

### บทที่ 3

#### ผลการทดลอง

#### 3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถใช้แอล-อะลานีนเป็นสารตั้งต้นของคาร์บอนและไนโตรเจน

เมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสจากดิน 44 ตัวอย่าง โดยเลี้ยงในอาหารคัดเลือกที่มีแอล-อะลานีนเป็นสารตั้งต้นของคาร์บอนและไนโตรเจน พบว่ามีแบคทีเรีย 49 ไอโซเลท (isolate) จากดิน 29 ตัวอย่าง ที่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ จึงทำการแยกเก็บแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวที่ได้บน slant อาหารอุดมที่อุณหภูมิห้องเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

#### 3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสที่ต้องการไพริดีนนิวคลีโอไทด์เป็นโคเอนไซม์

นำแบคทีเรียที่ได้จากข้อ 3.1 มาเพิ่มจำนวนในอาหารอุดมปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วแยกสารละลายเอนไซม์ (cell free extract) มาตรวจสอบแอกติวิตีของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสโดยใช้ NAD<sup>+</sup> เป็นโคเอนไซม์ (ตามวิธีข้อ 2.5.3) และวัดปริมาณโปรตีน (ตามวิธีข้อ 2.5.5) พบว่ามีแบคทีเรียเพียง 19 ไอโซเลทที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์ แสดงผลดังตารางที่ 3

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ของแบคทีเรียไอโซเลทที่ 9 ซึ่งมีค่าแอกติวิตีรวมสูงสุด ไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในพอลิอะคริลาไมด์เจล 7.7 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้อมในสารละลายย้อมสีแอกติวิตี (ตามวิธีในข้อ 2.5.6) พบว่าได้แถบของแอกติวิตีเพียง 1 แถบ โดยในภาวะควบคุมซึ่งไม่เติมแอล-อะลานีนไม่ปรากฏแถบใดๆ ซึ่งสรุปได้ว่าแบคทีเรียไอโซเลทที่ 9 มีแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสและการจำแนกสายพันธุ์จากสมบัติของไอโซเลทที่ 9 ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมข้อมูลจุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย สรุปได้ว่าแบคทีเรียไอโซเลทนี้คือ *Aeromonas hydrophila*

จากนั้นนำแบคทีเรียนี้ไปหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสในระดับขวดเขย่าโดยการแปรค่าตัวแปรต่างๆ คือ pH เวลา และอุณหภูมิ

ตารางที่ 3 แอคติวิตีของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจีเนสในสารละลายเอนไซม์ของแบคทีเรีย  
ที่แยกได้

หมายเลขไอโซเลท	แอกติวิตีจำเพาะ(หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	แอกติวิตีรวม (หน่วย)
1	0.15	1.8
2	0.04	1.3
3	0.07	1.2
4	0.36	1.2
5	0.02	0.6
6	0.01	0.1
7	0.01	0.2
8	0.02	0.1
9	0.12	3.0
10	0.11	1.1
11	0.09	0.5
12	0.07	2.4
13	0.06	0.6
14	0.13	2.4
15	0.05	1.1
16	0.09	1.2
17	0.03	0.7
18	0.06	1.8
19	0.01	0.2

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์แบคทีเรียไอโซเลทที่ 9

การตรวจวิเคราะห์	ผลการตรวจวิเคราะห์
Gram reaction	-ve
Reduction of nitrate	+
Indole production of tryptophan	-
Fermentative production of acid from glucose	+
Arginine dihydrolase	+
Urease	-
Hydrolysis of esculin	+
Hydrolysis of gelatin	+
$\beta$ -galactosidase of :	
-p-nitro-phenyl- $\beta$ D-galactopyranoside	+
-ortho-nitro-phenyl-galactoside	+
Ornithine decarboxylase	-
H <sub>2</sub> S production	-
Acetoin production (VP test)	-
Assimilation of :	
-glucose	+
-arabinose	+
-mannose	+
-mannitol	+
-n-acetyl-glucosamine	+
-maltose	+
-gluconate	+
-inositol	-
-sorbitol	-
-rhamnose	-
-melibiose	-
-amygdalin	+
-caprate	+
-adipate	+
-malate	+
-citrate	-
-phenyl-acetate	-
Cytochrome oxidase	+
Catalase	+
Motility	+

-ve : Gram negative bacteria

+ : Positive

- : Negative

### 3.3 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสในแบคทีเรียที่เลี้ยงใน ระดับขวดเขย่า

#### 3.3.1 การศึกษา pH ที่เหมาะสม

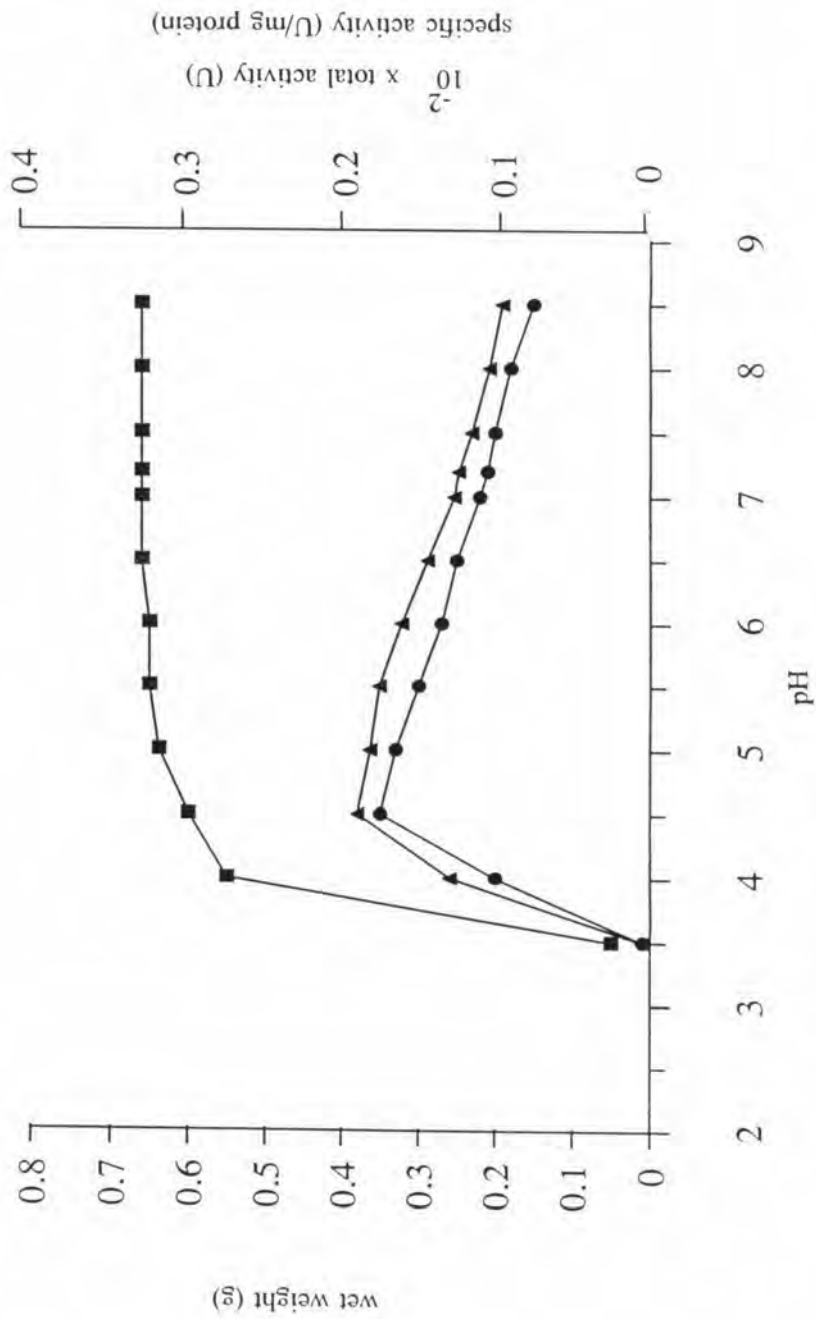
ทำการทดลองตามวิธีข้อ 2.7.1 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 9 จากกราฟจะเห็นว่าเมื่อ pH สูงขึ้นจาก 3.5 น้ำหนักเซลล์ แอคติวิตีรวม และแอคติวิตีจำเพาะจะสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจนถึง pH 4.5 ซึ่งให้ค่าแอคติวิตีรวมและแอคติวิตีจำเพาะมากที่สุด และที่ pH สูงกว่า 4.5 น้ำหนักเซลล์จะค่อนข้างคงที่ ส่วนแอคติวิตีรวมและแอคติวิตีจำเพาะจะลดลงอย่างช้าๆ จนกระทั่งถึง pH 8.5 แอคติวิตีรวมและแอคติวิตีจำเพาะจะเหลือประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับที่ pH 4.5 ดังนั้นจึงเลือก pH 4.5 ซึ่งให้ค่าแอคติวิตีรวมและแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด เพื่อใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียขั้นถัดไป

#### 3.3.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

ทำการทดลองตามวิธีข้อ 2.7.2 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 10 จากกราฟอธิบายได้ว่าเมื่อเลี้ยง *Aeromonas hydrophila* ในอาหารอุดม pH 4.5 ที่อุณหภูมิต่างๆกันคือ 15, 20, 25, 28, 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส น้ำหนักเซลล์ แอคติวิตีรวม และแอคติวิตีจำเพาะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นและจะสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส น้ำหนักเซลล์ แอคติวิตีรวม และแอคติวิตีจำเพาะมีแนวโน้มลดลงโดยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แอคติวิตีรวมและแอคติวิตีจำเพาะลดลงเหลือประมาณ 40 และ 70 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับเมื่อเทียบกับแอคติวิตีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสซึ่งให้ค่าแอคติวิตีรวมและแอคติวิตีจำเพาะสูงสุดเพื่อใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียขั้นถัดไป

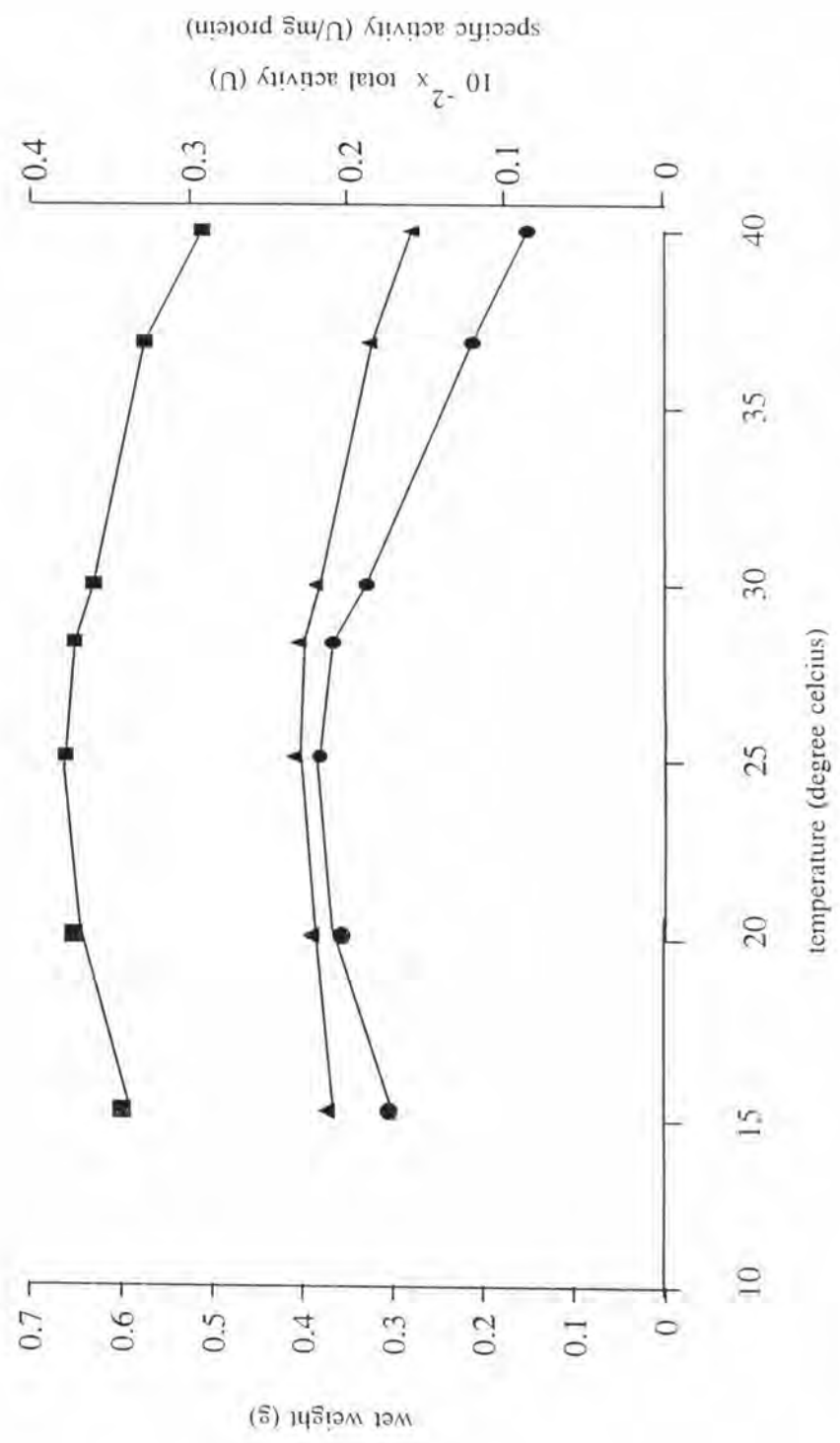
#### 3.3.3 การศึกษาเวลาที่เหมาะสม

ทำการทดลองตามวิธีข้อ 2.7.3 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 11 ซึ่งได้ว่าเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารอุดม pH 4.5 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เวลาตั้งแต่ 0 ถึง 36 ชั่วโมง โดยตรวจสอบน้ำหนักเซลล์และแอคติวิตีทุกๆ 4 ชั่วโมง น้ำหนักเซลล์จะสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 0 ถึง 8 ชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 8 น้ำหนักเซลล์จะเพิ่มเล็กน้อย จนค่อนข้างคงที่



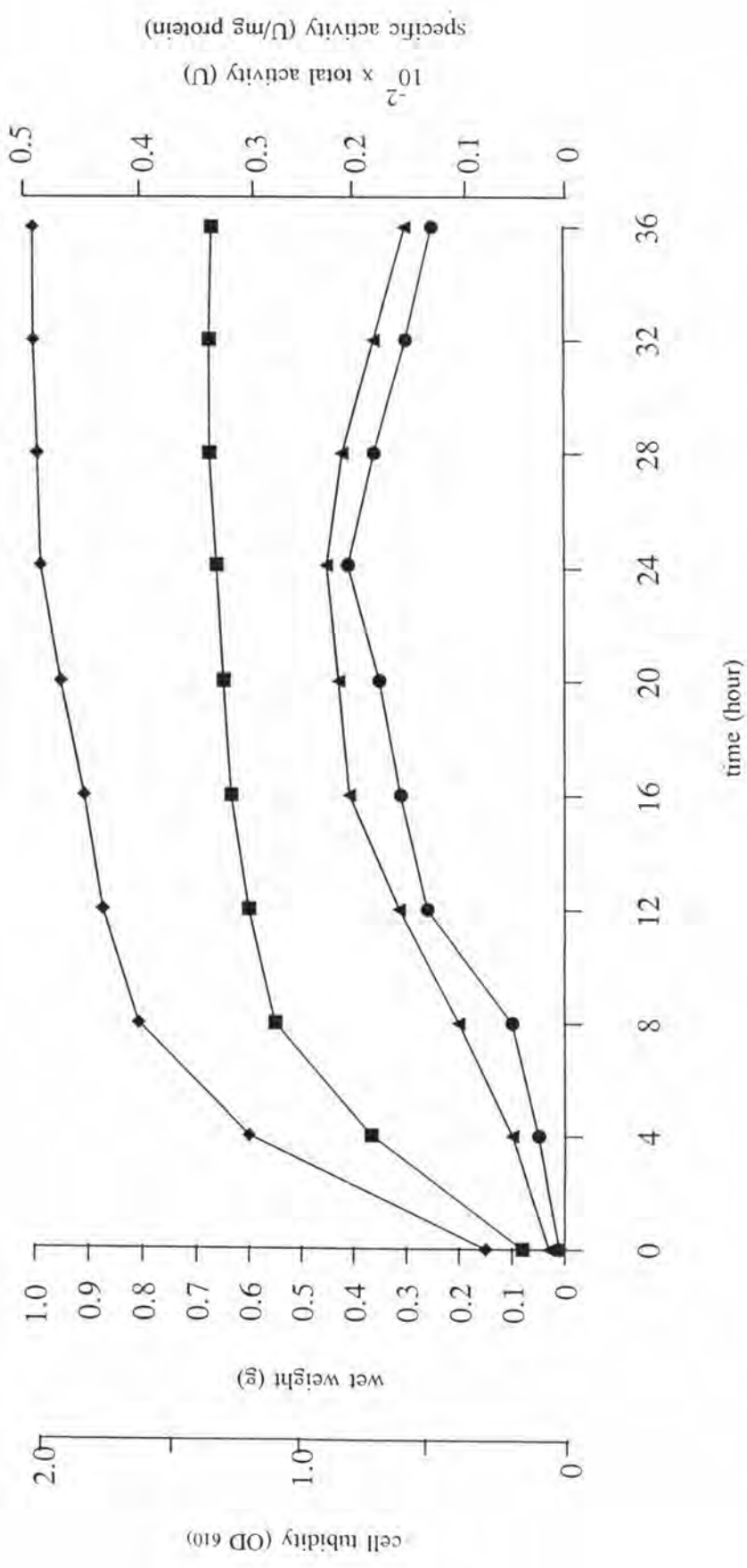
รูปที่ 9 ผลของ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของ *Aeromonas hydrophila* และแอกทีวิตีของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจีเนส

