10.0





รูปที่ 13 ผลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของนิวทริลโปรตีเอสจาก B. subtilis TISTR 25  
เปรียบเทียบกับเอนไซม์มาตรฐาน Thermolysin และเอนไซม์จาก B. polymyxa  
วัดแอกติวิตีที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 20-70 °C ที่ pH 7 ตามวิธีทดลองในข้อ 3.7.4



เมื่อวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ทั้งสามชนิดที่อุณหภูมิ 20-70 °C ได้ผลแสดงในรูปที่ 13 คือ นิวกัลโปรตีนเอสจาก TISTR 25, นิวกัลโปรตีนเอสจาก B. polymyxa และ Thermolysin เร่งปฏิกิริยาได้ดี ที่อุณหภูมิ 50, 30 และ 55 องศาเซลเซียสตามลำดับ

#### 4.4.4 ผลการศึกษาอุณหภูมิก่อนการเก็บเอนไซม์

นำเอนไซม์นิวกัลโปรตีนเอสที่ทำไว้บริสุทธิ์แล้วไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 และ 4 °C โดยเอนไซม์จะละลายอยู่ใน 10 มิลลิโมลาร์อิมิตาโซล 10 มิลลิโมลาร์ไคเฟออร์ pH 6.5 ที่มี 2 มิลลิโมลาร์แคลเซียมคลอไรด์อยู่ด้วย เป็นเวลา 1, 2, 5, 7, 9, 15, 30, 60 วัน แล้วนำมาวัดแอกติวิตี ได้ผลแสดงในรูปที่ 14 จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ไม่ค่อยเสถียร ไม่สามารถทนต่อการ freeze และ thaw เมื่อเก็บที่ -20 °C การเก็บเอนไซม์ที่ 4 °C จะเหมาะสมกว่า สามารถเก็บได้ 1 สัปดาห์ โดยไม่สูญเสียแอกติวิตี แต่แอกติวิตีจะลดลงเหลือเพียง 60 และ 20 เปอร์เซ็นต์ หลังการเก็บไว้ 2 และ 4 สัปดาห์ ตามลำดับ

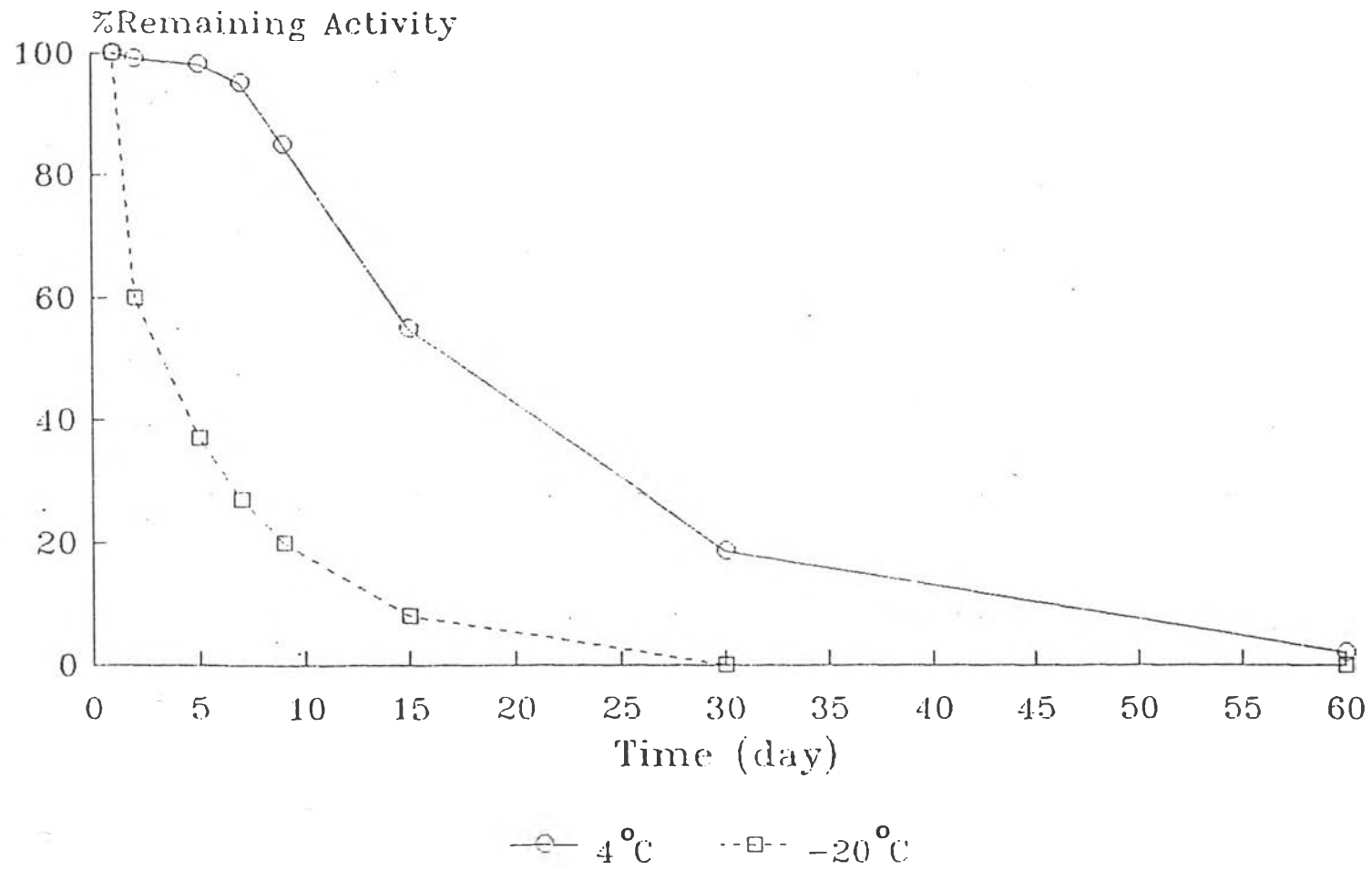
#### 4.4.5 ผลการศึกษาปฏิกิริยาการเร่งการไฮโดรไลสซิสโปรตีน

