การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. PS719 ซึ่งเติบโตได้ดีในสภาวะด่างและอุณหภูมิสูง

Purification and Characterization of Proteolytic Enzyme Produced from Alkalophilic and Thermophilic *Bacillus* sp. PS719

อนงนาฏ ไพนุพงศ์

Anongnat Painupong

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Sciences

Prince of Songkla University

2541

เลขหมู่ QP609.P38 O32 2541 c.2

Bib Key 144968

ชื่อวิทยานิพนธ์	การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. PS719 ซึ่งเติบโตได้ดี ในสภาวะด่างและอุณหภูมิสูง
ผู้เขียน	นางสาวอนงนาฏ ไพนุพงศ์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา	คณะกรรมการสอบ
.....ประธานกรรมการ	.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นงพร โตวัฒนะ)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นงพร โตวัฒนะ)
.....กรรมการ	.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ สันตินานาเลิศ)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ สันตินานาเลิศ)
	.....กรรมการ
	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)
	.....กรรมการ
	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สนั่น ศุภธีรสกุล)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ก้าน จันทร์พรหมมา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. PS719 ซึ่งเติบโตได้ดีในสภาวะด่างและอุณหภูมิสูง
ผู้เขียน	นางสาวอนงนาฏ ไพนุพงศ์
ปีการศึกษา	2540

บทคัดย่อ

Bacillus สายพันธุ์ PS719 เป็นแบคทีเรียที่ชอบด่างและอุณหภูมิสูง ซึ่งผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนออกสู่นอกเซลล์ สามารถทำให้เอนไซม์ดังกล่าวบริสุทธิ์ได้โดยวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 80% ของความอิ่มตัว ตามด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออนกับ DEAE-cellulose และโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะเจาะจงกับ α-casein agarose ตามลำดับ พบว่า เอนไซม์ที่แยกได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 18.5 เท่า โดยมีแอคทิวิตีจำเพาะคิดเป็น 32.54 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และปริมาณสุทธิเท่ากับ 39% ของเริ่มต้น ผลจากการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ พบว่า ลักษณะโมเลกุลของเอนไซม์เป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 42,200 ดอลตัน เอนไซม์นี้มีค่า pI เท่ากับ 4.8 และมี pH ที่เหมาะสมในการทำงานเท่ากับ 9 มีแอคทิวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 75 °ซ เอนไซม์มีความเสถียรที่ pH ระหว่าง 8-10 และทนอุณหภูมิสูงถึง 80 °ซ Ca^{2+} ที่ความเข้มข้น 2 mM สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ได้ดี ในขณะที่ Fe^{2+} และ Cu^{2+} มีผลยับยั้ง เอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดนี้มีสมบัติเป็นซีรีนโปรติเนสที่คล้ายคลึงกับทริปซิน เนื่องจากถูกยับยั้งได้ด้วย 10 mM PMSF และ 3,4-DCI รวมทั้ง 10 μM TLCK นอกจากนี้ยังสามารถย่อย N-CBZ-L-arginine *p*-nitroanilide ซึ่งเป็นสับสเตรทจำเพาะของเอนไซม์ทริปซิน

Thesis Title	Purification and Characterization of Proteolytic Enzyme Produced from An Alkalophilic Bacterium
Author	Miss Anongnat Painupong
Major Program	Biological Sciences
Academic Year	1997

Abstract

The protease produced from a thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. strain PS719 was purified to homogeneity from its cell-free culture liquid. The purification procedure included protein precipitation by 80% saturated ammonium sulfate, ion-exchange chromatography on DEAE-cellulose and α-casein agarose affinity chromatography. The overall procedure resulted in 18.5-fold enrichment of the activity with yield of about 39% The enzyme consisted of single polypeptide chain with a molecular weight of 42,200 Daltons on SDS-PAGE It exhibited pI of 4.8. The optimal pH and temperature for caseinolytic activity on azocasein was found to be pH 9 and 75 $^{\circ}$C, respectively.The enzyme was relatively thermal-stable since its activity was almost completely retained after heat treatment at 80 $^{\circ}$C for 10 minutes. Enzyme activity was considerably increased by addition of Ca^{2+} but was inhibited by Fe^{2+} and $Cu.^{2+}$ This alkaline protease was identified to be a trypsin-like serine proteinase since it was inhibited by PMSF and 3,4-DCI at 10 mM as well as 10 μM TLCK. The enzyme also showed a preference for arginine on the carboxylic side of the peptide bond of the substrate, liberating *p*-nitroaniline from N-CBZ-L-arginine *p*-nitroanilide.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นงพร โตวัฒนะ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและแนะแนวทางในการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ตลอดจน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ สันตินานาเลิศ กรรมการที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา กรรมการตัวแทนของภาควิชาชีวเคมี และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สนั่น ศุภธีรสกุล กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ให้คำแนะนำแก้ไขข้อผิดพลาดเพิ่มเติมให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จเรียบร้อยสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ได้ให้วิชาความรู้สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยเพื่อทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้และให้ความอนุเคราะห์เครื่องพิมพ์คอมพิวเตอร์สำหรับจัดเตรียมวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีวเคมีทุกคนซึ่งได้อำนวยความสะดวกเกี่ยวกับอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

ขอขอบคุณเพื่อนนักศึกษาร่วมรุ่นและผู้ให้คำแนะนำซึ่งไม่ได้กล่าวนาม ณ ที่นี้ทุกท่าน รวมทั้ง พี่สาวและน้องสาวซึ่งเป็นกำลังใจด้วยดีตลอดวิทยานิพนธ์ฉบับนี้แล้วเสร็จสมบูรณ์

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และคุณลัดดาวัลย์ เจ้าแก้ว ที่ได้ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจที่ดีมาตลอด

อนงนาฏ ไพนุพงศ์

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบาญ	(6)
รายการตาราง	(7)
รายการรูป	(8)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(10)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	26
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	27
วัสดุ	27
อุปกรณ์	29
วิธีการ	30
3. ผลการทดลอง	37
4. วิจารณ์	61
5. สรุป	66
เอกสารอ้างอิง	67
ประวัติผู้เขียน	77

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. เปรียบเทียบตำแหน่งของพันธะเปปไทด์ภายในสายบีตาของอินซูลินที่ถูกออกซิไดส์แล้ว ซึ่งถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ	6
2. ผลของแต่ละขั้นตอนในการทำให้เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 บริสุทธิ์	39
3. เปรียบเทียบผลของสารยับยั้งชนิดต่าง ๆ ต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719	59
4. ผลการย่อยสับสเตรทสังเคราะห์ชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719	60

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1.	ลักษณะการขีดเชื้อ *Bacillus* PS719 ลงบนจานอาหารเพาะเชื้อ	31
2.	การเกิดวงใสรอบโคโลนีบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719	37
3.	ผลการแยกเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 โดยคอลัมน์ DEAE-cellulose	40
4.	ผลการแยกเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 โดยโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะเจาะจงกับ α-casein agarose	42
5.	แบบแผนของแถบโปรตีนจากการทำอิเล็กโทรฟอริซิสแบบไม่แปลงสภาพ ซึ่งย้อมด้วยสีคูแมสซีบลู	44
6.	แบบแผนของแถบโปรตีนจากการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพของตัวอย่างเอนไซม์ที่เตรียมได้	45
7.	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) กับ log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน ที่ได้จากการอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ	46
8.	แบบแผนแถบโปรตีนที่ได้จากการหาค่า pI ของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 เปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน	47
9.	ผลของปริมาณโปรตีนต่อการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719	48
10.	ผลของการบ่มสารละลายเอนไซม์กับเอโซเคซีนที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน	50
11.	ผลของการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719	51
12.	ผลการหาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719	52
13.	ผลของการทดสอบความคงทนต่อ pH ของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิต	54

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

โดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719

14. ผลของการทดสอบความคงทนต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิต โดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 55

15. อิทธิพลของไอออนต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2 mM ต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 56

16. เปรียบเทียบผลของ Ca^{2+} ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 57

ตัวย่อและสัญลักษณ์

°ซ (°C)	=	องศาเซลเซียส (degree Celsius)
%	=	percent
α	=	alpha
β	=	beta
p	=	para
*p*CMB	=	*p*-chloromercuribenzoate
µl	=	microlitre
ml	=	millilitre
BSA	=	bovine serum albumin
Da	=	dalton
3,4-DCI	=	3,4-dichloroisocoumarin
DEAE	=	dimethylaminoethyl
DFP	=	diisopropyl fluorophosphate
DMSO	=	dimethyl sulfoxide
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
HCN	=	hydrogen cyanide
IEF	=	isoelectric focusing
k	=	kilo
KCN	=	potassium cyanide
M	=	molar
mA	=	milliampere
mM	=	millimolar
MW	=	molecular weight
OD.	=	optical density
N-CBZ	=	N-carbobenzoxy

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

pH	=	-log hydrogen concentration
pI	=	isoelectric point
PMSF	=	phenylmethyl sulphonyl fluoride
TEMED	=	N,N,N',N'-tetramethyl ethylenediamine
TLCK	=	tosyl-L-lysine cholromethyl ketone
TPCK	=	tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone
Tris-HCl	=	tris [hydroxymethyl] aminomethane hydrochloride
V	=	volt

1. บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

เอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป เพื่อทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการแยกสลายด้วยน้ำ (hydrolysis) ของพันธะเปปไทด์ (peptide bond) ภายในโมเลกุลโปรตีนให้เป็นสายเปปไทด์สั้น ๆ และกรดอะมิโน ตามลำดับ (Wong, 1995) เอนไซม์ชนิดนี้ซึ่งผลิตจากจุลินทรีย์ ชนิดต่าง ๆ เช่น แบคทีเรีย, รา และยีสต์ ซึ่งมีความสำคัญในเชิงอุตสาหกรรมอย่างมาก ทั้งนี้เนื่องจากสามารถนำมาประยุกต์ใช้งานแทนการใช้สารเคมีในกระบวนการผลิตของอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ ได้อย่างกว้างขวาง ทั้งในอุตสาหกรรมอาหารชนิดต่าง ๆ, อุตสาหกรรมยา, อุตสาหกรรมฟอกหนัง และอุตสาหกรรมผงซักฟอก เป็นต้น (Cheetham, 1985) ประกอบกับในปัจจุบันขั้นตอนการผลิตเอนไซม์เหล่านี้ ใช้เวลาสั้น และสามารถควบคุมคุณภาพได้ง่าย ทำให้มีการผลิตออกจำหน่ายได้ในปริมาณมากและราคาไม่สูงนัก (Yamamoto, 1990) จนทำให้เป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ในสกุล *Bacillus* ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาวะด่าง (alkaline protease) และเสถียรที่อุณหภูมิสูง (Priest, 1977) นั้น พบว่า มีปริมาณการซื้อขายกันทั่วโลกรวมแล้วถึง 35% ของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ผลิตขึ้นเพื่อการค้า (Kalisz, 1988) เนื่องจากเป็นที่ต้องการอย่างมากสำหรับนำไปเป็นส่วนผสมในผงซักฟอกเพื่อใช้ขจัดคราบสกปรกของโปรตีนต่าง ๆ ออกจากเนื้อผ้า (Maase and van Tilburg, 1983)

เมื่อไม่นานมานี้ ประเสริฐ และคณะ (2541) ได้แยกแบคทีเรียได้จากตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณน้ำพุร้อนแห่งหนึ่ง ในอำเภอควนกาหลง จังหวัดสตูล แบคทีเรียนั้นเป็นสกุล *Bacillus* sp. ที่เติบโตได้ดีในสภาวะด่างและอุณหภูมิสูง (alkalophilic and thermophilic *Bacillus*) และสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนออกสู่นอกเซลล์ได้ดีที่ pH 9-11.5 และอุณหภูมิ 55 °ซ ผลการทดสอบสมบัติต่าง ๆ ทางชีวเคมีและกายภาพ ของแบคทีเรียที่แยกได้พบว่า ไม่ตรงกับของ *Bacillus* สายพันธุ์ใด ๆ ที่ปรากฏอยู่ใน Bergey's manual of systemic bacteriology, vol.2 (Sneath, 1986) จึงได้เรียกชื่อแบคทีเรียดังกล่าวว่า *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ถึงแม้จะได้มีการศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนจาก

แบคทีเรียที่ชอบด่างและอุณหภูมิสูงดังกล่าว แต่สมบัติต่าง ๆ ตลอดจนสภาวะเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ดังนั้นงานวิทยานิพนธ์นี้ จึงมุ่งเน้นในการทำให้เอนไซม์ย่อยโปรตีนจาก *Bacillus* sp. PS719 มีความบริสุทธิ์ และการศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่เตรียมได้ ทั้งนี้คาดว่า ผลที่ได้จากการศึกษานี้ นอกจากจะใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบกับเอนไซม์ชนิดเดียวกันที่ผลิตจากแหล่งอื่นแล้ว ยังอาจจะเป็นพื้นฐานนำไปสู่การประยุกต์ใช้งาน ตลอดจนสามารถใช้เป็นแนวทางนำไปสู่การพัฒนาศักยภาพของการผลิตเอนไซม์นี้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไปได้ในอนาคต

การตรวจเอกสาร

1.1 เอนไซม์ย่อยโปรตีน

เอนไซม์ย่อยโปรตีน (peptide hydrolase, EC. 3.4) หรือที่รู้จักกันในชื่อเรียกทั่วไป (trivial name) ว่า เปปทิเดส (peptidase), โปรติเนส (proteinase), โปรติเอส (protease) และโปรติโอไลติคเอนไซม์ (proteolytic enzyme) (IUBMB, 1992) จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ประเภทที่เร่งปฏิกิริยาการแยกสลายพันธะต่าง ๆ ด้วยน้ำ (hydrolase or hydrolytic enzyme) เอนไซม์ย่อยโปรตีนสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ตามตำแหน่งของพันธะเปปไทด์ที่เอนไซม์นั้น ๆ เข้าไปเร่งปฏิกิริยาการแยกสลาย คือ เอกโซเปปทิเดส (exopeptidase, EC. 3.4.11-19) เป็นเอนไซม์ที่เร่งการตัดพันธะเปปไทด์ของกรดอะมิโนที่อยู่ตรงบริเวณปลายสายโพลีเปปไทด์ (polypeptide chain) ที่สำคัญ ได้แก่ อะมิโนเปปทิเดส (aminopeptidase, EC. 3.4.11), ไดเปปทิเดส (dipeptidase, EC. 3.4.13,15) และคาร์บอกซีเปปทิเดส (carboxypeptidase, EC. 3.4.16-17) กับเอนโดเปปทิเดส (endopeptidase, EC. 3.4.21-24) หรือบางทีเรียกว่า โปรติเนส ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการตัดพันธะเปปไทด์ภายในสายเปปไทด์ สามารถแบ่งเอนไซม์ย่อยโปรตีนในกลุ่มนี้ได้เป็น 4 กลุ่มย่อย ตามชนิดของกรดอะมิโนสำคัญที่อยู่ตรงบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ซึ่งใช้ในการจับกับอะตอมคาร์บอนของหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group -C=O) ตรงบริเวณพันธะเปปไทด์ของสับสเตรท (substrate) คือ ซีรีนโปรติเนส (serine proteinase, EC. 3.4.21), ซีสเตอีนโปรติเนส (cysteine proteinase, EC. 3.4.22), แอซิดโปรติเนส (acid proteinase, EC. 3.4.23) และเมทาลโลโปรติเนส (metalloproteinase, EC. 3.3.24) (Ward, 1983)

1.2 แหล่งของเอนไซม์ย่อยโปรตีน

สามารถพบเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป ไม่ว่าจะเป็นพืช, สัตว์ และจุลชีพชนิดต่าง ๆ สำหรับเอนไซม์ชนิดนี้ที่มาจากพืช ซึ่งเป็นที่รู้จักกันดี ได้แก่ ปาเปน (papain) และไคโมปาเปน (chymopapain) จากยางมะละกอ (papaya latex), ฟิซิน (ficin) จากยางของผลมะเดื่อ (fig latex) และโบรมีเลน (bromelain) จากน้ำสับปะรด (pineapple juice) ในขณะที่เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีแหล่งกำเนิดมาจากเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อย่างเช่น เรนนิน (rennin) และเปปซิน (pepsin) จากกระเพาะอาหาร, ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) และทริปซิน (trypsin) จากตับอ่อนนั้น เป็นที่ศึกษากันอย่างกว้างขวาง (Yamamoto, 1990) ส่วนเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจากจุลินทรีย์นั้น นับตั้งแต่ระหว่างปี ค.ศ. 1950-1952 เมื่อ Crewther กับ Lennox (1950), Fukumoto กับ Negoro (1951) และ Guntelberg กับ Ottesen (1952) สามารถแยกเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดที่ทำงานได้ดีในสภาวะต่างจาก *Aspergillus oryzae*, เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ทำงานได้ดีที่สภาวะเป็นกลาง (neutral protease) จาก *Bacillus subtilis* var *amyloliquefaciens* และสับไทลิซินคาร์ลสเบิร์ก (subtilisin Carlsberg) จาก *B.subtilis* var *licheniformis* ได้เป็นผลสำเร็จ ตามลำดับ (อ้างโดย Morihara, 1974) นับเป็นต้นมาจนถึงปัจจุบัน ได้มีรายงานการค้นพบและศึกษาเอนไซม์ย่อยโปรตีนมากมายหลายชนิดจากจุลินทรีย์ ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรียสกุลต่าง ๆ เช่น *Clostridium botulinum* (Dasgupta and Sugiyama, 1972), *Bacillus* spp. สายพันธุ์ต่าง ๆ (Vitkovic and Sadoff, 1977; Strongin *et al.*, 1979; Manachini *et al.*, 1988; Takii *et al.*, 1990; Takami *et al.*, 1992; Aoki *et al.*, 1995; Ferrero *et al.*, 1996), *Streptomyces rectus* (Borgia and Campbell, 1974), *Staphylococcus aureus* (Bjorklind and Jornvall, 1974), *Myxococcus virescens* (Gnosspelius, 1978), *Halobacterium halobium* (Izotova *et al.*, 1983), *Kurthia spiroforme* (Bernie Steele *et al.*, 1992), *Pyrococcus* sp. (Morikawa *et al.*, 1994) เป็นต้น ตลอดจนจากเชื้อราและยีสต์ต่าง ๆ กว่า 20 ชนิด ตามที่รวบรวมไว้โดย Matsubara กับ Feder (1971) และ Morihara (1974)

จากการที่มีเอนไซม์ย่อยโปรตีนในสิ่งมีชีวิตแทบทุกชนิดตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น จึงทำให้บทบาทสำคัญในธรรมชาติของเอนไซม์กลุ่มนี้เท่าที่ปรากฏมีมากมาย ไม่เพียงแต่ใช้สำหรับย่อยสารอาหารโปรตีนเพื่อช่วยการดูดซึมในทางเดินอาหารเท่านั้น แต่ยังรวมถึงหน้าที่ทางชีวภาพอื่น ๆ เช่น การควบคุมแรงดันเลือด, การกระตุ้นปัจจัย (clotting factor) ต่าง ๆ

ในกระบวนการแข็งตัวของเลือด (blood coagulation), การเจาะเยื่อหุ้มไข่ชั้น *corona radiata* โดยตัวอสุจิ (sperm) ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการปฏิสนธิ (fertilization process) ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม, การควบคุมสมดุลของการสร้างและสลายโปรตีนต่าง ๆ (protein turnover) ภายในเซลล์, การเกิดและการงอกของสปอร์แบคทีเรีย (spore formation and germination), การควบคุมการสร้างและการหลั่งของเอนไซม์บางชนิดจากเซลล์แบคทีเรีย และการควบคุมการแสดงออกของยีน (modulation of gene expression) ในแบคทีเรียบางชนิด เป็นต้น (Ward, 1983)

1.3 เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจากจุลินทรีย์

เอนไซม์ย่อยโปรตีนของจุลินทรีย์ มักเป็นเอนไซม์ที่หลั่งออกสู่นอกเซลล์ ทั้งนี้เพื่อใช้ย่อยโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมภายนอก ให้ได้กรดอะมิโน สำหรับดูดซึมเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต (Ward, 1983) เอนไซม์เหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นเอนโดเปปทิเดส ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ ๆ ตามความแตกต่างของบริเวณแร่ง (Hartley, 1960 อ้างโดย Morihara, 1974) เช่นเดียวกับเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มาจากพืช และสัตว์ทั่วไป คือ ซีรีนโปรติเนส, ซีสเตอีนโปรติเนส หรือไธออลโปรติเนส (thiol proteinase), เมทาลโลโปรติเนส หรือ metal-chelator sensitive proteinase และแอซิดโปรติเนส หรือ แอสปาร์ติกโปรติเนส (aspartic proteinase)

1.3.1 ซีรีนโปรติเนส

เป็นกลุ่มของเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากจุลินทรีย์ที่มีผู้ศึกษากันมาก (Wong, 1995) บริเวณแร่งของเอนไซม์ทั้งหมดที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ประกอบด้วยกรดอะมิโนสำคัญ 3 ชนิด คือ ฮีสทีดีน (histidine, His), แอสพาราจีน (asparagine, Asp) และซีรีน (serine, Ser) ซึ่งจัดเรียงตัวอยู่ในลักษณะทำมุมสามเหลี่ยม (triad) คล้ายคลึงกับของทริปซิน และไคโมทริปซินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Neurath, 1990) ซีรีนโปรติเนส เป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ทำงานได้ดีในช่วง pH เป็นกลางถึงด่าง และถูกยับยั้งได้ด้วยสารประกอบ DFP และ PMSF (Morihara, 1974) ปกติแล้ว EDTA ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้ ยกเว้น ซีรีนโปรติเนสที่ผลิตจาก *Pseudomonas* sp. (Kato *et al.*, 1974), *Myxococcus virescens* (Gnosspelius, 1978), *Bacillus subtilis* บางสายพันธุ์ (Strongin *et al.*, 1979) และ *Halobacterium halobium* (Izotova *et al.*, 1983) ซึ่งพบว่าถูกยับยั้งได้ด้วยสารคีเลต

(chelating agent) ดังกล่าว ตัวอย่างสำคัญของเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ซับไทลิซิน ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* และสปีชีส์ใกล้เคียงต่าง ๆ (related species) (Markland and Smith, 1971) และแอลคาไลน์โปรติเนส (alkaline proteinase) ที่ผลิตจาก *Aspergillus* spp. (Nakagawa, 1970) ซึ่งทั้ง 2 ชนิด จัดเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในทางการค้า (Ward, 1983) สามารถแบ่งเอนไซม์ซีรีนโปรติเนสจากจุลินทรีย์ ได้เป็น 4 กลุ่มย่อย ตามความจำเพาะต่อสับสเตรท (substrate specificity) คือ ซีรีนโปรติเนสที่คล้ายคลึงกับทริปซิน (trypsin-like proteinase, EC. 3.4.21.4), ซีรีนโปรติเนสที่ทำงานได้ดีในสภาวะด่าง (alkaline proteinase, EC. 3.4.21.14), ซีรีนโปรติเนสที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม *Myxobacterium* (*Myxobacter* α-lytic proteinase, EC. 3.4.21.12) และซีรีนโปรติเนสที่ผลิตจาก *Staphylococcus* spp. (Staphylococcal proteinase, EC. 3.4.21.19) (Morihara, 1974)

1.3.1.1 ซีรีนโปรติเนสที่คล้ายคลึงกับทริปซิน

มีรายงานผลิตได้จาก *Streptomyces* หลายสปีชีส์ เช่น *S. fradiae* (Morihara and Tsuzuki, 1968), *S. griseus* (Jurasek *et al.*, 1969 อ้างโดย Ward, 1983), *S. erythreus* (Yoshida *et al.*, 1971) และ *Streptomyces* สายพันธุ์ 771 (Palubinskas *et al.*, 1984) เป็นต้น เอนไซม์กลุ่มนี้มีความสามารถทำงานได้ดีที่ pH เป็นด่าง (ประมาณ 8) และมีความจำเพาะต่อการแยกสลายพันธะเปปไทด์ ตรงตำแหน่งกรดอะมิโนที่เป็นเบส (basic amino acid) คือ อาร์จินีน (arginine, Arg) และไลซีน (lysine, Lys) ซึ่งวางตัวไปทางด้านคาร์บอกซี (carboxyl side) ของสายเปปไทด์ นอกจากนี้ยังมีความไว (sensitive) ต่อสารยับยั้งทริปซิน (trypsin inhibitor) ต่าง ๆ เช่น DFP, ซอยบีนทริปซินอินฮิบิเตอร์ (soybean trypsin inhibitor) และ TLCK เอนไซม์เหล่านี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20,000 ดอลตัน (Dalton) และมีค่า pI อยู่ที่ประมาณ 9 สำหรับเอนไซม์จาก *S. griseus* และ *S. fradiae* (Ward, 1983) ส่วนเอนไซม์จาก *S. erythreus* (Ward, 1983) และ *Streptomyces* 771 มีค่า pI ประมาณ 9 (Palubinskas *et al.*, 1984) นอกจากนี้ ผลการศึกษาบริเวณเร่งของเอนไซม์จาก *S. griseus*, *S. fradiae* และ *S. erythreus* พบว่า มีลำดับกรดอะมิโน (amino acid sequence) คล้ายคลึงกับของทริปซินที่มาจากตับอ่อนของวัว (bovine parcreatic trypsin) (Jurasek *et al.*, 1969 อ้างโดย Ward, 1983) จึงทำให้เอนไซม์กลุ่มนี้ มีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่เป็นสายบีตาของอินซูลินในรูปถูกออกซิไดส์แล้ว (oxidized insulin β-chain) เช่นเดียวกับเอนไซม์จากตับอ่อน ดังกล่าว ดังแสดงใน ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบตำแหน่งของพันธะเปปไทด์ภายในสายบีตาของอินซูลินที่ถูกออกซิไดส์แล้ว ซึ่งถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ (Morihara, 1974)

(ลูกศร แสดง ตำแหน่งของพันธะเปปไทด์ที่ถูกย่อยสลาย)

Group	Serine trypsinlike proteinases	Serine alkaline proteinases																													The other serine proteinases		
1 Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-CySO₃H-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-CySO₃H-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala 30																																
Trypsin (21)																																	
St. griseus (15)																																	
St. fradiae (15)																																	
St. rutheus (27)																																	
α-Chymotrypsin (21)																																	
Chymotrypsin C (49)																																	
Subtilisin Carlsberg (50)																																	
Subtilisin BPN′ (50)																																	
St. griseus C (28)																																	
St. fradiae Ib (19)																																	
St. fradiae II (19)																																	
St. fradiae III (19)																																	
Asp. oryzae (19)																																	
Asp. flavus (51)																																	
Aspergillus fumigatus (52)																																	
Elastase (53)																																	
Myxobacter α-lytic (44)																																	
Staphylococcal (31)																																	