■ น้ำหนักเซลล์เปียก    ▲ แอคทีวิตีจำเพาะ    ● แอคทีวิตีรวม



รูปที่ 10 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *Aeromonas hydrophila* และแบคทีเรียที่ขงแอด-อะลาบีนดีไฮโดรจิเนส

■ น้ำหนักเซลล์เปียก ▲ แอคทีวิตีจำเพาะ ● แอคทีวิตีรวม



รูปที่ 11 รูปแบบการเจริญของ *Aeromonas hydrophila* และแอกติวิตีของเอนโด-อะลานีนดีไฮโดรจินเนสที่เวลาต่างๆ

- ◆ ความขุ่นของเซลล์
- น้ำหนักเซลล์เปียก
- ▲ แอกติวิตีจำเพาะ
- แอกติวิตีรวม

ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป ส่วนแอกติวิตีรวมและแอกติวิตีจำเพาะจะสูงขึ้นเรื่อยๆ จนถึงเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจะค่อยๆ ลดลงคือที่เวลา 36 ชั่วโมงจะเหลือประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับแอกติวิตีที่เวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกเวลา 24 ชั่วโมงซึ่งให้ค่าแอกติวิตีรวมและแอกติวิตีจำเพาะสูงสุดเพื่อใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียขั้นถัดไป

จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสจาก *Aeromonas hydrophila* ในระดับขวดเขย่าสรุปได้ว่าภาวะที่เหมาะสมคือ เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารอุดม pH 4.5 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ซึ่งในภาวะดังกล่าวนี้จะให้ค่าแอกติวิตีสูงสุดและจะนำผลการศึกษาภาวะที่ได้ไปใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียต่อไป

### 3.4 การทำแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสให้บริสุทธิ์

เพิ่มจำนวนแบคทีเรียปริมาณมากตามวิธีข้อ 2.8 จะได้น้ำหนักเซลล์เปียกประมาณ 30 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 6 ลิตร จากนั้นเตรียมสารละลายเอนไซม์ตามวิธีข้อ 2.9 หลังจากแยกเศษเซลล์ออกแล้วนำสารละลายเอนไซม์มาวัดแอกติวิตี (ตามวิธีข้อ 2.5.3) และวัดปริมาณโปรตีน (ตามวิธีข้อ 2.5.5) พบว่าค่าแอกติวิตีรวมเท่ากับ 914.4 หน่วย ปริมาณโปรตีนรวมเท่ากับ 3,910 มิลลิกรัม และค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.23 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ตารางที่ 5) จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์ตามขั้นตอนต่างๆ ในข้อ 2.10 ต่อไป

#### 3.4.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตทีละช่วง (วิธีทำข้อ 2.10.1) โดยห่างกันช่วงละ 10 เปอร์เซ็นต์จนสารละลายมีความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำแต่ละแฟรคชันไปตรวจวัดแอกติวิตีและโปรตีน พบว่าแฟรคชันที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 30-40 เปอร์เซ็นต์จะให้ค่าแอกติวิตีสูงสุดคือ ค่าแอกติวิตีรวมเท่ากับ 619.2 หน่วย ซึ่งจะเหลือประมาณ 67.7 เปอร์เซ็นต์ของแอกติวิตีรวมของสารละลายเอนไซม์ตั้งต้น โปรตีนรวมเท่ากับ 1,138 มิลลิกรัมเหลือประมาณ 29 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโปรตีนรวมของสารละลายเอนไซม์ตั้งต้น จะเห็นได้ว่าสามารถกำจัดโปรตีนไปได้ปริมาณมาก และค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 0.54 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์ขึ้น 2.4 เท่า (ตารางที่ 5) จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยนำ



ตารางที่ 5 ผลการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิมมัตว

แฟรกชัน	แอกติวิตีรวม (หน่วย)	โปรตีนรวม (มิลลิกรัม)	แอกติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มิลลิกรัมโปรตีน)	แอกติวิตีของเอนไซม์คงเหลือ (เปอร์เซ็นต์)
สารละลายเอนไซม์ตั้งต้น	914.4	3,910.0	0.23	100.0
แอมโมเนียมซัลเฟตอิมมัตว 0-30% <sup>a</sup>	123.2	1,130.0	0.11	13.5
แอมโมเนียมซัลเฟตอิมมัตว 30-40%	619.2	1,138.0	0.54	67.7
แอมโมเนียมซัลเฟตอิมมัตว 40-50%	27.0	304.0	0.09	3.0
แอมโมเนียมซัลเฟตอิมมัตว 50-60%	0	536.0	0	0
แอมโมเนียมซัลเฟตอิมมัตว 60-70%	0	94.0	0	0

<sup>a</sup> แฟรกชันของแอมโมเนียมซัลเฟตอิมมัตว 0-20 % ไม่มีการตกตะกอนของโปรตีน

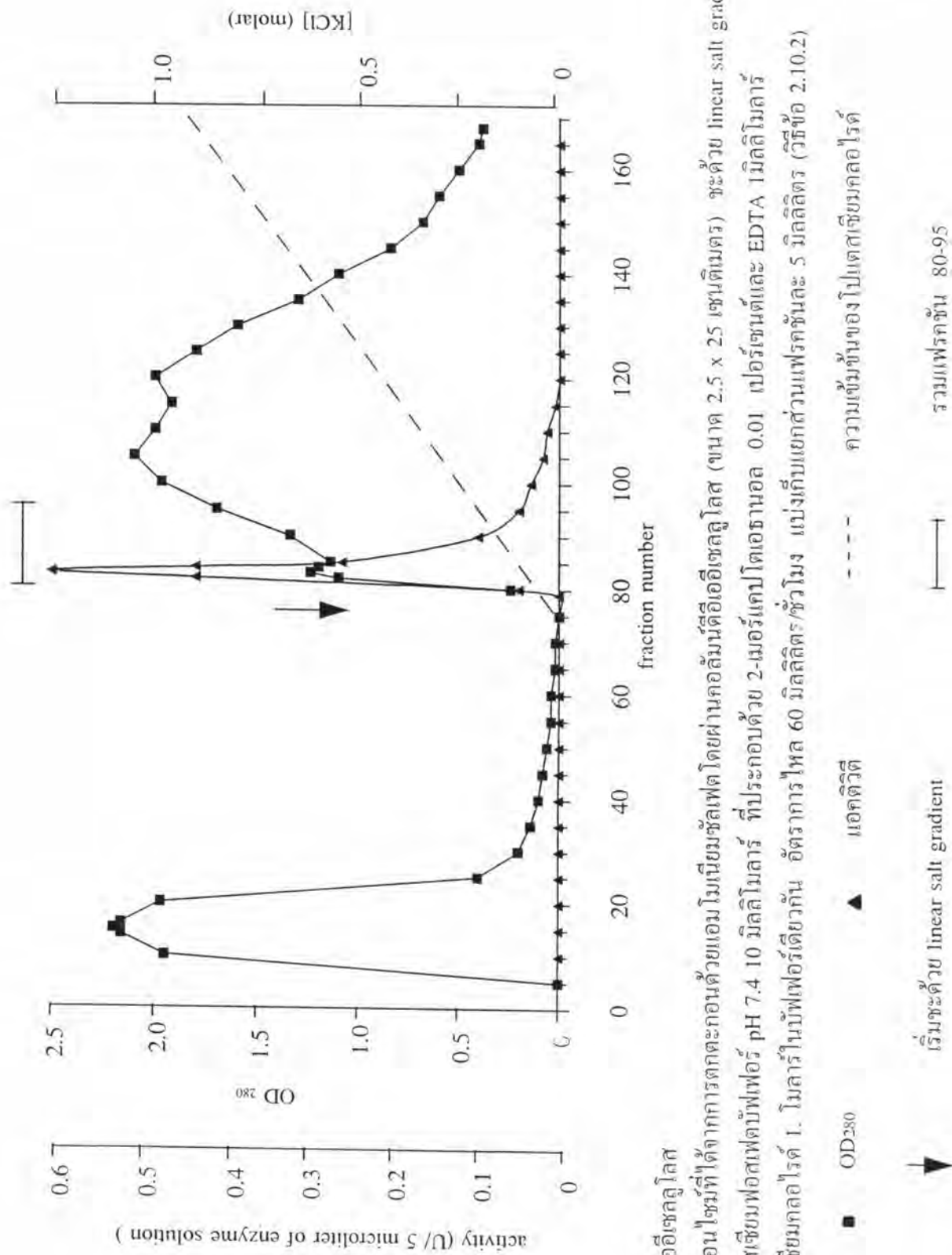
แฟรคชันที่อิ่มตัวด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 30-40 เปอร์เซ็นต์ไปไดอะไลซ์แล้วผ่านคอลัมน์ดีไอเออีเซลลูโลสต่อไป

### 3.4.2 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้คอลัมน์ดีไอเออีเซลลูโลส

เมื่อผ่านสารละลายโปรตีนลงในคอลัมน์ดีไอเออีเซลลูโลส (วิธีทำข้อ 2.10.2) ได้ผลการแยกโปรตีนแสดงดังกราฟรูปที่ 12 เห็นได้ว่าเมื่อชะด้วย elution buffer สามารถกำจัดโปรตีนอื่นออกได้มากพอสมควร และเมื่อชะด้วย linear salt gradient ของ elution buffer และโปแตสเซียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ในบัฟเฟอร์เดียวกัน พบว่าเอนไซม์ถูกชะออกมาจากคอลัมน์เมื่อความเข้มข้นของเกลือประมาณ 0.05-0.4 โมลาร์ ที่แฟรคชัน 80 ถึง 120 แต่เนื่องจากตั้งแต่แฟรคชันที่ 95 เป็นต้นไปจะมีโปรตีนอื่นปนอยู่มาก ดังนั้นจึงทำการรวมแฟรคชันที่มีเอนไซม์ส่วนมากเข้าด้วยกันคือตั้งแต่แฟรคชัน 80 ถึงแฟรคชัน 95 หลังจากที่ได้ดึงน้ำออกด้วยการกลบ aquacide แล้วนำไปไดอะไลซ์ นำสารละลายที่ได้มาตรวจวัดแอกติวิตีและปริมาณโปรตีนจะได้แอกติวิตีรวมเท่ากับ 304 หน่วย ซึ่งเกลือประมาณ 33.2 เปอร์เซ็นต์ของแอกติวิตีรวมของสารละลายเอนไซม์ตั้งต้น โปรตีนรวม 64 มิลลิกรัมคิดเป็น 1.6 เปอร์เซ็นต์จากโปรตีนตั้งต้น ค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 4.75 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 20.6 เท่า (ตารางที่ 6) ขั้นตอนต่อไปนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นอีกโดยผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซีอะพาไทต์

### 3.4.3 การทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยใช้คอลัมน์ไฮดรอกซีอะพาไทต์

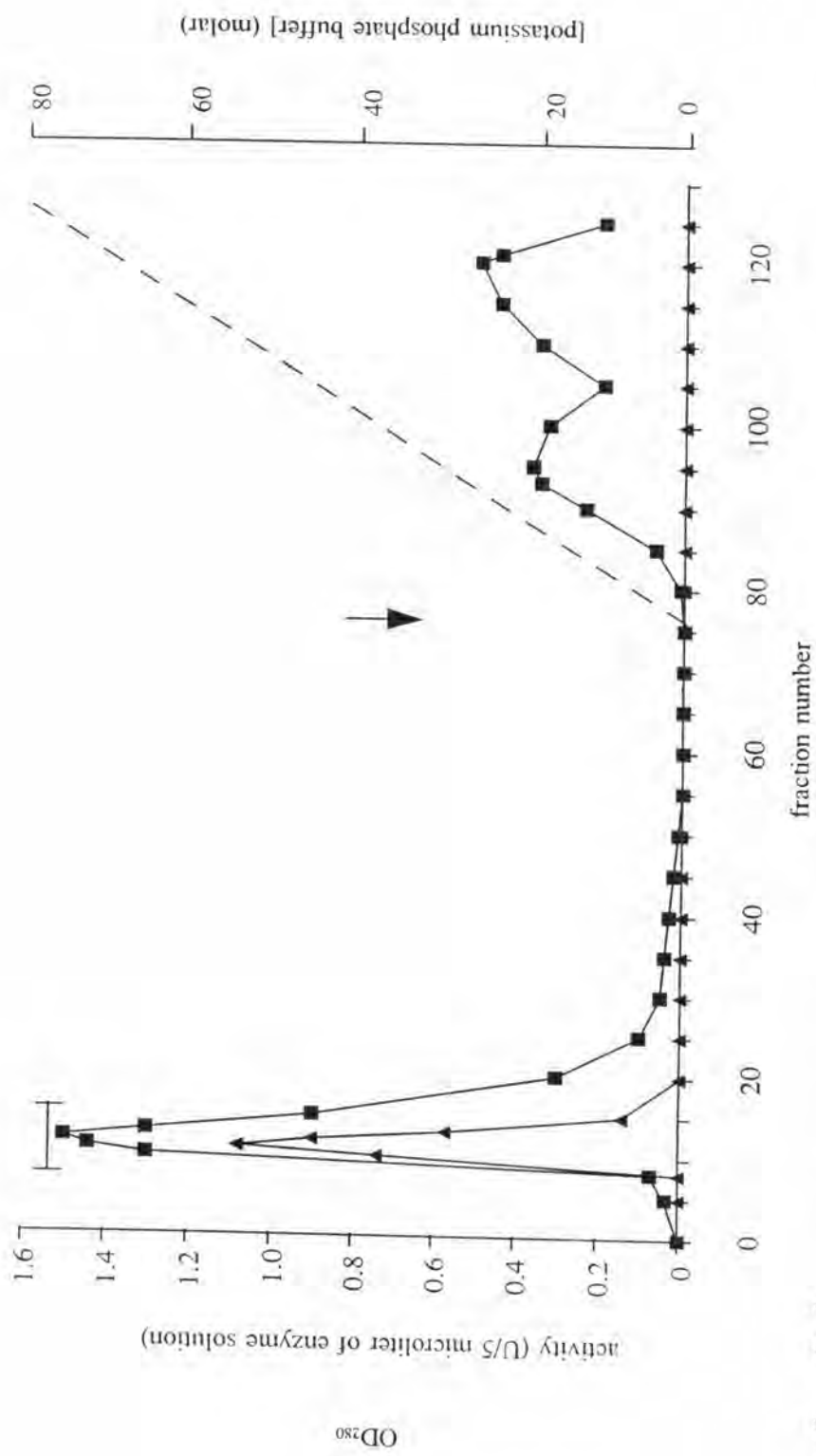
เมื่อผ่านสารละลายเอนไซม์ลงในคอลัมน์ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (วิธีทำข้อ 2.10.3) ได้ผลการแยกโปรตีนแสดงดังรูปที่ 13 โดยเอนไซม์ถูกชะออกมาด้วย elution buffer ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์ไม่จับกับไฮดรอกซีอะพาไทต์และจะออกมาที่แฟรคชัน 8 ถึง 18 แต่เลือกรวมเฉพาะแฟรคชัน 8 ถึง 15 เนื่องจากมีสัดส่วนของเอนไซม์ต่อโปรตีนสูง เมื่อรวมเอนไซม์แต่ละแฟรคชันเข้าด้วยกันแล้วนำไปวัดแอกติวิตีและปริมาณโปรตีน ได้ค่าแอกติวิตีรวมเท่ากับ 253.8 หน่วยคิดเป็น 27.8 เปอร์เซ็นต์ของแอกติวิตีรวมของสารละลายเอนไซม์ตั้งต้น โปรตีนรวมเท่ากับ 34.8 มิลลิกรัมซึ่งเกลือประมาณ 0.9 เปอร์เซ็นต์จากโปรตีนตั้งต้น แอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 7.27 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 31.6 เท่า (ตารางที่ 6) จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ไปทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยผ่านคอลัมน์บูเซฟาโรสต่อไป