วัดแอกติวิตีของเอนไซม์นิวกัลโปรตีนเอสจาก TISTR 25 เปรียบเทียบกับ Thermolysin ตามข้อ 3.6.2 โดยใช้โปรตีนสับสเตรกต่าง ๆ คือ Casein, Hemoglobin และ Azocoll มาวัดค่า  $K_m$  และ  $V_{max}$  ของสับสเตรกแต่ละชนิดโดยวิธี Lineweaver Burk plot ได้ผลแสดงในรูปที่ 14-16 และสรุปไว้ในตารางที่ 3 พบว่าค่า  $K_m$  ของเอนไซม์จาก TISTR 25 สำหรับสับสเตรกทั้ง 3 ชนิดมีค่าสูงกว่าค่า  $K_m$  ของเอนไซม์ Thermolysin แสดงว่าเอนไซม์จาก TISTR 25 มีความสามารถยึดจับกับสับสเตรก Casein, Hemoglobin และ Azocoll ได้ไม่ดีเท่า Thermolysin และเมื่อเปรียบเทียบกับความเร็วสูงสุดในการเร่งปฏิกิริยา ( $V_{max}$ ) ของเอนไซม์ทั้งสองชนิด พบว่านิวกัลโปรตีนเอสจาก TISTR 25 เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลสซิสโปรตีนทั้ง 3 ชนิดได้ดีกว่า Thermolysin อย่างเห็นได้ชัด

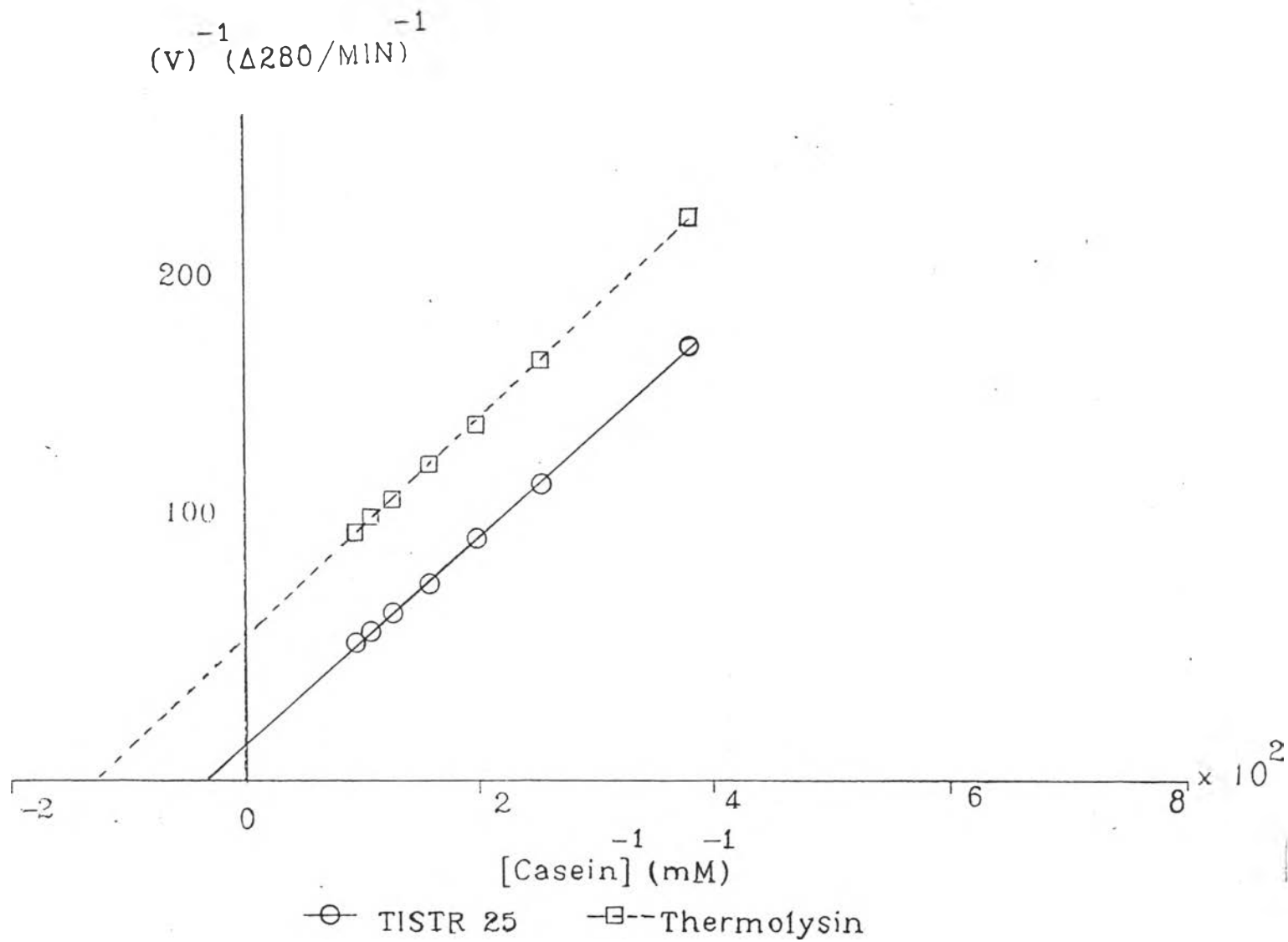
#### 4.4.6 ผลการศึกษาปฏิกิริยาการเร่งการย่อยสลายทีระเอสเทอร์