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Group	1 Phe-Val-Asn-Glu-His-Leu-CySO3H-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-CySO3H-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala 30	Source of enzyme
Thiol proteinases		Clostripain (14)
		Papain (54)
		Streptococcal (55)
Metal-chelator-sensitive neutral proteinases		Snake venom (56)
		B. subtilis (57)
		Thermolysin (58)
		B. stearothermophilus (59)
		Ps. aeruginosa (60)
		St. griseus (18)
		Asp. oryzae (18)
Metal-chelator-sensitive alkaline proteinases		*Ps. aeruginosa* (60)
		Proteus mirabilis (40)
		Serratia sp. (61)
Metal-chelator-sensitive lytic proteases		*Myxobacter β-lytic* (44)
		Myxobacter protease I (62)
		Myxobacter protease II (63)
Acid proteinases		Pepsin (21)
		Pen. janthinellum (63)
		Rh. chinensis (64)
		Mucor miehei (65)
		Endothia parasitica (66)

1.3.1.2 ซีรีนโปรติเนสที่ทำงานได้ดีในสภาวะด่าง

เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่สามารถผลิตได้จากแบคทีเรียชนิดกรัมลบ (gra negative bacteria) เป็นส่วนใหญ่, รา และยีสต์หลายสปีชีส์ (Markland and Smith, 19 Matsubara and Feder, 1971) เอนไซม์กลุ่มนี้มีความสามารถทำงานได้ดีในช่วง pH ประม 10 ถูกยับยั้งด้วย DFP และสารยับยั้งที่เตรียมได้จากหัวมันฝรั่ง (potato inhibitor) ในขณ TLCK และ TPCK ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีผลยับยั้งจำเพาะการทำงานของเอนไ ทริปซินและไคโมทริปซิน ตามลำดับ (Beynon and Salvesen, 1990) ไม่มีผลต่อการทำง ของเอนไซม์ นอกจากนี้ซีรีนโปรติเนสที่ทำงานได้ดีในสภาวะด่าง ยังมีความจำเพาะ สับสเตรทที่เป็นกรดอะมิโนซึ่งมีหมู่แทนที่เป็นวงแหวน (aromatic amino acid) เ ไทโรซีน (tyrosine, Tyr) และฟีนิลอะลานีน (phenylalanine, Phe) ตลอดจนกรดอะมิโน สมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acid) อย่างเช่น ลูซีน (leucine, Leu) ซึ่งคล้ายคลึง ของแอลฟา-ไคโมทริปซิน (α-chymotrypsin) (Johansen *et al.*, 1968 อ้างโดย Ward, 19 เอนไซม์ส่วนใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 15,000-30,000 ดอลตัน โดยมีค่า pI ประม 9 (Ward, 1983) สามารถแบ่งเอนไซม์ซีรีนโปรติเนสชนิดที่ทำงานได้ดีในสภาวะด่างซึ่งผ จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้เป็นกลุ่มย่อย ดังนี้ คือ

ก. สับไทลิซิน

จัดเป็นซีรีนโปรติเนสที่ทำงานได้ดีในสภาวะด่างซึ่งรู้จักกันดี เอนไ กลุ่มนี้ผลิตจาก *Bacillus* spp. ที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นกลาง (neutrophilic *Bacill* เป็นส่วนใหญ่ และนับเป็นเอนไซม์เพื่อการค้ากลุ่มสำคัญ ซึ่งมีสมบัติทั่วไป คือ มีน้ำห โมเลกุลระหว่าง 26,000 ถึง 28,000 ดอลตัน มีความเสถียรในช่วง pH ที่กว้าง ตั้งแต่ 5 ถึง และส่วนใหญ่เสถียรที่อุณหภูมิสูง ไม่ต้องการอิออนของโลหะใด ๆ ในการทำงาน แต่ ยับยั้งโดย PMSF และ DFP (Markland and Smith, 1971) นอกจากนี้ ยังพบว่า เอนไ กลุ่มนี้มีความจำเพาะต่อสับสเตรทใกล้เคียงกับไคโมทริปซิน ซี (chymotrypsin (Morihara, 1974) ดังแสดงในตารางที่ 1 สามารถแบ่งสับไทลิซินได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คื

1) สับไทลิซินคาร์ลสเบิร์ก

เป็นเอนไซม์เพื่อการค้าที่มีบทบาทสำคัญมากในอุตสาหกรรม ซักฟอก เอนไซม์นี้พบผลิตได้ครั้งแรกจาก *Bacillus licheniformis* (Guntelberg and Ottes

1952 อ้างโดย Ward, 1983) และต่อมาภายหลังยังมีรายงานว่า สามารถผลิตได้จาก *B. pumilus* อีกด้วย (Markland and Smith, 1971) ลักษณะโมเลกุลเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว (single polypeptide chain) ที่มีกรดอะมิโนอยู่ 274 หน่วย (residue) แต่ไม่มีกรดอะมิโนซิสเตอีน (cysteine, Cys) เป็นองค์ประกอบ ทำให้ไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) อยู่เลย บริเวณเร่งของเอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโนแอสพาราจีน, ฮีสทีดีน และซีรีน ตรงตำแหน่งที่ 32, 64 และ 221 ตามลำดับ ดังนั้นจึงถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วยสารเคมีที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับซีรีนตรงบริเวณเร่ง ซึ่งได้แก่ DFP และ PMSF ได้เช่นเดียวกับซีรีนโปรติเนสทั่วไป เอนไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 27,277 ดอลตัน และมีค่า pI อยู่ที่ 9.4 มีความจำเพาะต่อสับสเตรทหลายชนิด และสามารถย่อยพันธะเปปไทด์ได้เกือบทุกแบบ โดยเฉพาะมีความชอบ (affinity) มากที่สุดตรงบริเวณกรดอะมิโนที่มีหมู่แทนที่เป็นวงแหวนเช่นเดียวกับซีรีนโปรติเนสชนิดอื่น ๆ เอนไซม์นี้ไม่ต้องการอิออนของแคลเซียมในการทำงาน และสารคีเลตไม่มีผลในการยับยั้งแอคทิวิตี (activity) ของเอนไซม์ สับไทลิซินคาร์ลสเบิร์กเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ดีในช่วง pH 8 ถึง 9 แต่มีความเสถียรในช่วงความเป็นกรด-ด่างกว้าง โดยถูกยับยั้งการทำงานเมื่อมี pH ต่ำกว่า 5 และสูงกว่า 11 (Ward, 1983)

2) สับไทลิซิน บีพีเอ็น (Subtilisin BPN)

บางทีเรียกว่า "subtilopeptidase C" (Wong, 1995) เป็นสับไทลิซินซึ่งจัดว่ามีความสำคัญทางอุตสาหกรรมน้อยกว่าสับไทลิซินคาร์ลสเบิร์ก (Ward, 1983) เอนไซม์นี้ถูกทำให้บริสุทธิ์เป็นครั้งแรกโดย Hagihara (1954) จากส่วนผสมของเอนไซม์ย่อยโปรตีน "Bacterial Protease Nagarase" ที่เตรียมขึ้นเพื่อการค้า ในขณะที่ Ottesen และ Spector (1960) ทำการแยกเอนไซม์สับไทลิซินโนโว (subtilisin Novo) หรือ subtilopeptidase B ได้จาก Bacterial Proteinase Novo ซึ่งต่อมาภายหลังพบว่า เป็นเอนไซม์เดียวกับสับไทลิซิน บีพีเอ็น เนื่องจากมีโครงสร้างโมเลกุลและลำดับกรดอะมิโนเหมือนกันทุกประการ (Robertus *et al.*, 1971; Drenth *et al.*, 1972 อ้างโดย Wong, 1995) สับไทลิซิน บีพีเอ็นมีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบ 275 หน่วย มีค่า pI เท่ากับ 9.1 และมีกรดอะมิโนอยู่ 58 หน่วย ที่แตกต่างจากของเอนไซม์สับไทลิซินคาร์ลสเบิร์ก และเช่นเดียวกับสับไทลิซินคาร์ลสเบิร์ก เอนไซม์นี้ไม่มีกรดอะมิโนซีสเตอีน ส่วนบริเวณเร่งของเอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโนซีรีน, ฮีสทีดีนและแอสพาราจีน ตรงตำแหน่งที่32, 54 และ 221

ตามลำดับ จึงทำให้สับไทลิซินคาร์ลสเบิร์กและสับไทลิซิน บีพีเอ็น มีความจำเพาะต่อสับสเตรทแตกต่างกัน (ดังแสดงในตารางที่ 1) แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* และ *B. stearothermophilus* (Ward, 1983)

นอกเหนือจากสับไทลิซิน 2 ชนิดดังกล่าวแล้ว มีสับไทลิซินอีก 3 ชนิดซึ่งยังไม่เป็นที่รู้จักกันแพร่หลายนัก คือ สับไทลิซินอะไมโลแซคคาไรติคัส (subtilisin Amylosacchariticus) ที่ผลิตจาก *B. amylosacchariticus* (Kurihara *et al.*, 1972), สับไทลิซินดีวาย (subtilisin DY) (Nedkov *et al.*, 1985) และสับไทลิซิน อี (subtilisin E) (Ikemura *et al.*, 1987) จาก *B. subtilis*

ข. ซีรีนโปรติเนสจาก *Bacillus* spp. ที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง

เอนไซม์ชนิดนี้มีลักษณะเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว ซึ่งไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 20,000-30,000 ดอลตัน และ ค่า pI ประมาณ 11 ซึ่งสูงกว่าของเอนไซม์ในกลุ่มสับไทลิซิน เอนไซม์มีความเสถียรในช่วง pH กว้าง คือ ตั้งแต่ 6 ถึง 12 และสามารถทำงานได้ดีในช่วง pH 7 ถึง 12 นอกจากนี้ยังพบว่า Ca^{2+} มีผลช่วยรักษาความเสถียรของเอนไซม์ส่วนใหญ่ในกลุ่มนี้ด้วย เมื่ออยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิสูงหรือความเป็นกรด-ด่างรุนแรง เช่นเดียวกับสับไทลิซินคาร์ลสเบิร์กและสับไทลิซิน บีพีเอ็น บางทีเรียกเอนไซม์กลุ่มนี้ รวมกันว่า ซีรีนโปรติเนสที่คล้ายคลึงกับสับไทลิซิน (subtilisin-like serine proteinase) (Ward, 1983) แบคทีเรียที่พบผลิตเอนไซม์ในกลุ่มนี้มีมากมาย เช่น *B. alcolophilus* subsp.*halodurans* KP 1239 (Takii *et al.*, 1990), *Bacillus* sp. no. AH-101 (Takami *et al.*, 1992), *Bacillus* sp. AM-23 (Aoki *et al.*, 1995) และ *Bacillus* sp.KSM-K16 (Kobayashi *et al.*, 1996) เป็นต้น

ค. ซีรีนโปรติเนสที่ผลิตจากเชื้อรา (fungal serine alkaline proteinase)

เอนไซม์ชนิดนี้จัดเป็นซีรีนโปรติเนสที่ทำงานได้ดีในสภาวะด่าง ซึ่งส่วนใหญ่ผลิตได้จากเชื้อราในสกุล *Aspergillus* เช่น *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. sojae*, *A. sydowi* และ *A. sulphureus* เป็นต้น เอนไซม์เหล่านี้มีสมบัติบางประการคล้ายคลึงกัน คือ ไม่ถูกยับยั้งได้ด้วยสารซัลฟ์ไฮดริล (sulphyldryl reagent) คือ *p*CMB, ซีสเตอีน และ KCN (Nakagawa, 1970) และมีความจำเพาะต่อสับสเตรทคล้ายคลึงกัน (Turkova *et al.*, 1972 อ้างโดย Morihara, 1974) ดังแสดงในตารางที่ 1 แต่มี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานที่แตกต่างกัน เช่น เอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. candidus* สามารถทำงานได้ดีที่ pH 11-11.5 (Nasuno

and Onara, 1972 อ้างโดย Ward, 1983) ในขณะที่เอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ *A. ochaceus* ทำงานได้ดีที่ pH 8 (Topfer and Piesche, 1974 อ้างโดย Ward, 1983) และเอนไซม์ชนิดเดียวกันที่ผลิตจาก *Neurospora crassa* ทำงานได้ดีที่ pH 6-10 (Lindberg *et al.*, 1981) ซีรีนโปรติเนสกลุ่มนี้ซึ่งถูกนำมาใช้ประโยชน์มากในอุตสาหกรรมอาหาร, ฟอกหนัง และยา ได้แก่ เอนไซม์ที่ผลิตจาก *A. oryzae* (Bergkvist, 1963 อ้างโดย Nakagawa, 1970) ส่วนเอนไซม์โปรติเนส เค (proteinase K) ที่ผลิตจาก *Tritirachim album* Limber (Ebeling *et al.*, 1974) ซึ่งมี pH ที่เหมาะสมในการทำงานสูงถึง 12 นั้นถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมผงซักฟอกเป็นส่วนใหญ่ (Ward, 1983)

ง. ซีรีนโปรติเนสที่ผลิตจาก *Streptomyces* spp.

ซีรีนโปรติเนสที่ผลิตได้โดยเชื้อ *Streptomyces* บางสปีชีส์ อย่างเช่นที่ผลิตจาก *S. rectus* (Borgia and Campbell, 1974), *S. rimosus* (Renko *et al.*, 1981 อ้างโดย Ward, 1983) เป็นเอนไซม์ที่มีสมบัติทำงานได้ดีในสภาวะด่างและเสถียรภายใต้อุณหภูมิสูง เนื่องจากใกล้บริเวณแร่งของเอนไซม์มีหมู่ซัลฟ์ไฮดริล (sulphydryl group; -SH) อยู่ ดังนั้นเมื่อเอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงานด้วย *p*CMB จึงมีผลให้ความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงลดลงด้วย (Mizusawa and Yoshida, 1976 อ้างโดย Ward, 1983) นอกจากนี้ยังมีรายงานของซีรีนโปรติเนสที่ผลิตจาก *Streptomyces* บางชนิด เช่น *S. griseus* (Wahlby, 1969), *S. fridiae* (Morihara and Tsuzuki, 1969) และ *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ C5-A13 (Vinci *et al.*, 1993) เป็นต้น พบว่า มีสมบัติในการย่อยสับสเตรทจำเพาะคล้ายคลึงกับไคโมทริปซินมาก จึงรวมเรียกกลุ่มเอนไซม์ดังกล่าวว่า ซีรีนโปรติเนสที่คล้ายคลึงกับไคโมทริปซิน (chymotrypsin-like serine proteinase)

สำหรับซีรีนโปรติเนสที่ผลิตจากยีสต์ที่รู้จักกันดี ได้แก่ โปรติเนส บี (proteinase B) และโปรติเนส ซี (proteinase C) จาก *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งถูกยับยั้งได้ด้วย DFP กับ *p*CMB และทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 8-9 (Morihara, 1974)

1.3.1.3 ซีรีนโปรติเนสที่ผลิตจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Myxobacterium*

เป็นเอนไซม์กลุ่มที่มีผลในการทำลายแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่เติบโตในดินได้ดี ตัวอย่างของเอนไซม์ชนิดนี้ที่ผลิตได้โดยเชื้อแบคทีเรีย *Sorangium* sp. พบว่า สามารถย่อยสับสเตรทเคซีน (casein) และโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบผนังเซลล์แบคทีเรีย *Arthrobacter* sp. ได้ดี ที่ pH 9 เอนไซม์ดังกล่าวถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วย DFP มีน้ำหนัก

โมเลกุล 20,000 ดอลตัน โดยมีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับซีรีน โปรติเนสจากตับอ่อน (pacreatic serine proteinase) และมีค่า pI อยู่ที่ประมาณ 9 พบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนขนาดเล็ก (aliphatic amino acid) เช่น อะลานีน (alanine, Ala) และวาลีน (valine, Val) เช่นเดียวกับอีลาสเทสที่เตรียมจากกระเพาะหมู (porcine elastase) (Whitaker, 1970 อ้างโดย Ward, 1983) นอกจากนี้ยังมีรายงานการผลิตซีรีนโปรติเนสจาก *Myxobacterium* ชนิดอื่น ๆ คือ *Myxococcus xanthus* (Sudo and Dworkin, 1972), *M. virescens* (Gnosspelius, 1978) และ *Lysobacter enzymogenes* (Bone *et al.*, 1989) ซึ่งมีสมบัติต่าง ๆ คล้ายคลึงกับของ *Soragium* sp. อีกด้วย

1.3.1.4 ซีรีนโปรติเนสที่ผลิตจาก *Staphylococcus* spp. หรือ DFP-sensitive protease

เอนไซม์ชนิดนี้มีรายงานผลิตจากเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ V8 มีน้ำหนักโมเลกุล 12,000 ดอลตัน และทำงานได้ดีในช่วง pH 3.5-9.5 แต่ pH ที่เหมาะสมในการย่อยฮีโมโกลบิน (hemoglobin) คือ 4.0 และ 7.8 นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีความจำเพาะในการตัดพันธะเปปไทด์ของกรดอะมิโนแอสพาร์ติค (aspartic acid, Asp) หรือ กลูตามิก (glutamic acid, Glu) ของโปรตีนที่มีโมเลกุลใหญ่หลายชนิดด้วยกัน (Houmard *et al.*, 1972 อ้างโดย Ward, 1983)

1.3.2 ซีสเตอีนโปรติเนส

เอนไซม์ในกลุ่มย่อยนี้มีหมู่ซัลฟ์ไฮดริล อยู่ตรงบริเวณแร่ง ส่วนใหญ่สามารถทำงานได้ดีในช่วง pH เป็นกลาง คือ 6-7.5 และมีความคงทนต่ออุณหภูมิในช่วง 60-80 °ซ ต้องการสารรีดิวซ์ (reducing agent) อย่างเช่น HCN หรือ ซีสเตอีน เป็นตัวกระตุ้นในการทำงานนอกจากนี้ยังถูกยับยั้งการทำงานด้วยสารซัลฟ์ไฮดริล เช่น *p*CMB ในขณะที่ DFP และสารคีเลต มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์นี้เพียงเล็กน้อย (Ward, 1983) สามารถจำแนกเอนไซม์ชนิดนี้เป็น 2 กลุ่ม ตามความจำเพาะต่อสับสเตรท คือ

1.3.2.1 คลอสตริเพน (clostripain)

เอนไซม์ชนิดนี้สามารถผลิตได้โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต (anaerobic bacteria) คือ *Clostridium histolytuicum* (Mitchell and Harrington, 1971) เนื่องจากมีหมู่ซัลฟ์ไฮดริลอยู่ตรงบริเวณแร่ง จึงทำให้มีความไวต่อการยับยั้งด้วย *p*CMB และต้องการสารรีดิวซ์ เช่น HCN หรือ ซีสเตอีน ในการทำงานเช่นเดียว

กับเอนไซม์ชนิดเดียวกันที่มาจาก *C.botulinum* (Dasgupta and Sugiyama, 1972) นอกจากนี้ยังถูกยับยั้งด้วย TLCK ในขณะที่ DFP, TPCK และสารคีเลต มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์นี้เพียงเล็กน้อย pH ที่เหมาะสมต่อการย่อยโปรตีนของเอนไซม์ชนิดนี้อยู่ในช่วง pH เป็นกลาง เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 50,000 ดอลตัน และ มีค่า pI อยู่ในช่วง 4.8-4.9 และมีความจำเพาะต่อสับสเตรทเช่นเดียวกับทริปซินและเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่คล้ายทริปซิน ซึ่งผลิตจาก *Streptomyces* spp. (ดังแสดงในตารางที่ 1)

1.3.2.2 สเตรปโตคอคคอลโปรติเนส (Streptococcal proteinase)

เอนไซม์ในกลุ่มย่อยนี้สามารถผลิตได้โดย *Streptococcus* sp. Group A ในรูปของไซโมเจน (zymogen) ซึ่งจะเปลี่ยนรูปเป็นไธออลโปรติเนสที่ทำงานได้ (active form) ภายหลัง ในการทำงานของเอนไซม์นี้ต้องการสารรีดิวซ์ ขณะเดียวกันสามารถถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วยสารซัลฟ์ไฮดริล เช่น *p*CMB ในขณะที่ DFP และสารคีเลต มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย เอนไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 32,000 ดอลตัน มีค่า pI อยู่ที่ 8.4 นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีความสามารถในการย่อยสับสเตรทจำเพาะของทริปซินหลายชนิดในอัตราค่อนข้างต่ำ แต่มีความสามารถในการย่อยสายบีตาของอินซูลินที่ถูกออกซิไดส์แล้วได้เช่นเดียวกับปาเปน (ดังแสดงในตารางที่ 1) (Liu and Elliott, 1970; Elliott and Liu, 1971)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า ในกลุ่มของแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในอุณหภูมิสูงมาก ๆ อย่างเช่น *Pyrococcus* sp.ยังสามารถผลิตไธออลโปรติเนส ซึ่งทนความร้อนสูงออกนอกเซลล์อีกด้วย (Morikawa *et al.*, 1994)

1.3.3 แอซิดโปรติเนส (acid proteinase)

เอนไซม์ชนิดนี้สามารถพบได้ส่วนใหญ่ในราและยีสต์ แต่ไม่ค่อยพบในแบคทีเรีย (Matsubara and Feder, 1971) มีความสามารถทำงานได้ดีในช่วง pH 3-4 และไม่ถูกยับยั้งการทำงานด้วยสารยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีนทั่วไป คือ DFP, *p*CMB และ EDTA แต่ถูกยับยั้งด้วยสารประกอบพวกไดเอโซคีโตน (diazoketone compound) เช่น diazoacetyl-DL-norleucine methyl ester (Mizobe *et al.*, 1973 อ้างโดย Ward, 1983) นอกจากนี้ยังพบว่าบริเวณเร่งของเอนไซม์กลุ่มนี้มีความคล้ายคลึงกับของเปปซิน (Kovaleva *et al.*, 1972 อ้างโดย Ward, 1983) ถึงแม้เอนไซม์มีความจำเพาะกับกรดอะมิโนที่มีหมู่แทนที่เป็นวงแหวน และกรดอะมิโนที่มีขนาดใหญ่ (bulky amino acid) อย่างเช่น ไทโรซีน กับ

ฟีนิลอะลานีน ตรงบริเวณจุดตัดเช่นเดียวกับเปปซิน แต่มีความจำเพาะต่อสับสเตรทไม่เหมือนกับของเปปซิน (ดังแสดงในตารางที่ 1) เอนไซม์ส่วนใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 30,000-40,000 ดอลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับเปปซิน แต่มีค่า pI เท่ากับ 3-5 ซึ่งสูงกว่าของเปปซิน ยกเว้น เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Podospora aserina* และเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus oryzae* ที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 29,000-34,000 ดอลตัน (North, 1982) สามารถจำแนกแอซิดโปรติเนสได้เป็น 2 กลุ่ม ด้วยกัน คือ แอซิดโปรติเนสที่คล้ายคลึงกับเปปซิน (pepsin-like acid proteinase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Rhizopus* spp. กับ แอซิดโปรติเนสที่คล้ายคลึงกับเรนนิน (rennin-like acid proteinase) ซึ่งผลิตโดย *Mucor* และ *Endothia* spp. (Matsubara and Feder, 1971)

1.3.3.1 แอซิดโปรติเนสที่คล้ายคลึงกับเปปซิน

เอนไซม์ส่วนใหญ่ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ เป็นแอซิดโปรติเนสที่มาจากเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* อย่างเช่น *A. saitoi* (*A. phoenicis*) ซึ่งมีการผลิตเป็นการค้าเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารแปรรูปจากถั่วเหลือง เช่น มิโซ (miso), เต้าเจี้ยว, ซีอิ้ว และซอสถั่วเหลืองชนิดต่าง ๆ สามารถทำงานได้ดีในช่วง pH 2.5-3 เป็นโปรตีนที่มีลักษณะโมเลกุลเป็นเปปไทด์สายเดี่ยว ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 34,000-35,000 ดอลตัน มีกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบจำนวน 283-289 หน่วย รวมทั้งมีซีสเตอีนเป็นองค์ประกอบทำให้มีพันธะไดซัลไฟด์ภายในสายเปปไทด์เกิดขึ้น เอนไซม์ที่แยกได้นี้บางทีจัดเป็นแอสเพอร์จิลโลเปปติเดส เอ (aspergillopeptidase A) (Yoshida,1956 อ้างโดย Ward, 1983) ส่วนเอนไซม์แอซิดโปรติเนสที่ผลิตจาก *A. oryzae* มีความสามารถทำงานได้ดีที่ pH 4-4.5 เอนไซม์ประกอบด้วยส่วนที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบอยู่ถึง 50% จึงส่งผลให้เอนไซม์มีความเสถียรภายใต้อุณหภูมิสูงได้ดี (Tsujita and Endo, 1977 อ้างโดย Ward; 1983) ส่วนเอนไซม์จากเชื้อราชนิดอื่นที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ เปปซินที่ผลิตจาก *Rhizopus chinesi* และเพนนิซิโลเปปซิน (penicillopepsin) ที่ผลิตจาก *Penicillium janthinellum* พบว่าเปปซิน ดังกล่าวและเพนนิซิโลเปปซินมีลำดับกรดอะมิโนเหมือนกับเอนไซม์โปรติเนสซึ่งผลิตจากเชื้อรา *Penicillium duponte* เอนไซม์เหล่านี้มีความเสถียรภายใต้อุณหภูมิสูง เช่นเดียวกับแอซิดโปรติเนสจาก *Aspergillus* spp. (Hashimoto *et al*, 1973 อ้างโดย Ward, 1983)

1.3.3.2 แอซิดโปรติเนสที่คล้ายคลึงกับเรนนิน

เป็นเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อราในกลุ่ม *Endothia* และ *Mucor* spp. ที่มีความสำคัญในทางการค้าได้จาก *Endothia parasitica, Mucor pusillus* และ *Mucor miehei* ซึ่งส่วนใหญ่นำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตเนยแข็ง (cheese manufacture)

ก. แอซิดโปรติเนสที่ผลิตจาก *Mucor* spp. (*Mucor* proteinase)