รูปที่ 12 กอลัมน์ดีเอไอเซลลูโลส

ผลการแยกแอมโมไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตโดยผ่านคอลัมน์ดีเอไอเซลลูโลส (ขนาด 2.5 x 25 เซนติเมตร) จะด้วย linear salt gradient ของโปรแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 10 มิลลิโมลาร์ ที่ประกอบด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 0.01 เปอร์เซ็นต์และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ กับโปรแตสเซียมคลอไรด์ 1. โมลาร์ในบัฟเฟอร์เดียวกัน อัตราการไหล 60 มิลลิลิตร/ชั่วโมง แบ่งเก็บแยกส่วนแฟรคชันละ 5 มิลลิลิตร (วิธีข้อ 2.10.2)

■ OD<sub>280</sub>      ▲ แอกติวิตี      - - - - ความเข้มข้นของโปรแตสเซียมคลอไรด์  
 ▼ เริ่มด้วย linear salt gradient      ——— รวมแฟรคชัน 80-95



รูปที่ 13 คอลัมน์ไฮดรอกซีอะพาไทต์

ผลการแยกอนไซม์ที่ได้จากคอลัมน์ดีเอไอเซลลูโลสโดยผ่านคอลัมน์ไฮดรอกซีอะพาไทต์ (ขนาด 2 x 10 เซนติเมตร) ชะด้วยโพลีแคสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 10 มิลลิโมลาร์ 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 0.01 เปอร์เซ็นต์และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ อัตราการไหล 15 มิลลิตร/ชั่วโมง เก็บแยกส่วนแฟรคชันละ 2 มิลลิตร (วิธีข้อ 2.10.3)

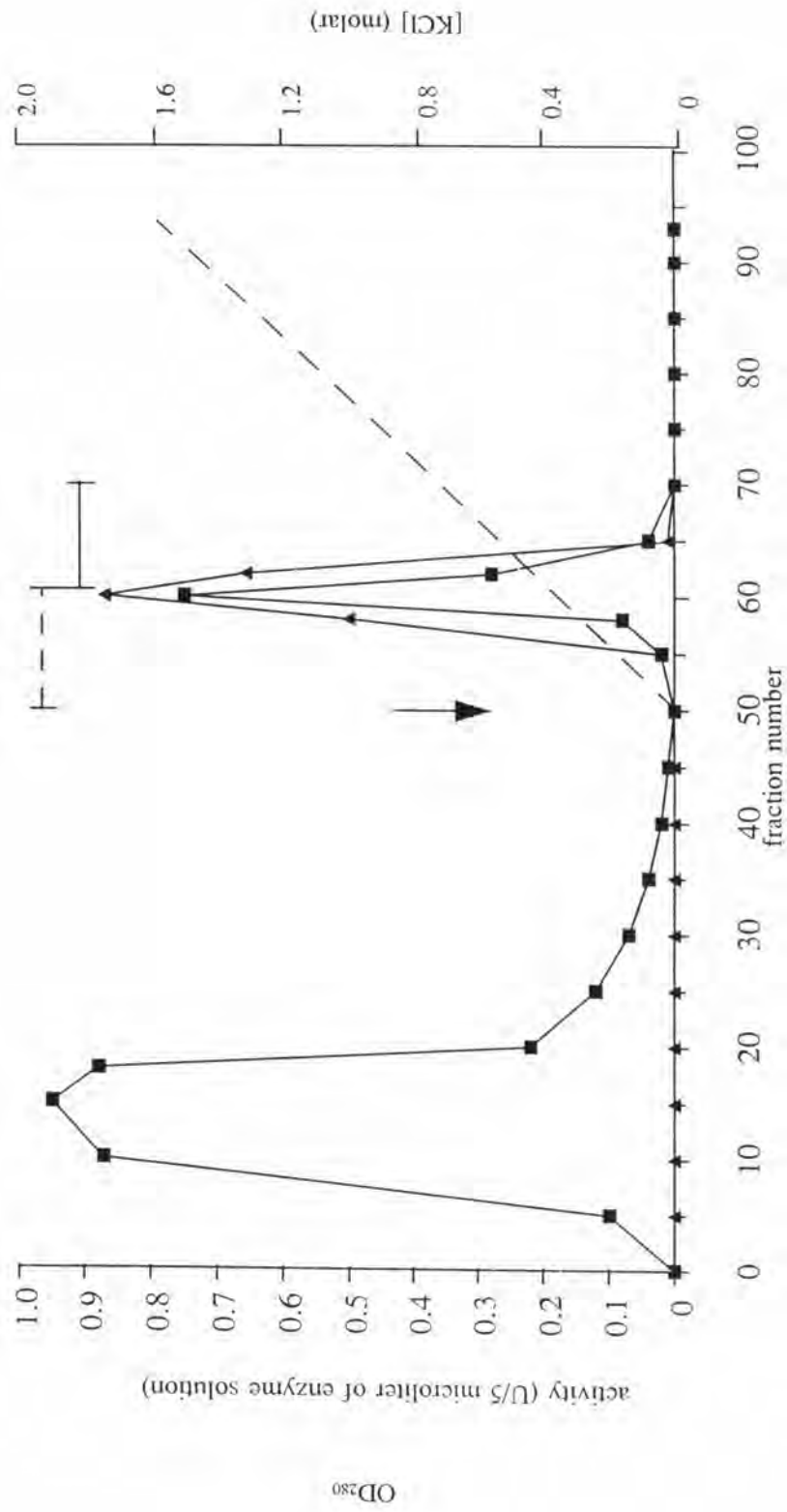
- OD<sub>280</sub>
- ▲ แอคติวิตี
- ความเข้มข้นของโพลีแคสเซียมกลอไรด์
- ▼ เริ่มชะด้วย linear salt gradient
- ┌───┐ รวมแฟรคชัน 8-15

### 3.4.4 การทำแอนไซม์ให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยใช้คอลัมน์บลูเซฟาโรส

หลังจากผ่านสารละลายแอนไซม์ลงในคอลัมน์บลูเซฟาโรส (วิธีทำข้อ 2.10.4) ได้ผลการแยกโปรตีนแสดงดังรูปที่ 14 จากกราฟแสดงให้เห็นว่ามีโปรตีนอื่นถูกกำจัดออกมาจำนวนมากเมื่อชะด้วย elution buffer ส่วนแอนไซม์จะถูกชะออกมาเมื่อชะด้วย linear salt gradient ของ elution buffer และไปแตสเซียมคลอไรด์ 2 โมลาร์ในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน โดยแอนไซม์จะถูกชะออกที่ความเข้มข้นเกลือประมาณ 0.15-0.5 โมลาร์ จากนั้นทดสอบความบริสุทธิ์ของแอนไซม์โดยนำแฟรคชันที่มีแอกติวิตีของแอนไซม์คือ 52 ถึง 70 มาตรวจสอบโดยแยกโปรตีนโดยพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิส 7.7 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแฟรคชัน 52 ถึง 60 ปรากฏแถบของโปรตีนเพียงแถบเดียว และยืนยันได้ว่าแถบที่ปรากฏนี้เป็นแอล-อะลานินดีไฮโดรจินเนสโดยทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิส 7.7 เปอร์เซ็นต์แล้วย้อมในสารละลายย้อมสีแอกติวิตี ปรากฏแถบสีตรงตำแหน่งที่ตรงกับแถบของโปรตีนดังกล่าว ส่วนแฟรคชันที่ 61 ถึง 70 จะปรากฏแถบของโปรตีน 3 แถบ ซึ่งแสดงว่ายังมีโปรตีนอื่นปนอยู่และจะต้องทำให้บริสุทธิ์ต่อไป จากนั้นรวมแฟรคชันที่บริสุทธิ์เข้าด้วยกัน (สารละลายแอนไซม์ 1) ดึงน้ำออกด้วย aquacide และไดอะไลซ์ นำไปตรวจสอบแอกติวิตีและปริมาณโปรตีน พบว่าแอกติวิตีรวมเท่ากับ 115.5 หน่วยคิดเป็น 12.6 เปอร์เซ็นต์ของแอกติวิตีรวมของสารละลายแอนไซม์ตั้งต้น ส่วนปริมาณโปรตีนเหลือประมาณ 5.1 มิลลิกรัมคิดเป็น 0.13 เปอร์เซ็นต์จากโปรตีนตั้งต้น ค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 22.9 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 99.6 เท่า และเมื่อรวมแฟรคชันที่ยังไม่บริสุทธิ์เข้าด้วยกัน (สารละลายแอนไซม์ 2) ดึงน้ำออกด้วย aquacide แล้วนำไปไดอะไลซ์ จากนั้นตรวจสอบแอกติวิตีและปริมาณโปรตีนพบว่าแอกติวิตีรวมเท่ากับ 58.3 หน่วยคิดเป็น 6.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณโปรตีนเหลือประมาณ 2.9 มิลลิกรัมคิดเป็น 0.07 เปอร์เซ็นต์ มีค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 20.1 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์ขึ้น 87.4 เท่า (ตารางที่ 6) จากนั้นนำสารละลายแอนไซม์ 2 มาทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยผ่านคอลัมน์เซฟาเด็คซ์จี-200

### 3.4.5 การทำแอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเด็คซ์จี-200

แผนภาพการแยกโปรตีนแสดงดังรูปที่ 15 เมื่อผ่านแอนไซม์ลงในคอลัมน์เซฟาเด็คซ์จี-200 (วิธีทำข้อ 2.10.5) แล้วชะด้วยสารละลายไปแตสเซียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ใน elution buffer โดยแอนไซม์จะถูกชะออกมาที่ประมาณแฟรคชันที่ 30 ถึง 50 ส่วนโปรตีนอื่นจะถูกชะออกมาที่แฟรคชันหลังจากนี้ เมื่อทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของแอนไซม์โดยทำ

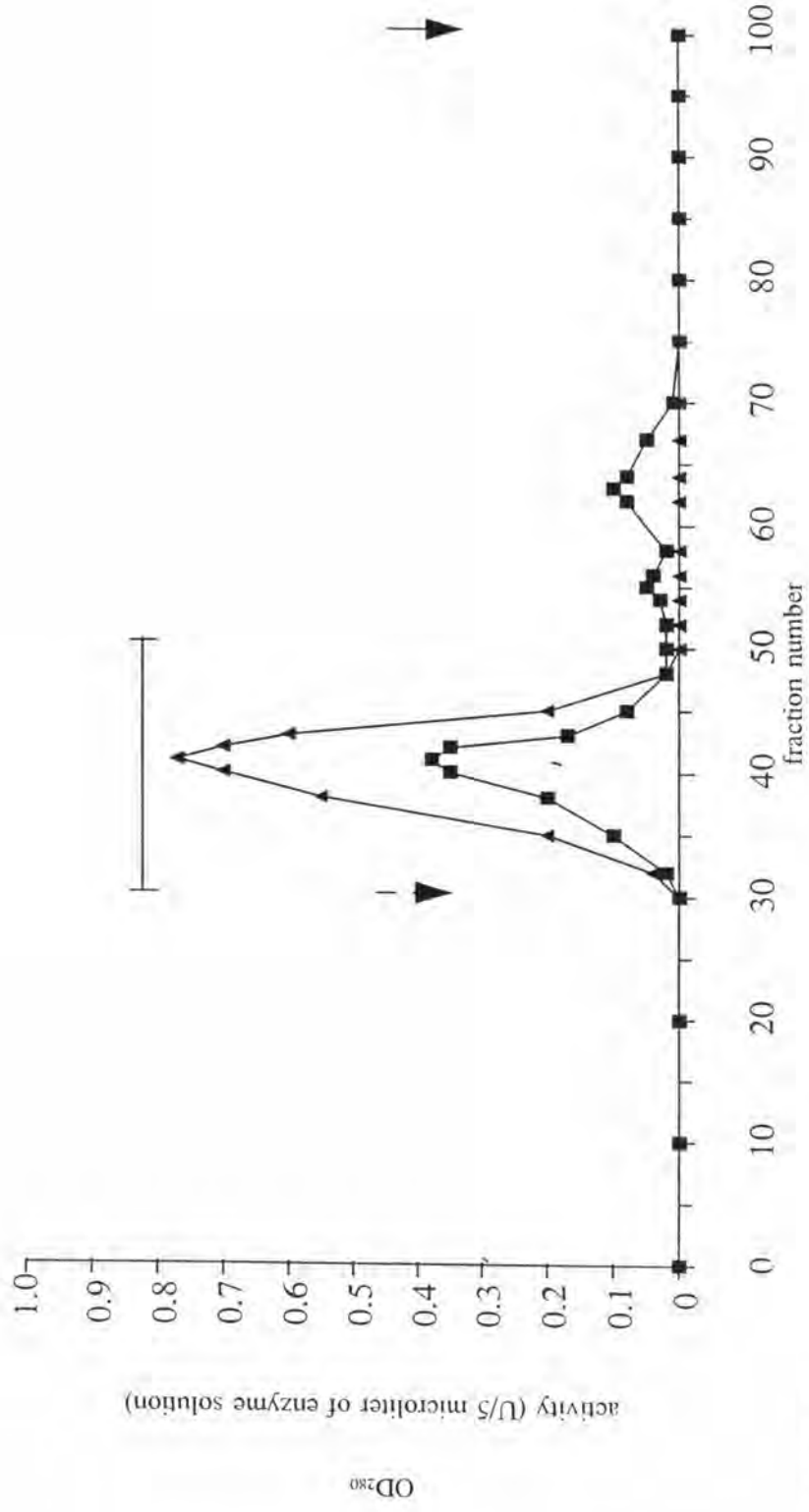


รูปที่ 14 คอลัมน์บลูเซฟาไวรัส

ผลการแยกเออนไซม์ที่ได้จากคอลัมน์ สดรออกซีอะพาไทต์โดยผ่านคอลัมน์บลูเซฟาไวรัส (ขนาด 5 มิลลิลิตร) จะด้วย linear salt gradient ของโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 10 มิลลิโมลาร์ ที่ประกอบด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 0.01 เปอร์เซ็นต์ และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ กับโปแตสเซียมคลอไรด์ 2 โมลาร์ ในบัฟเฟอร์เดียวกัน อัตราการไหล 60 มิลลิลิตร/ชั่วโมงแบ่งเก็บแยกส่วนแฟรคชันที่ 1-50 แฟรคชันละ 1 มิลลิลิตร และแฟรคชันที่ 51-93 แฟรคชันละ 0.5 มิลลิลิตร (วิธีข้อ 2.10.4)