การศึกษาปฏิกิริยาการเร่งการย่อยสลายทีระเอสเทอร์ ของเอนไซม์นิวกัลโปรตีนเอสจาก TISTR 25 โดยใช้ N-Benzoyl-L-Tyrosine Ethyl Ester (BTEE)

รูปที่ 14 ความเสถียรของเอนไซม์นิวคลีโอโปรตีนเอส จาก B. subtilis TISTR 25  
เมื่อเก็บในสารละลาย 10 มิลลิโมล/ลิตร อิมิดาโซลีนเฟอริล pH 6.5 ที่มี 2 มิลลิโมลาร์  
แคลเซียมคลอไรด์ในช่วงเวลาต่าง ๆ กัน ที่อุณหภูมิ 4 °C และ -20 °C

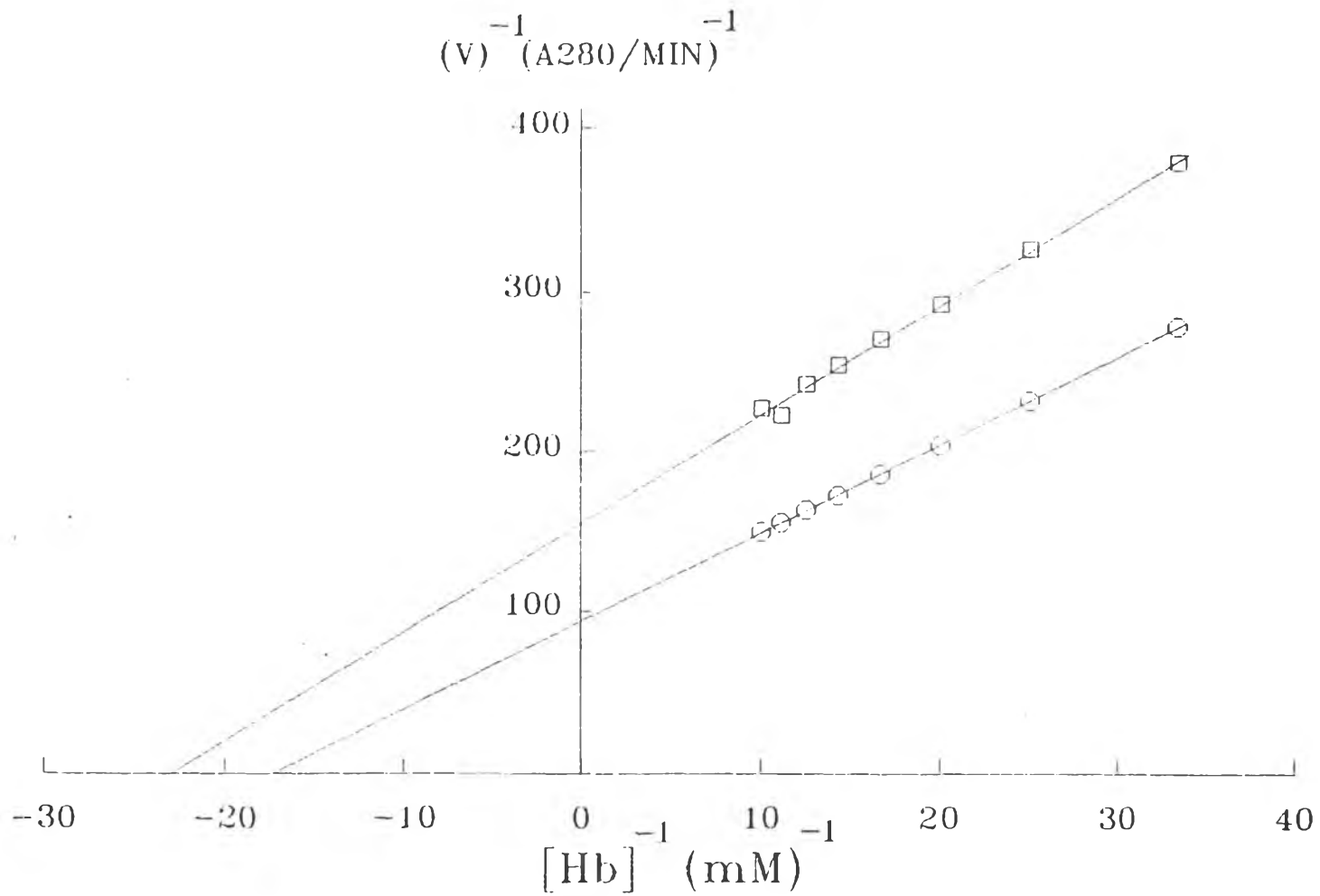


รูปที่ 15 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์ชาทรอลโปรตีเอส เปรียบเทียบกับ  
Thermolysin เมื่อใช้ casein เป็นสับสเตรท ทำการวัดแอกติวิตี ที่อุณหภูมิ 50 °C  
pH 7 ตามวิธีในข้อ 3.3.2