เอนไซม์ชนิดนี้ที่ผลิตจาก *Mucor pusillus* ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ ที่มีกรดอะมิโนซีสเตอีนอยู่ 2 หน่วย แต่ไม่มีการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ขึ้น มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 30,000 ดอลตัน สามารถทำงานได้ดีที่ pH 4 ในการย่อยฮีโมโกลบิน และที่ pH 4.5 สำหรับเคซีน เอนไซม์มีความเสถียรที่ pH ในช่วง 3-6 ส่วนแอซิดโปรติเนสจากเชื้อ *Mucor miehei* มีโมเลกุลขนาดใหญ่กว่า คือ มีน้ำหนักโมเลกุลเป็น 38,000 ดอลตัน และมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 6% สามารถทำงานได้ดีที่ pH 4.5 สำหรับการย่อยฮีโมโกลบิน พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตจาก *M. miehei* และ *M. pusillus* มีความแตกต่างกันที่ความสามารถในการทำให้นมจับตัวเป็นก้อน (milk coagulation capacity) โดยเอนไซม์ที่ผลิตโดย *M. pusillus* มีความสามารถทำให้นมจับตัวเป็นก้อนได้ดีกว่า *M. miehei* และเรนเนตที่ผลิตจากกระเพาะอาหารของลูกวัว (calf rennet) (Arima *et al.*, 1970; Ottesen and Rickert, 1970)

ข. แอซิดโปรติเนสที่ผลิตจาก *Endothia parasitica* (*Endothia* proteinase)

โมเลกุลของเอนไซม์ชนิดนี้เป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว...ที่ไม่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 34,000 และ 39,000 ดอลตัน มีค่า pI เท่ากับ 4.6 และมีความสามารถทำงานได้ดีที่ pH 2 และ 2.5 สำหรับการย่อยฮีโมโกลบินและเคซีน ตามลำดับ ส่วนการย่อยสับสเตรทชนิดอื่น ๆ นั้นพบว่า ดีที่สุดที่ pH 4.5 แต่ที่ pH 3.4 เอนไซม์นี้สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยเคซีนได้น้อยกว่าเปปซิน หรือ เรนนิน แต่สามารถย่อยแคปปาเคซีน (kappa casein) และสายบีตาของอินซูลินที่ถูกออกซิไดส์แล้วได้ดีกว่าเรนนิน ในการทำให้นมจับตัวกันเป็นก้อนของเอนไซม์ชนิดนี้ พบว่า แทบจะไม่ขึ้นกับอุณหภูมิและปริมาณแคลเซียมในนมซึ่งต่างจากกรณีของเรนนิน และแอซิดโปรติเนสที่ผลิตจาก *Mucor* spp. (Whitaker, 1970)

1.3.4. เมทาลโลโปรติเนส

เป็นเอนโดเปปทิเดสที่มีอิออนของโลหะ เป็นส่วนประกอบสำคัญในบริเวณแร่ง ซึ่งส่วนใหญ่ พบว่า ได้แก่ Zn^{2+} สำหรับทำหน้าที่สำคัญคือจับกับสับสเตรท ดังนั้นการทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้จึงถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วยสารคีเลต เช่น EDTA เอนไซม์กลุ่มนี้สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยต่าง ๆ คือ

1.3.4.1 นิวทรอลโปรติเนส (neutral proteinase)

เป็นเอนไซม์ที่พบในจุลชีพต่าง ๆ หลายชนิดเช่นเดียวกับซีรีนโปรติเนสที่ทำงานได้ดีในด่าง แต่นิวทรอลโปรติเนส มีความสามารถทำงานได้ดีที่ pH ใกล้เคียงกับ 7 และมีความไวต่อการยับยั้งด้วยสารคีเลต อย่างเช่น EDTA และออร์โธ-ฟีแนนโทรลีน (*o*-phenanthroline) แต่ DFP และสารซัลฟ์ไฮดริลต่าง ๆ ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ เอนไซม์ส่วนใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุล 35,000-40,000 ดอลตัน ยกเว้นของ *Aspergillus oryzae* กับ *A. sojae* ซึ่งมีขนาดเพียง 19,000-20,000 ดอลตัน เท่านั้น (Gripon *et al.*, 1980) เอนไซม์ชนิดนี้ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa*, *Streptomyces naraensis* มีค่า pI อยู่ที่ 9, 5.9 และ 4.2 ตามลำดับ (Hiramatsu and Ouchi, 1972) เอนไซม์มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ อย่างเช่น ลูซีน และกรดอะมิโนที่มีขนาดใหญ่ เช่น ฟีนิลอะลานีน และสามารถย่อยสายบีตาของอินซูลินซึ่งถูกออกซิไดส์แล้ว ผลการย่อยสับสเตรทสังเคราะห์ (synthetic substrate) ต่าง ๆ แสดงว่า เอนไซม์กลุ่มนี้มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนที่เป็นสับสเตรทแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งเอนไซม์ โดยพบว่า เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* มีความจำเพาะต่อลูซีนมากกว่าหรือเท่ากับฟีนิลอะลานีนมากกว่าหรือเท่ากับไทโรซีน (Leu≥Phe≥Tyr) ในขณะที่เธอร์โมไลซิน (thermolysin) ที่ผลิตจาก *B. thermoproteolyticus* มีความจำเพาะต่อลูซีนเท่ากับหรือมากกว่าฟีนิลอะลานีนและมากกว่าไทโรซีน (Leu ≥ Phe > Tyr) ซึ่งคล้ายคลึงกับเอนไซม์ของ *B. megaterium* และเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptomyces griseus* และ *Aspergillus oryzae* มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนมากกว่าลูซีนหรือไทโรซีน (Phe≥Leu หรือ Tyr) แสดงว่า เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus* มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นสายตรงมากกว่าที่เป็นวงแหวน ในขณะที่เอนไซม์จากแหล่งอื่น ๆ จะมีลักษณะตรงกันข้าม (Ward, 1983)

1.3.4.2 แอลคาไลน์โปรติเนส (alkaline proteinase)

ส่วนใหญ่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรัมลบ อย่างเช่น *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Escherichia freundii*, *Erwinia chryxanthemi* และ *Proteus mirabilis* (Morihara, 1963; Hampson *et al.*, 1963; Miyata *et al.*, 1970 อ้างโดย Ward, 1983 และ Kato *et al.*, 1972) เป็นต้น เอนไซม์สามารถย่อยเคซีนได้ดีที่ pH 7-9 และถูกยับยั้งด้วยสารคีเลต เช่น EDTA และออร์โธฟีแนนโทรลีน แต่ DFP, *p*CMB, สารยับยั้งจากหัวมันฝรั่ง และซอยบีนทริปซินอินฮิบิเตอร์ ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เอนไซม์ชนิดนี้ที่ผลิตโดย *Pseudomonas aeruginosa* และ *Serratia* spp. มีน้ำหนักโมเลกุล 48,000 และ 60,000 ดอลตัน ตามลำดับ มีค่า pI อยู่ที่ 4 มีความไวต่อการยับยั้งของสารคีเลต คือ EDTA น้อยกว่านิวทรอลโปรติเนส พบว่า เอนไซม์กลุ่มนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อพันธะเปปไทด์ของกรดอะมิโน ต่าง ๆ ชนิดกัน (Ward, 1983)

1.3.4.3 Myxobacter AL-1 Proteinase I

Myxobacter สายพันธุ์ AL-1 ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน 2 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดที่ 1 (Proteinase I) และ 2 (Proteinase II) โดยเอนไซม์ชนิดแรกสามารถทำงานได้ดีที่ pH 9 มีน้ำหนักโมเลกุล 14,000 ดอลตัน สามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อ *Arthrobacter crystallopoietes* มีความไวต่อ EDTA ที่ความเข้มข้น 0.01 M แต่ DFP และ *p*CMB ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ (Wingard *et al.*, 1972 อ้างโดย Morihara, 1974)

นอกจากนี้โปรติเนสชนิดหนึ่งจาก *Sorangium* sp. ชื่อว่า zinc-containing β-lytic protease ยังจัดอยู่ในกลุ่มนี้ด้วย เนื่องจากมีความจำเพาะต่อสับสเตรทเหมือนกับเอนไซม์ข้างต้น (ตารางที่ 1) (Whitaker *et al.*, 1966 อ้างโดย Morihara, 1974)

1.3.4.4 Myxobacter AL-1 Proteinase II

เอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดที่ 2 จาก *Myxobacter* สายพันธุ์ AL-1 ไม่สามารถย่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้ สามารถทำงานได้ดีที่ pH 8.5-9 ในการย่อยสับสเตรท คือ เอโซคอล (azocoll) เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล 17,000 ดอลตัน สามารถย่อยสายบีตาของอินซูลินที่ถูกออกซิไดส์แล้ว, ไซโทโครม ซี (cytochrome C) ซึ่งได้จากหัวใจม้า, ไลโซไซม์ (lyzozyme) และฮอร์โมนวาโซเพรสซิน (vasopressin) ตรงตำแหน่งกรดอะมิโนไลซีนได้ดี พบว่า PMSF, *p*CMB และซอยบีนทริปซินอินฮิบิเตอร์ ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ แต่เกลือโซเดียมซิเตรต (sodium citrate) และ EDTA มีผลยับยั้งเอนไซม์

ทำงานของเอนไซม์ แต่เกลือโซเดียมซิเตรต (sodium citrate) และ EDTA มีผลยับยั้งเอนไซม์นี้ได้ดี (Wingard *et al.*, 1972 อ้างถึงโดย Morihara, 1974)

1.4 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจากแบคทีเรียซึ่งเติบโตได้ดีในสภาวะด่าง

ในปัจจุบันเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจากแบคทีเรียซึ่งเติบโตได้ดีในสภาวะด่างนั้นได้รับความสนใจอย่างมาก ทั้งนี้เนื่องจากส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่มีความเสถียรภายใต้สภาวะด่างและอุณหภูมิสูง ซึ่งเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม ดังนั้นจึงมีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากแบคทีเรียชนิดดังกล่าว จากหลาย ๆ แหล่งด้วยกัน ดังตัวอย่างต่อไปนี้

Takami และคณะ (1989) สามารถแยก *Bacillus* sp. no AH-101 ได้จากตัวอย่างดิน แบคทีเรียดังกล่าวเติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง และผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีความเสถียรในภาวะที่เป็นด่างและอุณหภูมิสูงออกสู่นอกเซลล์ โดยพบมีแอคทิวิตีของเอนไซม์สูงสุดหลังการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียดังกล่าวในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่ pH 9.5 เท่ากับ 1,500 หน่วยต่อมิลลิลิตร เอนไซม์สามารถย่อยเคซีนได้ดีที่ pH 12-13 อุณหภูมิ 80 °ซ และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 60 °ซ และ pH 5-13 เป็นเวลา 10 นาที อิออนของแคลเซียมมีผลรักษาความเสถียรของเอนไซม์นี้ภายใต้อุณหภูมิสูง นอกจากนี้การทำงานของเอนไซม์ถูกยับยั้งได้ด้วย PMSF ในขณะที่ EDTA, ยูเรีย (urea), โซเดียมโดดีซิลเบนซีนซัลโฟเนต (sodium dodecyl benzenesulphonate) และ SDS มีผลยับยั้งแอคทิวิตีเพียงเล็กน้อย เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 ดอลตัน และมีค่า pI อยู่ที่ 9.2

นอกจากนี้ Takami และคณะ (1990) ยังพบว่า เอนไซม์ดังกล่าวซึ่งจัดเป็นซีรีนโปรติเนสชนิดหนึ่งสามารถย่อยโปรตีนที่มีลักษณะเป็นเส้นใยไม่ละลายน้ำ (insoluble fiber) อย่างเช่น อีลาสติน (elastin) และเคอราติน (keratin) ได้ดีกว่าเอนไซม์สับไทลิซิน และ โปรติเนส เค โดยสามารถย่อยอีลาสเทสและเคอราตินได้ดีที่ pH 10.5 และ 11-12 ตามลำดับ และจากการศึกษากรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ และลำดับของกรดอะมิโนทางด้านปลายอะมิโน (amino terminal sequence) ของโมเลกุลเอนไซม์นี้ พบว่า มีลักษณะคล้ายคลึงกับ สับไทลิซิน บีพีเอ็น และสับไทลิซินคาร์ลสเบิร์ก หมายเลข 221 (Horikoshi, 1971) กับยา-บี แอลคาไลน์ โปรติเนส (Ya-B alkaline proteinase) (Tsai *et al.*, 1986) ต่อมาในปี ค.ศ. 1992 Takami และคณะ ได้ทำการโคลนยีน (gene cloning) ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ซีรีนโปรติเนส

ดังกล่าวจาก *Bacillus* sp. no. AH-101 เข้าสู่ *Escherichia coli* และแสดงออก (express) ใน *B. subtilis* ได้เป็นผลสำเร็จ โดย พบว่า เอนไซม์ที่ได้มีสมบัติเหมือนกับที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. no. AH-101 ทุกประการ

Takii และคณะ (1990) ศึกษาเอนไซม์ซีรีนโปรติเนสชนิดหนึ่งที่ผลิตจาก *Bacillus alcalophilus* subsp. *halodurans* KP 1239 ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกรดซิตริค (citric acid) ความเข้มข้น 1% เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง เอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์แล้ว พบว่าสามารถทำงานได้ดีที่สุดเมื่ออยู่ภายใต้อุณหภูมิ 60 °ซ และที่ pH 11 เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล 29,000 ดอลตัน มีค่า pI อยู่ที่ 8.8 นอกจากนี้ จากการศึกษาลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลายอะมิโนของโมเลกุลเอนไซม์นี้พบว่า ประกอบด้วย Ala-Gln-Ser-Val-Pro-Trp-Gly-Ile-Ser-Arg-Val-Gln-Ala-Pro-Ala-Ala-His-Asn-Arg-Gly- เอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วย DFP, PMSF และ SDS ที่ความเข้มข้น 1, 10, และ 6.9 mM ตามลำดับ และ 40% เอธานอล (ethanol) ในขณะที่ 1 mM EDTA ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้

Tachiya และคณะ (1992) นำเอนไซม์โปรติเนส ที่ผลิตจาก *Thermoactinomyces* sp. HS 682 ที่เติบโตได้ดีในสภาวะด่าง มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟี (chromatography) โดยใช้ Butyl-Toyoperl 650 M และ SP-Toyoperl 650 S และวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิส (electrophoresis) ตามลำดับ เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ดังกล่าวมีน้ำหนักโมเลกุล 25,000 ดอลตัน มีค่า pI อยู่ที่ 11 ถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วย DFP, PMSF, Cu^{2+} และ Hg^{2+} เอนไซม์สามารถรักษาแอคทิวิตีไว้ได้นาน 60 นาที ที่ pH 11.5 ภายใต้อุณหภูมิ 37 °ซ ในสภาวะที่มีสารเคมีชนิดต่าง ๆ ที่ประกอบอยู่ในผงซักฟอกทั่วไป เช่น โซเดียมเปอร์บอเรต (sodium perborate), โซเดียมไตรฟอสเฟต (sodium triphosphate), โซเดียมโดดีซิลเบนซีนซัลโฟเนต และ SDS อยู่ด้วย ที่ระดับความเข้มข้น 0.1%

Bernie Steele และคณะ (1992) ศึกษาเอนไซม์โปรติเนสชนิดหนึ่ง ซึ่งมีความเสถียรภายใต้อุณหภูมิสูง และทำงานได้ดีในสภาวะด่าง ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรีย *Kurthia spiroforme*, sp. nov. ที่แยกได้จากน้ำพุร้อน แบคทีเรียชนิดนี้จะมีรูปร่างเป็นเกลียว เมื่ออยู่ในสภาวะที่ค่อนข้างเป็นกลาง สามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 4-47 °ซ และ pH 7-11.5 แต่สามารถเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 °ซ และ pH 10.5 พบว่า เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจากแบคทีเรียนี้ มีน้ำหนักโมเลกุลเพียง 8,000 ดอลตัน สามารถทำงานได้ดีที่ pH 11 และอุณหภูมิ 60 °ซ

นอกจากนี้ที่อุณหภูมิ 50°ซ และ pH 9 เอนไซม์ดังกล่าวมีค่าครึ่งชีวิต (half-life) เท่ากับ 41 ชั่วโมง

Kobayashi และคณะ (1995) ศึกษาเอนไซม์โปรติเนส (EC. 3.4.21.14) ที่ผลิตออกสู่นอกเซลล์ของ *Bacillus* sp. KSM-K16 ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน ซึ่งนำมาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟี โดยใช้ DEAE-Bio-Gel A และ CM-Bio-Gel A ตามลำดับ พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ที่เตรียมได้ เรียกว่า M protease มีน้ำหนักโมเลกุล 28,000 ดอลตัน และมีค่า pI อยู่ที่ประมาณ 10.6 สามารถย่อยเคซีนได้ดีที่ pH 12.3 และอุณหภูมิ 55 °ซ เอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วย PMSF และไคโมสตาติน (chymostatin) พบว่า ลำดับของกรดอะมิโนที่อยู่ตรงปลายด้านอะมิโนของโมเลกุล เป็น Ala-Glu-Ser-Val-Pro-Trp-Gly-Ile-Ser-Ala-Val-Gln-Ala-Pro-Ala-Ala-His-Asn-Arg-Gly-Leu-Thr-Gly เอนไซม์นี้มีความคงทนที่อุณหภูมิ 40 °ซ ในน้ำยาซักฟอก (liquid detergent) นอกจากนี้ยังพบว่า M protease ทำการย่อยสายบีตาของอินซูลินที่ออกซิไดส์แล้ว ตรงตำแหน่งของกรดอะมิโนลูซีนและไทโรซีนที่ตำแหน่ง 15 และ 16 ตามลำดับ

ต่อมา Kobayashi และคณะ (1996) ได้ศึกษาเปรียบเทียบสมบัติของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดย *Bacillus* sp. KSM-K16 ทั้ง 3 ชนิด คือ M, H และ N พบว่าเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิด H (H protease) มีน้ำหนักโมเลกุล 28,000 ดอลตัน สามารถย่อยเคซีนได้ดีที่ pH 11 และอุณหภูมิ 55 °ซ ส่วนเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิด N (N protease) ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์นี้ 2 สาย ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 12,500 และ 14,500 ดอลตัน ตามลำดับ สามารถทำงานได้ดีที่ pH 11 อุณหภูมิ 60 °ซ พบว่าลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลายอะมิโนของเอนไซม์ชนิด H และสายโพลีเปปไทด์ที่ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 14,500 ดอลตัน ของเอนไซม์ชนิด N เหมือนกัน ผลการเก็บรักษาเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด ใน pH ต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 5 °ซ พบว่าเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิด M สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิด H ที่ pH 11 ได้เร็วกว่าที่ pH 8 หรือต่ำกว่า ในขณะที่เอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิด H สามารถเปลี่ยนเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิด M ได้ที่ pH 8 หรือต่ำกว่า แต่ที่ pH 11 ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง ส่วนเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิด N เมื่อเกิดสภาวะการย่อยตัวเอง (autolysis) จะให้ผลิตผลเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิด M และ H ได้เช่นเดียวกัน

และในปี ค.ศ. 1995 Razak และคณะ สามารถแยก *Bacillus stearothmophilus* สายพันธุ์ F1 ที่เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิถึง 80 °ซ และ pH ระหว่าง 5 ถึง 11 ได้จากตัวอย่างดิน

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

พบว่า แบคทีเรียนี้ สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ดีในสภาวะด่างที่อุณหภูมิสูง โดยการหลั่งเอนไซม์ดังกล่าวออกนอกเซลล์เกิดขึ้นหลังจาก 12 ชั่งโมง ของการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พร้อม ๆ กับการเริ่มต้นเกิดสปอร์ (sporulation) ของแบคทีเรีย เอนไซม์ที่เตรียมได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมีอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 85 °ซ และ 9 ตามลำดับ เอนไซม์เสถียรที่อุณหภูมิ 70 °ซ ได้นานถึง 24 ชั่วโมง เอนไซม์ชนิดนี้ จัดเป็นซีรีนโปรติเนสชนิดหนึ่ง เนื่องจากถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วย PMSF

1.5 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจากจุลินทรีย์

การนำเอนไซม์ย่อยโปรตีนมาใช้แทนสารเคมีในขั้นตอนการย่อยสลายโปรตีนของกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมต่าง ๆ นั้น มีข้อได้เปรียบบางประการ คือ ปฏิกิริยาของเอนไซม์มีความไวและความจำเพาะสูง อีกทั้งดำเนินไปภายใต้สภาวะที่รุนแรงน้อยกว่า ดังนั้นจึงทำให้สามารถควบคุมอัตราการผลิตตลอดจนคุณภาพของผลผลิตได้ง่าย โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหาร พบว่า การใช้เอนไซม์ทำให้คุณค่าทางโภชนาการและความสามารถในการถูกย่อยของผลิตภัณฑ์อาหารนั้น ๆ ไม่เสียไปด้วย (Feeney and Whitaker, 1985) เอนไซม์เหล่านี้ที่ผลิตจำหน่ายนอกจากมีแหล่งที่มาจาก พืชและสัตว์ อย่างเช่น เรนเนต จากกระเพาะลูกวัว, เอนไซม์โปรติเนสที่ผลิตจากข้าวมอลต์ (malt proteinase) และปาเปนจากมะละกอ ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายในการผลิตเนยแข็ง, กำจัดขนสัตว์, การทำเบียร์และการทำให้เนื้อมีความอ่อนนุ่ม แล้ว ยังมีเอนไซม์ย่อยโปรตีนอีกกลุ่มหนึ่งที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งได้รับความนิยมใช้เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในปัจจุบัน ที่รู้จักกันดี ได้แก่ ได้แก่ สับไทลิซิน ซึ่งผลิตจาก *Bacillus licheniformis*, เรนเนต ที่ผลิตจาก *Mucor* spp., นิวทรอลโปรติเนส ที่ผลิตจาก *B. amyloliquefaciens* และเอนไซม์โปรติเนสชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตจาก *Aspergillus oryzae* (Ward, 1983)

1.5.1 อุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอก (laundry detergent)

เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่นำมาใช้เป็นส่วนประกอบในผงซักฟอก ต้องมีคุณสมบัติที่สำคัญหลายประการ คือ

ก) ต้องมีความเสถียร เมื่ออยู่ในผงซักฟอกตลอดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา

ข) ต้องมีความเสถียรและสามารถทำงานได้ภายใต้การซักล้างที่อุณหภูมิสูงด้วยเครื่องซักผ้า

ค) ต้องมีความสามารถในการย่อยโปรตีนได้หลายชนิด

ง) ควรอยู่ในรูปที่ปราศจากฝุ่นละออง (dust-free form) เมื่อนำมาผสมเป็นผงซักฟอก (Ward, 1983)

นอกจากนี้เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ใช้ควรมีโครงสร้าง ซึ่งไม่สามารถรวมตัว หรือทำปฏิกิริยากันสารอื่น ๆ ที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในผงซักฟอก อย่างเช่น สารออกซิไดส์ (oxidizing agent) ต่าง ๆ หรือสารคีเลต ซึ่งได้แก่ เกลือฟอสเฟต (phosphate) และ EDTA ซึ่งมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์กลุ่มเมทาลโลโปรติเนส ทำให้ไม่สามารถนำเอนไซม์ชนิดนี้ในผงซักฟอกได้

เนื่องจาก pH ของสารละลายผงซักฟอกอยู่ในช่วง 9-12 ดังนั้นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่นำมาใช้ผสมในผงซักฟอกควรเป็นชนิดที่ทำงานได้ดีในสภาวะด่างและเสถียรในช่วง pH ดังกล่าว (Kalisz, 1988) สำหรับเอนไซม์เหล่านี้ ซึ่งมีการผลิตออกมาจำหน่ายและประสบความสำเร็จในท้องตลาด ภายใต้ชื่อการค้าต่าง ๆ กัน เช่น Savinase, Esperase (Novo), Maxcal (Gist-brocades), Maxatase, M protease และ 221 protease เป็นต้น ส่วนใหญ่เป็นชนิดซีรีนโปรติเนสที่มาจาก *Bacillus* spp. ซึ่งเติบโตได้ดีในสภาวะด่าง (Kobayashi *et al.*, 1996) และในปัจจุบันได้มีการพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ ๆ เพิ่มขึ้น เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีความเสถียรและสามารถทำงานในการขจัดคราบเปื้อนที่ติดอยู่บนเนื้อผ้าอย่างมีประสิทธิภาพสูงยิ่งขึ้น

1.5.2 อุตสาหกรรมการฟอกหนัง (tanning)

1.5.2.1 กระบวนการกำจัดขน (dehairing)

เนื่องจากกระบวนการกำจัดขนสัตว์โดยวิธีทางเคมี ซึ่งใช้ปูนขาวที่มีโซเดียมซัลไฟด์ (sodium sulfide) เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วยนั้น ถึงแม้เป็นวิธีการที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน และค่าใช่จ่ายไม่สูงมากนัก แต่มีผลเสียต่อสุขภาพของคนงาน เนื่องจากการสะสมของไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulfide) ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา และการก่อปัญหาในการกำจัดของเสีย (waste treatment) ทำให้วิธีการนำเอนไซม์มาใช้ในอุตสาหกรรมประเภทนี้ได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น โดยที่เอนไซม์โปรติเนส ซึ่งถูกนำมาใช้ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีที่ pH ค่อนข้างเป็นกลาง ภายใต้อุณหภูมิ 30-35 °ซ อย่างเช่น นิวทรอลโปรติเนส (neutral proteinase) ที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* (Ward, 1983) และนิวทรอลโปรติเนส As 1.398 จาก *B. subtilis* As 1.398 (Guo *et al.*, 1996) เป็นต้น

1.5.2.2 การทำให้หนังอ่อนนุ่มและยืดหยุ่น (bating)

เดิมกระบวนการนี้ใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากตับอ่อนของลูกวัว แต่ปัจจุบันได้หันมานิยมใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้แก่ *Aspergillus oryzae, Bacillus amyloliquefaciens* หรือ *B. licheniformis* (Ward, 1983) และ *B. subtilis* K2 (Hameed *et al.*, 1996) เป็นต้น

1.5.3. อุตสาหกรรมการผลิตเนย

การพัฒนาและนำเอนไซม์เรนเนตที่ผลิตเพื่อจำหน่ายจาก *Mucor miehei, M.pusillus, Endothia parasitica* และ *Aspergillus oryzae* ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในรูปของเหลว (ยกเว้น เรนเนตจาก *Endothia .parasitica* ที่มีความเสถียรต่ำมากและมักซื้อขายกันในรูปของแข็ง) มาใช้ในกระบวนการผลิตเนยแข็งนั้นเพิ่งเริ่มต้น เมื่อประมาณ 10 ปี ที่ผ่านมา เพื่อทดแทนความขาดแคลนเรนเนตที่ผลิตจากกระเพาะของลูกวัว (Ward, 1983) นอกจากนี้ การทำให้นมจับตัวกันเป็นก้อน ซึ่งเป็นผลมาจากการย่อยพันธะเปปไทด์ระหว่างฟีนิลอะลานีนกับเมไธโอนีน (methionine, Met) ภายในโมเลกุลของแคปปาเคซีน (Jolles *et al.*, 1968 อ้างโดย Ward, 1983) โดยเรนเนตที่ผลิตจากจุลินทรีย์ มีลักษณะที่คล้ายคลึงกับเรนเนตที่ผลิตจากลูกวัว เนื่องจากพบว่า ให้ผลผลิตของปฏิกิริยาที่เหมือนกันเมื่อตรวจสอบด้วยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิส ยกเว้นอัตราการย่อยเคซีนชนิดแอลฟา (α) และบีตา (β) ของเอนไซม์จากจุลินทรีย์สูงกว่าเรนเนตของกระเพาะอาหาร โดยที่เรนเนตซึ่งผลิตได้จาก *E. parasitica* สามารถย่อยเคซีนได้สูงสุด (Vanderpoorten and Weckx, 1972 อ้างโดย Yamamoto, 1990)