□ OD<sub>280</sub>      ▲ แอคทีวิตี      - - - - ความเข้มข้นของโปแตสเซียมคลอไรด์

▼ เริ่มด้วย linear salt gradient      | - - - | รวมแฟรคชัน 52-60 (สารละลายเอ็นไซม์ 1)      | - - - | รวมแฟรคชัน 61-70 (สารละลายเอ็นไซม์ 2)



รูปที่ 15 กอลัมน์เซฟาเดกซ์จี-200

ผลการแยกแอมไซม์ที่ได้จากคอลัมน์บูเซฟาโรสโดยผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์จี-200 (ขนาด 2.0 x 80 เซนติเมตร) ระบุด้วยโพลีเตสซีเมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ในโบเตสซีเมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.4 10 มิลลิโมลาร์ที่ประกอบด้วย 2-เมอร์แคปโตเอทานอล 0.01 เปอร์เซ็นต์และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ อัตราการไหล 15 มิลลิลิตร/ ชั่วโมง แบ่งเก็บแยกส่วนแฟรคชันละ 2 มิลลิลิตร (วิธีข้อ 2.10.5)

- OD<sub>280</sub>
- ▲ แอคทีวิตี
- แฟรคชันที่โพลีเตสซีเมไดโครเมตถูกชะออกมา (bed volume)
- แฟรคชันที่โพลีเตสซีเมไดโครเมตถูกชะออกมา (void volume)
- รวมแฟรคชัน 30-50 (สารละลายแอมไซม์ 3)

ตารางที่ 6 ผลการทำแอด-อะลาไมน์ดีไฮโดรจิเนสจาก *Aeromonas hydrophila* ให้บริสุทธิ์

ขั้นตอน	แอกติวิตีรวม (หน่วย)	โปรตีนรวม (มิลลิกรัม)	แอกติวิตีจำเพาะ (หน่วย/มิลลิกรัมโปรตีน)	แอกติวิตีของเอนไซม์ คงเหลือ (เปอร์เซ็นต์)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
สารละลายเอนไซม์ตั้งต้น	914.4	3,910.0	0.23	100.0	1.0
แอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 30-40 เปอร์เซ็นต์	619.2	1,138.0	0.54	67.7	2.4
คอลัมน์ดีเออีเซลลูโลส	304.0	64.0	4.75	33.2	20.6
คอลัมน์ไฮดรอกซีอะพาไทต์	253.8	34.8	7.27	27.8	31.6
คอลัมน์บลูเซฟาโรส					
-สารละลายเอนไซม์ 1	115.5	5.1	22.90	12.6	99.6
-สารละลายเอนไซม์ 2	58.3	2.9	20.10	6.4	87.4
คอลัมน์เซฟาเดกซ์จี-200 (จากสารละลายเอนไซม์ 2)					
-สารละลายเอนไซม์ 3	52.8	2.2	23.90	5.8	104.0
สารละลายเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ (สารละลายเอนไซม์ 1 และ 3)	168.3	7.3	23.00	18.4	100.0



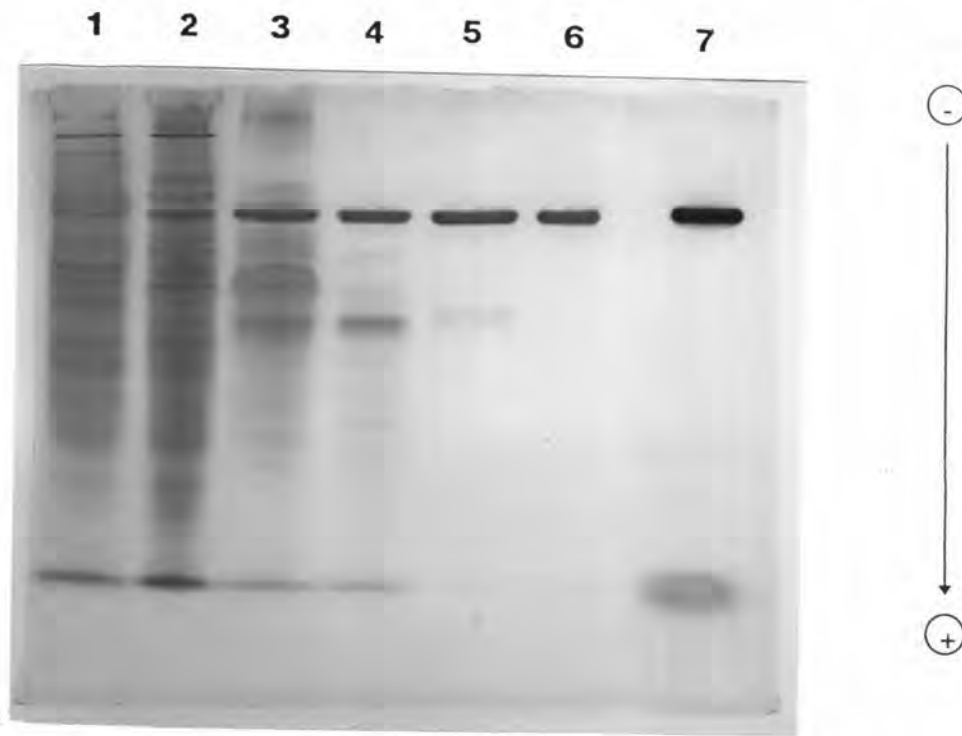
จากขั้นตอนการทำแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสให้บริสุทธิ์ดังกล่าวมา ได้ เอนไซม์ที่บริสุทธิ์ 2 แฟรคชัน คือ สารละลายเอนไซม์ 1 และสารละลายเอนไซม์ 3 หลังจาก รวมแฟรคชันทั้ง 2 เข้าด้วยกันแล้วจะได้ค่าแอกติวิตีรวมเท่ากับ 168.3 หน่วยคิดเป็น 18.4 เปอร์เซ็นต์จากแอกติวิตีตั้งต้น ปริมาณโปรตีน 7.3 มิลลิกรัมคิดเป็น 0.19 เปอร์เซ็นต์จาก โปรตีนตั้งต้น ค่าแอกติวิตีจำเพาะเท่ากับ 23 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์ขึ้น 100 เท่า ซึ่งรวบรวมผลการทำแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสให้บริสุทธิ์แต่ละขั้นตอนไว้ใน ตารางที่ 6

และจากการทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิส (วิธีข้อ 2.5.6) แสดงรูปแบบของโปรตีนในแต่ละขั้นตอนของการทำแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสให้บริสุทธิ์ จะเห็นได้ว่าโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนสุดท้ายปรากฏแถบโปรตีนเพียงแถบเดียว ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าเป็นแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนส โดยเปรียบเทียบจากผลการย้ายสีแอกติวิตี ดังแสดงในรูปที่ 16

### 3.5 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์

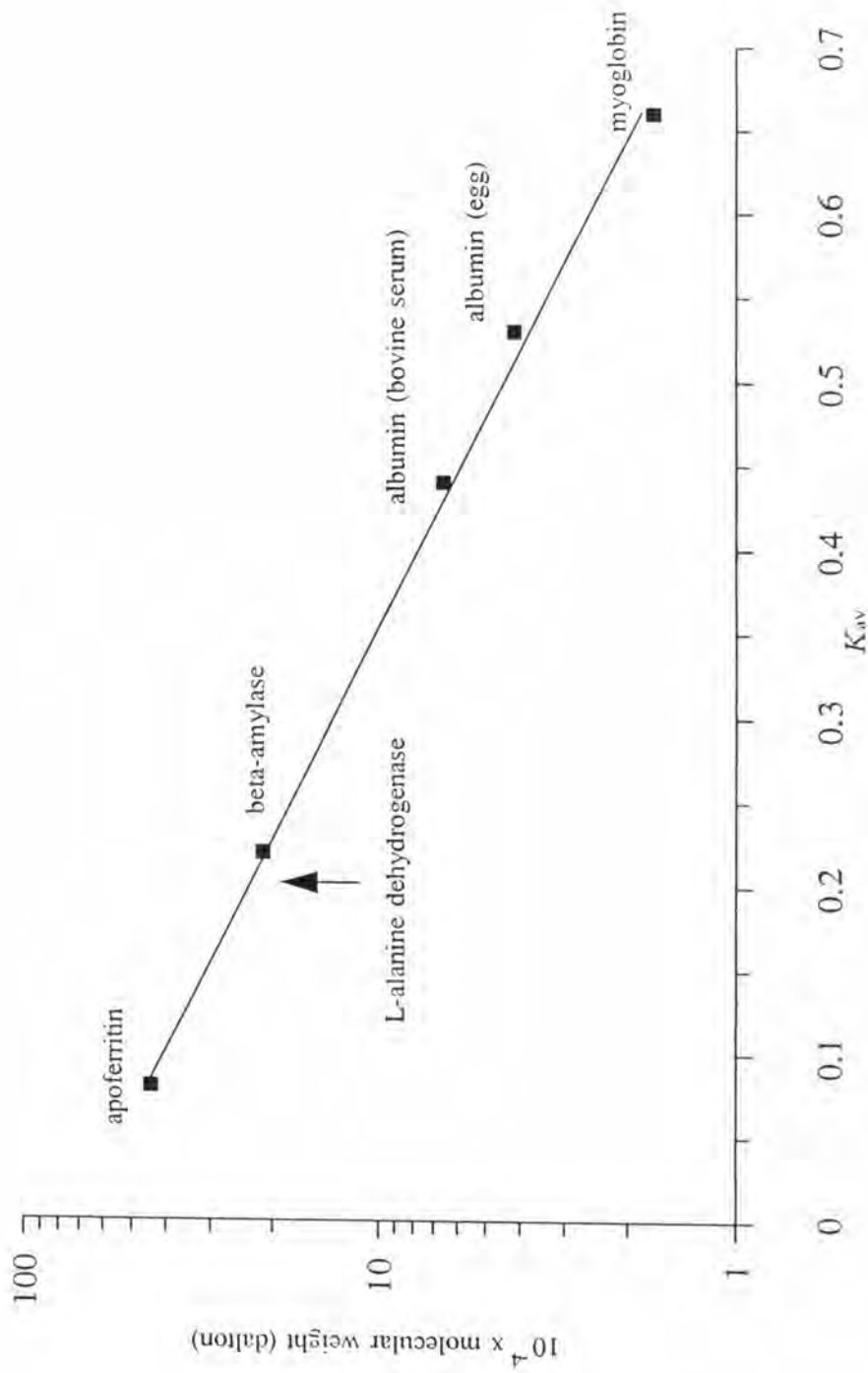
#### 3.5.1 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200

เมื่อผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐานต่างๆลงในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200 แล้วจะด้วยไปแคตเซียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์ใน elution buffer (วิธีทำข้อ 2.11.1) สารละลายโปรตีนมาตรฐานอะโปเฟอร์ริทิน บีตา-อะไมเลส อัลบูมิน(จากซีรัมวัว) อัลบูมิน (จากไข่ขาว) และไมโอโกลบินถูกชะออกจากคอลัมน์ที่ elution volume ( $V_e$ ) เท่ากับ 82, 102, 132, 146 และ 164 มิลลิลิตรตามลำดับ โดยที่สารละลายเอนไซม์ถูกชะออกที่ elution volume เท่ากับ 96 มิลลิลิตร ในขณะที่ void volume ( $V_0$ ) ของคอลัมน์เท่ากับ 70 มิลลิลิตรและ bed volume ( $V_b$ ) เท่ากับ 212 มิลลิลิตร เมื่อคำนวณค่า  $K_{av}$  แล้วเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 17) พบว่าแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนสมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 230,000 ดาลตัน



รูปที่ 16 รูปแบบของโปรตีนในแต่ละขั้นตอนของการทำแอล-อะลานินดีไฮโดรจีเนสให้บริสุทธิ์เทียบกับผลการย้อมสีแอกติวิตี (พอลิอะครีลาไมด์เจล = 7.7%)

ช่องที่ 1	โปรตีนตั้งต้น	150 ไมโครกรัม
ช่องที่ 2	โปรตีนจากการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 30-40 เปอร์เซ็นต์	200 ไมโครกรัม
ช่องที่ 3	โปรตีนจากคอลัมน์ดีไอเออีเซลลูโลส	32 ไมโครกรัม
ช่องที่ 4	โปรตีนจากคอลัมน์ไฮดรอกซีอะพาไทต์	10 ไมโครกรัม
ช่องที่ 5	โปรตีนจากคอลัมน์บลูเซฟาโรส (สารละลายเอนไซม์ 2)	10 ไมโครกรัม
ช่องที่ 6	โปรตีนจากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200	10 ไมโครกรัม
ช่องที่ 7	ผลการย้อมสีแอกติวิตีของแอล-อะลานินดีไฮโดรจีเนสจากคอลัมน์เซฟาเด็กซ์จี-200	3 ไมโครกรัม



รูปที่ 17 ความสัมพันธ์ระหว่าง  $K_{av}$  และ  $\log$  ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน

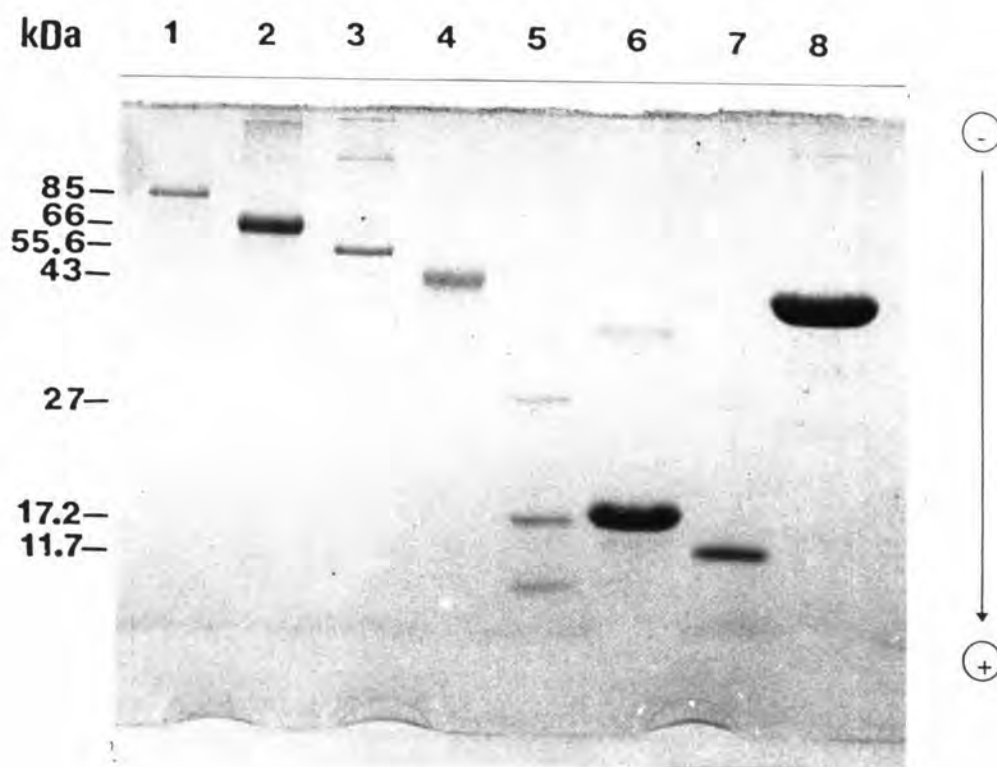
ในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจีเนสโดยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ ซี-200 (ขนาด  $2.0 \times 80$  เซนติเมตร) (วิธีทดลองข้อ 2.11.1)