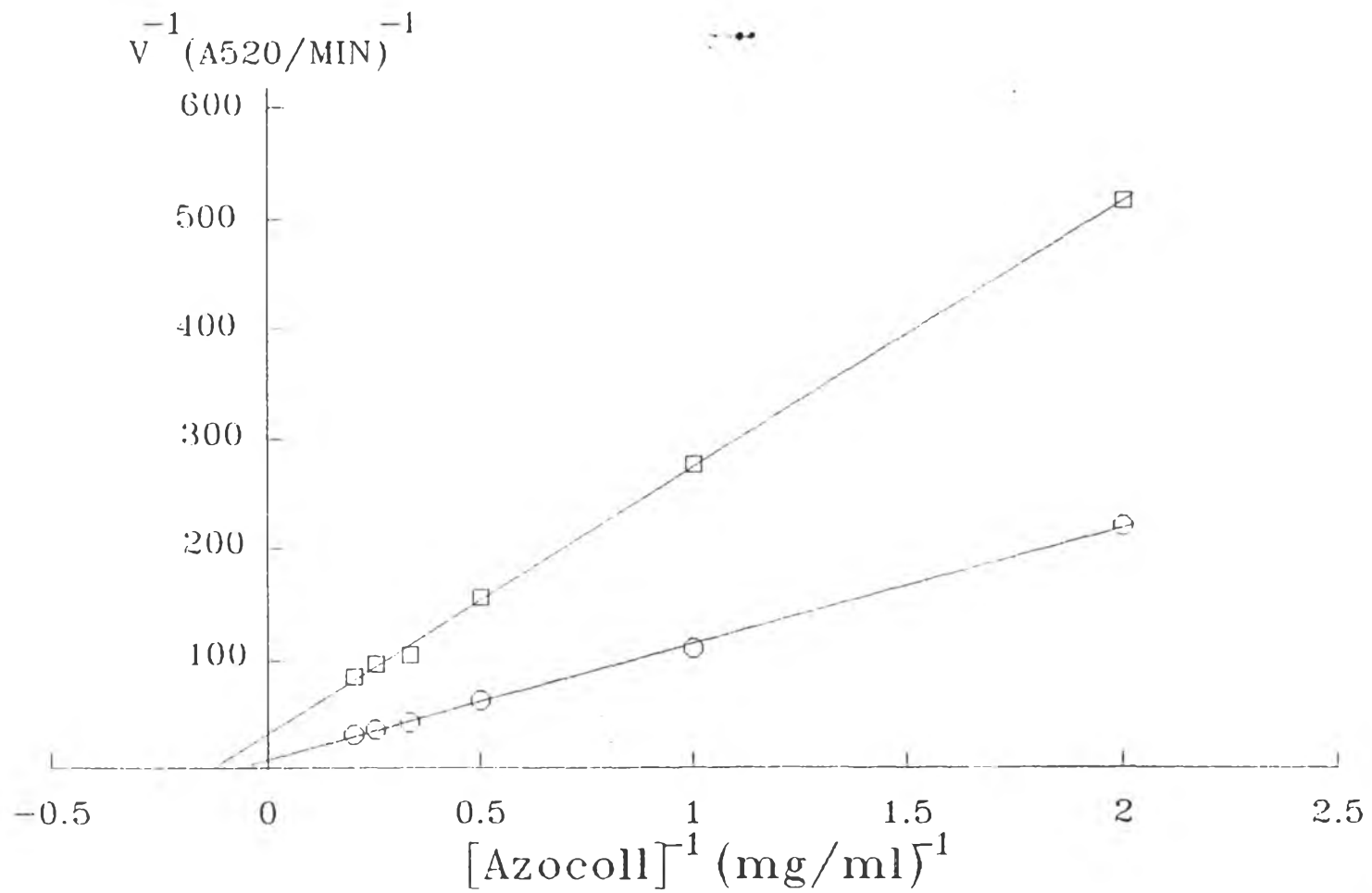
รูปที่ 16 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์ฮีมาทรีน โปรตีเอส เปรียบเทียบกับ Thermolysin เมื่อใช้ hemoglobin เป็นสับสเตรท ทำการวัดแอกติวิตีที่อุณหภูมิ 50 °C pH 7 ตามวิธีในข้อ 3.3.2





—○— TISTR 25      —□— Thermolysin

รูปที่ 17 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์แคทาลิโปรตีเอสเปรียบเทียบกับ Thermolysin เมื่อใช้ azocoll เป็นสับสเตรท ทำการวัดแอดติวิตีที่อุณหภูมิ 50 °C pH 7 ตามวิธีในข้อ 3.3.2 ทุกประการ ยกเว้นหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปแช่น้ำแข็งแทกการเติม 10 เปอร์เซ็นต์กรดไตรคลอโรอะซิติก วัดสีในส่วนน้ำใสที่  $A_{520}$



—○— TISTR 25    —□— Thermolysin

ตารางที่ ๒ สรุปลค่า  $K_m$  และ  $V_{max}$  ของเอนไซม์ทริคัลโปรตีเอสกับ Thermolysin  
เมื่อใช้โปรตีนต่างชนิดเป็นสับสเตรท (วิธีทดลองข้อ 3.3.2)

สับสเตรท	ชนิดของ เอนไซม์ทริคัล โปรตีเอส	ค่าคงที่ทาง จลนศาสตร์	
		$K_m$ *	$V_{max}$ **
Casein	TISTR 25	0.04	0.086
	Thermolysin	0.01	0.022
Hemoglobin	TISTR 25	0.05	0.011
	Thermolysin	0.04	0.006
Azocoll	TISTR 25	15.15	0.150
	Thermolysin	8.60	0.033

\*  $K_m$  ของ casein และ hemoglobin มีหน่วยเป็น มิลลิโมล/ลิตร แต่ azocoll มีหน่วยเป็น มก./มล.