จากการศึกษาเกี่ยวกับปฏิกิริยาการย่อยเคซีนบริสุทธิ์ของเรนเนต แสดงให้เห็นว่าเรนเนตสามารถย่อยสลายโปรตีนดังกล่าวในเนยแข็งให้เป็นสายโอลิโกเปปไทด์ (oligopeptide) ซึ่งจะถูกย่อยสลายต่อไปเป็นสายเปปไทด์สั้น ๆ และกรดอะมิโน ตามลำดับ โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค (lactic acid bacteria) และ เชื้อราในกลุ่ม *Penicillium* โดยที่ ปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์เหล่านี้ มีความแตกต่างกัน คือ เอนไซม์นิวทรอลโปรติเนสที่ผลิตจาก *Penicillium caseicolum* และแอซิดโปรติเนสที่ผลิตจาก *P. roqueforti* สามารถย่อยโปรตีนจนกระทั่งได้เป็นสารประกอบไนโตรเจนขนาดเล็กที่ละลายน้ำได้เป็นจำนวนมาก...และเหลืออยู่ในรูปกรดอะมิโนเพียงเล็กน้อย ในขณะที่ *Streptomyces lactis* สามารถย่อยโปรตีนได้เป็นกรดอะมิโนส่วนใหญ่ ดังนั้น การเติมเอนไซม์โปรติเนสจากภายนอกลงไป น่าจะเป็นการช่วยปรับปรุง

คุณภาพของเนยแข็ง และช่วยเร่งเวลาสุก (ripening) ให้เร็วขึ้น นอกจากนี้ในระหว่างที่เนยกำลังจะสุก พบว่า เรนเนต และอะมิโนเปปทิเดสที่ผลิตจากแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค 2 ชนิด คือ *S. ceremoris* และ *S. lactis* มีบทบาทสำคัญในการช่วยให้รสชาดของเนยแข็งดีขึ้นด้วย (Hwang *et al.*, 1981)

1.5.4 การย่อยโปรตีน (protein hydrolysis)

สันนิษฐานว่า การพัฒนาเอนไซม์สำหรับอุตสาหกรรมโปรตีน เกิดขึ้นครั้งแรกในช่วงปี ค.ศ. 1980-1989 โดยมีบริษัทที่ผลิตเอนไซม์หลายแห่ง ร่วมกันพัฒนากระบวนการใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีนสำหรับการผลิตและแปรรูปอาหาร ซึ่งส่วนใหญ่ ได้แก่ การย่อยโปรตีนจากถั่วเหลืองและผักต่าง ๆ รวมทั้งโปรตีนจากเนื้อปลา, เนื้อ และโปรตีนจากจุลินทรีย์ เอนไซม์เหล่านี้ ได้แก่ ที่ผลิตจาก *Aspergillus oryzae* และ *A. niger* เป็นส่วนใหญ่ รวมทั้ง *Bacillus subtilis* บางสายพันธุ์ (Ward, 1983; Guo *et al.*, 1996) ซึ่งเหล่านี้เป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรค (non-pathogenic) และไม่หลั่งสารพิษ (toxin) ดังนั้นจึงปลอดภัยต่อการบริโภค

1.5.4.1 อุตสาหกรรมการผลิตเบียร์

กระบวนการผลิตเบียร์ใช้เอนไซม์โปรติเนส ซึ่งส่วนใหญ่เป็นนิวทรอลโปรติเนสที่ผลิตจาก *Bacillus* และ *Aspergillus* spp. ใน 2 ขั้นตอนด้วยกัน คือ ระหว่างการบด (mashing) เพื่อให้ได้ปริมาณของน้ำคั้น (extract) เพิ่มขึ้น และระดับของแอลฟา-อะมิโนไนโตรเจน (α-amino nitrogen) ในน้ำเบียร์ที่ต้มแล้วแต่ยังไม่ผ่านการหมัก (wort) เพิ่มขึ้น และในขั้นตอนสุดท้ายซึ่งต้องมีการกำจัดส่วนขุ่น (chill haze) ออกจากเบียร์ (Ward, 1983)

1.5.4.2 อุตสาหกรรมทำแป้งและขนมปัง (milling and baking)

สมบัติของแป้งทำขนมปัง (bakery dough) คือ มีความเหนียวนุ่มและทนทานต่อการผสมที่รุนแรงได้ดีเป็นพิเศษนั้น ส่วนใหญ่เกิดจากกลูเต็น (gluten) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ โดยที่ความเหนียวของแป้ง มีความสัมพันธ์กับปริมาณ และคุณภาพของกลูเต็น ถึงแม้ภายในแป้งสาลี (wheat flour) จะมีเอนไซม์ย่อยโปรตีนอยู่กลุ่มหนึ่ง แต่กลูเต็นในแป้งสาลีไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ดังกล่าว ดังนั้นการเติมเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากแหล่งอื่นลงในแป้งขนมปัง แล้วทำให้คุณภาพของแป้งที่ได้ดีขึ้นนั้นส่วนหนึ่งเกิดจากการที่เอนไซม์ไปเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (texture) บางประการของกลูเต็นนั่นเอง พบว่า ประมาณ 2 ใน 3 ของแป้งทำขนมปังในอเมริกา มีการเติมส่วนผสมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนจาก

Aspergillus oryzae สายพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งมีสมบัติในการย่อยกลูเต็นแตกต่างกันไป นอกจากนี้ยังพบว่า การเติมเอนไซม์ย่อยโปรตีนดังกล่าวลงไป ช่วยทำให้ขนมปังที่ได้มีกลิ่นหอมขึ้นด้วย ส่วนการเติมเอนไซม์จากทั้งแบคทีเรียและเชื้อราลงไปในแป้งสำหรับทำขนมปังกรอบ (cracker dough) พบว่า ทำให้สามารถคลึง (roll) แป้งได้บางมาก ๆ โดยไม่ฉีกขาดอีกด้วย (Ward, 1983)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทำให้เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. PS719 มีความบริสุทธิ์โดยวิธีต่าง ๆ ทางชีวเคมี

2. เพื่อศึกษาสมบัติต่าง ๆ ตลอดจนสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนบริสุทธิ์ที่เตรียมได้

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

Bacillus สายพันธุ์ PS719 ซึ่งถูกเก็บรักษาไว้ใน 15% กลีเซอรอล (glycerol) ที่ -70 °ซ ได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ สันตินานาเลิศ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองเป็นชนิดคุณภาพวิเคราะห์ (analytical grade) หรือเทียบเท่า

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทผู้ผลิต
acrylamide	71.1	Merck
ammonium persulphate $(NH_4)_2S_2O_8$	228.20	Merck
ammonium sulphate $(NH_4)_2SO_4$	132.14	Merck
aquacide (carboxymethyl cellulose, Na salt)	-	Sigma
azocasein	-	Sigma
bovine serum albumin (BSA)	67.000	Sigma
bromophenol blue	-	Merck
calcium chloride $CaCl_2$	147.02	Merck
α-casein	-	Sigma
citric acid	214.11	Merck
Coomassie brilliant blue R 250	-	Fluka
cupric sulphate $CuSO_4.5H_2O$	249.68	J.T.Baker
diethylaminoethyl cellulose (DEAE-cellulose)	-	Whatman
disodium hydrogen phosphate dodecahydrates $Na_2HPO_4.12H_2O$	358.14	Merck
3,4-dichloroisocoumarin (3,4-DCI)	215	Sigma
dimethyl sulfoxide (DMSO)	78.13	Sigma

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทผู้ผลิต
ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	292.25	Fluka
ferrous sulphate $FeSO_4.7H_2O$	278	Merck
Folin-Ciocalteau's phenol reagent	-	Merck
glycerol	92.09	BDH
glycine	75.07	Merck
isopropanol	60.097	Carlo Erba
iodoacetic acid	185.9	Sigma
magnesium chloride $MgCl_2$	203.31	Sigma
manganese chloride $MnCl_2.4H_2O$	197.91	Fluka
2-mercaptoethanol	78.18	Merck
N-CBZ-ala-ala-leu *p*-nitroanilide	527.6	Sigma
N-CBZ-L-arginine *p*-nitroanilide	464.9	Sigma
N-CBZ-gly-gly-leu *p*-nitroanilide	499.5	Sigma
N-CBZ-gly-pro-arg *p*-nitroanilide	582.6	Sigma
N-CBZ-L-phenylalanine *p*-nitroanilide	419.4	Sigma
N-CBZ-val-gly-arg *p*-nitroanilide	584.6	Sigma
N-α-*p*-tosyl-L-phenylalanine chloromethylketone (TPCK)	315.8	Sigma
N-α-*p*-tosyl-L-lysine chloromethylketone (TLCK)	369.3	Sigma
N,N'-methylene bisacrylamide	154.17	Fluka
N,N,N',N',-tetramethylene diamine (TEMED)	116.2	Fluka
pepstatin A	685.9	Sigma
phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	174.2	Sigma
sodium acetate $CH_3COONa.3H_2O$	136.08	Carlo Erba
sodium carbonate Na_2CO_3	105.99	Merck
sodium chloride NaCl	58.443	Carlo Erba
sodium citrate $C_6H_5Na_3O_7$	258.07	Fluka

ชื่อสารเคมี	M.W.	บริษัทผู้ผลิต
sodium dihydrogen phosphate dihydrates $NaH_2PO_4.2H_2O$	156.01	Merck
sodium dodecyl sulphate (SDS)	288.4	Sigma
sodium potassium tartrate tetrahydrates $NaKC_4H_4O_6.4H_2O$	282.23	Carbo Erba
trichloroacetic acid	163.39	Carbo Erba
tris[hydroxymethyl]aminomethane	121.11	Sigma
zinc sulphate $ZnSO_4.7H_2O$	287.55	Hopkins & Williams

อุปกรณ์

1. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น 1510E ของ SHEL LAB, U.S.A.
2. ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (incubator shaker) รุ่น 4518 ของ Forma Scientific, U.S.A.
3. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) รุ่น HLF ของ Gelman Sciences, U.S.A.
4. เครื่องเซนตริฟิวจ์แบบตั้งโต๊ะ (SERO-FUGE centrifuge) ของ Clay.Adams, U.S.A.
5. เครื่องเซนตริฟิวจ์แบบแรงเหวี่ยงสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (superspeed refrigerated centrifuge) รุ่น J2-21 ของ Beckman, U.S.A.
6. เครื่องชั่งอิเล็กทรอนิกส์แบบอ่านทศนิยมได้ 2 ตำแหน่ง รุ่น P1210 ของ Mettler, Switzerland
7. เครื่องชั่งอิเล็กทรอนิกส์แบบอ่านทศนิยมได้ 4 ตำแหน่ง รุ่น H10 ของ Mettler, Switzerland
8. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-VIS recording spectrophotometer) รุ่น UV160A ของ Shimadzu, Japan
9. เครื่องผสมสารละลาย (magnetic stirrer) รุ่น Nuova II ของ Thermolyne, England
10. เครื่องวัด pH ของสารละลาย (pH-meter) รุ่น PHM61 ของ Radiometer, Denmark
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water-bath) รุ่น SS40-D ของ Grant, England

12. ชุดเจลอิเล็กโทรฟอรีซิส (electrophoresis unit) ของ C.B.S. Scientific, U.S.A.
13. เครื่องกำเนิดไฟฟ้ากระแสตรงสำหรับอิเล็กโทรฟอรีซิส (power supply) รุ่น 100/500 ของ Bio-Rad, U.S.A.
14. เครื่องเก็บแยกส่วนสารละลายแบบอัตโนมัติ (fraction collector) รุ่น 2100 ของ Bio-Rad, U.S.A.
15. เครื่องปั๊มพ์สารละลาย (microtube pump) รุ่น MP-3 ของ EYELA, Japan

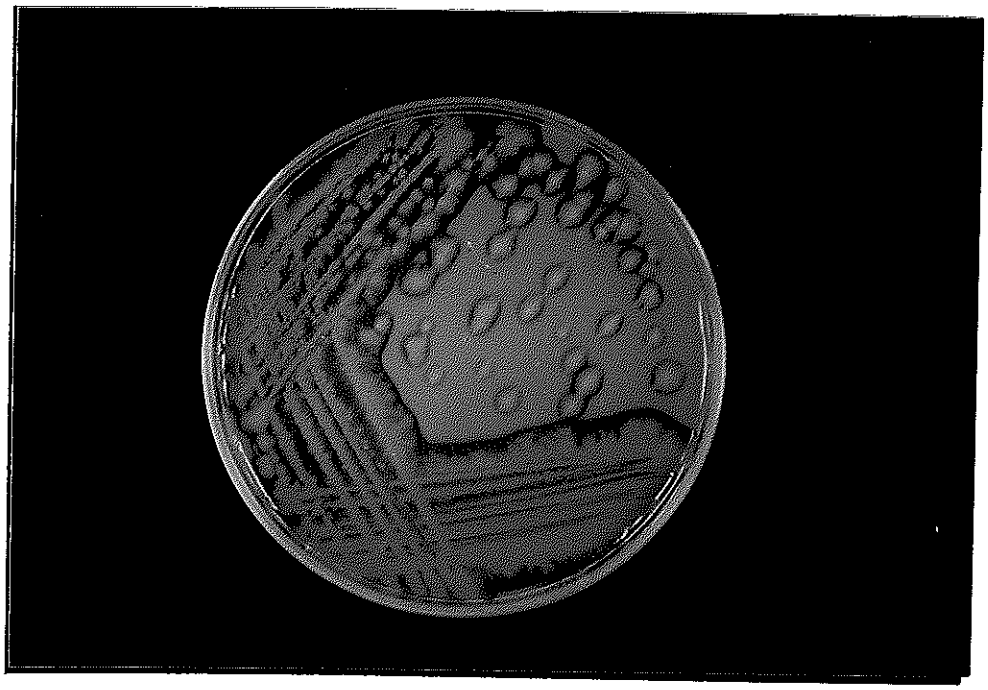
วิธีการ

2.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

นำตัวอย่างเชื้อตั้งต้น (stock pure culture) ของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS 719 ซึ่งเก็บรักษาไว้ที่ -70 °ซ มาทำให้แยกเป็นโคโลนี (colony) เดี่ยวๆ โดยการขีด (streak) ด้วย loop ลงบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ ซึ่งประกอบด้วย nutrient agar (Oxoid) 28 กรัม, และ NaCl 5 กรัม ในปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ที่มี 1% skim milk (Difco) ผสมอยู่ด้วย (ดังแสดงในรูปที่ 1) จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงโดยบ่ม (incubate) ในตู้บ่มเชื้อ ที่ 55 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำเชื้อจำนวน 3-5 โคโลนี ถ่ายเลี้ยง (transfer) ลงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วย nutrient broth (Oxoid) 13 กรัม, และ NaCl 5 กรัม ในปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ที่มี 1% skim milk ผสมอยู่ด้วย แล้วนำไปบ่มต่อในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิเดิม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จะใสขึ้น เนื่องจากมีการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากแบคทีเรียออกมาย่อยเคซีน ภายในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว

2.2 การเตรียมเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS 719

นำอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อจากข้อ 2.1 มาปั่นแยกเอาแบคทีเรียออกด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ของ Beckman รุ่น J2-21 โดยใช้โรเตอร์ (rotor) ชนิด JA14 ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 15 นาที วัดปริมาตรส่วนใส (supernate) ที่ได้ แล้วทำการตรวจวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic activity) และหาปริมาณโปรตีน ก่อนนำมาผ่านขั้นตอนการทำให้เอนไซม์ย่อยโปรตีนบริสุทธิ์ต่อไป



รูปที่ 1 ลักษณะการขีดเชื้อ *Bacillus* PS 719 ลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยง

2.3 การตรวจวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ย่อยโปรตีน

การหาแอคทิวิตีของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในสารละลายตัวอย่าง อาศัยหลักการย่อยสับสเตรท คือ เอโซเคซีน (azocasein) ซึ่งเป็นสารประกอบที่ได้จากการคู่ควบ (coupling) ซัลฟานิลาไมด์ (sulfanilamide) เข้ากับเคซีน ด้วยหมู่เอโซ (-N=N-) ให้ผลิตผล (product) เป็นสายเปปไทด์ขนาดสั้นๆ ที่ยังมีหมู่เอโซประกอบอยู่ (diazotized peptide fragment) ซึ่งมีสีและไม่ตกตะกอนในกรดไตรคลอโรแอซีติก (trichloroacetic acid) (Charney and Tomarelli, 1947) สำหรับในการศึกษานี้ใช้ตามวิธีของ Sarath และคณะ (1990) โดยการนำสารละลายเอโซเคซีนความเข้มข้น 2% ใน 50 mM Tris-HCl pH 9 ที่มี 2 mM $CaCl_2$ ปริมาตร 125 ไมโครลิตร มาบ่มก่อน (pre-incubate) เป็นเวลา 5 นาที ที่ 75 °ซ แล้วจึงเติมสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 75 ไมโครลิตร ลงไป บ่มต่อที่อุณหภูมิเดิม เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดไตรคลอโรแอซีติก ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน แล้วนำมาวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นแยกเอาตะกอนโปรตีนออกด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์แบบตั้งโต๊ะ ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บเฉพาะส่วนใส ปริมาตร 600 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับ 1 M

NaOH ปริมาตร 700 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (control) ซึ่งทำเช่นเดียวกันกับชุดทดลอง (test) ข้างต้น แต่ลำดับการผสมสารต่างกัน คือ เติมสารละลายเอนไซม์ก่อน แล้วตามด้วย 10% กรดไตรคลอโรแอซีติก และสารละลายสับสเตรทซึ่งผ่านการบ่มที่ 75 °ซ เป็นเวลา 30 นาที มาแล้ว ตามลำดับ ทั้งนี้โดยใช้ 50 mM Tris-HCl pH 9 ที่มี 2 mM $CaCl_2$ แทนสารละลายเอนไซม์เป็น blank

ปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาภายใต้สภาวะข้างต้น ซึ่งให้ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 440 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 เมื่อวัดในหลอดใส่ตัวอย่างสำหรับวัดการดูดกลืนแสง (cuvette) ขนาดความกว้าง 1 เซนติเมตร เทียบได้เป็น 1 หน่วย (unit) ของแอคทิวิตี

2.4 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

นำสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลายแอลคาไลน์คอปเปอร์ (alkaline copper reagent) (ประกอบด้วย 2% Na_2CO_3, 1% $CuSO_4$ และ 2% $NaKC_4H_4O_6.H_2O$ ในอัตราส่วน 100:1:1) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วจึงเติมสารละลายโฟลิน (Folin-Ciocalteau's phenol reagent) ซึ่งเจือจางในอัตราส่วน 1:1 ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร เทียบกับ blank ซึ่งใช้น้ำกลั่นหรือบัฟเฟอร์ (buffer) แทนสารละลายตัวอย่าง แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2.5 การทำให้เอนไซม์ย่อยโปรตีนบริสุทธิ์

2.5.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulphate precipitation)

นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากข้อ 2.2 มาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 80% ของความอิ่มตัว ค้างคืนที่ 4 °ซ จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนของตะกอน (pellet) ออก แล้วนำสารละลายใน 50 mM Tris-HCl-2 mM $CaCl_2$, pH 9 ก่อนนำไปไดแอไลซ์ แล้วทำให้เข้มข้นโดยใช้แอควาไซด์ (aquacide) ให้ได้ความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ

8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ย่อยโปรตีนตามวิธีการในข้อ 2.3 แล้วนำไปทำให้เอนไซม์ย่อยโปรตีนบริสุทธิ์ในขั้นตอนโครมาโทกราฟีต่อไป

2.5.2 โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออน (ion-cxchange chromatography)

นำ DEAE-cellulose (DE-52) มาแช่ให้อิ่มตัวใน 50 mM Tris-HCl, pH 9 ที่มี 2 mM $CaCl_2$ อยู่ด้วย ก่อนนำมาบรรจุในคอลัมน์แก้วขนาด 2.5x14.5 เซนติเมตร ล้างและปรับสภาพสมดุลของคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันปริมาตรมากเกินพอก่อนใส่สารละลายโปรตีน 5 มิลลิลิตร ซึ่งเตรียมได้จากข้อ 2.5.1 ลงไป แล้วทำการชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิมด้วยอัตราการไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เก็บสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 2 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน และชะโปรตีนซึ่งจับกับคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันที่มีความเข้มข้นของ NaCl เพิ่มขึ้น อย่างต่อเนื่อง (gradient) จาก 0 ถึง 1 M นำสารละลายที่เก็บได้แต่ละหลอดมาตรวจหาปริมาณโปรตีนโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ก่อนนำไปตรวจวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ตามวิธีในข้อ 2.3 หลังจากนั้นนำสารละลายในหลอดที่มีแอคทิวิตีของเอนไซม์ย่อยโปรตีนสูงมารวมกัน ทำให้เข้มข้นด้วยแอควาไซด์ ให้ได้ความเข้มข้นของโปรตีน เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

2.5.3 โครมาโทกราฟีแบบจำเพาะเจาะจง (affinity chromatography)

ดัดแปลงจากวิธีของ Manachini และคณะ (1988) โดยนำ α-casein agarose มาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 1.2x5 เซนติเมตร ล้างและปรับสมดุลคอลัมน์ ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 9 ที่มี 2 mM $CaCl_2$ ก่อนใส่สารละลายเอนไซม์จากข้อ 2.5.2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตรลงไป แล้วทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เอนไซม์จับกับเรซิน (resin) ได้อย่างเต็มที่ จากนั้นชะคอลัมน์ดังกล่าวด้วยบัฟเฟอร์เดิมด้วยอัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บสารละลายด้วยเครื่องเก็บแยกส่วน หลอดละ 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้แต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนกระทั่งค่าที่ได้เข้าใกล้ศูนย์ จากนั้นชะโปรตีนที่จับอยู่กับคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ที่มีส่วนผสมของ 1 M NaCl ด้วยอัตราการไหลเท่าเดิม นำสารละลายแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนกระทั่งค่าที่ได้เข้าใกล้ศูนย์ จึงชะเอนไซม์ย่อยโปรตีนออกจากคอลัมน์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีส่วนผสมของ 1 M NaCl และ 25% ไอโซโพรพานอล (isopropanol) อยู่ด้วย

2.6 การตรวจสอบความบริสุทธิ์และการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่เตรียมได้

2.6.1 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพธรรมชาติ (non-denatured polyacrylamide gel electrophoresis)

ใช้ตามวิธีประยุกต์ของ Davis (1964) ซึ่งประกอบด้วยแผ่นเจล 2 ชั้น คือ เจลชั้นบน (stacking gel) ซึ่งมีโพลีอะคริลาไมด์อยู่ 4% และเจลชั้นล่าง (separating gel) ซึ่งมีความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์ตั้งแต่ 10 ถึง 12% โดยมีส่วนประกอบของเจลแต่ละชั้นดังนี้

	stacking gel	separating gel	
	4%	10%	12%
30% acrylamide+0.8% bis-acrylamide (ml)	0.65	2.38	2.80
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 (ml)	1.25	-	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 (ml)	-	1.82	1.82
10% ammonium persulphate (µl)	25	70	70
TEMED (µl)	5	5	5
น้ำกลั่น (ml)	3.02	2.66	2.24
ปริมาตรรวม (ml)	5.0	7.0	7.0

หลังจากเตรียมแผ่นเจลเสร็จเรียบร้อยแล้ว ผสมสารตัวอย่างกับบัฟเฟอร์ตัวอย่าง (sample buffer) ซึ่งประกอบด้วย 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8, 40% กลีเซอรอล, 0.4% สีโบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue) และ 8 mM EDTA ในอัตราส่วน 3:1 โดยปริมาตร และเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานโดยใช้ low molecular weight calibration kit ของ Pharmacia คือ ฟอสฟอรีเลสบี (phosphorylase b, 94,000 ดอลตัน), BSA (67,000 ดอลตัน), โอวัลบูมิน (ovalbumin, 43,000 ดอลตัน), คาร์บอนิกแอนไฮเดรส (carbonic anhydrase, 30,000 ดอลตัน), ซอยบีนทริปซินอินฮิบิเตอร์ (20,100 ดอลตัน) และ แอลฟา-แลคทัลบูมิน (α-lactalbumin, 14,000 ดอลตัน) ด้วยวิธีเดียวกัน จากนั้นจึงนำสารตัวอย่างและสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่เตรียมได้ใส่ลงไปในแต่ละช่อง (well) ของเจลส่วนบนแล้วทำอิเล็กโทรฟอรีซิส โดยมี 25 mM Tris-0.192 M glycine, pH 8.3 เป็นอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ (electrode buffer) และใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 10 มิลลิแอมแปร์ (mA) จนกระทั่งแถบสีฟ้าของโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนลงไปจนถึงขอบล่างของแผ่นเจล (นานประมาณ 3 ชั่วโมง) จึงปิดกระแสไฟฟ้า

แล้วนำแผ่นเจลที่ได้ไปแช่ในสารละลายสีย้อม (staining solution) ซึ่งประกอบด้วย 0.02% สีคูแมสซีบลู (Coomassie brilliant blue R250), 7.5% กรดแอซีติก (acetic acid) และ 50% เมธานอล (methanol) ทิ้งไว้ข้ามคืน ต่อจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย 5% เมธานอลใน 7.5% กรดแอซิติก จนกว่าจะเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนที่ชัดเจน

2.6.2 การทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970) โดยทำเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 2.6.1 แต่มี 10% SDS อยู่ในองค์ประกอบของเจลและอิเล็กโทรดบัฟเฟอร์ นอกจากนี้ในการเตรียมสารละลายตัวอย่างใช้ 0.2 M Tris-HCl, pH 6.8 ที่มี 40% กลีเซอรอล, 0.4% สีโบรโมฟีนอลบลู, 8mM EDTA, 4% SDS และ 4% เมอร์แคปโตเอธานอล (2-mercaptoethanol) รวมอยู่ด้วย ผสมกับสารละลายโปรตีนตัวอย่างในอัตราส่วน 3:1 โดยปริมาตร จากนั้นนำไปต้ม 5 นาทีก่อนนำไปทำอิเล็กโทรฟอรีซิส สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพธรรมชาติได้ โดยเปรียบเทียบค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility) หรือ R_f ของแถบโปรตีนในสารตัวอย่าง กับกราฟมาตรฐานระหว่าง log น้ำหนักโมเลกุลกับค่า R_f ของแถบโปรตีนมาตรฐาน 5 ชนิด ที่อยู่ใน low molecular weight calibration kit ของ Pharmacia