### 3.5.2 การศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิส

นำสารละลายเอนไซม์ที่บริสุทธิ์มาทำเอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟริซิส (วิธีข้อ 2.11.2) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 18 จากรูปจะเห็นว่าช่องที่ 8 คือแถบของสารละลายเอนไซม์ปรากฏเป็นแถบเข้มมาก 1 แถบ อาจกล่าวได้ว่ามีความบริสุทธิ์มาก ซึ่งแถบนี้มีระยะทางสัมพัทธ์เท่ากับ 0.33 ส่วนแถบของโปรตีนมาตรฐานในช่องต่างๆ ได้แก่ ฟรุกโตส-6-ฟอสเฟตไคเนส (จากกล้ามเนื้อกระต่าย) อัลบูมิน (จากซีรัมวัว) กลูตาเมตดีไฮโดรจีเนส (จากตับวัว) อัลบูมิน (จากไข่ขาว) ไคโมทริปซิโนเจน ไมโอโกลบิน และไซโตโครมซีมีระยะทางสัมพัทธ์เท่ากับ 0.16, 0.22, 0.25, 0.31, 0.47, 0.69 และ 0.74 ตามลำดับ ซึ่งระยะทางสัมพัทธ์ของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจีเนสจะอยู่ระหว่างอัลบูมิน (จากไข่ขาว) และไคโมทริปซิโนเจน และจากกราฟของโปรตีนมาตรฐาน (รูปที่ 19) สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลของหน่วยย่อยของเอนไซม์ได้เท่ากับ 40,000 ดาลตันเมื่อเทียบผลการทดลองกับการหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์จี-200 ซึ่งได้ขนาดน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 230,000 ดาลตัน จะสามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์นี้ประกอบด้วย 6 หน่วยย่อยและแต่ละหน่วยย่อยมีขนาด 40,000 ดาลตัน

### 3.5.3 การศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทและโคเอนไซม์ของเอนไซม์

ทำการทดลองตามวิธีข้อ 2.11.3 โดยปฏิกิริยา oxidative deamination จากการทำปฏิกิริยาโดยใช้สารเคมีชนิดอื่นๆ เป็นสารตั้งต้น แล้วทำการวัดแอกติวิตีของปฏิกิริยาเทียบกับแอกติวิตีที่ใช้แอล-อะลานีนเป็นสารตั้งต้น ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์มีความจำเพาะต่อแอล-อะลานีนสูงคือ เมื่อใช้ดีแอล-แอสปาร์เตต แอล-แอสปาร์เตต แอล-ฟีนิลอะลานีน แอล-ลูซีน แอล-เมทไทโอนีน แอล-ทรีโอนีน แอล-ไอโซลูซีน แอล-ทริปโตเฟน แอล-วาลีน ไกลซีน แอล-กลูตาเมต ดี-อะลานีน บีตา-อะลานีน แอล-ซิสเตอีน แอล-แอสพาราจีน ดีแอล-ไลซีน และดีแอล-มาเลตเป็นสารตั้งต้นแล้วจะไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาเลย และเมื่อใช้แอล-แอลฟา-อะมิโน-เอ็น-บิวทิเรต และแอล-ซีรีนเป็นสารตั้งต้นค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์เมื่อเทียบกับใช้แอล-อะลานีนเป็นสารตั้งต้นเท่ากับ 1.43 และ 0.47 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สำหรับ reductive amination เมื่อทำปฏิกิริยาโดยใช้แอลฟา-คีโตนบิวทิเรตเป็นสารตั้งต้นเทียบกับไพรูเวทพบว่าได้ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์เท่ากับ 38.9 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองข้างต้นสามารถบอกได้ว่าในปฏิกิริยา oxidative deamination

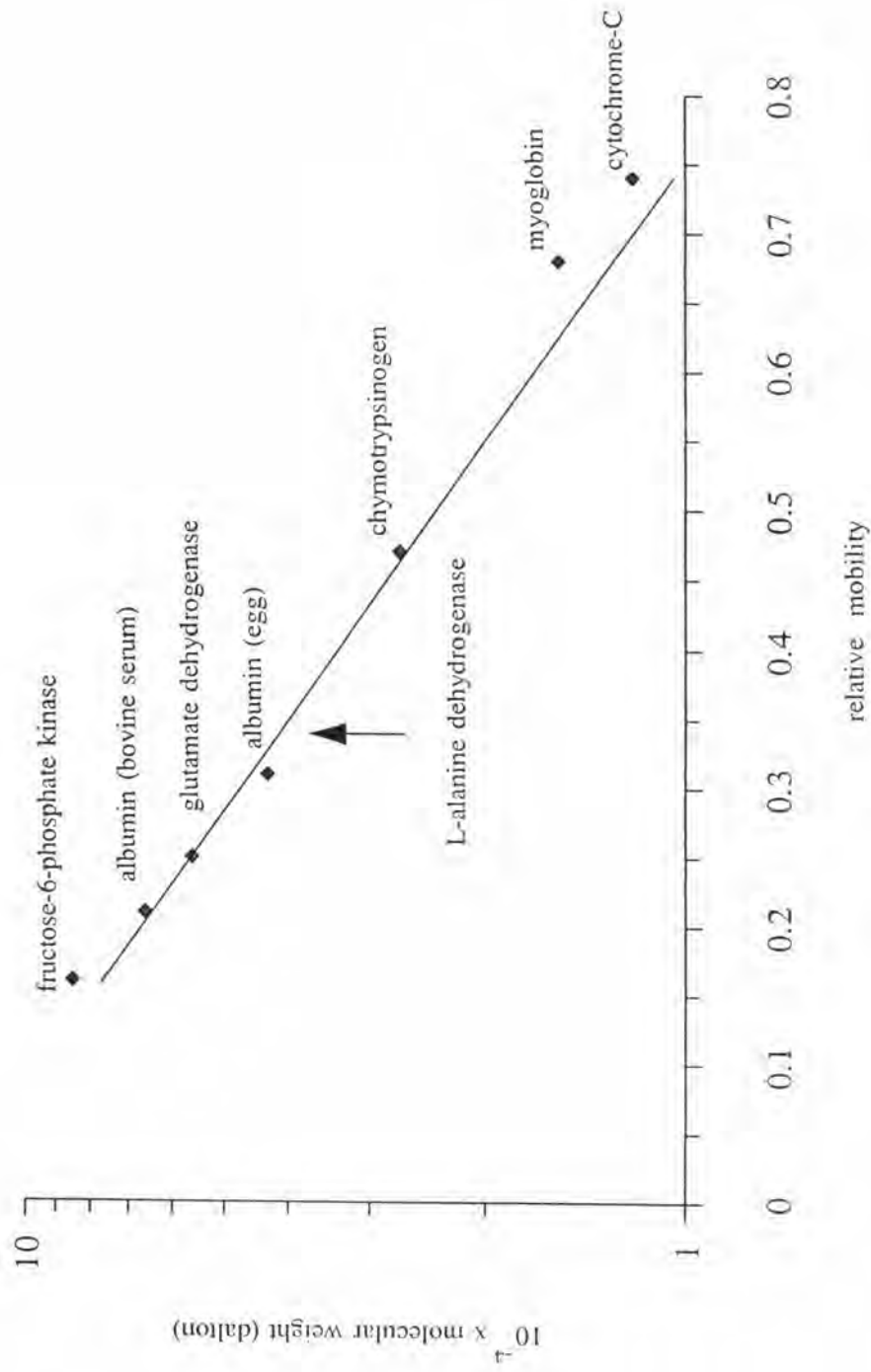


รูปที่ 18 รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและแอล-อะลานีนดีไฮโดรจีเนสที่บริสุทธิ์

จากการทำแอสดีเอส-พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

(พอลิอะคริลาไมด์เจล = 13%)

- |           |  |              |
|-----------|--|--------------|
| ช่องที่ 1 | ฟรุกโตส-6-ฟอสเฟตไคเนส (จากกล้ามเนื้อกระต่าย) (85,000 ดาลตัน) | 2 ไมโครกรัม  |
| ช่องที่ 2 | อัลบูมิน (จากซีรัมวัว) (66,000 ดาลตัน)                       | 2 ไมโครกรัม  |
| ช่องที่ 3 | กลูตามาตดีไฮโดรจีเนส (จากตับวัว) (55,600 ดาลตัน)             | 2 ไมโครกรัม  |
| ช่องที่ 4 | อัลบูมิน (จากไข่ขาว) (43,000 ดาลตัน)                         | 2 ไมโครกรัม  |
| ช่องที่ 5 | โคโมทริปซิโนเจน (27,000 ดาลตัน)                              | 2 ไมโครกรัม  |
| ช่องที่ 6 | ไมโอโกลบิน (17,200 ดาลตัน)                                   | 10 ไมโครกรัม |
| ช่องที่ 7 | ไซโตโครมซี (11,700 ดาลตัน)                                   | 2 ไมโครกรัม  |
| ช่องที่ 8 | แอล-อะลานีนดีไฮโดรจีเนส                                      | 10 ไมโครกรัม |



รูปที่ 19 ความสัมพันธ์ระหว่าง relative mobility และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน ในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจีเนสโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส (วิธีทดลองข้อ 2.11.2)

จะมีความจำเพาะต่อสับสเตรทคือแอล-อะลานีนสูง ในขณะที่ปฏิกิริยา reductive amination มีความจำเพาะต่อสับสเตรทคือไพรูเวทน้อยกว่า

จากการศึกษาความจำเพาะต่อโคเอนไซม์ในปฏิกิริยา oxidative deamination เมื่อทำปฏิกิริยาโดยใช้ NADP<sup>+</sup> เป็นโคเอนไซม์เทียบกับ NAD<sup>+</sup> พบว่าให้ค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์แค่ 0.07 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเอนไซม์มีความจำเพาะต่อ NAD<sup>+</sup> สูง

#### 3.5.4 การศึกษาผลของสารเคมีที่มีต่อแอกติวิตีของเอนไซม์

ทำการทดลองตามวิธีข้อ 2.11.4 ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 7 จากตารางแสดงค่าแอกติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์) เทียบกับแอกติวิตีที่ภาวะมาตรฐาน คือ ภาวะที่ไม่ได้ใส่สารเคมีใดๆ จะเห็นได้ว่าสารที่มีผลต่อปฏิกิริยาโดยทำให้แอกติวิตีลดลง ได้แก่ ไอโอโดอะเซตาไมด์ พารา-คลอโรเมอร์คิวริเบนโซเอต 5,5'-ไดโธโอ-บิส(2-ไนโตรเบนโซเอต) ซิงค์ซัลเฟต คอปเปอร์ซัลเฟต ดี-ซิสเทอีน และซาโคซิน ส่วน DTT EDTA แมกนีเซียมคลอไรด์ แคลเซียมคลอไรด์ แอมโมเนียมคลอไรด์ แมงกานีสคลอไรด์ โทบอลต์คลอไรด์ และแอล-กลูตามेटไม่มีผลต่อปฏิกิริยาแต่อย่างใด

#### 3.5.5 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ

ทำการทดลองตามวิธีข้อ 2.11.5 โดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดแอกติวิตีได้ผลดังรูปที่ 20 จากรูปจะเห็นได้ว่าแอกติวิตีจะคงที่จนถึงอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จากนั้นแอกติวิตีของเอนไซม์เริ่มลดลงเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเพิ่มขึ้น โดยเหลือประมาณ 55 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และจะไม่เหลือแอกติวิตีเลยที่ประมาณ 65 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการทดลองโดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสที่เวลาต่างๆแล้วนำไปวัดแอกติวิตีผลดังรูปที่ 21 คือเมื่อบ่มนานตั้งแต่ 16 ชั่วโมงเป็นต้นไป แอกติวิตีของเอนไซม์เริ่มลดลงจนกระทั่งไม่เหลือแอกติวิตีเลยที่เวลา 52 ชั่วโมง

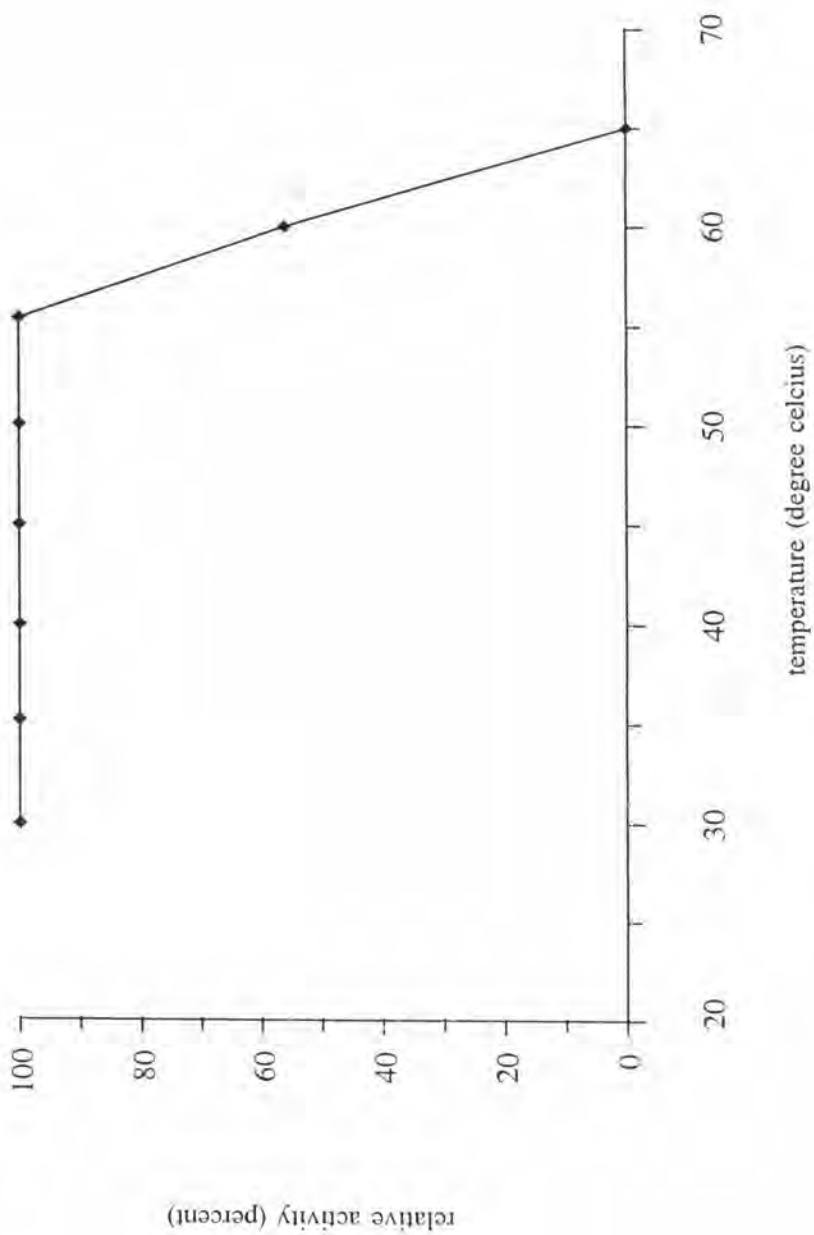
#### 3.5.6 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของเอนไซม์

ทำการทดลองตามวิธีข้อ 2.11.6 โดยวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ ทั้งปฏิกิริยา reductive amination และ oxidative deamination ได้ผลดังรูปที่ 22 สามารถสรุปได้ว่าอุณหภูมิที่ทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 45 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