\*\*  $V_{max}$  มีหน่วยเป็น  $A_{280} / \text{min}$  สำหรับสับสเตรท Casein และ Hemoglobin  
 $A_{520} / \text{min}$  สำหรับสับสเตรท Azocoll

เป็นสับสเตรตตามวิธีในข้อ 3.7.7 พบว่านิเวทรีลนิเวทรีลโปรตีเอสจาก TISTR 25 และ Thermolysin ไม่สามารถเร่งการย่อยสลายใยธะเอสเทอร์

#### 4.4.7 ผลการศึกษาอิทธิพลของ ไอออนโลหะและตัวยับยั้งต่อแอกติวิตีของเอนไซม์

จากการศึกษาอิทธิพลของ ไอออนโลหะชนิดต่างๆต่อแอกติวิตีของเอนไซม์นิเวทรีลโปรตีเอสจากสายพันธุ์ TISTR 25 ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.7.8 ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4 พบว่า  $Ca^{++}$  และ  $Mg^{++}$  มีผลทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย (5-14%) ขณะที่  $Fe^{++}$ ,  $Mn^{++}$  และ  $Co^{++}$  มีผลลดแอกติวิตีของเอนไซม์ลงไปประมาณ 10-15 % และ  $Zn^{++}$  ทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์ลดลงอย่างชัดเจนถึง 50 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 5 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของตัวยับยั้งชนิดต่างๆต่อเอนไซม์ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า สารคีเลตติ้ง EDTA และ O-Phenanthroline สามารถยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ได้หมด โดยที่สารชนิดอื่นที่ใช้ทดลองในสภาวะเดียวกันไม่สามารถยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ได้ แสดงว่าโมเลกุลของเอนไซม์น่าจะมีไอออนโลหะที่จำเป็นต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

#### 4.4.8 ผลการศึกษาความสำคัญของ $Zn^{++}$ ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์

จากผลการทดลองในตารางที่ 6 พบว่าเอนไซม์นิเวทรีลโปรตีเอสจาก TISTR 25 และ Thermolysin มีปริมาณ  $Zn^{++}$  เท่ากับ 0.85 และ 1.20 ppm ซึ่งคิดเป็นปริมาณของ  $Zn^{++}$  ต่อโมเลกุลของเอนไซม์เท่ากับ 1.5 และ 2 อะตอม/โมเลกุล ตามลำดับ และหลังจากไดอะไลส์เอนไซม์ในบัฟเฟอร์ pH 7 ที่มี EDTA และ  $CaCl_2$  ความเข้มข้นอย่างละ 2 มิลลิโมลาร์ พบว่าปริมาณ  $Zn^{++}$  ลดลงประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ แต่แอกติวิตีลดลงเกือบหมด และเมื่อไดอะไลส์เอนไซม์ในบัฟเฟอร์เดิมที่ไม่มี EDTA แต่มี  $CaCl_2$  ปริมาณ  $Zn^{++}$  ที่วัดได้เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ขณะที่แอกติวิตีก็เพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 18 เปอร์เซ็นต์ของค่า control การเติม  $Zn^{++}$  ให้กับเอนไซม์ที่ถูก inactivate ด้วย EDTA โดยการไดอะไลส์เพิ่มในบัฟเฟอร์เดิมที่ไม่มีทั้ง EDTA และ  $CaCl_2$  แต่มี  $Zn^{++}$  ที่ความเข้มข้น 0.5, 1 หรือ 2 มิลลิโมลาร์ พบว่าปริมาณ  $Zn^{++}$  ที่วัดได้ (ทั้งในรูปอิสระและจับกับเอนไซม์) เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ  $Zn^{++}$  ที่เติม และแอกติวิตีของเอนไซม์ก็เพิ่มขึ้นตามลำดับด้วย

ตารางที่ 4 ผลของไอออนของโลหะต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ฟิวรัลโปรตีเอสจาก  
*B. subtilis* TISTR 25

1 mM metal ion	% Remaining activity
control	100
Mg <sup>++</sup>	105.5
Mn <sup>++</sup>	87.7
Fe <sup>++</sup>	90.4
Zn <sup>++</sup>	49.7
Ca <sup>++</sup>	114.0
Co <sup>++</sup>	85.5

ตารางที่ 5 ผลของสารเคมีต่างชนิดต่อเอนไซม์ของไมทริลโปรตีเอสจาก  
*B. subtilis* TISTR 25

Inhibitors	% Remaining activity
control	100
10 % Ethanol	97.0
10 mM PMSF	97.1
10 mM 1,10-Phenanthroline	0
10 mM EDTA	0
10 mM Iodoacetamide	92.8
10 mM p-Chloromercuribenzoic acid	101.4
10 mM N-ethylmaleimide	97.3





### การแทนที่ $Zn^{++}$ ด้วยโควาเลนต์ไอออนชนิดอื่น

จากผลการทดลองในตารางที่ 7 พบว่าเมื่อ inactivate เอนไซม์ ด้วยการเติม 1 มิลลิโมลาร์ EDTA ที่ 4°C เป็นเวลา 20 นาที ตามวิธีทดลองในข้อ 3.7.9 มีผลทำให้เอนไซม์มีแอกติวิตีเอนไซม์ลดลงประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเติมโควาเลนต์ไอออนชนิดอื่นลงไป ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ในปริมาณที่ทำให้เอนไซม์กับ EDTA เจือจางลง 20 เท่า พบว่าโควาเลนต์ไอออนที่ทำให้เอนไซม์มีแอกติวิตีกลับคืนมามากที่สุด (20-30%) คือ  $Co^{++}$ ,  $Mn^{++}$  และ  $Zn^{++}$  ส่วน  $Ca^{++}$ ,  $Fe^{++}$  และ  $Mg^{++}$  ทำให้แอกติวิตีกลับคืนมาบ้างเล็กน้อย (8-16%) ในสภาวะที่ทำการทดลอง