2.7 การหาค่า pI ของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่เตรียมได้

หาค่า pI ของเอนไซม์ที่เตรียมได้ โดยใช้แผ่นเจลที่มีความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์เท่ากับ %T=5 และ %C=3 และมี ampholytes (Bio-Rad) ที่ให้ค่า pH ระหว่าง 3.5-9.5 ทำการแยกโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ (V) เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็น 200 โวลต์ 15 นาที และเพิ่มเป็น 450 โวลต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามลำดับ นำแผ่นเจลที่ได้ไปย้อมแถบโปรตีนด้วยสีคูแมสซีบลู เปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐานของ Pharmacia (IEF markers) ทั้งหมด 11 แถบ ที่มีค่า pI ระหว่าง 3.6 ถึง 9.3 ซึ่งได้แก่ อะไมโลกลูโคไซเดส (amyloglucosidase, pI 3.6), ซอยบีนทริปซินอินฮิบิเตอร์ (pI 4.6), บีตา-แลคโทโกลบูลิน (β-lactoglobulin, pI 5.1), คาร์บอนิกแอนไฮเดรส 2 แถบ (carbonic anhydrase, pI 5.9 และ 6.6), ไมโอโกลบิน 2 แถบ (myoglobin, pI 6.8 และ 7.2), เลนทิลเลคติน 3 แถบ (lentil lectin, pI 8.2, 8.6 และ 8.8) และ ทริปซิโนเจน (trypsinogen, pI 9.3)

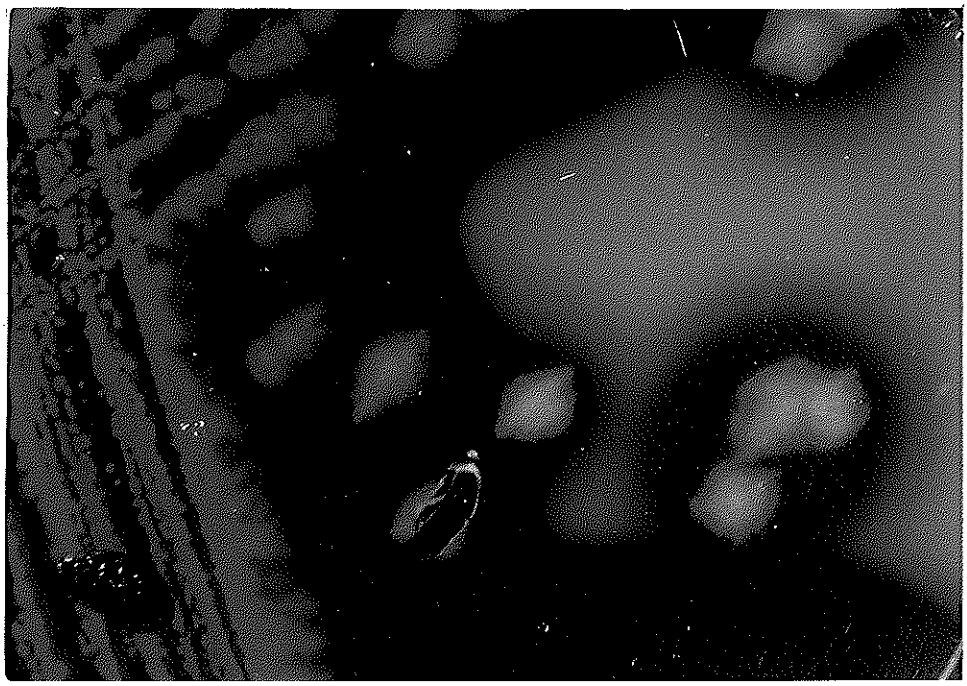
2.8 การศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS 719

นำสารละลายเอนไซม์บริสุทธิ์ที่เตรียมได้ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใน 50 mM Tris-HCl-2 mM $CaCl_2$, pH 9 ปริมาตร 625 ไมโครลิตร มาบ่มที่ 75 °ซ กับ 125 ไมโครลิตร ของ 5 mM oligopeptidyl *p*-nitroanilide ชนิดต่างๆ คือ N-CBZ-ala-ala-leu *p*-nitroanilide, N-CBZ-L-arginine *p*-nitroanilide, N-CBZ-gly-gly-leu *p*-nitroanilide, N-CBZ-gly-pro-arg *p*-nitroanilide, N-CBZ-L-phenylalanine *p*-nitroanilide และ N-CBZ-L-val-gly-arg *p*-nitroanilide ใน DMSO เป็นเวลา 30 นาที ต่อจากนั้นจึงหยุดปฏิกิริยาด้วย 250 ไมโครลิตรของ 2 M sodium citrate, pH 5 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของ พารา-ไนโตรแอนิลีน (*p*-nitroaniline) ที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากปฏิกิริยา ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร โดยเทียบกับชุดควบคุมซึ่งมีส่วนผสมต่าง ๆ เช่นเดียวกับชุดทดลองข้างต้น ยกเว้นไม่ได้นำไปบ่ม ที่ 75 °ซ นาน 30 นาที ก่อนเติมสารละลาย sodium citrate ลงไป ทั้งนี้โดยใช้ 50 mM Tris-HCl-2 mM $CaCl_2$, pH 9 เป็น blank (Strongin *et al.*, 1978)

3. ผลการทดลอง

3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* สายพันธุ์ PS 719 โดยการขีดเชื้อลงบนอาหารแข็ง ซึ่งมีส่วนผสมของ 1% skim milk อยู่ด้วย แล้วนำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 55 °ซ นาน 24 ชั่วโมง พบว่าโคโลนีที่เกิดขึ้นมีลักษณะสีขาวเป็นมัน และปรากฏวงใส (clear zone) อยู่รอบ ๆ ดังแสดงในรูปที่ 2 ซึ่งแสดงว่า แบคทีเรียชนิดนี้ มีการสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนออกสู่นอกเซลล์ แล้วมาย่อยเคซีนจาก skim milk ซึ่งเป็นส่วนประกอบอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว



รูปที่ 2 การเกิดวงใสรอบโคโลนีบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อของ *Bacillus* สายพันธุ์ PS719

3.2 การทำให้เอนไซม์ย่อยโปรตีนบริสุทธิ์

3.2.1 การเตรียมตัวอย่างสำหรับแยกเอนไซม์ย่อยโปรตีน

เมื่อนำอาหารเหลวที่ได้หลังจากการถ่ายโอน *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 ลงไปแล้วเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 55 °ซ เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์แบคทีเรีย และปริมาณเอนไซม์ย่อยโปรตีน มาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °ซ ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำเฉพาะส่วนใส ปริมาตร 1,200 มิลลิลิตร มาตรวจวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ที่ pH 9 อุณหภูมิ 75 °ซ โดยใช้เอโซเคซีนเป็นสับสเตรท ตามวิธีการในข้อ 2.3 พบว่า เอนไซม์มีแอคทิวิตีทั้งหมด (total activity) คิดเป็น 1,184 หน่วย โดยมีปริมาณโปรตีนอยู่ทั้งหมด 672 มิลลิกรัม ดังนั้น สามารถคำนวณหาค่าแอคทิวิตีจำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์ชนิดดังกล่าวได้ เป็น 1.76 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 2

3.2.2 การตกตะกอนโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

เมื่อนำอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปั่นแยกแบคทีเรียออกแล้ว จากข้อ 3.2.1 มาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความอิ่มตัว 80% พบว่า มีปริมาณโปรตีนอยู่ในตะกอน ทั้งหมด 359 มิลลิกรัม และมีแอคทิวิตีของเอนไซม์ย่อยโปรตีนอยู่ในส่วนนี้ทั้งหมด 961 หน่วย หรือประมาณ 81 % ของปริมาณเอนไซม์เริ่มต้น (% yield) ดังนั้นจึงคิดเป็นแอคทิวิตีจำเพาะได้เท่ากับ 2.68 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังแสดงในตารางที่2

3.2.3 การทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออนกับ DEAE-cellulose

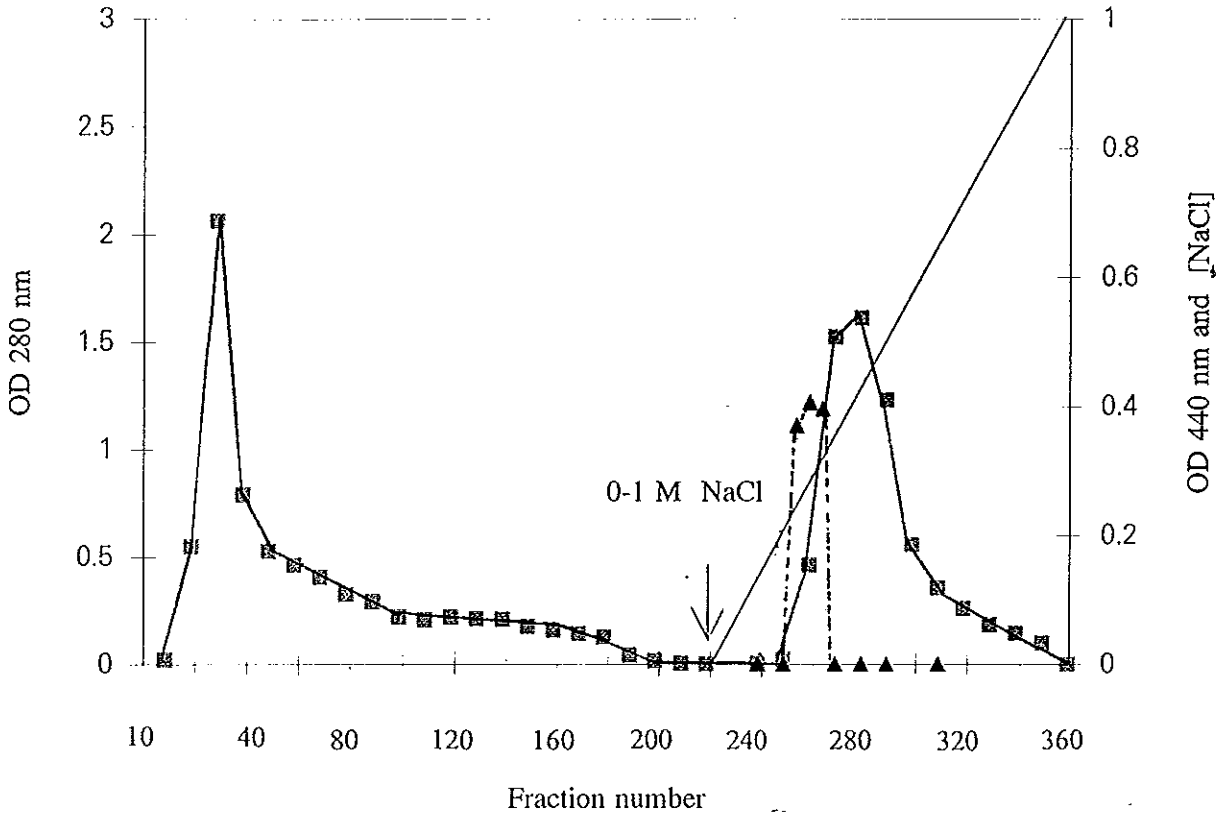
เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ย่อยโปรตีน จากข้อ 3.2.2 ที่ได้จากการละลายตะกอนโปรตีนที่ตกด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตใน 50 mM Tris-HCl ที่มี 2 mM $CaCl_2$, pH 9 มาทำโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออนกับ DEAE-cellulose ดังรายละเอียดปรากฏในวิธีการข้อ 2.5.2

จากผลการทดลอง พบว่า สามารถแยกเอนไซม์ออกจากโปรตีนส่วนใหญ่ในสารละลายดังกล่าวได้ โดยการชะคอลัมน์ด้วย NaCl ที่ความเข้มข้นประมาณ 0.25 M ดังแสดงในรูปที่ 3 หลังจากนำสารละลายเฉพาะในหลอดที่มีแอคทิวิตีของเอนไซม์ย่อยโปรตีนสูง ๆ มารวมกัน (pool) แล้ว นำไปเอาเกลือออกโดยวิธีไดแอไลซิส (dialysis) ใน 50 mM Tris-HCl, pH 9 ที่ 4 °ซ แล้วนำไปลดปริมาตรโดยใช้แอควาไซด์ ต่อจากนั้น

ตารางที่ 2 ผลของแต่ละขั้นตอนในการทำให้เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 บริสุทธิ์

Step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg protein)	%Yield	Purification (fold)
supernate of culture media	672	1,184	1.76	100	1
$[NH_4]_2SO_4$ precipitation	359	961	2.68	81	1.5
DEAE-cellulose	90	770	8.56	65	4.9
α-casein agarose	9.3	302	32.54	39	18.5

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 5 ครั้ง



รูปที่ 3 ผลการแยกเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 โดยใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose ขนาด 2.5x14.5 เซนติเมตร ล้างคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl-2 mM $CaCl_2$, pH 9 อัตราเร็ว 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แล้วชะด้วย 0-1 M NaCl อย่างต่อเนื่อง ที่ความเร็วเดิมเก็บสารละลายแยกส่วน (fraction) หลอดละ 2 มิลลิลิตร

(—■—) แสดง ปริมาณโปรตีนที่ OD 280 nm

(—▲—) แสดง แอคทิวิตีของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ OD 440 nm

ตำแหน่งลูกศร แสดง จุดเริ่มต้นการชะคอลัมน์ดังกล่าวด้วยเกลือ NaCl

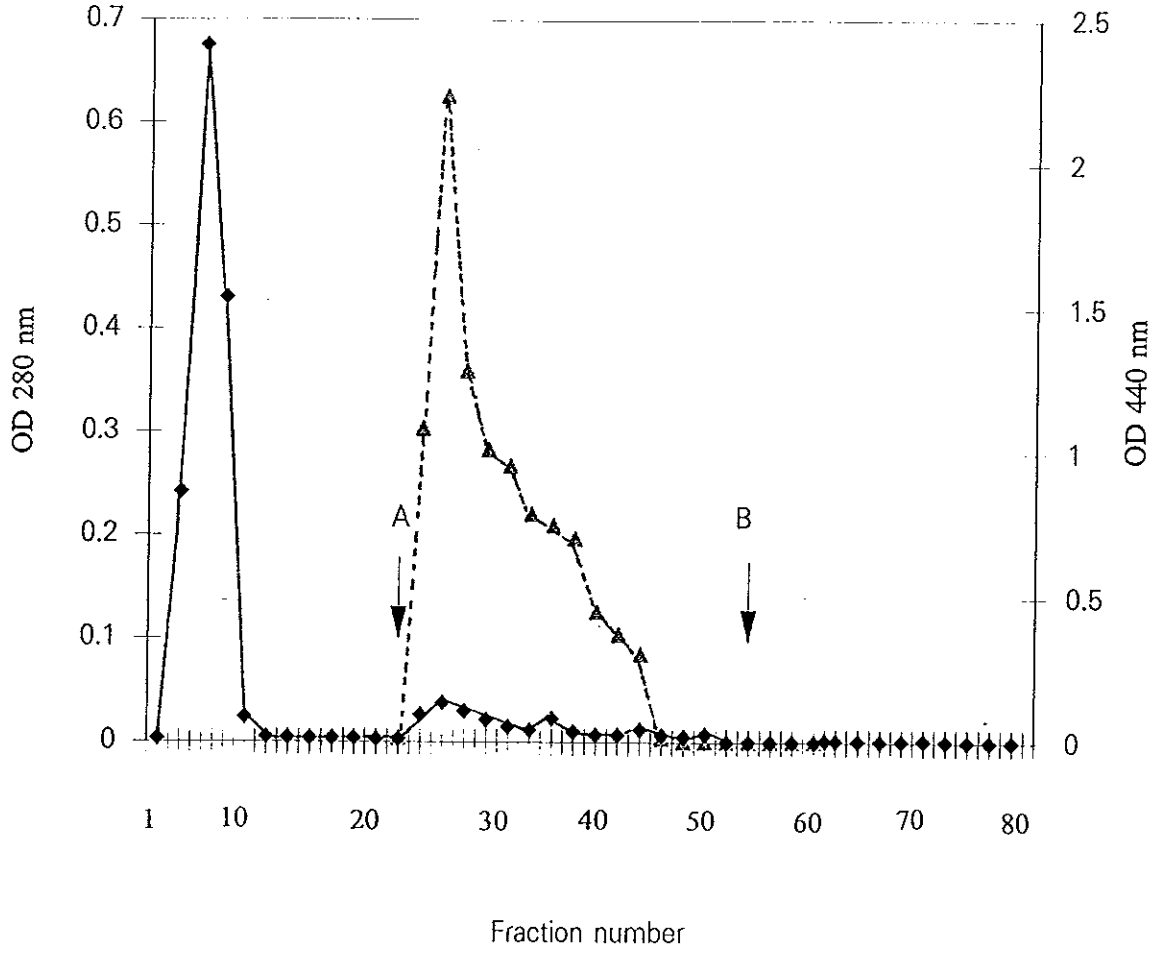
จึงหาค่าแอคทิวิตีของเอนไซม์ และ ปริมาณโปรตีน ซึ่งพบว่า มีค่าแอคทิวิตีของเอนไซม์ย่อยโปรตีนโดยรวม เท่ากับ 770 หน่วย โดยมีปริมาณโปรตีนทั้งหมด เท่ากับ 90 มิลลิกรัม และคิดเป็น แอคทิวิตีจำเพาะของเอนไซม์ดังกล่าวได้เท่ากับ 8.56 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 2

3.2.4 การทำโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะเจาะจงกับ α-casein agarose

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.2.3 มาผ่านลงในคอลัมน์ซึ่งบรรจุด้วย α-casein agarose แล้วทำการชะด้วยบัฟเฟอร์ 3 ชนิด ตามลำดับ ดังรายละเอียดในข้อ 2.5.3 พบว่า โปรตีนส่วนใหญ่ซึ่งไม่จับกับเรซินดังกล่าว ถูกชะออกมาในช่วงแรกด้วยบัฟเฟอร์ที่ไม่มี NaCl ดังปรากฏเป็นพีคของโปรตีน (protein peak) ที่มีขนาดใหญ่ในรูปที่ 4 ในขณะที่โปรตีนที่จับกับคอลัมน์สามารถถูกชะออกมาด้วย 1 M NaCl มีปริมาณน้อยกว่ามาก (สังเกตจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร) และในพีคนี้มีแอคทิวิตีของเอนไซม์ย่อยโปรตีนปรากฏอยู่ด้วย ส่วนการชะคอลัมน์ดังกล่าวด้วยไอโซโพรพานอลนั้น ไม่ปรากฏพีคของโปรตีนเลย เมื่อหาค่าแอคทิวิตีของเอนไซม์ และปริมาณโปรตีนของพีคที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ด้วย NaCl หลังจากนำไปไดแอไลซ์ ใน 50 mM Tris-HCl, pH 9 ที่ 4 °ซ เพื่อกำจัดเกลือออกแล้ว พบว่า สารละลายเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่แยกได้จากขั้นตอนสุดท้ายนี้มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 9.3 มิลลิกรัม และมีแอคทิวิตีทั้งหมด 302 หน่วย ซึ่งเป็นปริมาณสุทธิของเอนไซม์ เท่ากับ 39 % โดยมีค่าความบริสุทธิ์ (purification fold) เท่ากับ 18.5 เท่าของเอนไซม์ในส่วนใสของอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.2.1 ดังแสดงในตารางที่ 2

3.3 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่เตรียมได้

เมื่อนำสารละลายตัวอย่างจากขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ คือ การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต, คอลัมน์ DEAE-cellulose และ α-casein agarose ตามลำดับ ไปทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอริซิสแบบไม่แปลงสภาพธรรมชาติ ตามวิธีในหัวข้อ 2.6.1 เพื่อเปรียบเทียบแบบแผนของโปรตีนตัวอย่างที่เตรียมได้จากแต่ละขั้นตอนดังกล่าว พบว่า มีแถบโปรตีนจำนวนมากในตัวอย่างตะกอนโปรตีนที่ตกด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และแถบโปรตีนเหล่านี้ส่วนใหญ่ได้จางหายไป เมื่อผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose โดยมีแถบโปรตีนที่ติดสีคูแมสซีบลูชัดเจนอยู่หนึ่งแถบ ซึ่งเมื่อผ่านขั้นตอน α-casein agarose แล้วเหลือแถบโปรตีนดังกล่าวอยู่เพียงแถบเดียว มีขนาดประมาณ 42,000 ดอลตัน เมื่อเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 4 ผลการทำให้เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 บริสุทธิ์ โดยการทำโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะเจาะจงกับ α-casein agarose ซึ่งบรรจุในคอลัมน์ ขนาด 1.2X5 เซนติเมตร ล้างคอลัมน์ ดังกล่าวด้วย 50 mM Tris-HCl ที่มี 2 mM $CaCl_2$, pH 9 อัตราเร็ว 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ต่อจากนั้นชะโปรตีนที่จับ กับคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์เดิมที่มี 1M NaCl แล้วตามด้วย 50 mM Tris-HCl-2 mM $CaCl_2$, pH 9 ที่มี 1 M NaCl และ 25 %ไอโซโพรพานอลรวมอยู่ด้วย ตามลำดับ

ตำแหน่งลูกศร A แสดงจุดเริ่มต้นการชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ที่มี 1 M NaCl

ตำแหน่งลูกศร B แสดงจุดเริ่มต้นการชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ที่มี 1 M NaCl และ ไอโซโพรพานอล

3.4 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนโดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ

เมื่อนำตัวอย่างเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผ่านขั้นตอนทั้งหมดของการทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ ตามรายละเอียดของวิธีการซึ่งระบุไว้ในหัวข้อ 2.6.2 พบว่า แถบโปรตีนที่ปรากฏมีเพียงแถบเดียว (ดังแสดงในรูปที่ 6) ซึ่งสามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลได้ เท่ากับ 42,200 ดอลตัน โดยการเปรียบเทียบค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์หรือ R_f ของเอนไซม์ดังกล่าวกับกราฟระหว่างค่า R_f ของแถบโปรตีนมาตรฐาน 6 ชนิด ได้แก่ ฟอสฟอรีเลส บี, BSA, โอวัลบูมิน, คาร์บอนิกแอนไฮเดรส, ซอยบีนทริปซินอินฮิบิเตอร์, และแอลฟา-แลคทัลบูมิน กับค่า log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแต่ละชนิด ดังแสดงในรูปที่ 7

3.5 การหาค่า pI ของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719

จากการเปรียบเทียบระยะทางการเคลื่อนที่ของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่เตรียมได้ กับแถบโปรตีนมาตรฐานที่มีค่า pI ตั้งแต่ 3.6-9.3 ในการหาค่า pI ตามรายละเอียดของวิธีการในหัวข้อ 2.7 พบว่า เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS 719 มีค่า pI ประมาณ 4.8 ดังแสดงในรูปที่ 8

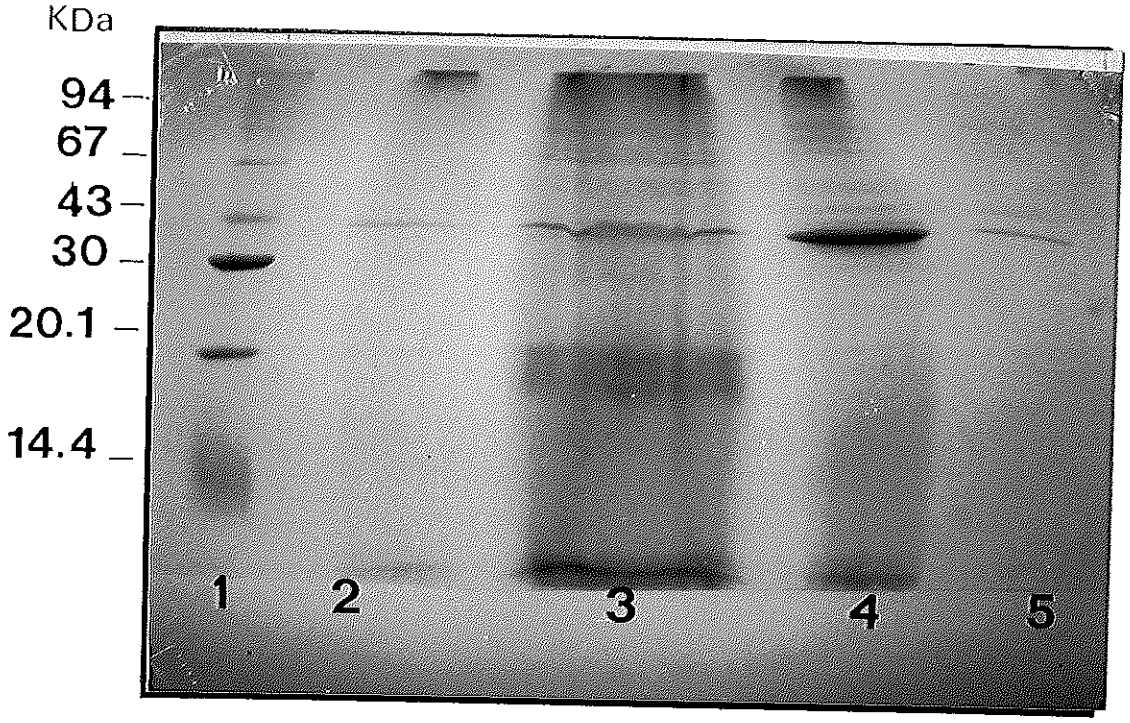
3.6 การศึกษาสมบัติต่างๆของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719

3.6.1 ปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมในสารละลายตัวอย่างสำหรับการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์

เมื่อนำส่วนใสของอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ มาหาแอคทิวิตีของเอนไซม์ย่อยโปรตีนตามวิธีการในข้อ 2.3 โดยให้มีปริมาณโปรตีนต่าง ๆ กันตั้งแต่ 0-200 ไมโครกรัม พบว่าแอคทิวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรง กับปริมาณโปรตีนที่ใช้ ดังแสดงในรูปที่ 9

3.6.2 เวลาที่เหมาะสมสำหรับการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนแรกของการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ (ข้อ 2.2) มาตรวจวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ตามวิธีในข้อ 2.3 โดยนำมาบ่มกับ 2% เอโซเคซีน ที่อุณหภูมิ 75 °ซ เป็นเวลาต่าง ๆ คือ 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที พบว่า เอนไซม์ย่อยโปรตีนในตัวอย่างดังกล่าว สามารถทำงานได้ดีด้วยอัตราเร็วเริ่มต้น (initial rate) อยู่ในช่วง 10-50 นาที โดยดูจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว