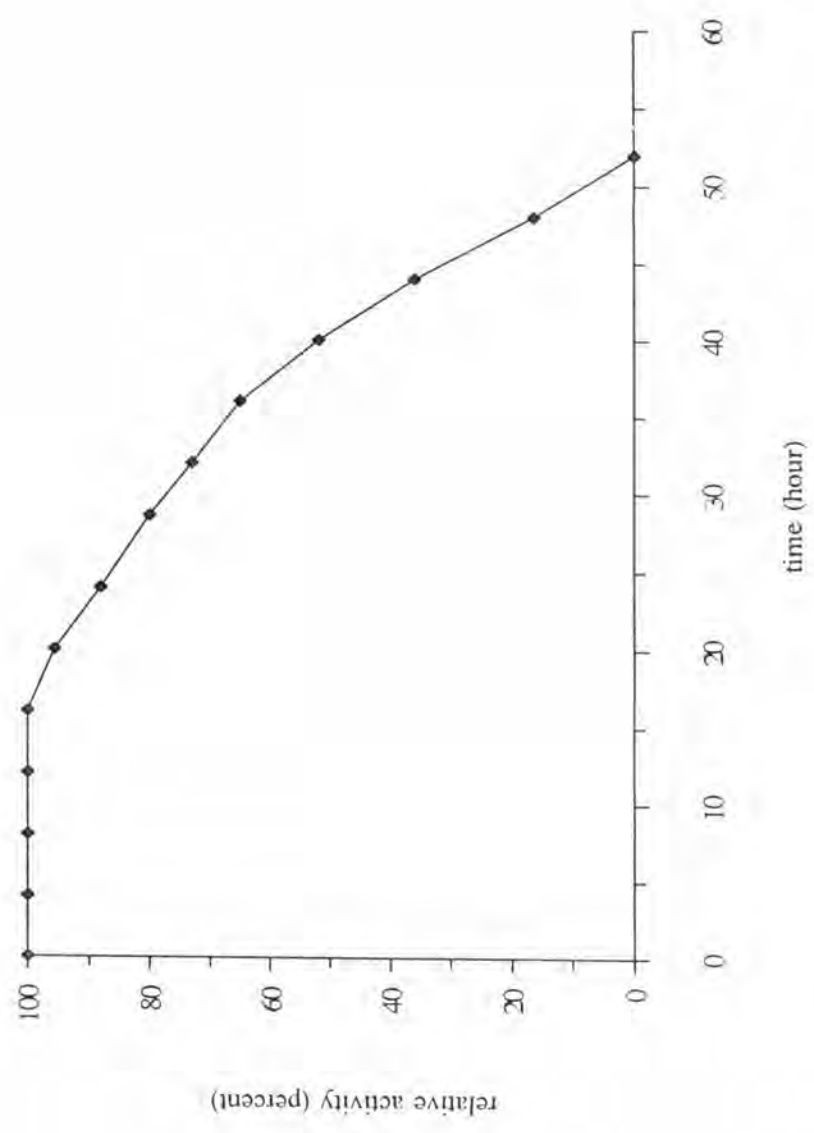
ตารางที่ 7 ผลของสารเคมีที่มีต่อแอกติวิตีของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจีเนส

สารเคมี	แอกติวิตีสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
ภาวะควบคุม (ไม่ได้ใส่สารเคมี)	100
DTT	114
ไอโอโดอะเซตาไมด์	1.9
พารา-คลอโรเมอร์คิวริเบนโซเอต	0
5,5'-ไดไฮโดรไอโซบิส(2-ไนโตรเบนโซเอต)	0
EDTA	114
แมกนีเซียมคลอไรด์	108
แคลเซียมคลอไรด์	98
แอมโมเนียมคลอไรด์	95
แมงกานีสคลอไรด์	95
โคบอลต์คลอไรด์	95
ซิงก์ซัลเฟต	38
คอปเปอร์ซัลเฟต	0.4
แอล-กลูตาเมต	98
ดี-ซิสเทอีน	68
ซาโคซิน	57

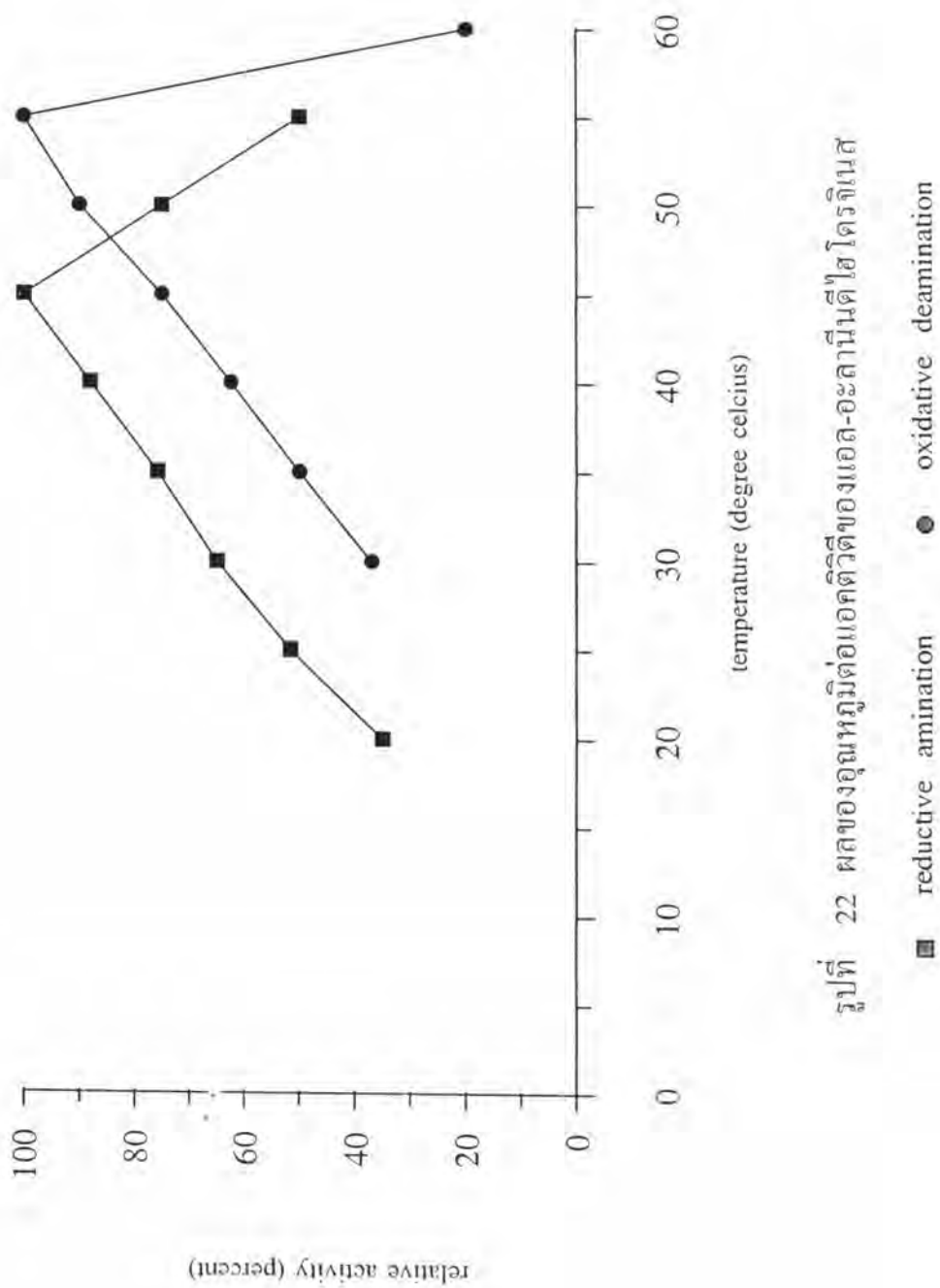




รูปที่ 20 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจิเนส



รูปที่ 21 ผลของระยะเวลาต่อความเสถียรของแอส-อะลานีนดีไฮโดรจินเนสที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส



รูปที่ 22 ผลของอุณหภูมิต่อคัตวิตีของแอส-อะลานีนดีไฮโดรจีเนส

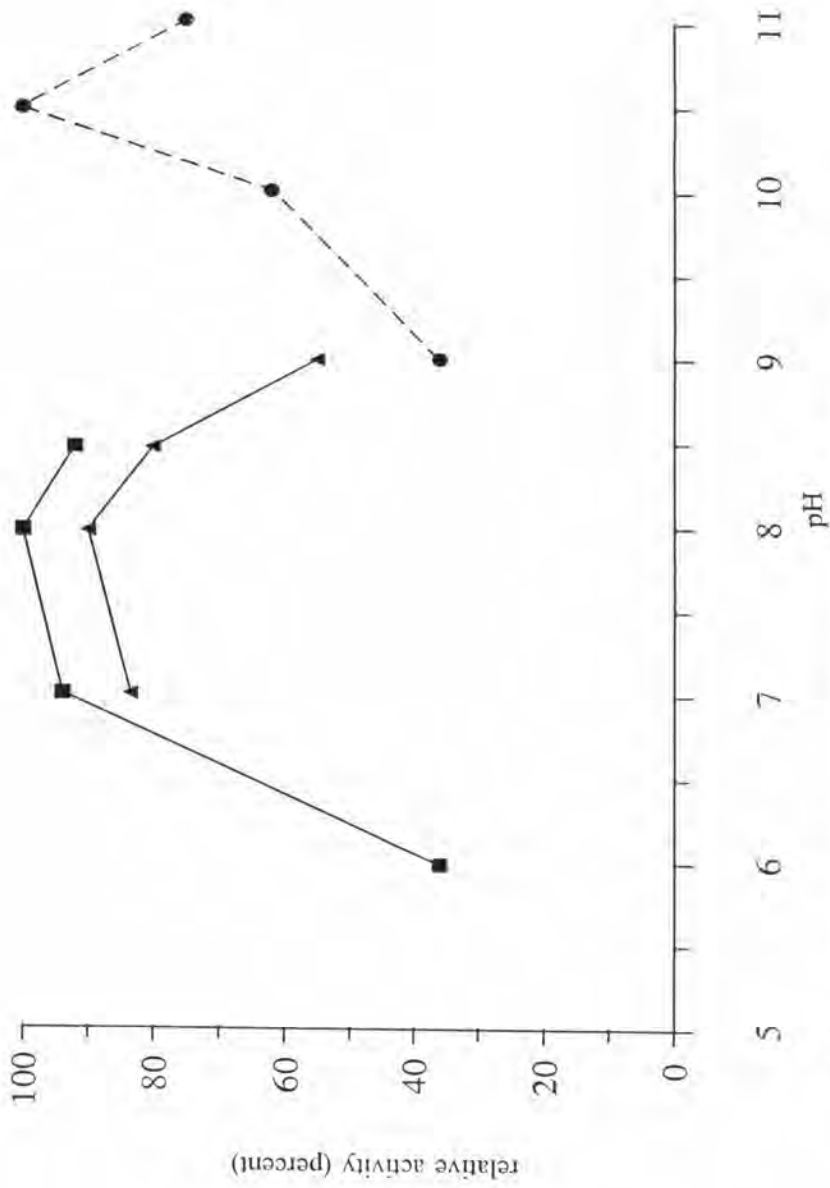
### 3.5.7 การศึกษาผลของ pH ต่อแอกติวิตีของเอนไซม์

ทำการทดลองตามวิธีข้อ 2.11.7 โดยวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ pH ต่างๆ ทั้งปฏิกิริยา reductive amination และ oxidative deamination ได้ผลดังรูปที่ 23 จากกราฟแสดงให้เห็นว่า pH ที่ทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 8 และ 10.5 ตามลำดับ

## 3.6 การศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์

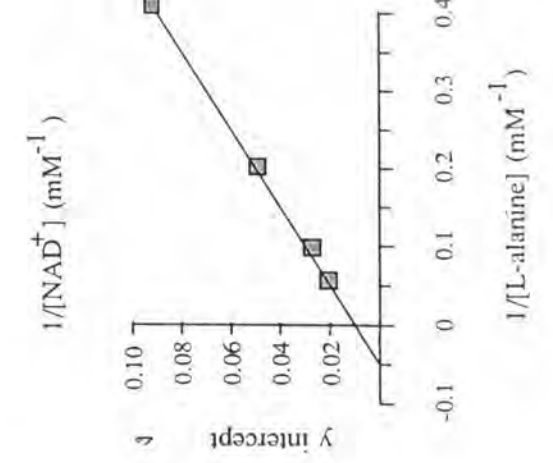
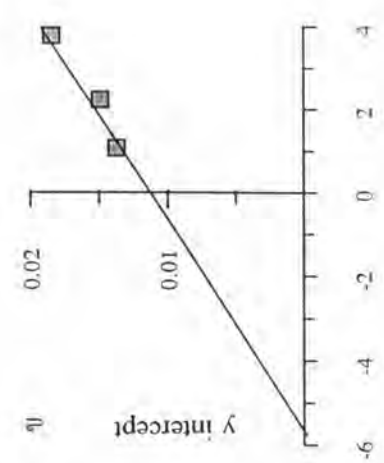
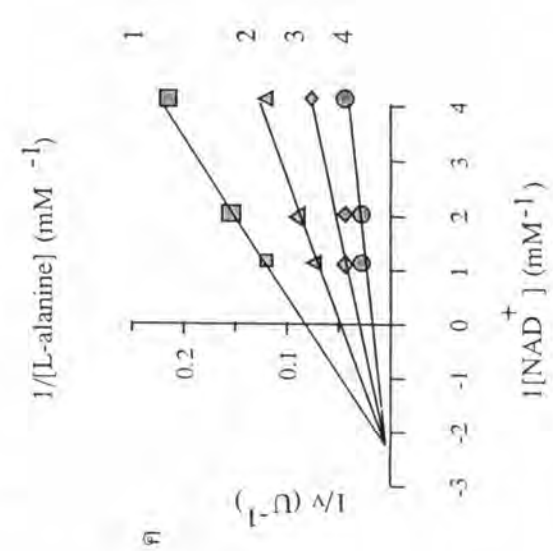
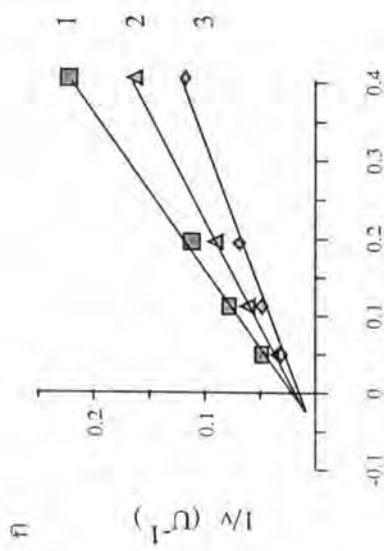
### 3.6.1 การหาค่า $K_m$

ทำการทดลองตามวิธีข้อ 2.12.1 (ปฏิกิริยา oxidative deamination) เพื่อหาค่า  $K_m$  ของสับสเตรทชนิดต่างๆ โดยศึกษาผลของความเข้มข้นของแอล-อะลานีนต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ความเข้มข้นของ  $NAD^+$  คงที่ต่างๆ แล้วนำไปสร้างกราฟ double-reciprocal plots ระหว่างความเข้มข้นของแอล-อะลานีนกับความเร็วเริ่มต้นได้กราฟรูปที่ 24 ก และจากรูปที่ 24 ก สามารถนำมาสร้างกราฟ secondary plots ของจุดตัดแกน y กับส่วนกลับของความเข้มข้น  $NAD^+$  ได้ดังรูปที่ 24 ข จากกราฟสามารถคำนวณค่า  $K_m$  ของ  $NAD^+$  ได้เท่ากับ 0.17 มิลลิโมลาร์ จากนั้นสร้างกราฟ double-reciprocal plots ระหว่างความเข้มข้น  $NAD^+$  กับความเร็วเริ่มต้นจะได้กราฟที่ 24 ค แล้วจะสามารถสร้างกราฟ secondary plots ของจุดตัดแกน y กับส่วนกลับของความเข้มข้นแอล-อะลานีนได้ดังรูปที่ 24 ง จากกราฟสามารถคำนวณค่า  $K_m$  ของแอล-อะลานีนได้เท่ากับ 20 มิลลิโมลาร์ จากรูป 24 ก และ 24 ข ซึ่งได้กราฟเส้นตรงมีจุดตัดอยู่ในควอดเรนท์ที่ 2 แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาเกิดขึ้นโดยเกิดโมเลกุลเชิงซ้อนของเอนไซม์ แอล-อะลานีนและ  $NAD^+$



รูปที่ 23 ผลของ pH ต่อแอกติวิตีของแอมด-อะลานีนดีไฮโดรจิเนส

- potassium phosphate buffer
- ▲ Tris-HCl buffer
- glycine-KCl-KOH buffer
- reductive amination
- - - oxidative deamination



รูปที่ 24 รูปแบบความเร็วเริ่มต้นระหว่างแอลอะลานีนกับ  $NAD^+$   
 ก. double-reciprocal plots ของความเร็วเริ่มต้นกับความเข้มข้นของแอลอะลานีนที่ความเข้มข้นของ  $NAD^+$  คงที่ต่างๆ กัน ได้แก่ (1) 0.25 (2) 0.5 และ (3) 1 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ  
 ข. secondary plots ของจุดตัดแกน y กับส่วนกลับของความเข้มข้นของ  $NAD^+$  ที่ความเข้มข้นของความเข้มข้นของ  $NAD^+$  ที่ความเข้มข้นของแอลอะลานีนคงที่ต่างๆ กัน ได้แก่ (1) 2.5 (2) 5 (3) 10 และ (4) 20 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ  
 ค. double-reciprocal plots ของความเร็วเริ่มต้นกับความเข้มข้นของ  $NAD^+$  ที่ความเข้มข้นของความเข้มข้นของแอลอะลานีนคงที่ต่างๆ กัน ได้แก่ (1) 0.25 (2) 0.5 และ (3) 1 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ  
 ง. secondary plots ของจุดตัดแกน y กับส่วนกลับของความเข้มข้นของแอลอะลานีน