#### 4.4.9 ผลการศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อเปปไทด์สังเคราะห์

จากการศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์นิวทริลโปรตีเอสจาก TISTR 25 เปรียบเทียบกับ Thermolysin ต่อสับสเตรทที่เป็นเปปไทด์สังเคราะห์ชนิดที่ปลายอะมิโนอิสระและไม่อิสระ สำหรับสับสเตรทที่มีกลุ่ม pNA ที่ปลายคาร์บอกซิลและมีปลายอะมิโนไม่อิสระสามารถติดตามปฏิกิริยาโดยวัดการเกิดสีของ pNA ซึ่งมีการดูดกลืนแสงที่ 105 นาโนเมตร พบว่าด้วยวิธีนี้สามารถติดตามจลนศาสตร์ของการย่อยเปปไทด์โดยเอนไซม์ในเวลา 5 นาที ได้เฉพาะคู่ของเอนไซม์-สับสเตรท ระหว่างเอนไซม์จาก TISTR 25 กับสับสเตรทที่เป็น Succ-Ala-Ala-Pro-Leu pNA และ pNA (รูปที่ 18) และเมื่อเพิ่มระยะเวลาการทำปฏิกิริยาให้มากขึ้นจนปฏิกิริยาเกิดขึ้นโดยสมบูรณ์ (10 ชม.) แล้วนำไฮโดรไลเสทที่ได้ไป spot TLC plate ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 8 และ รูปที่ 19 พบว่าเอนไซม์จาก TISTR 25 สามารถตัดสับสเตรท Succ-Ala-Ala-Pro-Leu pNA ที่ตำแหน่งระหว่าง Leu กับ pNA หรือที่ตำแหน่งปลายด้านอะมิโนของ Leu เช่นเดียวกับเอนไซม์ Thermolysin และสำหรับสับสเตรท Succ-Ala-Ala-Pro-Phe pNA เอนไซม์จาก TISTR 25 สามารถตัดที่ตำแหน่งระหว่าง Phe กับ pNA ซึ่งต่างจาก Thermolysin ที่ตัดที่ตำแหน่งระหว่าง Pro กับ Phe สำหรับสับสเตรทที่มีลิและปลายอะมิโนไม่อิสระอื่นๆ (ตารางที่ 8) พบว่าถ้าสับสเตรทมีขนาดเล็ก คือ มีกรดอะมิโนเพียงตัวเดียว เช่น NBZ-Arg pNA , NBZ-Tyr pNA และ Succ-Phe pNA เอนไซม์ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา

ตารางที่ 7 การแทนที่  $Zn^{++}$  ด้วยไอออนชนิดอื่น

เอนไซม์จาก TISTR 25	% Remaining Activity
control	100
Inactivation: EDTA	19.4
Reactivation: $Ca^{++}$	24.0
$Co^{++}$	43.0
$Mg^{++}$	16.8
$Mn^{++}$	35.1
$Fe^{++}$	22.2
$Zn^{++}$	31.9
none	8.2

\* นำเอนไซม์นิวทริลโปรตีเอสจาก TISTR 25 มาอินคิวเบตกับ 1 mM EDTA ที่ 4°C 20 นาที แล้วจึงนำมาเติม 1mM ไอออนชนิดต่างๆ ที่ 4°C.20 นาที (รายละเอียดวิธีทดลองแสดงในข้อที่ 3.7.9)

ช่วยสับสเตรตได้ แต่ถ้านิยามาสับสเตรตที่มีขนาดใหญ่ขึ้น เช่น เป็น tripeptide ได้แก่ Succ-Ala-Ala-Ala pNA และ NBz-Phe-Val-Arg pNA พบว่าตำแหน่งที่ถูกนิวทริลโปรตีเอสจาก TISTR 25 และ Thermolysin ตัดคือ พันธะที่ต่อระหว่าง Arg กับ pNA ส่วนสับสเตรต NBz-Val-Gly-Arg pNA พบว่าเอนไซม์จาก TISTR 25 อาจตัดที่ตำแหน่งระหว่าง Gly-Arg หรือที่ระหว่าง Arg กับ pNA ขณะที่ Thermolysin ตัดเฉพาะตำแหน่งระหว่าง Arg กับ pNA และสำหรับสับสเตรต NBz-Pro-Phe-Arg pNA เอนไซม์จาก TISTR 25 อาจตัดที่ตำแหน่งระหว่าง Pro กับ Phe, หรือ Phe กับ Arg และระหว่าง Arg กับ pNA ส่วน Thermolysin ตัดสับสเตรตที่ตำแหน่งระหว่าง Pro กับ Phe และที่ Arg กับ pNA เช่นกัน ผลสรุปจากตารางที่ 8 แสดงไว้ในรูปที่ 19 ซึ่งจะเห็นว่าสำหรับสับสเตรตที่มีกรดอะมิโน 3 หรือ 4 ตัว ที่ปลายอะมิโนไมเอิสระนี้ตำแหน่งส่วนใหญ่ที่ถูกตัดโดยเอนไซม์นิวทริลโปรตีเอสทั้งสองชนิดนี้ คือพันธะที่ต่อระหว่างเปปไทด์ที่ปลายด้าน C กับ pNA ไม่ว่ากรดอะมิโนที่ปลาย C จะเป็นชนิดใด นอกจากนั้นเอนไซม์มักจะตัดที่ปลาย N ของกรดอะมิโนขนาดใหญ่ เช่น Leu, Phe และ Arg

เมื่อศึกษาการไฮโดรไลสสับสเตรตชนิดปลายอะมิโนอิสระ โดยนำไฮโดรไลสจากการบ่มเอนไซม์และสับสเตรตนาน 10 ชม. ไป spot บนแผ่น TLC เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบกับระหว่างสับสเตรตที่เป็น tripeptide และ tetrapeptide (ตารางที่ 9, รูปที่ 20) พบว่านิวทริลโปรตีเอสทั้งสองชนิดตัดที่ปลาย N ของกรดอะมิโน Phe และ Leu ในสับสเตรต Gly-Gly-Phe, Gly-Gly-Leu และ Gly-Phe-Ala-Ala และตัดที่ตำแหน่งระหว่าง Phe กับ pNA สำหรับสับสเตรต Ala-Ala-Phe pNA แต่เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ไม่สามารถตัดพันธะเปปไทด์ในสับสเตรต Gly-Gly-Ala และ Gly-Pro-Ala แสดงว่าเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถตัดพันธะเปปไทด์ได้เฉพาะใน สับสเตรตที่มีกรดอะมิโนขนาดใหญ่ (bulky amino acid) เช่น Phe หรือ Leu