รูปที่ 5 แบบแผนของแถบโปรตีนจากการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ 10-12% โพลีอะครลาไมด์เจล ซึ่งย้อมด้วยสีคูแมสซีบลู

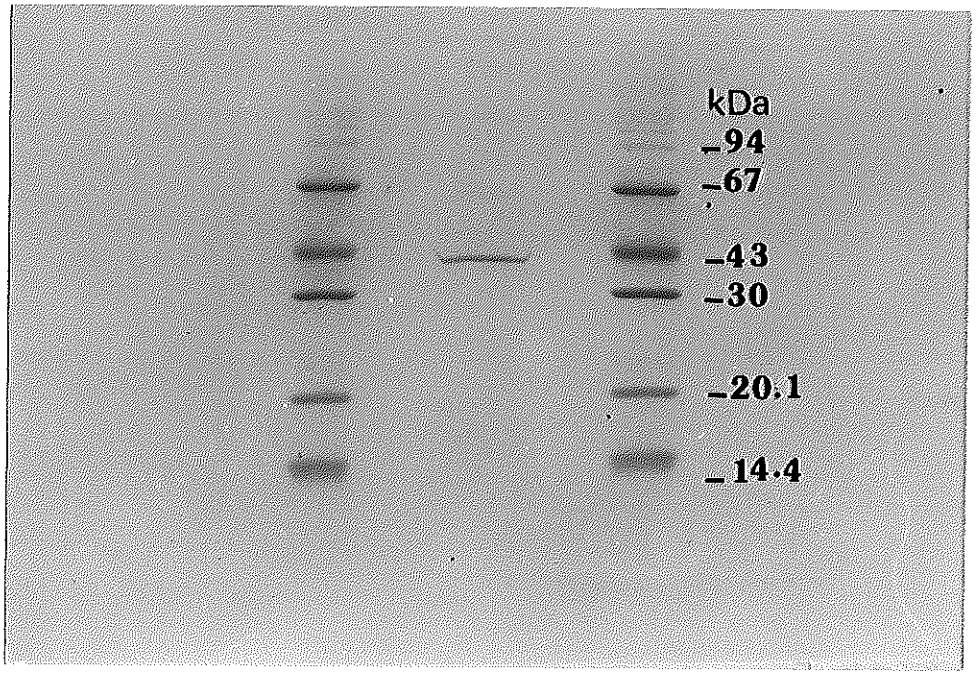
ช่องที่ 1 คือ สารละลายโปรตีนมาตรฐาน

ช่องที่ 2 คือ โปรตีนตัวอย่าง ปริมาณ 10 ไมโครกรัม ที่แยกได้จากคอลัมน์ α-casein agarose

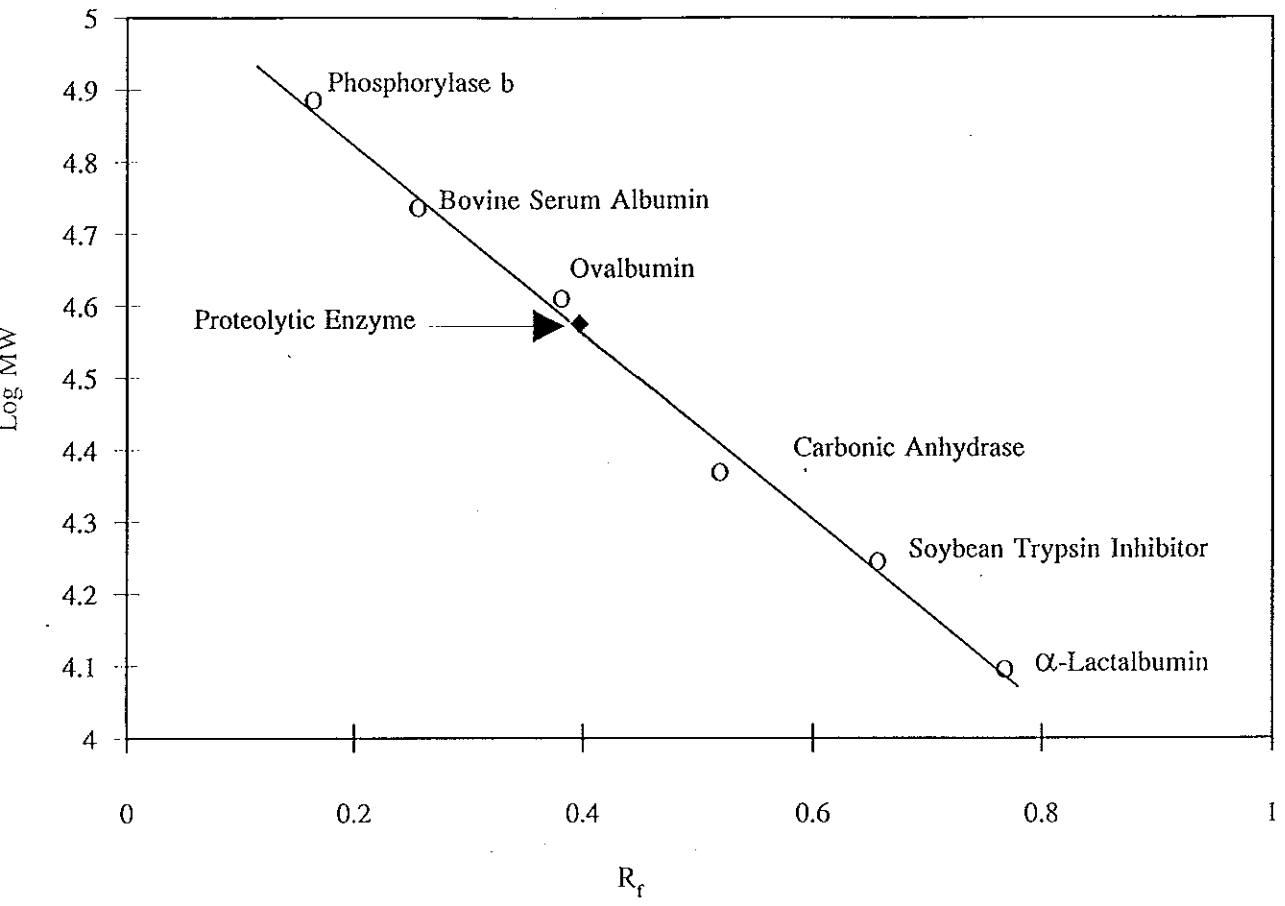
ช่องที่ 3 คือ โปรตีนตัวอย่าง ปริมาณ 30 ไมโครกรัม ที่แยกได้จากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

ช่องที่ 4 คือ โปรตีนตัวอย่าง ปริมาณ 25 ไมโครกรัม ที่แยกได้จากคอลัมน์ DEAE-cellulose

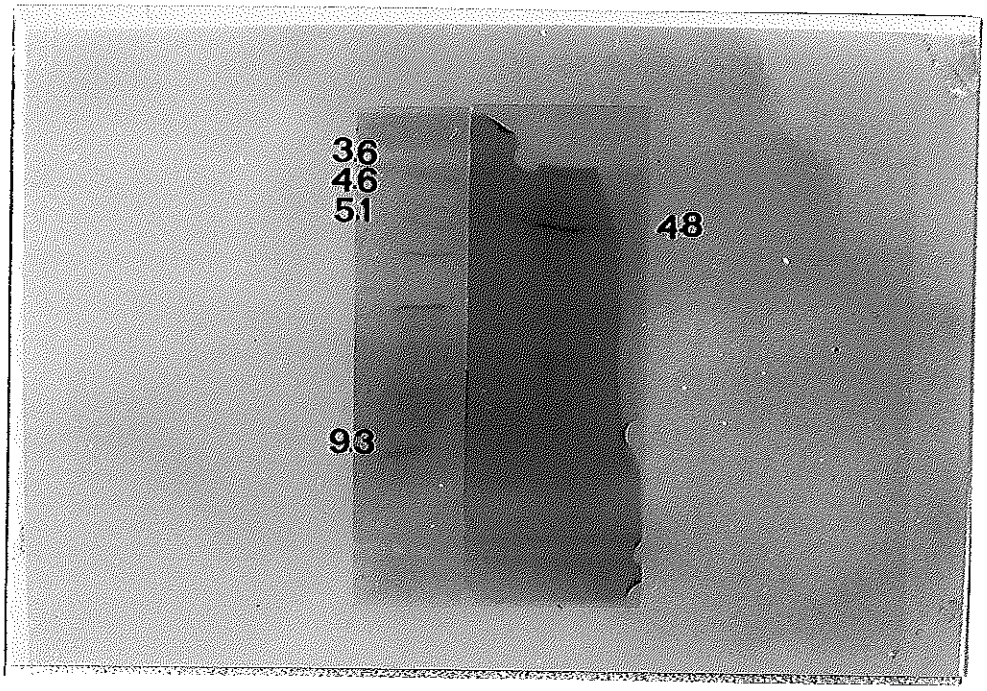
ช่องที่ 5 คือ โปรตีนตัวอย่าง ปริมาณ 12 ไมโครกรัม ที่แยกได้จากคอลัมน์ DEAE-cellulose



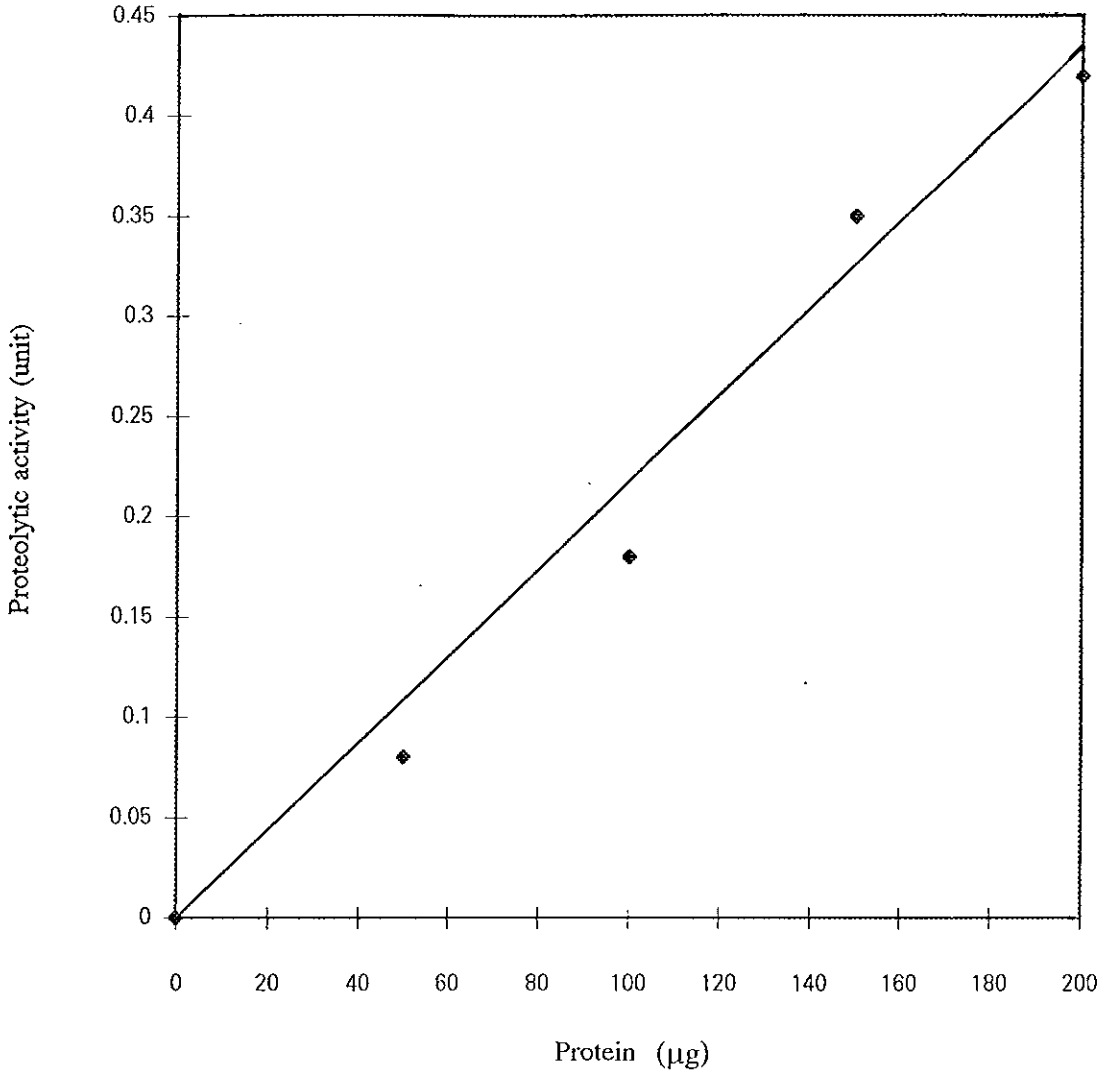
รูปที่ 6 แบบแผนของแถบโปรตีนที่ได้จากการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ 10-12% โพลีอะคริลาไมด์เจลของตัวอย่างเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่เตรียมได้ ซึ่งมีปริมาณโปรตีนอยู่ 15 ไมโครกรัม (ช่องที่ 2) เปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน (ช่องที่ 1 และ 3)



รูปที่ 7 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (R_f) กับ log น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน 6 ชนิด ได้แก่ ฟอสฟอรีเลส บ(94,000 ดอลตัน), BSA (67,000 ดอลตัน), โอวัลบูมิน (43,000 ดอลตัน), คาร์บอนิกแอนไฮเดรส (30,000 ดอลตัน), ซอยบีนทริปซินอินฮิบิเตอร์ (20,100 ดอลตัน) และ แอลฟา-แลคทัลบูมิน (14,400 ดอลตัน) ที่แยกได้จากการทำอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ เปรียบเทียบกับแถบโปรตีนของเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Proteolytic Enzyme) ที่เตรียมได้



รูปที่ 8 แบบแผนของแถบโปรตีนที่ได้จากการหาค่า pI ของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 (เจลทางขวามือ) เปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐานที่มีค่า pI ตั้งแต่ 3.6-9.3 (เจลทางซ้ายมือ)



รูปที่ 9 ผลของปริมาณโปรตีนต่อการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719
(ผลที่แสดงในรูปเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ)

คลื่น440 นาโนเมตร ซึ่งเพิ่มขึ้นในลักษณะเส้นตรง หลังจากนั้นอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเริ่มต้นคงที่ ดังตัวอย่างในรูปที่ 10

3.6.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

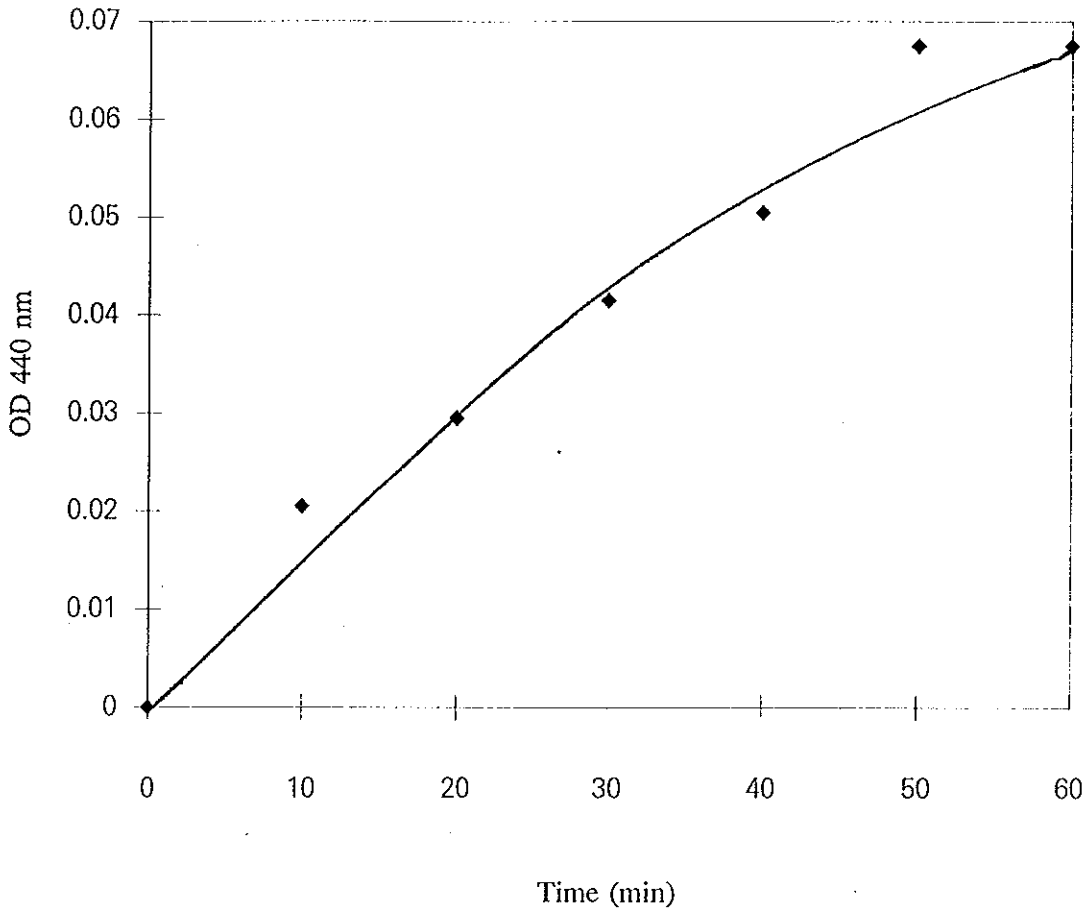
นำสารละลายเอนไซม์ย่อยโปรตีนซึ่งเป็นส่วนใสของอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ หลังปั่นเหวี่ยงเอาเซลล์แบคทีเรียออกแล้ว มาศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ 35, 45, 55, 65, 70, 75 , 80 และ 85 °ซ เป็นเวลา 30 นาที ก่อนหยุดปฏิกิริยา แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร ผลปรากฏว่าเอนไซม์ย่อยโปรตีนสามารถทำงานได้ดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 75 °ซ และ 55 °ซ ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 11

3.6.4 pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

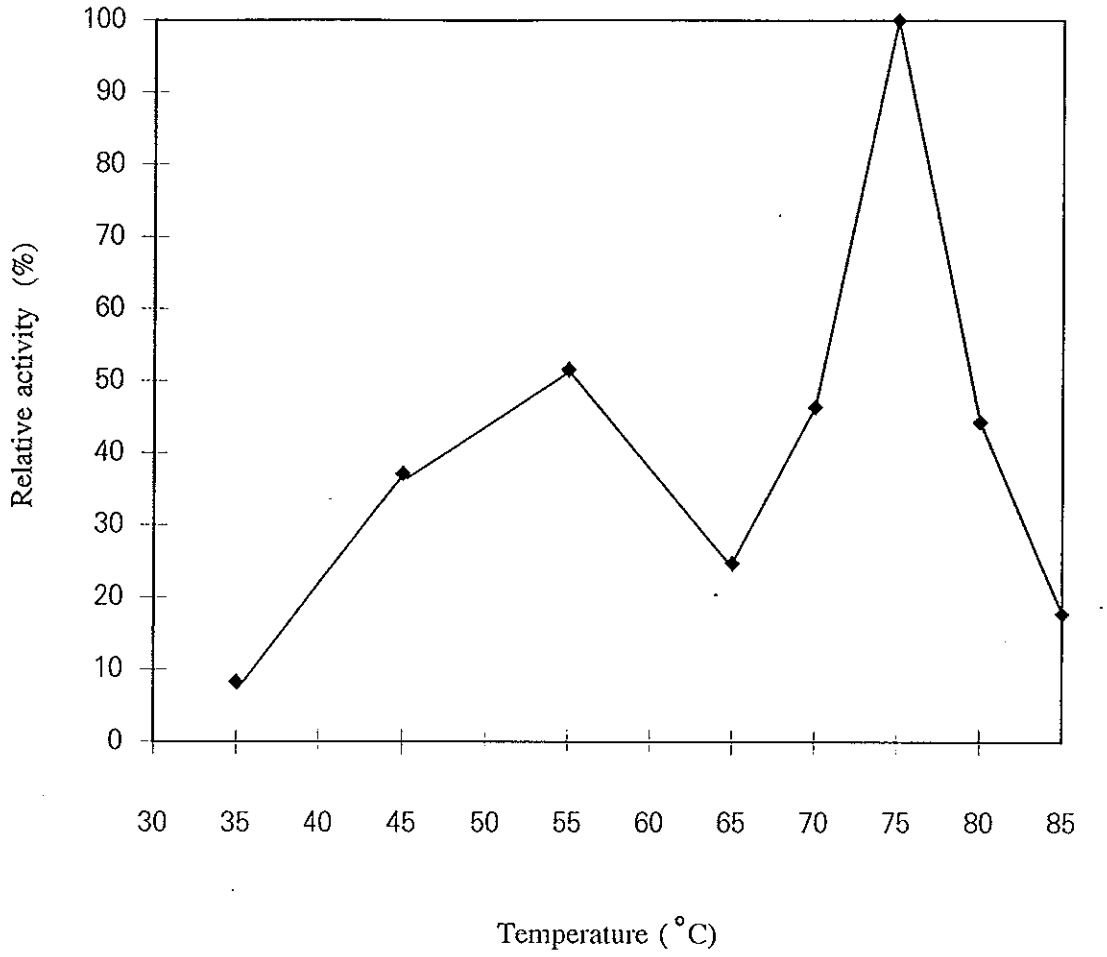
นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นแยกเอาแบคทีเรียออก จากอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อในข้อ 2.2 มาทำการไดแอไลซ์ในน้ำกลั่น ที่ 4 °ซ ค้างคืน ต่อจากนั้นจึงนำมาตรวจวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ที่อุณหภูมิ 75 °ซ โดยใช้เอโซเคซีนเป็นสับสเตรท ที่ pH ระหว่าง 6-12 ตามวิธีการในข้อ 2.3 โดยใช้ 50 mM sodium phosphate (pH 6, 7 และ 8), 50 mM Tris-HCl (pH 9) และ 50 mM glycine-NaOH (pH 10, 11 และ 12.) เป็นบัฟเฟอร์ตามลำดับ พบว่า เอนไซม์ย่อยโปรตีนในตัวอย่างดังกล่าว ปรากฏมีค่าแอคทิวิตีสูงสุดที่ pH 9 ดังแสดงในรูปที่ 12

3.6.5 ความเสถียรต่อ pH (pH stability) ของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่เตรียมได้

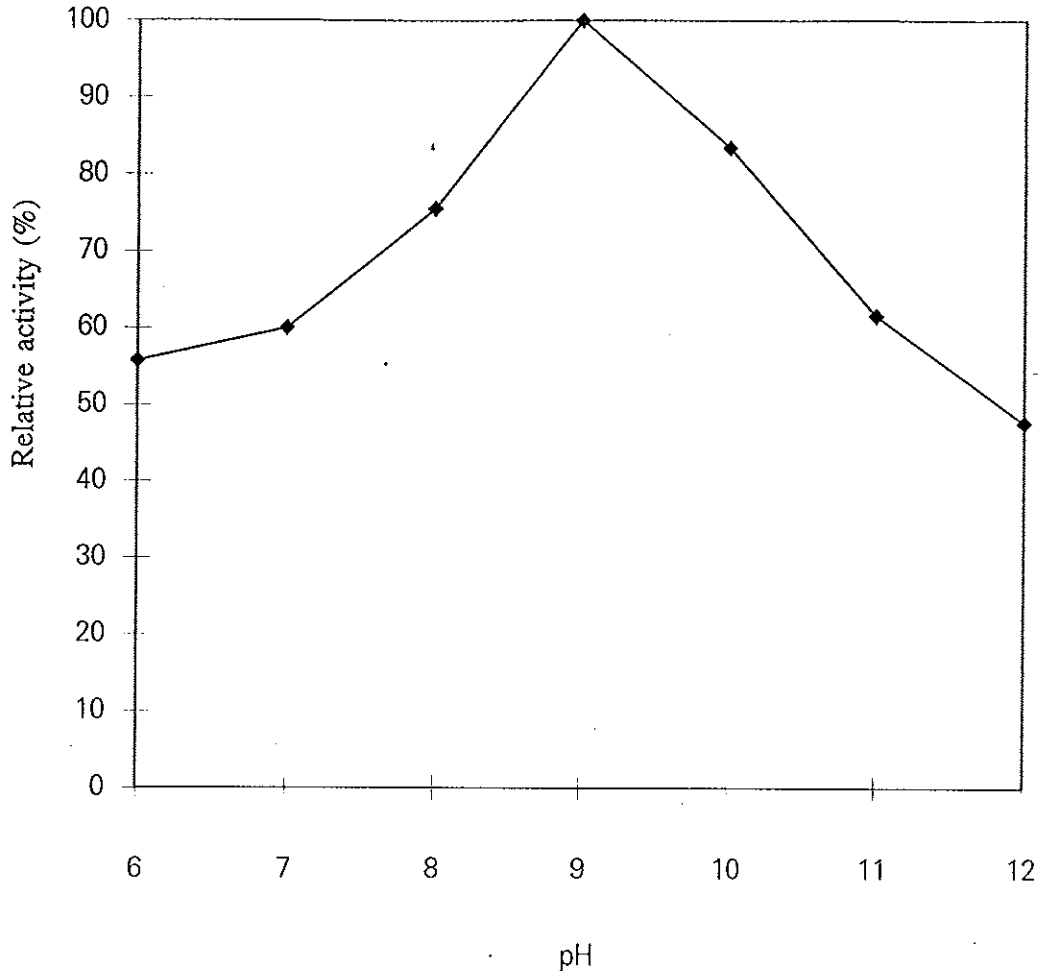
นำสารละลายเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนสุดท้ายของการทำให้บริสุทธิ์มาไดแอไลซ์ในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ คือ 50 mM sodium acetate (pH 4-5), 50 mM sodium phosphate (pH 6-8), 50 mM Tris-HCl (pH 9) และ 50 mM glycine-NaOH (pH 10-12) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง แล้วนำมาไดแอไลซ์ในน้ำกลั่นต่ออีกประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาทดสอบแอคทิวิตีที่เหลือของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ pH 9 ตามวิธีที่ระบุไว้ในข้อ 2.3 ผลปรากฏว่าในสภาวะที่ไม่มี Ca^{2+} อยู่ด้วย เอนไซม์ย่อยโปรตีนโปรตีนจาก *Bacillus* PS 719 สามารถคงทนต่อ pH ซึ่งอยู่ในช่วง 8-10 ได้ดี ในขณะที่แอคทิวิตีของเอนไซม์ดังกล่าวลดลงอย่างมาก ที่ pH ระหว่าง 4 ถึง 7 และ 11 ถึง 12 โดยมีค่าแอคทิวิตีสัมพัทธ์ (relative activity) ของเอนไซม์โดยเฉลี่ย แค่ 50 % ที่ pH 4 และ 12 เมื่อเทียบกับที่ pH 9 ดังแสดงในรูปที่ 13