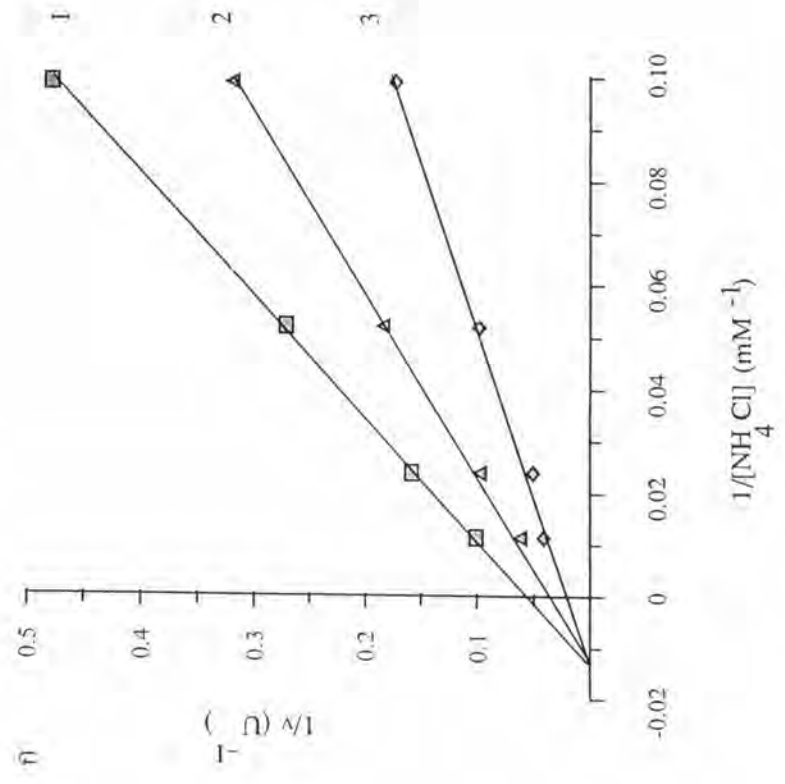
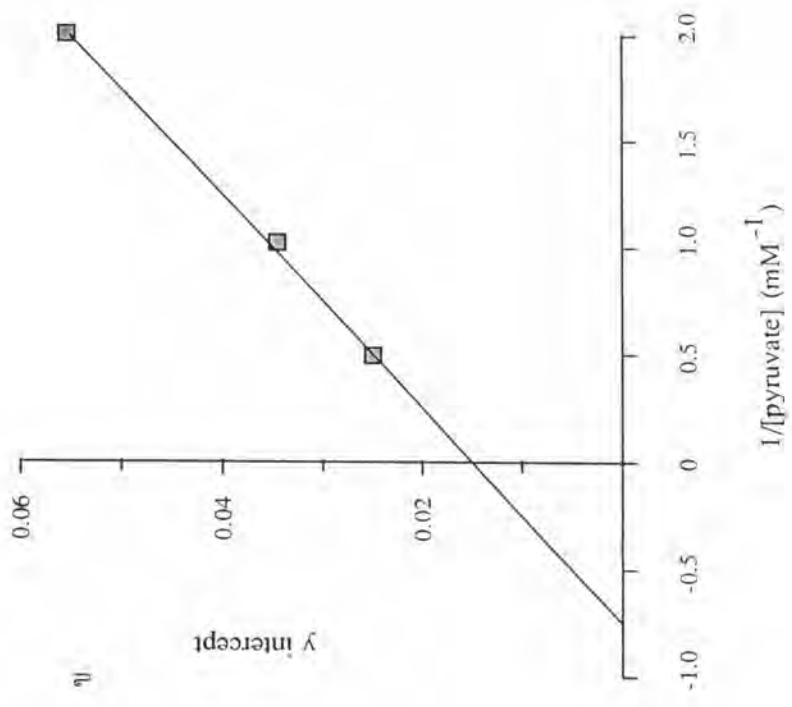
ส่วนปฏิกิริยา reductive amination ทำตามวิธีในข้อ 2.12.1 นำผลการทดลองที่ได้มาสร้างกราฟ

1. double-reciprocal plots ระหว่างความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์กับความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นของไพรูเวทที่ต่างๆ โดยความเข้มข้นของ NADH สูงและคงที่ (รูปที่ 25 ก) ได้กราฟเส้นตรงมีจุดตัดอยู่บนแกน X จำนวนค่า  $K_m$  ของแอมโมเนียมคลอไรด์ได้เท่ากับ 77 มิลลิโมลาร์ และจากรูปที่ 25 ก สามารถนำมาสร้างกราฟ secondary plots ของจุดตัดแกน y กับส่วนกลับของความเข้มข้นไพรูเวทต่างๆ (รูปที่ 25 ข) จำนวนค่า  $K_m$  ของไพรูเวทได้เท่ากับ 1.33 มิลลิโมลาร์

2. double-reciprocal plots ระหว่างความเข้มข้นของ NADH กับความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นของไพรูเวทที่ต่างๆ โดยความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์สูงและคงที่ (รูปที่ 26) ได้กราฟเส้นตรงที่ขนานกัน

3. double-reciprocal plots ระหว่างความเข้มข้นของ NADH กับความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ต่างๆ โดยความเข้มข้นของไพรูเวทสูงและคงที่ (รูปที่ 27 ก) กราฟที่ได้เป็นเส้นตรงและมีจุดตัดอยู่บนแกน X หาค่า  $K_m$  ของ NADH ได้เท่ากับ 0.25 มิลลิโมลาร์ และจากรูปที่ 27 ก สามารถนำมาสร้างกราฟ secondary plots ของจุดตัดแกน y กับส่วนกลับของความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ต่างๆ (รูปที่ 27 ข) และสามารถหาค่า  $K_m$  ของแอมโมเนียมคลอไรด์ได้เท่ากับ 80 มิลลิโมลาร์ ซึ่งใกล้เคียงกับค่า  $K_m$  ของแอมโมเนียมคลอไรด์ในข้อ 1 ค่า  $K_m$  ของสับสเตรทชนิดต่างๆ ของเอนไซม์แสดงดังตารางที่ 8

จากรูปที่ 25 ก, 26 และ 27 ก สามารถตัดความเป็นไปได้ของกลไกการเร่งปฏิกิริยาแบบสุ่ม (random addition of substrate) และสนับสนุนกลไกของปฏิกิริยาแบบ sequential ordered mechanism โดยที่แอมโมเนียจะจับกับเอนไซม์อยู่ระหว่าง NADH และไพรูเวท สำหรับลำดับการเข้าร่วมปฏิกิริยาของสับสเตรทศึกษาได้จากผลการยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์โดยผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาดังหัวข้อถัดไป



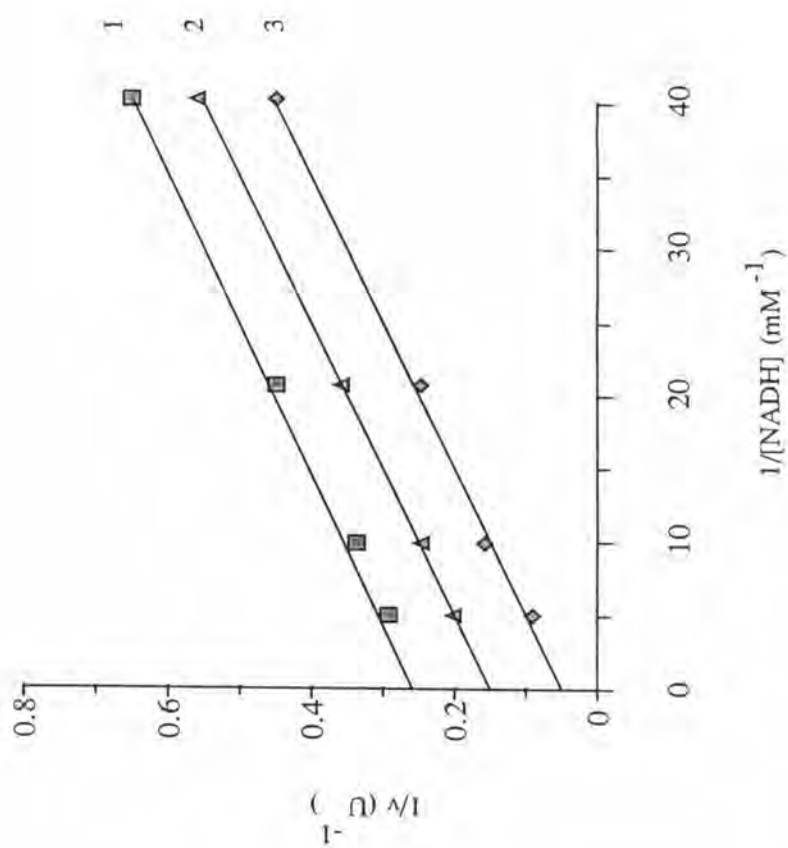
รูปที่ 25 รูปแบบความเร็วเริ่มต้นระหว่างแอมโมเนียมคลอไรด์กับไพรูเวท

ก double-reciprocal plots ของความเร็วเริ่มต้นกับความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นของไพรูเวทคงที่ต่างๆ กัน ได้แก่ (1) 0.5 (2) 1

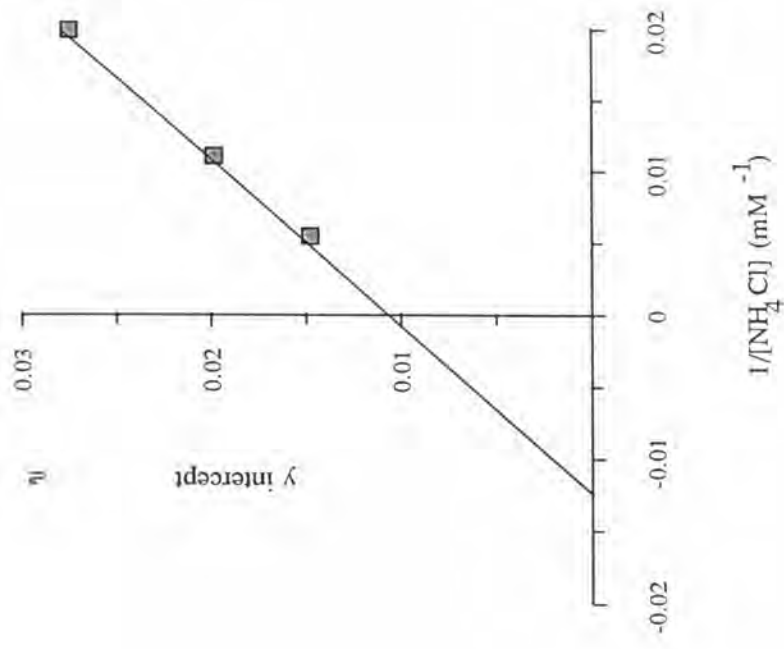
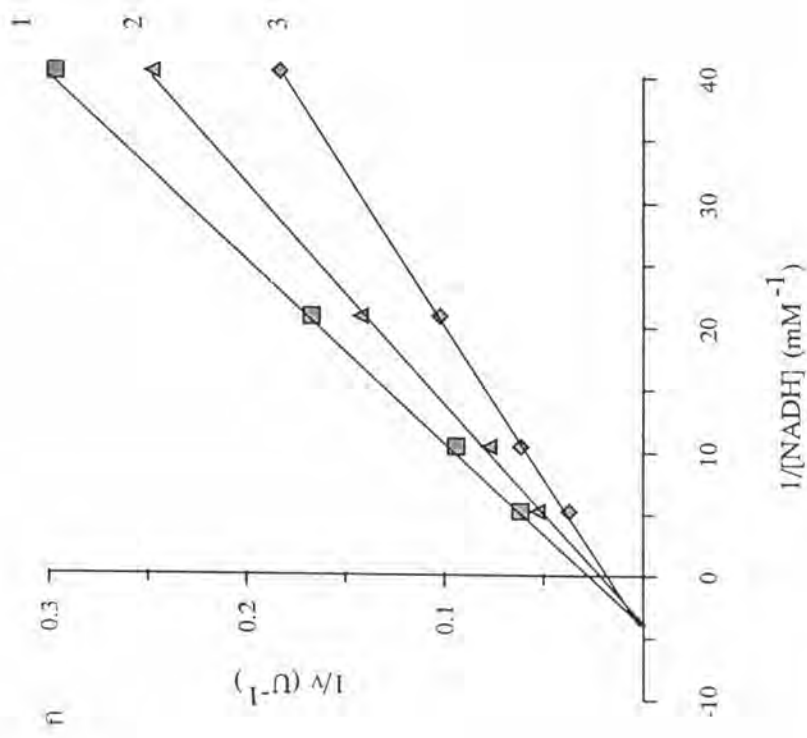
และ (3) 2 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ โดยมีความเข้มข้นของ NADH คงและคงที่เท่ากับ 0.25 มิลลิโมลาร์

ข secondary plots ของจุดตัดแกน y กับส่วนกลับของความเข้มข้นของไพรูเวท





รูปที่ 26 รูปแบบความเร็วเริ่มต้นระหว่าง NADH กับไพริเวท double-reciprocal plots ของความเร็วเริ่มต้นกับความเข้มข้นของ NADH ที่ความเข้มข้นของไพริเวทที่ต่างกัน ได้แก่ (1) 0.5 (2) 1 และ (3) 2 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ โดยมีค่าของแอมโมเนียมคลอไรด์สูงและคงที่เท่ากับ 250 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 27 รูปแบบความเร็วเริ่มต้นระหว่าง NADH กับแอมโมเนียมคลอไรด์

ก double-reciprocal plots ของความเร็วเริ่มต้นกับความเข้มข้นของ NADH ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์คงที่ต่างๆ กัน ได้แก่ (1) 50 (2) 100 และ (3) 200 มิลลิโมลาร์ โดยมีความเข้มข้นของไพรวาทสูงและคงที่เท่ากับ 10 มิลลิโมลาร์

ข secondary plots ของจุดตัดแกน y กับส่วนกลับของความเข้มข้นของแอมโมเนียมคลอไรด์

ตารางที่ 8 ค่า  $K_m$  ของสับสเตรทชนิดต่างๆ ของแอล-อะลานินดีไฮโดรจิเนสจาก *Aeromonas hydrophila*

สับสเตรท	$K_m$ (มิลลิโมลาร์)
แอล-อะลานิน	20
$NAD^+$	0.17
ไพรูเวท	1.33
แอมโมเนีย	77
$NADH$	0.25

### 3.6.2 การศึกษาการยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์โดยผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา (product inhibition)