ตารางที่ 10 เป็นผลโดยสรุปแสดงความจำเพาะของเอนไซม์จาก TISTR 25 เปรียบเทียบกับ Thermolysin ในการไฮโดรไลสเปปไทด์สังเคราะห์ทั้งสองกลุ่มคือ ชนิดปลายอะมิโนอิสระและไมเอิสระ ซึ่งสรุปได้ว่าเอนไซม์ทั้งสอง มีความจำเพาะต่อเปปไทด์สับสเตรตเหมือนกัน

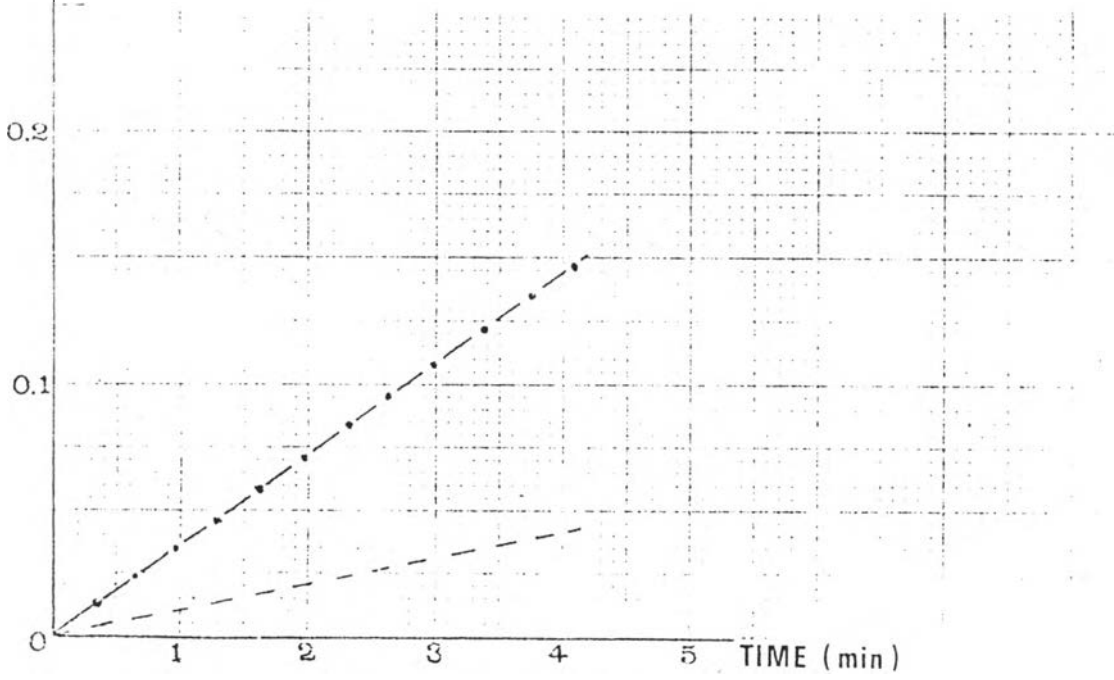
SPECTRONIC

A405

0.5-

รูปที่ 18 การติดตามผลปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิสเปปไทด์สังเคราะห์ที่มีผล  
Suc-Ala-Ala-Pro-Leu pNA และ Suc-Ala-Ala-Pro-Phe pNA  
ตามวิธีทดลองที่ 3.7.10 ติดตามผลโดยการวัดการดูดกลืนแสงที่  
ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

----- Suc-Ala-Ala-Pro-Leu pNA  
-.-.-.-.- Suc-Ala-Ala-Pro-Phe pNA



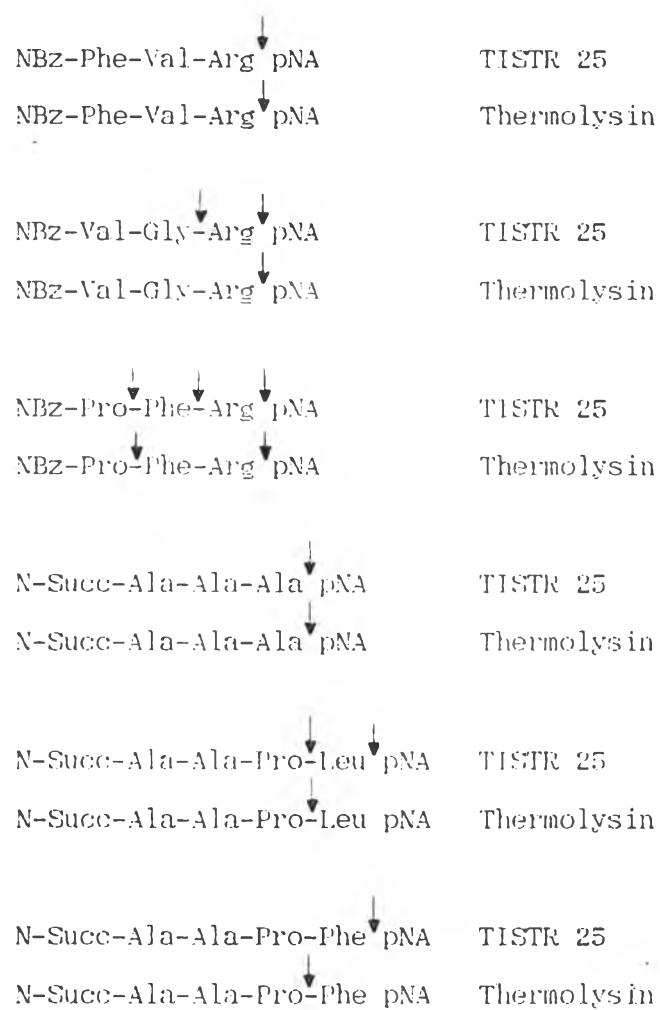
ตารางที่ 8 ค่า  $R_f$  ของ spot บนแผ่น TLC ของกรดอะมิโนมาตรฐาน และ enzyme hydrolysates ที่ได้จากการอินคิวบต. เอนไซม์ชนิดต่างๆกับ สับสเตรทชนิดละลายอะมิโนไโกลิซีน