รูปที่ 10 ผลของการบ่มสารละลายเอนไซม์กับเอโซเคซีนที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน
(ผลที่แสดงในรูปเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ)



รูปที่ 11 ผลของการหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719
(ผลที่แสดงในรูปเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ)



รูปที่ 12 ผลการหาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน
ที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719
(ผลที่แสดงในรูปเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ)

3.6.6 ความคงทนต่ออุณหภูมิ (temperature stability) ของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่เตรียมได้

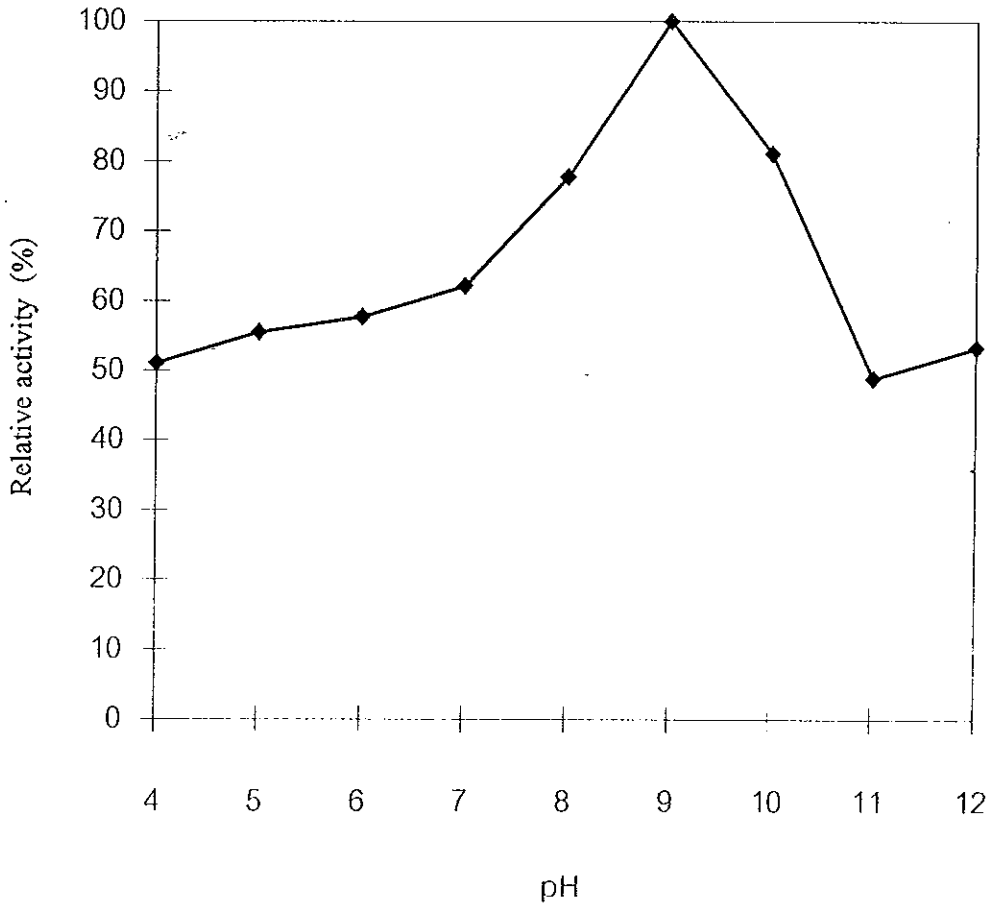
นำตัวอย่างเอนไซม์ซึ่งทำให้บริสุทธิ์แล้ว มาบ่ม ที่อุณหภูมิ ต่างๆ กัน คือ 40, 50, 60, 70, 80 และ 100 °ซ ใน 50 mM Tris-HCl, pH 9 เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที แล้วตรวจวัดแอคทิวิตีที่เหลือของเอนไซม์ย่อยโปรตีน โดยใช้เอโซเคซีนเป็นสับสเตรท ที่อุณหภูมิ 75 °ซ ตามวิธีในข้อ 2.3 ผลปรากฏว่า เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* PS719 มีความคงทนต่ออุณหภูมิในช่วง 40-80 °ซ ได้ดี หลังจากนั้นเอนไซม์จะสูญเสียแอคทิวิตีไปเรื่อย ๆ โดยที่อุณหภูมิ 90 และ 100 °ซ มีค่าแอคทิวิตีสัมพัทธ์เหลือเพียง 42 และ 34 % ตามลำดับ ในสภาวะที่ปราศจาก Ca^{2+} ดังแสดงในรูปที่ 14

3.6.7 อิทธิพลของอิออนต่าง ๆ ต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719

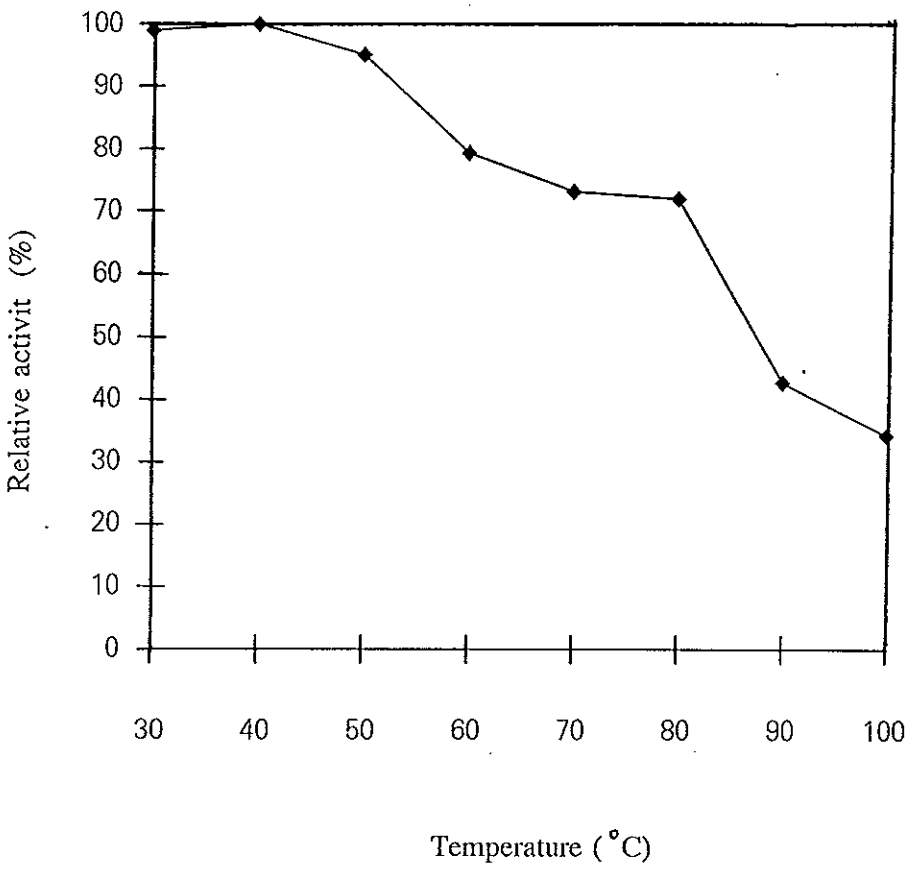
จากการเปรียบเทียบผลการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่เตรียมได้ โดยใช้เอโซเคซีนเป็นสับสเตรท ที่ pH 9 ตามวิธีการในข้อ 2.3 ในสภาวะที่มีไดวาเลนท์แคทอิออน (divalent cation) ต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2 mM ได้แก่ Ca^{2+} ในรูปของเกลือ $CaCl_2$, Mg^{2+} ในรูป $MgCl_2$, Cu^{2+} ในรูป $CuSO_4$, Zn^{2+} ในรูป $ZnSO_4$, Mn^{2+} ในรูป $MnCl_2$ และ Fe^{2+} ในรูป $FeSO_4$ ผลปรากฏว่า Cu^{2+} และ Fe^{2+} ที่ความเข้มข้นซึ่งใช้ทดสอบ มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ Ca^{2+}, Mg^{2+} และ Mn^{2+} สามารถกระตุ้นแอคทิวิตีของเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ดี โดยเฉพาะ Ca^{2+} สามารถกระตุ้นแอคทิวิตีได้สูงสุด โดยมีค่าแอคทิวิตีสัมพัทธ์ เพิ่มขึ้นถึง 85 % เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งไม่มีอิออนใด ๆ ปะปนอยู่ด้วย ดังแสดงในรูปที่ 15

3.6.8 ความเข้มข้นของ Ca^{2+} ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

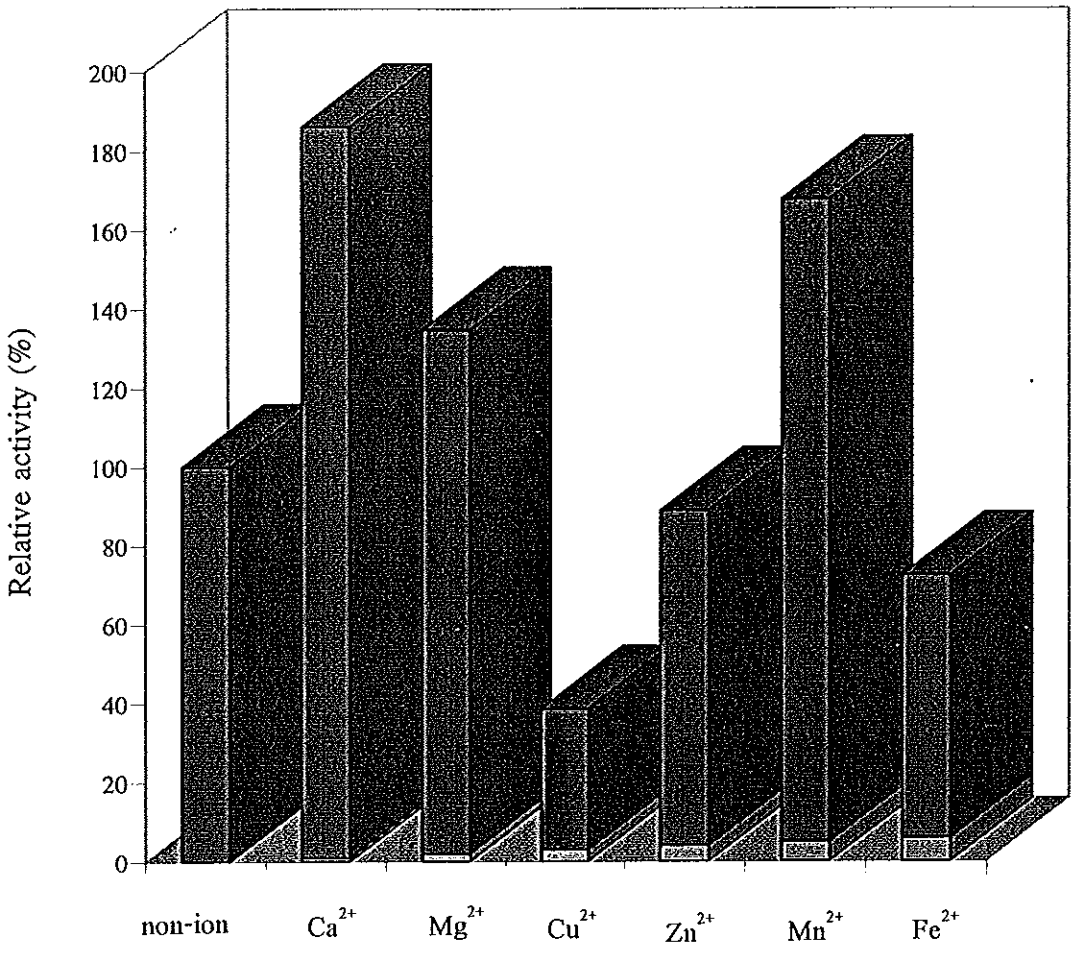
จากการเปรียบเทียบผลการวัดแอคทิวิตีเอนไซม์ย่อยโปรตีน ตามวิธีการในหัวข้อ 2.3 โดยมี Ca^{2+} ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-8 mM พบว่า Ca^{2+} สามารถกระตุ้นแอคทิวิตีของเอนไซม์ให้เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตั้งแต่ 0.01-2 mM โดยมีค่าแอคทิวิตีสัมพัทธ์เพิ่มขึ้นถึง 129.3 % เมื่อเทียบกับหลอดควบคุมซึ่งไม่มี Ca^{2+} อยู่เลย ในขณะที่ความเข้มข้น 8 mM ของ Ca^{2+} มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวบางส่วน ดังแสดงในรูปที่ 16



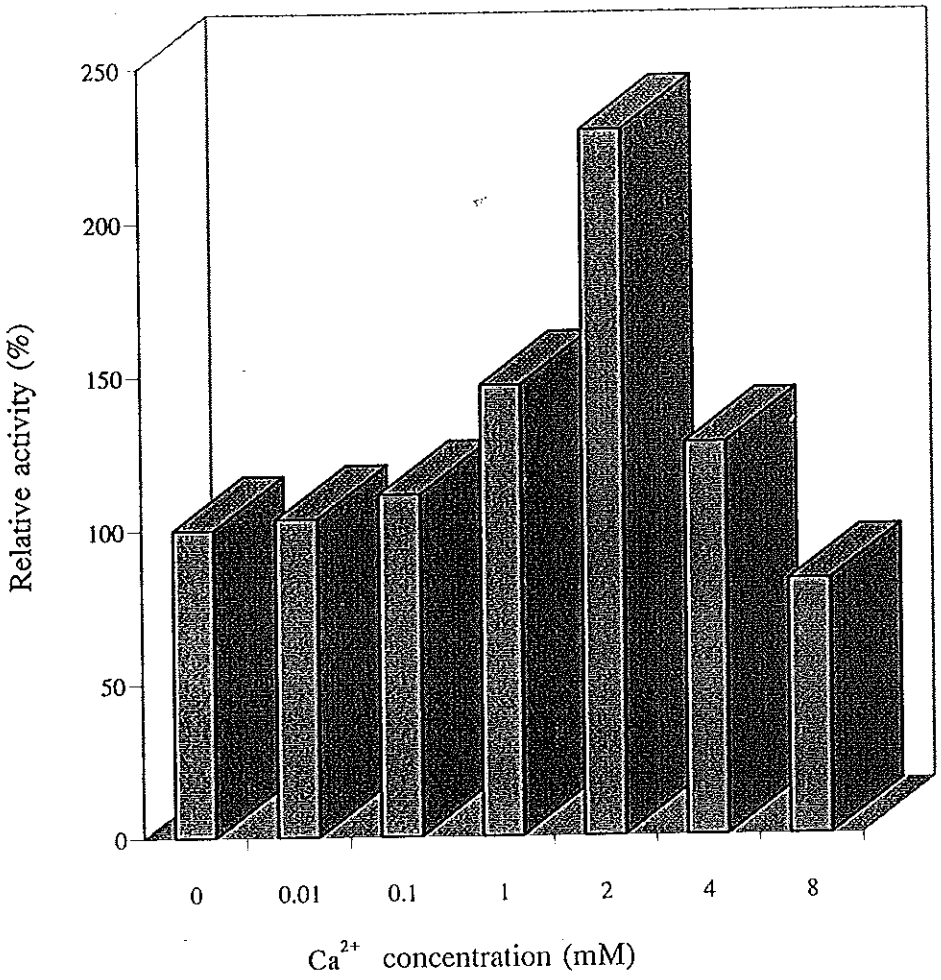
รูปที่ 13 ผลของการทดสอบความคงทนต่อ pH ของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719
(ผลที่แสดงในรูปเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ)



รูปที่ 14 ผลของการทดสอบความคงทนต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719
(ผลที่แสดงในรูปเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ)



รูปที่ 15 อิทธิพลของอิออนต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 2 mM ต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719



รูปที่ 16 เปรียบเทียบผลของ Ca^{2+} ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิต โดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719

3.6.9 ผลของสารยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีน ชนิดต่าง ๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719

จากการวัดแอคทิวิตีของเอนไซม์ย่อยโปรตีนบริสุทธิ์ที่เตรียมได้ ตามวิธีการในข้อ 2.3 เมื่อมีสารยับยั้งของเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดต่าง ๆ อยู่ด้วย ผลปรากฏว่า เอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดนี้ ถูกยับยั้งการทำงานด้วย 0.1-10 mM PMSF และ 3,4-DCI โดยที่ความเข้มข้น 10 mM สารประกอบเหล่านี้สามารถยับยั้งแอคทิวิตีของเอนไซม์ได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่กรดไอโอโดแอซีติก (iodoacetic acid) ที่ความเข้มข้น 0.1-10 mM ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เลย ส่วน EDTA มีผลยับยั้งบางส่วน นอกจากนี้ เอนไซม์ยังถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วย TLCK ที่ความเข้มข้น 10 μM ในขณะที่ TPCK และเปปสตาติน (pepstatin) ที่ช่วงความเข้มข้นเดียวกัน ไม่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนดังกล่าว ดังแสดงในตารางที่ 3

3.6.10 ความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์ย่อยโปรตีนจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719

เมื่อนำเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 มาทดสอบความสามารถในการย่อยสับสเตรทสังเคราะห์ชนิดต่าง ๆ พบว่า เอนไซม์นี้สามารถย่อย N-CBZ-L-arginine *p*-nitroanilide, N-CBZ-gly-pro-arg *p*-nitroanilide และ N-CBZ-val-gly-arg *p*-nitroanilide ได้ดี ตามลำดับ แต่ไม่สามารถย่อย N-CBZ-gly-gly-leu *p*-nitroanilide และ N-CBZ-L-phenylalanine *p*-nitroanilide ได้ ดังแสดงผลเปรียบเทียบค่าแอคทิวิตีสัมพัทธ์ ของเอนไซม์ที่ได้จากปฏิกิริยาการย่อยสับสเตรททั้ง 6 ชนิด ดังกล่าว ไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบผลของสารยับยั้งชนิดต่าง ๆ ต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตโดย *Bacillus* สายพันธุ์ PS719

สารยับยั้ง	ความเข้มข้น	Relative activity (%) (X±SD, n=3)
no inhibitor	-	100
iodoacetic acid	0.1 mM	111.1±0.03
	1 mM	103.7±0.01
	10 mM	85.2±0.02
PMSF	0.1 mM	63.9±0.01
	1 mM	30.6±0.07
	10 mM	0
3,4DCI	0.1 mM	53.7±0.01
	1 mM	28.9±0.55
	10 mM	10.5±0.09
EDTA	0.1 mM	83.3±0.08
	1 mM	60.2±0.02
	10 mM	55.6±0.11
pepstatin	10 µM	94.9±0.03
TLCK	10 µM	0
TPCK	10 µM	115.4±0.15

ตารางที่ 4 ผลการย่อยสับสเตรทสังเคราะห์ชนิดต่าง ๆ ของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719

สับสเตรทที่ทดสอบ	Relative activity (%)
N-CBZ-ala-ala-leu *p*-nitroanilide	24.32
N-CBZ-L-arginine *p*-nitroanilide	100
N-CBZ-gly-gly-leu *p*-nitroanilide	10.21
N-CBZ-gly-pro-arg *p*-nitroanilide	53.75
N-CBZ-L-phenylalanine *p*-nitroanilide	10.81
N-CBZ-val-gly-arg *p*-nitroanilide	36.04

(ผลที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ)

4. วิจารณ์

4.1 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. PS719

Bacillus สายพันธุ์ PS719 ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน บริเวณบ่อน้ำพุร้อน ในอำเภอควนกาหลง จังหวัดสตูล เป็นแบคทีเรียที่มีสมบัติเติบโตได้ดีในสภาวะด่าง ที่ pH 9-11 และอุณหภูมิ 50 °ซ แต่สามารถหลั่งเอนไซม์ย่อยโปรตีนออกสู่นอกเซลล์ ได้ดีในช่วง pH 9-12 ที่อุณหภูมิ 55 °ซ (ประเสริฐ และคณะ 2541) ในการศึกษานี้ เพื่อให้ได้ปริมาณของเอนไซม์เพียงพอ สำหรับขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ต่อไป จึงทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus* ดังกล่าวในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ ที่มี 1% skim milk อยู่ด้วย ที่ pH 9 และอุณหภูมิ 55 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่พบว่า แบคทีเรียดังกล่าวมีการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด (ประเสริฐ และคณะ 2541) จากนั้นจึงนำอาหารเหลวที่ได้แยกเอาตัวเชื้อแบคทีเรียออกไปแล้ว มาทดสอบแอคทิวิตีของเอนไซม์ย่อยโปรตีน โดยใช้เอโซเคซีน ซึ่งเป็นโปรตีนที่เอนไซม์นี้สามารถย่อยได้ดีกว่าฮีโมโกลบิน และเคซีน ตามลำดับ (ประเสริฐ และคณะ 2541) เป็นสับสเตรท ซึ่งพบว่า การย่อยเอโซเคซีนของเอนไซม์ดังกล่าวเกิดขึ้นดีที่สุด ที่ pH 9 โดยมีอุณหภูมิเหมาะสมเท่ากับ 75 °ซ ดังนั้นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. PS719 จึงจัดเป็นเอนไซม์ชนิดที่ทำงานได้ดีในสภาวะด่าง และอุณหภูมิสูงเช่นเดียวกับที่ผลิตจาก *Bacillus* ที่ชอบด่างและอุณหภูมิสูงอื่น ๆ ซึ่งเคยมีรายงานมาแล้ว เช่น *Bacillus* sp. no. AH-101 ซึ่งเติบโตได้ดีที่ pH 7-11 และอุณหภูมิ 20-50 °ซ แต่ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ดีที่ pH 9.5 และอุณหภูมิ 37 °ซ เอนไซม์สามารถย่อยเคซีนได้ดีที่ pH ระหว่าง 12-13 และอุณหภูมิ 80 °ซ (Takami *et al.*, 1989) ส่วน *Bacillus* sp. B18 ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ดีที่ pH 10.5 และอุณหภูมิ 40 °ซ โดยเอนไซม์มีแอคทิวิตีสูงสุดที่ pH 12-13 และอุณหภูมิ 85 °ซ (Fujiwara *et al.*, 1993) และ *Bacillus stearothermophilus* F1 ซึ่งผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ดีที่ pH 10 และอุณหภูมิ 60 °ซ เอนไซม์ดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ดีที่ pH 9 และอุณหภูมิ 85 °ซ (Razak *et al.*, 1995) เป็นต้น

ส่วนในขั้นตอนการทำให้เอนไซม์ดังกล่าวบริสุทธิ์นั้น เมื่อนำสารละลายใสของอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* PS719 ไปทำการตกตะกอนโปรตีนแบบ salting out โดยใช้สารเคมีที่มีสมบัติสามารถแย่งจับกับน้ำได้ดี เนื่องจากสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจน (H-bond) กับน้ำได้ จึงทำให้โมเลกุลโปรตีนซึ่งเดิมจับอยู่กับน้ำ แยกตัวตกตะกอนลงมา อย่างเช่น

เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการทดลองนี้ พบว่า ที่ความอิ่มตัวของเกลือดังกล่าวเท่ากับ 80% สามารถทำให้โปรตีนที่อยู่ในสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวตกตะกอนได้เพียง 53% ซึ่งสันนิษฐาน ได้ว่า โปรตีนส่วนที่เหลือซึ่งไม่สามารถตกตะกอนลงมาด้วยเกลือดังกล่าวนั้น อาจเป็นเพียงสายเปปไทด์สั้น ๆ ที่เกิดจากการย่อยโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจากแบคทีเรียดังกล่าว รวมกับที่มีอยู่แล้วใน yeast extract ซึ่งสามารถให้ผลบวกกับการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry และคณะ (1951) นอกจากนี้ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว ที่เป็นสารละลายสีเหลืองอ่อน อาจจะทำให้เกิดผลบวกปลอม (false positive) ในการหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีดังกล่าวด้วย อย่างไรก็ตาม พบว่า เอนไซม์ย่อยโปรตีนส่วนใหญ่ที่มีอยู่ในสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ (ประมาณ 81%) ได้ตกตะกอนลงมา โดยคิดเป็นแอคทิวิตีของเอนไซม์ในส่วนนี้ทั้งหมด เท่ากับ 961 หน่วย เทียบกับ 1,184 หน่วย ในสารละลายใสของอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1,200 มิลลิลิตร เมื่อเริ่มต้น

จากการที่พบว่า เอนไซม์ย่อยโปรตีนนี้จับกับ DEAE-cellulose ในสภาวะที่ pH เป็นด่าง สามารถบ่งชี้การมีประจุสุทธิเป็บลบของเอนไซม์ดังกล่าวได้เป็นอย่างดี ทั้งนี้เนื่องจากการแตกตัวของหมู่คาร์บอกซีของกรดอะมิโนแอสพาร์ติกและกลูตามิกที่เป็นองค์ประกอบนั่นเอง ซึ่งยืนยันได้จากผลของการหาค่า pI ของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่เตรียมได้ ซึ่งมีค่าประมาณ 4.8 อย่างไรก็ตาม ถึงแม้จะสามารถแยกเอนไซม์ที่ต้องการออกมาจากคอลัมน์ DEAE-cellulose ได้ด้วย 0.25 M NaCl แต่พบว่า ยังมีโปรตีนอื่น ๆ ร่วมชะออกมาด้วย โดยสังเกตได้จากแบบแผนของแถบโปรตีนที่ได้ จากการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพของตัวอย่างที่แยกได้จากขั้นตอนนี้ (รูปที่ 5) ดังนั้นเมื่อนำเอนไซม์ที่ได้จากขั้นตอนโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออน ไปผ่านคอลัมน์ α-casein agarose จึงพบมีโปรตีนกลุ่มที่ไม่จับกับเรซินดังกล่าวถูกชะออกมาด้วยบัฟเฟอร์ที่ไม่มี NaCl ในขณะที่เอนไซม์ย่อยโปรตีนของ *Bacillus* sp. PS719 สามารถจับกับ α-casein agarose ได้ และถูกชะออกมาด้วย 1 M NaCl ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดเดียวกัน ที่มีรายงานผลิตจาก *Bacillus thermoruber* ที่ต้องใช้ไอโซโพรพานอล ชะออกมาจากคอลัมน์ชนิดเดียวกัน (Manachini *et al.*, 1988) แสดงว่า เอนไซม์นี้สามารถจับกับ α-casein ได้ดีแต่ไม่ได้เป็นการจับแบบจำเพาะเจาะจง ดังนั้นจึงไม่สามารถย่อยโปรตีนดังกล่าวได้ และเมื่อนำตัวอย่างเอนไซม์ที่เตรียมได้จากขั้นตอนสุดท้ายนี้ ไปทดสอบความบริสุทธิ์ โดยวิธีอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ พบว่า เอนไซม์ที่เตรียมได้มีความบริสุทธิ์เพียงพอ

โดยปรากฏแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว ซึ่งสามารถเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าดังกล่าวได้ใกล้เคียงกับแถบโปรตีนมาตรฐานโอวัลบูมิน ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 43,000 ดอลตัน ดังนั้นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่เตรียมได้จากการทดลองนี้ พบว่า มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 18.5 เท่า จากในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีปริมาณของเอนไซม์เหลืออยู่เพียง 39% เท่านั้น ทั้งนี้อาจเกิดจากการที่เอนไซม์บางส่วนเสียสภาพธรรมชาติ (denature) ไป เนื่องจากกระบวนการย่อยตัวเองในระหว่างขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์นั่นเอง

4.2 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ที่เตรียมได้

ผลการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพธรรมชาติของตัวอย่างเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่เตรียมได้ใกล้เคียงกับผลของการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบไม่แปลงสภาพ กล่าวคือ ปรากฏแถบโปรตีนเพียงแถบเดียวที่มีขนาดประมาณ 42,000 ดอลตัน ซึ่งแสดงว่าโครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์นี้ไม่ได้ประกอบด้วยหลายหน่วยย่อย (subunit) แต่เป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว เอนไซม์นี้มีขนาดใหญ่กว่า เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* spp.ทั่วไป ซึ่งส่วนใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลไม่เกิน 30,000 ดอลตัน (Ward, 1983) แต่มีขนาดใกล้เคียงกับเอนไซม์ชนิดเดียวกันที่ผลิตจาก *B. thermoruber* ซึ่งมีขนาด 38,000 ดอลตัน (Manachini *et al.*, 1988)

จากผลการศึกษาความคงทนของเอนไซม์นี้ พบว่า เมื่อไม่มี Ca^{2+} อยู่ด้วย เอนไซม์มีความเสถียรเฉพาะในช่วง pH เป็นด่างค่อนข้างแก่ คือ ระหว่าง 8-10 โดยที่ pH 9 มีแอคทิวิตีคงเหลือสูงที่สุด ในขณะที่ pH เป็นกรด-ด่างรุนแรงกว่านี้ แอคทิวิตีของเอนไซม์ลดลงเรื่อย ๆ จนเหลือประมาณครึ่งหนึ่ง ที่ pH 4 และ 11 (รูปที่ 13) โดยเฉพาะที่ pH 4 พบว่าเอนไซม์ส่วนหนึ่งได้เสียสภาพธรรมชาติและตกตะกอนลงมาด้วย นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีสมบัติทนความร้อนสูงได้ค่อนข้างดี เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงถึง 80 °ซ นาน 10 นาที แอคทิวิตีของเอนไซม์ลดลงเพียง 30% ดังแสดงในรูปที่ 14 ทั้งนี้เพื่อความเหมาะสมกับการดำรงอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เป็นบริเวณบ่อน้ำพุร้อนของเอนไซม์ดังกล่าวนั่นเอง เช่นเดียวกับเอนไซม์ย่อยโปรตีนซึ่งผลิตออกสู่นอกเซลล์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากสภาพแวดล้อมใกล้เคียงกัน อย่างเช่น ซีรีนโปรติเนสจาก *Desulfurococcus* สายพันธุ์ Tok12S1 ที่แยกได้จากบริเวณภูเขาไฟ Tokoaanu ในประเทศนิวซีแลนด์ ซึ่งสามารถทนอุณหภูมิสูงถึง 95 °ซ ได้ดี (Cowan *et al.*, 1987) ส่วนแบคทีเรีย *Kurthia spiroforme*, sp. nov. ซึ่งแยกได้จากบริเวณบ่อน้ำพุร้อน

ใน Yellow Stone National Park ประเทศสหรัฐอเมริกา ผลิตเมทาลโลโปรติเนสขนาดเล็ก ซึ่งทนอุณหภูมิสูง 50 °ซ ได้ถึง 24 ชั่งโมงเมื่อมี Ca^{2+} อยู่ด้วย (Bernie Steele *et al.*, 1992) นอกจากนี้ไธออลโปรติเนสที่ผลิตจาก *Pyrococcus* sp. ซึ่งแยกได้จากบริเวณน้ำพุร้อน (solfatara) บริเวณเกาะ Kodakara ในประเทศญี่ปุ่น พบว่า สามารถทนอุณหภูมิ 90 °ซ ได้ถึง 2 ชั่งโมง (Morikawa *et al.*, 1994) และเมื่อไม่นานมานี้ได้มีรายงานเกี่ยวกับ *Bacillus* spp. ต่าง ๆ ที่แยกได้จากบริเวณบ่อน้ำพุร้อน 3 แห่ง ของทะเลทราย Orissa ประเทศอินเดีย ซึ่งพบว่า เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงถึง 75 °ซ และผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนออกนอกเซลล์ ซึ่งทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงถึง 50-60 °ซ (Rath and Subramanyam, 1996) เป็นต้น

จากผลการศึกษาอิทธิพลของอิออน โดยเฉพาะในกลุ่มไดวาเลนท์แคทอิออนต่าง ๆ ที่อาจมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่า Ca^{2+} ที่ความเข้มข้น 2 mM มีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ดีที่สุด เช่นเดียวกับเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus* ส่วนใหญ่ (Ward., 1983) รองลงมา คือ Mn^{2+} และ Mg^{2+} ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบสารยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดต่าง ๆ ต่อแอคทิวิตีของเอนไซม์นี้ ที่ความเข้มข้นซึ่งสารยับยั้งเหล่านี้มีการออกฤทธิ์ได้ผล (effective concentration) (Beynon and Salvesen, 1990) พบว่าทั้ง PMSF และ 3,4-DCI ที่ความเข้มข้น 10 mM สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้อย่างรุนแรง ซึ่งเป็นข้อบ่งชี้ที่สำคัญว่า เอนไซม์นี้จัดเป็นซีรีนโปรติเนส ในขณะที่ผลยับยั้งบางส่วนของ EDTA นั้น เกิดจากการคีเลต Ca^{2+} ที่มีอยู่ในสารผสม (reaction mixture) นั่นเอง อย่างไรก็ตาม ประเสริฐ และคณะ 2541 พบว่า EDTA ไม่มีผลยับยั้งใด ๆ ต่อเอนไซม์นี้เมื่อทดสอบกับสารละลายเอนไซม์ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ โดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรท และไม่มี Ca^{2+} อยู่ด้วย ซึ่งปกติเป็นสมบัติของซีรีนโปรติเนสทั่วไป ที่สารคีเลตชนิดนี้ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ (Ward, 1983) นอกจากนี้การที่ TLCK ซึ่งเป็นสารยับยั้งจำเพาะของทริปซิน สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ได้ แสดงว่า เอนไซม์มีสมบัติคล้ายคลึงกับทริปซิน ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 จัดอยู่ในกลุ่มซีรีนโปรติเนสที่คล้ายคลึงกับทริปซิน ซึ่งปกติเอนไซม์กลุ่มนี้มีรายงานผลิตจากกลุ่มแบคทีเรีย *Streptomyces* spp. เป็นส่วนใหญ่ (Ward, 1983) ทั้งนี้ยืนยันได้จาก ผลการย่อยสับสเตรทสังเคราะห์ ที่พบว่า เอนไซม์สามารถย่อย N-CBZ-L-arginine *p*-nitroanilide ซึ่งเป็นสับสเตรทจำเพาะของทริปซิน (Morihara *et al.*, 1974) ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ N-CBZ-pro-arg-*p*-nitroanilide และ N-CBZ-val-arg-*p*-nitroanilide

ตามลำดับ แต่ย่อย N-CBZ-ala-ala-leu-*p*-nitroanilide ซึ่งเป็นสับสเตรทจำเพาะของสับไทลิซิน (Morihara *et al.*, 1974) ได้ไม่ดีนัก และไม่สามารถย่อย N-CBZ-gly-gly-leu-*p*-nitroanilide และ N-CBZ-L-phenylalanine *p*-nitroanilide ซึ่งเป็นสับสเตรทจำเพาะสำหรับเธอร์โมไลซินได้ (Morihara *et al.*, 1974) แสดงว่า เอนไซม์นี้ไม่มีความชอบต่อกรดอะมิโนที่มีหมู่แทนที่เป็นวงแหวน อย่างเช่น ฟีนิลอะลานีน และกรดอะมิโนที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำ อย่างเช่น ลูซีน

จากผลการศึกษาสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacilllus* PS719 ในครั้งนี้ จะเห็นได้ว่า เอนไซม์นี้ซึ่งมีสมบัติเป็นซีรีนโปรติเนสที่คล้ายคลึงกับทริปซิน ที่ไม่เคยมีรายงานว่า ผลิตจาก *Bacillus* ชนิดใดมาก่อน และมีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมผลิตผงซักฟอกได้ดี ทั้งนี้เนื่องจากมีสมบัติที่เหมาะสมหลายประการ คือ ทำงานได้ดีและเสถียรที่สภาวะด่างแก่และอุณหภูมิสูง ซึ่งเป็นสมบัติสำคัญของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในผงซักฟอก ที่จะต้องทำงานใน pH ระหว่าง 9-12 (Kalisz, 1988) และสามารถย่อยโปรตีนต่าง ๆ ได้หลายชนิด รวมทั้งทนต่อสารลดแรงตึงผิว สารปรุงแต่ง และสารคีเลต ที่ใช้ผสมกับผงซักฟอกทั่วไปได้ดี (ประเสริฐ และคณะ 2541) นอกจากนี้การที่ Ca^{2+} และ Mg^{2+} ซึ่งเป็นอิออนที่พบอยู่ทั่วไปในน้ำกระด้าง ตลอดจน Mn^{2+} ซึ่งปัจจุบันมักมีการเติมลงไปในผงซักฟอกเพื่อช่วยทำให้ผ้าขาวขึ้น มีผลกระตุ้นแอคทิวิตีของเอนไซม์นี้ได้ดี นับได้ว่า มีส่วนสนับสนุนให้เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. PS719 มีความเหมาะสมมากขึ้นในการนำมาใช้งานร่วมกับผงซักฟอก ดังนั้นการศึกษาเพิ่มเติมทางด้านพันธุวิศวกรรมของเอนไซม์นี้ เพื่อเป็นแนวทางสำหรับพัฒนาการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจอย่างยิ่ง

5. สรุป

จากการศึกษาเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. สามารถทำให้เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตจาก *Bacillus* สายพันธุ์ PS719 มีความบริสุทธิ์ได้โดยการตกตะกอนโปรตีนในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 80% ของความอิ่มตัว ตามด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออน กับ DEAE-cellulose และคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบจำเพาะเจาะจง กับ α-casein agarose ตามลำดับ

2. หลังผ่านขั้นตอนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ต่าง ๆ ข้างต้น เอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 18.5 เท่า และมีปริมาณสุทธิคิดเป็น 39 % เมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้น

3. เอนไซม์ที่เตรียมได้ พบว่า มีลักษณะโครงสร้างเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 42,200 ดอลตัน จากการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซิสแบบแปลงสภาพ

4. เอนไซม์นี้ย่อยเอโซเคซีนได้ดีที่ pH เหมาะสม 9 และอุณหภูมิเหมาะสม 75 °ซ

5. เอนไซม์มีค่า pI เท่ากับ 4.8 จึงจัดเป็นแอซิดิกโปรตีน (acidic protein) ชนิดหนึ่ง

6. Ca^{2+} ที่ความเข้มข้น 2 mM สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ได้ดี รองลงมา คือ Mn^{2+} และ Mg^{2+} ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน

7. เอนไซม์นี้จัดเป็นซีรีนโปรติเนสที่คล้ายคลึงกับทริปซินชนิดหนึ่ง เนื่องจากถูกยับยั้งการทำงานอย่างรุนแรงได้ด้วย PMSF และ 3,4DCI ที่ความเข้มข้น 10 mM ประกอบกับเอนไซม์นี้สามารถย่อย N-CBZ-L-arginine *p*-nitroanilide ซึ่งเป็นสับสเตรทจำเพาะของทริปซินได้ดีที่สุด ในขณะที่ TLCK ที่ความเข้มข้น 10 μM สามารถยับยั้งเอนไซม์ชนิดนี้เช่นเดียวกัน

8. เอนไซม์มีความเสถียรที่ pH ระหว่าง 8-10 และทนอุณหภูมิสูงถึง 80 °ซ นาน 10 นาที ได้ดี

เอกสารอ้างอิง

ประเสริฐ สันตินานาเลิศ, สุดเอื้อม พัฒนใหญ่ยิ่งและนงพร โตวัฒนะ 2541. การผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนจาก *Bacillus* sp. PS719 ที่ชอบด่างและอุณหภูมิสูง. ว. สงขลานครินทร์ (กำลังตีพิมพ์) .

Aoki. K., Miyamoto. K., Murakami, S. and Shinke, R. 1995. Anaerobic synthesis of extracellular proteases by the soil bacterium *Bacillus* sp. AN-23 : Purification and Characterization of the enzymes. Soil. Biol. Biochem. 27 (11) : 1377-1382.

Arima, K., Yu, J. and Iwasaki, S. 1970. Milk clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. In methods enzymol. 19 : 446-458.

Bernie Steele, D., Fiske, M. J., Steele, B. P. and Kelley, S. B. 1992. Production of a low-molecular-weight, alkaline -active, thermostable protease by a novel, spiral-shaped bacterium, *Kurthia spiroforme*, sp. nov. Enzyme Microb. Technol 14 : 358-360.

Beynon, R. J. and Salvesen, G., 1990. Commercially available protease inhibitors. In Proteolytic enzymes : a practical approach. (eds. R. J. Beynon, and Bond), pp. 241-249, Oxford : IRL Press.

Bjorklind, A. and Jornvall, H. 1974. Substrate specificity of three different extracellular proteolytic enzymes from *Staphylococcus aureus*. Biochim. Biophys. Acta. 370 : 524-529.

Ogbadu, O. ,

Bone, R., Flank, D., Keftner, C. A. and Agard, D. A. 1989. Structural analysis of specificity : α-lytic protease with analogues reaction intermediates. Biochem. J. 28 : 7600-7609.

Borgia, P. and Campbell, C. L. 1974. Properties of two homogenous alkaline proteases from *Streptomyces rectus*. J. Bacteriol. 120 : 1109-1115.

Charney, J. and Tomarelli, R. M. 1947. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. J. Biol. Biochem. 171 : 501-505.

Cheetham, P. S. J. 1985. The applications of enzyme in industry. In Handbook of enzyme biotechnology. (ed. A. Wisseman), pp. 274-379. London : Ellis Horwood Ltd.

Cowan, D. A., Smolenski, K. A. Daniel, R. M. and Morgan, H. W. 1987. An extremely thermostable extracellular proteinase from a strain of the archaebacterium *Desulfurococcus* growing at 88 °C. Biochem. J. 247 : 121-133.

Dasgupta, B. R. and Sugiyama, H. 1972. Isolation and characterization of a protease from *Clostridium botulinum* type B. Biochim. Biophys Acta. 268 : pp. 719-729.

Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis methods and application to human serum protein. Ann. NY. Acad. Sci. 121 : 404-427.

Drenth, J., Hol, W. G. J., Jansonius, J. N. and Koekoek, R. 1972. Subtilisin Novo. The three dimensional structure and its comparison with subtilisin BPN. Eur. J. Biochem. 26 : 177-181.

Ebeling, W. Hennrich, N., Klockow, M. Metz, H. Orth, H. D. Lang, H. 1974. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. Eur J. Biochem. 47 : 91-97.

Elliott, S. D. and Liu, T. Y. 1970. Streptococcal proteinase. Methods in Enzymol. 19 : pp. 252-261.

Feency, R. E. and Whitaker, J. R. 1985. Chemical and enzymatic modification proteins. New Protein Foods. 5 : 181-219.

Ferrero, M. A., Castro, G. R., Abate, C. M., Baigori, and M. D., Sineriz, F, 1996. Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR 29 : isolation production and characterization. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45 : 327-332.

Fujiwara, N., Masui, A. and Imanaka, T. 1993. Purification and properties of the highly thermostable alkaline protease from alkaliphilic and thermophilic *Bacillus* sp. J. Biotechnol. 30 : 245-256.

Gnosspelius, G. 1978. Purification and properties of an extracellular protease from *Myxococcus virescens*. J. Bacteriol. 133 : 17-25.

Guo, M.-L., Jiang, Y.-M., Ma, Z.-L., Li, Y.-L. 1996. Hydrolytic characteristics of chitosan-immobilized As 1.398 neutral proteinase from *B.* subtilis to soybean protein. Food Chemistry. 55 (4) : 373-377.

Hagihara, B. 1960. Bacterial and mold proteases, In The enzymes (ed. P. D. Boyer) , 193-213, New York.

Hameed, A., Natt, M. A., Evans, C. S. 1996. Production of alkaline protease by a new *Bacillus* subtilisin isolate for use a bating enzyme in leather threatment. Warld-J. Microbiol. Biotechnol. 12 (3) : 289-291.

Horikoshi, K. 1971. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part I. Alkaline protease produced by *Bacillus* no. 221. Agric. Bio. Chem 35 : 1407-1414.

Hwang, I. K., Kaminogawa, S. and Yamauchi, K. 1981. Purification and properties of a dipeptidase from *Streptococcus cremoris*. Agric. Biol. Chem. 45 : 159-165.

International Union of Biochenistry and Molecular Biology (IUBMB), Nomenclature Committee, 1992. Hydrolases. In Enzyme nomenclature, pp. 371-421, London : Academic Press.

Izotova, L. S. Strongin, A. Y., Chekulaeva, L. N., Sterkin, V. E., Ostoslavskaya, V. I, Lyublinskaya, L. A., Tiomokhina, E. A. and Stepanov V. M. 1983. Purification and properties of serine protease from *Halobacterium halobium*. J. Bacteriol. 155 : pp. 826-830.

Kalisz, H. M. 1988. Microbial proteinase. In Advances in biochemical engineering/biotechnology. (ed. A. Fietcher), pp. 3-61. Berlin : Springer-Verlag.

Kato, N., Adachi, S., Takeuchi, K., Morihara, K., Tani, Y., and Ogata, K. 1974. Substrate specificities of the from a marine-psychrophilic bacterium *Pseudomonas* sp. No. 548. Agric. Biol. Chem. 38 : pp. 103-109.

Kato, N. Nagasawa, T., Adachi, S., Tani, Y. and Ogata, K. 1972. Purification and properties of protease from a marine psychrophilic bacterium. Agric. Biol. Chem. 36 : 1185-1192.

Kobayashi, T., Hakamada, Y., Adachi, S., Hitomi, J., Yoshimatsu, T., Koike, K., Kawai, S. and Ito, S. 1995. Purification and properties of an alkaline protease from alkalophilic *Bacillus* sp. KSM-K16. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43 : pp. 473-481.

Kobayashi, T., Hakamada, Y., Hitomi, K, Koike, K. Ito, S. 1996. Purification of alkaline proteases from and *Bacillus* strain a their possible interrelationship. Appl. Microbiol. Biotechnol. 45 : 63-71.

Kurihara, M. F. S., Markland, and Smith, E. L. 1972. Subtilisin amylosacchariticus III. Isolation and sequence of the complete amino acid sequence. J. Biol. Chem. 247 : 5619-5631.

Lindberg., R. A., Eirich, L. D., Price, J. S., Wolfinbarger, L., Jr., and Drucker, H., 1981. Alkaline Protease form *Neurospora Crassa*. J. Biol. Chem. 25 : 811-814.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structure proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 277 : 680-685.

Liu, T. Y. and Elliot, S. D. 1971. Streptococcal proteinase. In The enzyme (ed. P.D.), 609-647, New York : Academic Press Inc.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. F. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275.

Maase, F. W. J. L. and Tilburg, R. 1983. The benefit of detergent enzymes under changing washing conditions. J. Am Oil Chem Soc 60 : 1672-1677.

Manachini, P. L., Fortina, M. G., Parini, C. 1988. Thermostable alkaline proteases produced by *Bacillus thermoruber*-a new species of *Bacillus*.

Markland, E. S. and Smith, E. L., 1971. Subtilisin : Primary structure, chemical and physical properties. In The enzyme (ed. P. D. Boyer), 561-608, New York Academic Press Inc.

Matsubara, H. and Feder, J. 1971. Other bacterial, mold, and yeast proteinase. In The enzyme (ed. P. D. Boyer), pp. 721-795. New York Academic Press Inc.

Mitchell, W. M. and Harrington, W. F. 1971. Clostripain. In The enzyme (ed. P. D. Boyer), pp 699-719. New York : Acadamic Press Inc.

Morihara, K., and Tsuzuki, H. 1967. Elastolytic properties of various proteinase from microbial origin. Arch. Biochem. Biophys. 120 : 68-78.

Morihara, K., and Tsuzuki, H. 1968. Comparison of the specificities of various neutral proteinase from microorganism. Arch. Biochem. Biophys. 123 : 572-588.

Morihara, K. 1974. Comparative specificity of microbial proteinase. Adv. Enzymol. 41 : 179-243.

Morikawa, M., Izawa, Y., Rashid, N., Hoahi T., and Imanaka, T., 1994. Purification and characterization of a thermostable thiol protease from a newly isolated hyperthermophilic *Pyrococcus* sp. Appl. Environ. Microbiol. 60(12) : 4559-4566.

Nakagawa, Y. 1970. Alkaline proteases from *Aspergillus*. Methods Enzymol. 19 : 581-591.

Neurath, H. 1990. Commercially available protease inhibitors. In Proteolytic enzymes : a practical approach. (eds. R. J. Beynon, and Bond), pp. 241-249, Oxford : IRL Press.

North, M. J. 1982. Comparative biochemistry of the proteinase of eucaryotic microorganisms. Microbiol. Rev. 46 : 308-340.

North, M. J. 1990. Commercially available protease inhibitors. In Proteolytic enzymes : a practical approach. (eds. R. J. Beynon, and Bond), pp. 241-249, Oxford : IRL Press.

Ottesen, M. and Rickert, W. 1970. The acid protease of *Mucor miehei*. Methods in Enzymol. 19 : 459-460.

Palubinskas, V. F., Yankevich, N. B., Yanulaitene, K. K., Vesa, V. S., Bendikene, V. G., Maksimenko, A. V., Torchilin, V. S., Ilyina, E. V., Smirnov, V. N., Krestyanova, I. N., Bartosherich, Y. E. and Zabirova, R. C. 1984.

Trypsin-like enzyme from *Streptomyces* 771. Appl Biochem. Biotechnol. 9 : 231-241.

Priest, F. G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. Bacteriol Rev. 41 : 711-753.

Rath, C. C., Subramanyam, V. R. 1996. Thermotolerant enzyme activities of *Bacillus* species isolated from the hot springs of Orissa. Microbios. 86 : 157-161.

Razak, C. N., Rahman, R. N. Z. A , Ampon, K., Basri, M., Yunus, W. Z. W., Salleh, A. B. Production of a thermostable alkaline serine protease by a new strain of *Bacillus stearothermophilus*. 1995. J. Biosci. Penang. 6 : 94-100.

Sarath, G., de la Motte, R. S. and Wagner, F. W. 1990. Protease assay methods. In Proteolytic enzyme : appractical approach. (ed. R. J. Beynon and J. S. Bond), Oxford : IRL Press.

Strongin, A. Y. A., Abramov, Z. T., Yaroslavtseva, N. G., Baratova, V. A., Shaginyan, K. A., Belyanova, L. P. and Stepanov, V. M., 1979. Direct comparison of subtilisin-like intracellular protease of *Bacillus licheniformis* with the homologous enzymes of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 137 : 1017-1019.

Strongin, A., Y. A., Izotova, L. S., Abramov, Z. T., Gorodetsky, D. I., Ermakova, L. M., Baratova, L. A., Belyanova, L. P. and Stepanov, V. M. 1978. Intracellular serine protease of *Bacillus subtilis* sequence homology. with extracellular subtilisin. J. Bacteriol. 133 : 1401-1411.

Sneath, P. H. A. 1986. Endospore-forming gram-positive rods and cocci In : Bergey's manual of systenatic bacteriology, Vol II. Sneath, P. A. H, Mc Nair, N. S., Sharpe, M. E. (eds), pp. 1104-1207.

Sudo, S., and Dworkin, M 1972. Bacteriolytic enzymes produced by *Myxococcus Xanthus*. J. Bacteriol. 110 : 236-245.

Takami, H., Akiba, T., Horikoshi, K. 1989. Production of extremly thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. Appl. Microbiol. Biotechnol. 30 : 120-124.

Takami, H. Kobayashi, T., Aono, R. and Horikoshi, K. 1992. Molecular cloning, nucleotide sequence and expression of the structural gene for a thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38 : 101-108.

Takii, Y., Kurigama, N. and Suzuki, Y. 1990. Alkaline serine produced from citric acid by *Bacillus alcalophilus* subsp. halodurans KP 1239. Appl. Microbiol. Biotechnol. 34 : 57-62.

Trop, M. and Birk, Y. 1968. The trypsin-like enzyme from *Streptomyces griseus* (Pronase). Biochem. J. 109 : 475-476.

Tsai, Y. C., Lin, S. F., Li, Y. F., Yamazaki, M. and Tamura, G. 1986. Characterization of an alkaline elastase from alkalophilic *Bacillus* Ya-B. Biochim Biophys. Acta 883 : 439-447.

Vinci, V. A., Aphale, J. S., Gibb, G. D. and Strohl, W. R. 1993. Purification and properties of the chymotrypsin-like serine proteinase over produced by *Streptomyces* sp. strain C5-A13. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39 : 69-73.

Vitkovic, L., and Sadoff, H. H. 1977. Purification of extracellular protease of *Bacillus licheniformis* and its inhibition by bacitracin. J. Bacteriol. 81 : 891-896.

Wahlby, S.1969. Studies on *Streptomyces grisenus* protease. III. Purification of two DFP-reacting enzyme. Biochim. Biophys. Acta. 185 : 178-185.

Ward, O. P. 1983. Proteinase . In Microbial enzymes and biotechnology (ed. W.M. Fogarty), pp. 251-317, London Applied Science Publishers.

Whitaker, J. R. 1970. Protease of *Endothia parasitica*. Methods Enzymol. 19 : 436-445.

Wingard, M., Matueda, G. and Wolfe, R. S. 1972. Myxobacter AL-1 protease II : specific peptide bond cleavage on the amino side of lysine. J. Bacteriol. 112 : 940-949.

Wong, D. W. S. 1995. Proteolytic enzyme New York Chapman and Hall, pp. 124-169.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวอนงนาฏ ไพนุพงศ์

วัน เดือน ปีเกิด 25 มีนาคม 2516

วุฒิทางการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีการศึกษา
การศึกษาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์กายภาพชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ภาคใต้	2537