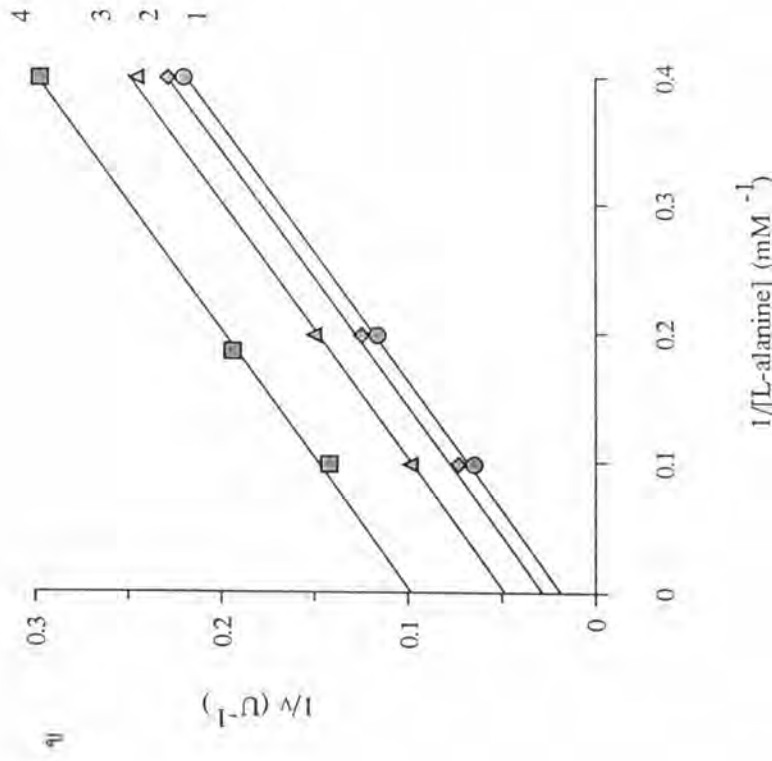
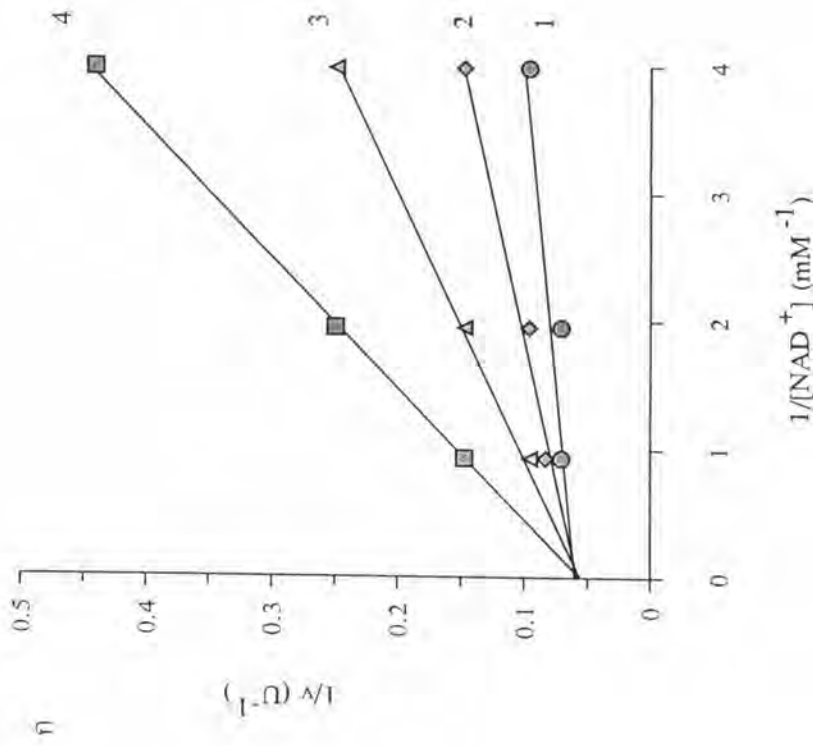
ทำการทดลองตามวิธีข้อ 2.12.2 แล้วนำค่าแอกติวิตีที่ความเร็วต้นมาสร้างกราฟ double-reciprocal plots ระหว่างความเข้มข้นของสับสเตรทและความเร็วต้นของปฏิกิริยาที่ความเข้มข้นของตัวยับยั้งต่างๆ ได้ดังรูปที่ 28, 29 และ 30 ตามลำดับ สามารถเขียนสรุปได้ดังตารางที่ 9

การที่รูปแบบการยับยั้งของ NADH ต่อ NAD<sup>+</sup> เป็นแบบ competitive แสดงว่าทั้ง NAD<sup>+</sup> และ NADH สามารถจับได้กับเอนไซม์อิสระ เมื่อพิจารณารูปแบบของการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ประกอบกับข้อมูลในข้อ 3.6.1 สรุปได้ว่ากลไกการเร่งปฏิกิริยาของแอล-อะลานินดีไฮโดรจีเนสจาก *Aeromonas hydrophila* เป็นแบบ sequential ordered binary-ternary kinetic mechanism โดย NAD<sup>+</sup> เข้าจับกับเอนไซม์ก่อนตามด้วยแอล-อะลานิน ส่วนกลไกการปล่อยผลิตภัณฑ์เริ่มจากปล่อยไพริูเวทก่อนตามด้วยแอมโมเนียและ NADH แสดงกลไกของปฏิกิริยาดังรูปที่ 31

### 3.7 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N

จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N ของแอล-อะลานินดีไฮโดรจีเนสจาก *Aeromonas hydrophila* จำนวน 20 ลำดับได้ผลดังรูปที่ 32

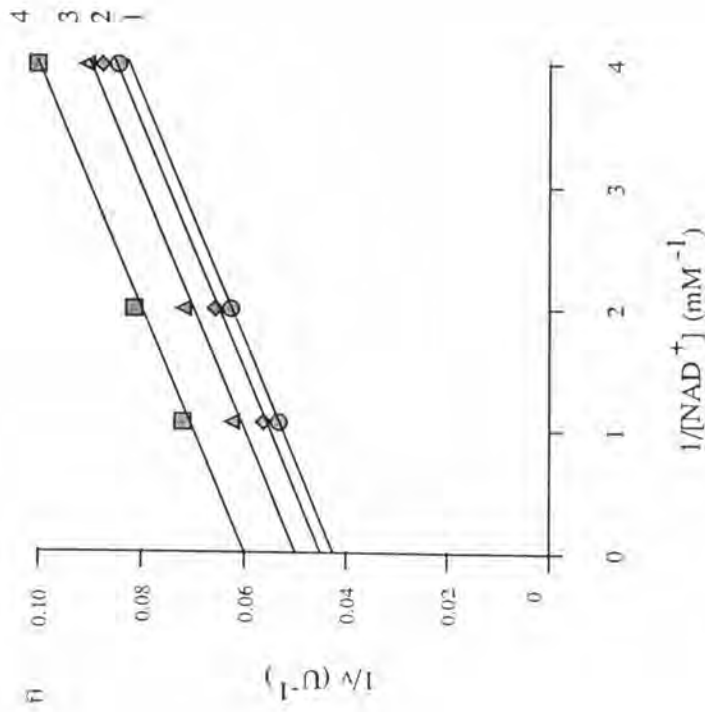
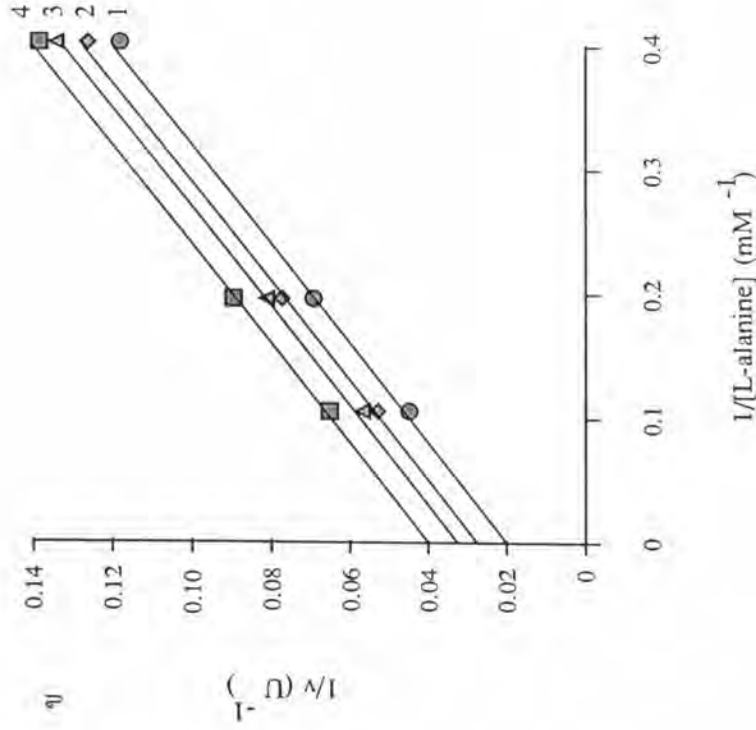
จากการเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N ของแอล-อะลานินดีไฮโดรจีเนสจาก *Aeromonas hydrophila* กับลำดับกรดอะมิโนต่างๆใน GENBANK พบว่ามีความเหมือน (identity) ดังตารางที่ 10



รูปที่ 28 รูปแบบของการยับยั้งโดย NADH ต่อ NAD<sup>+</sup> และแอล-อะลานีน

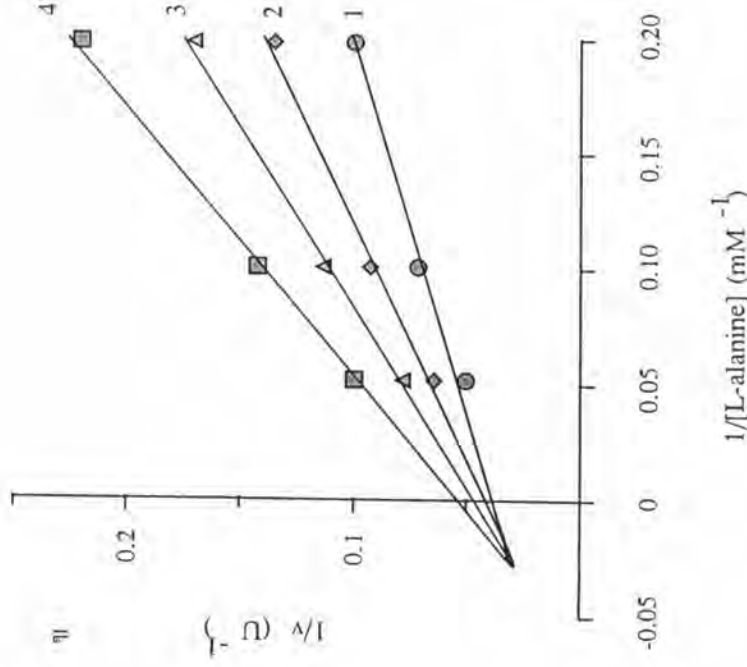
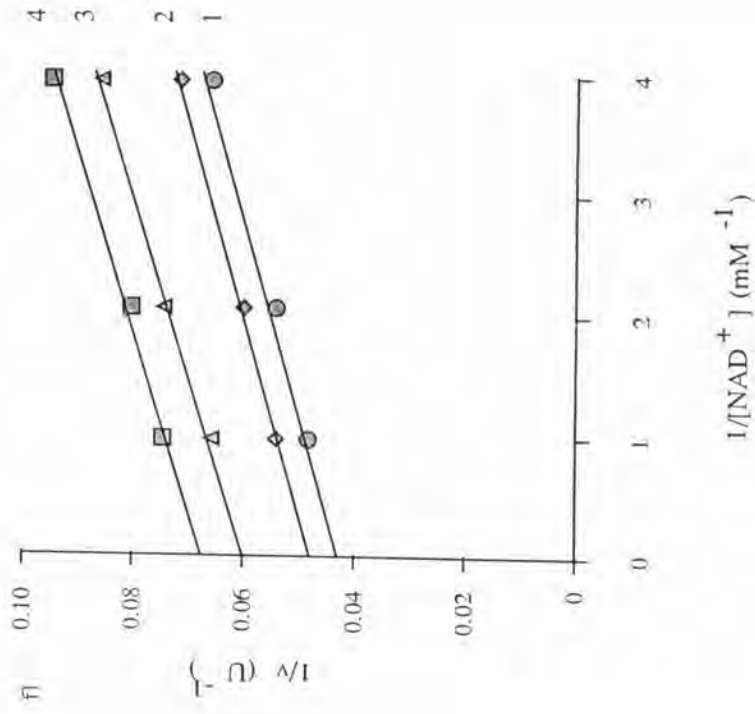
ก. รูปแบบของการยับยั้งโดย NADH ความเข้มข้นต่างกันได้แก่ (1) 0 (2) 0.05 (3) 0.1 และ (4) 0.2 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับต่อ NAD<sup>+</sup> ที่ความเข้มข้นของ แอล-อะลานีนสูงและคงที่เท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์

ข. รูปแบบของการยับยั้งโดย NADH ความเข้มข้นต่างกันได้แก่ (1) 0 (2) 0.05 (3) 0.1 และ (4) 0.2 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับต่อแอล-อะลานีนที่ความเข้มข้นของ NAD<sup>+</sup> สูงและคงที่เท่ากับ 1.25 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 29 รูปแบบของการยับยั้งโดยโพวเวทต่อ NAD<sup>+</sup> และแอล-อะลานีน

- ก. รูปแบบของการยับยั้งโดยโพวเวทความเข้มข้นต่างๆ กัน ได้แก่ (1) 0 (2) 0.5 (3) 1 และ (4) 2 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับต่อ NAD<sup>+</sup> ที่ความเข้มข้นของ แอล-อะลานีนสูงและคงที่เท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์
- ข. รูปแบบของการยับยั้งโดยโพวเวทความเข้มข้นต่างๆ กัน ได้แก่ (1) 0 (2) 0.5 (3) 1 และ (4) 2 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับต่อแอล-อะลานีนที่ความเข้มข้น ของ NAD<sup>+</sup> สูงและคงที่เท่ากับ 1.25 มิลลิโมลาร์



รูปที่ 30 รูปแบบของการยับยั้งโดยแอมโมเนียมคลอไรด์ต่อ  $\text{NAD}^+$  และแอล-อะลานีน

ก. รูปแบบของการยับยั้งโดยแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ กัน ได้แก่ (1) 0 (2) 10 (3) 20 และ (4) 40 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับต่อ  $\text{NAD}^+$  ที่ความเข้มข้นของแอล-อะลานีนสูงและคงที่เท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์

ข. รูปแบบของการยับยั้งโดยแอมโมเนียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ กัน ได้แก่ (1) 0 (2) 10 (3) 20 และ (4) 40 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับต่อแอล-อะลานีนที่ความเข้มข้นของ  $\text{NAD}^+$  สูงและคงที่เท่ากับ 1.25 มิลลิโมลาร์

ตารางที่ 9 รูปแบบการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจีเนสจาก

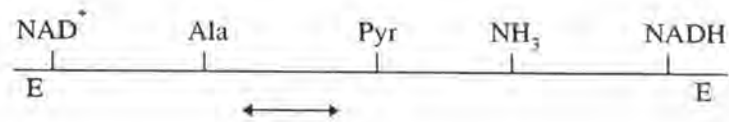
*Aeromonas hydrophila*

สับสเตรท	รูปแบบการยับยั้งโดย		
	NADH	ไพรูเวท	แอมโมเนีย
NAD <sup>+</sup>	competitive	uncompetitive	uncompetitive
แอล-อะลานีน	uncompetitive	uncompetitive	noncompetitive

ตารางที่ 10 การเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N ของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจีเนสจาก *Aeromonas hydrophila* กับเอนไซม์จากสายพันธุ์ต่างๆ ใน GENBANK

แหล่งของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจีเนส	ลำดับกรดอะมิโนของแอล-อะลานีนดีไฮโดรจีเนส	identity (%)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	MIIGVPTEIANHELRVGMS	100
<i>Phormidium lapideum</i>	-E----K--K-Q-F---L-	68
<i>Oscillatoriacean cyanobacterium</i>	-E----K--K-Q-F---L-	68
<i>Myxococcus xanthus</i>	--V---K--KTR-Y----	66
<i>Bacillus subtilis</i>	-----K--K-N-N--ALT	63
<i>Synechocystis sp.</i>	-E----K--KDQ-F---LT	57
<i>Bacillus sphaericus</i>	-K--I-K--K-N-N--A-T	57
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-RV-I---TK-N-F--AIT	47





รูปที่ 31 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของแอส-อะลานีนดีไฮโดรจีเนสจาก *Aeromonas hydrophila*

Met-Ile-Ile-Gly-Val-Pro-Thr-Glu-Ile-Ala-Asn-His-Glu-Leu-Arg-Val-Gly-Met-Ser-Val  
 M - I - I - G - V - P - T - E - I - A - N - H - E - L - R - V - G - M - S - V

รูปที่ 32 ลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N ของแอส-อะลานีนดีไฮโดรจีเนสจาก  
*Aeromonas hydrophila*