Synthetic peptides and amino acids	$R_f$		
	control	TISTR 25	Thermolysin
p-Nitroaniline	0.80		
Ala	0.43		
Val	0.57		
Arg	0.25		
Tyr	0.64		
Pro	0.34		
Phe	0.69		
Leu	0.67		
Leu pNA	0.72		
Gly	0.39		
NBz-Arg pNA	-	-	-
NBz-Tyr pNA	-	.80	.80
NBz-Phe-Val-Arg pNA	-	.80	.80
NBz-Val-Gly-Arg pNA	-	.80, .39	.80
NBz-Pro-Phe-Arg pNA	-	.23, .37, .80	.80, .37
N-Succ-Phe pNA	-	-	-
N-Succ-Ala-Ala-Ala pNA	-	.80	.80
N-Succ-Ala-Ala-Pro-Leu pNA	-	.70, .80	.70
N-Succ-Ala-Ala-Pro-Phe pNA	-	.80	.70

+ control คือ ไนใส่เอนไซม์ทำปฏิกิริยา

- คือ ไนมีจุด

รูปที่ 19 ความจำเพาะในการไฮโดรไลสเปปไทด์สังเคราะห์ชนิดปลายอะมิโนไม่มีอิสระของเอนไซม์นิวคลีโอโปรตีนเอส: ลูกศรแสดงพันธะที่เอนไซม์สามารถตัดได้



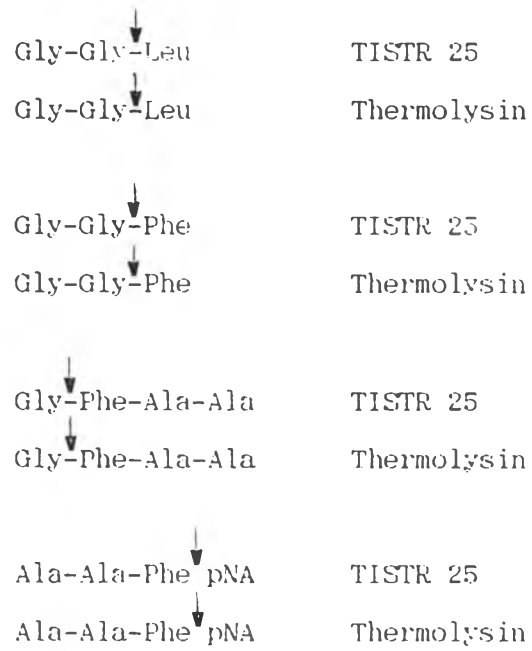
ตารางที่ 9 ค่า  $R_f$  ของ spot บนแผ่น TLC ของกรดอะมิโนมาตรฐาน และ enzyme hydrolysates ที่ได้จากการอินคิวเบตเอนไซม์ชนิดต่างๆกับ สับสเตรทชนิดปลายอะมิโนอิสระ

Synthetic peptides and amino acids	$R_f$		
	control*	TISTR 25	Thermolysin
Gly	.39		
Ala	.43		
Pro	.34		
Phe	.65		
Leu	.65		
pNA	.80		
Gly-Pro-Ala	-	-	-
Gly-Gly-Phe	.37, .50	.37, .50, .62	.37, .50, .63
Gly-Gly-Leu	.37, .50	.37, .50, .63	.37, .50, .63
Gly-Gly-Ala	-	-	-
Ala-Ala-Phe pNA	.80	.80	.80

\* control คือ ไมใส่เอนไซม์ทำปฏิกิริยา

- คือ ไม่พบจุด

รูปที่ 20 ความจำเพาะในการไฮโดรไลสเปปไทด์สังเคราะห์ชนิดปลายอะมิโนเอสิระ  
ของเอนไซม์ทริคโปตีเอส (ลูกศรแสดงตำแหน่งที่เอนไซม์สามารถตัดได้)





ตารางที่ 10 เปรียบเทียบการไฮโดรไลสเปปไทด์สังเคราะห์ โดยเอนไซม์นิวทริลโปรตีเอสจาก *B. subtilis* TISTR 25 และ Thermolysin  
(+) ไฮโดรไลส, (-) ไม่ไฮโดรไลส

Synthetic peptides	Hydrolysis	
	TISTR 25	Thermolysin
ชนิดที่มีปลายอะมิโนอิสระ		
Gly-Pro-Ala	-	-
Gly-Gly-Ala	-	-
Gly-Gly-Leu	+	+
Gly-Gly-Phe	+	+
Ala-Ala-Phe pNA	+	+
ชนิดที่ปลายอะมิโนไม่อิสระ		
NBz-Arg pNA	-	-
NBz-Tyr pNA	-	-
NBz-Phe-Val-Arg pNA	+	+
NBz-Val-Gly-Arg pNA	+	+
NBz-Pro-Phe-Arg pNA	+	+
N-Succ-Phe pNA	-	-
N-Succ-Ala-Ala-Ala pNA	+	+
N-Succ-Ala-Ala-Pro-Leu pNA	+	+
N-Succ-Ala-Ala-Pro-Phe pNA	+	+