หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

โปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีน มีการค้นพบเอนไซม์นี้มากว่าสองร้อยปี (Mihalyi, 1972; Adler-Nissen, 1986) โดยเริ่มจากการสังเกตระบบการย่อยในกระเพาะอาหารสัตว์ ในปีคศ. 1783 Spallanzani ได้นำน้ำย่อยจากกระเพาะอาหารสัตว์ออกมาศึกษาการย่อยอาหารภายนอกสัตว์ทดลองเป็นครั้งแรก ในปี คศ. 1836 Schwann ได้สกัดสารจาก mucous line ของกระเพาะอาหารสัตว์มาศึกษาและให้ชื่อว่า "Pepsin" ซึ่งมาจากคำภาษากรีกคือ Pepsis ซึ่งแปลว่า การย่อย (digestion) pepsin นี้เป็นเอนไซม์ชนิดที่สองในโลกที่ค้นพบหลังจาก "Amylase"โดย Kirchoff ในปี คศ. 1814 (แต่คำว่า"เอนไซม์" Kuhne เป็นผู้ให้คำนิยามและเรียกใช้ในปี คศ. 1878)หลังจากมีการค้นพบเอนไซม์โปรตีเอสจากระบบทางเดินอาหารสัตว์แล้ว ยังพบในเนื้อเยื่ออื่นๆอีก รวมทั้งมีการค้นพบในพืชและจุลชีพจำพวกราและแบคทีเรียต่างๆอีกด้วย (Matsubara & Feder, 1971) โปรตีเอสจากพืชที่พบเป็นชนิดแรกคือ "Papain" ในยางมะละกอ โดย Wurtz & Bouchut ในปี คศ. 1879 โปรตีเอสจาก Bacillus subtilis เป็นโปรตีเอสจากจุลชีพตัวแรกที่ค้นพบ คือ "Subtilisin" โดย Gunthelberg & Ottesen ในปี คศ. 1954

จนถึงปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์โปรตีเอสไว้มากมาย และได้มีการจัดแบ่งชนิดของโปรตีเอสไว้หลายวิธี เช่น แบ่งตามจุดกำเนิดได้เป็นสามชนิดคือ จากสัตว์ , จากพืช และ จากจุลชีพ หรือแบ่งตามลักษณะบริเวณว่องไว (active site) ของเอนไซม์ได้เป็นสี่ชนิด คือ serine , thiol , metal และ acid protease หรือถ้าแบ่งตามลักษณะการตัดพันธะสายโพลีเปปไทด์แบ่งได้สองชนิด คือ exoprotease ตัดที่ปลายสายและ endoprotease ตัดที่ในระหว่างสายโพลีเปปไทด์

จากการที่โปรตีเอสต่างชนิดมีสมบัติแตกต่างกัน ทำให้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมได้หลายประเภท (Ward, 1983) โปรตีเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่

จะได้มาจากจุลชีพ เนื่องจากเป็นแหล่งที่เหมาะสมในการผลิตปริมาณมาก และการสกัดเอนไซม์ทำได้ง่ายเนื่องจากจุลชีพผลิตแล้วส่งออกภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) เอนไซม์โปรตีเอสจากจุลชีพแบ่งเป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ (Keay,1971) คือ

1. Acid protease เร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH ประมาณ 2-5 ส่วนใหญ่ได้จากจุลชีพจำพวกเชื้อราและยีสต์ ไม่ค่อยพบในแบคทีเรีย มีกรดอะมิโนแอสปาเทตอยู่ที่บริเวณเร่ง (Fruton,1970) ไม่ถูกยับยั้งโดยสารพวก Diisopropyl fluorophosphate (DFP), และ Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) แต่ถูกยับยั้งโดยสารพวก diazoketone compounds (Mizube และคณะ, 1973) Mutsubara & Feder (1971) แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ดังนี้

1.1 Rennin-like acid protease ชนิดสำคัญที่นำมาใช้ประโยชน์ทางการค้า คือโปรตีเอสที่ได้จาก Mucor pusillus , Mucor miehei และ Endothia parasitica ส่วนใหญ่ใช้ในอุตสาหกรรมการทำเนยแข็ง

1.1.1 Mucor protease ทั้ง Mucor pusillus และ Mucor miehei เป็นพวก Thermophile M. pusillus เจริญได้ดีที่อุณหภูมิช่วง 20-55 °ซ ส่วน M.miehei เจริญดีที่ 30-60 °ซ โปรตีเอสจาก M.miehei เป็นไกลโคโปรตีน มีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบอยู่ 6% มีน้ำหนักโมเลกุล 38.000 มี pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 4.5 (เมื่อใช้ฮีโมโกลบินเป็นสับสเตรท) โปรตีเอสจาก M.pusillus เป็น simple peptide chain มีกรดอะมิโนซิสเตอีน 2 ตำแหน่ง ไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ น้ำหนักโมเลกุล 30.000 pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 4 (เมื่อใช้ฮีโมโกลบินเป็นสับสเตรท) เอนไซม์มีความเสถียรดีในช่วง pH 3-6 และโปรตีเอสจาก Mucor ทั้งสองชนิดนี้เมื่อปรับสภาวะการทำงานให้เหมาะสมจะสามารถใช้ในการผลิตเนยแข็งที่มีคุณภาพดีเหมือนกับที่ใช้โปรตีเอสจากกระเพาะลูกวัว (calf rennet protease) (Aunstrup,1980)

1.1.2 Endothia parasitica protease ค้นพบในปี คศ. 1963 โดย Sordinas มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 34.000-39.000 เป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 2 และ 2.5 สำหรับสับสเตรทฮีโมโกลบินและเคซีนตามลำดับ

1.2 Pepsin-like Acid protease ใช้ย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองในอุตสาหกรรมการทำซีอิ๊ว(soy sauce) เอนไซม์กลุ่มนี้ที่ใช้มากในอุตสาหกรรมคือโปรตีเอสที่ได้จาก Aspergillus oryzae เอนไซม์นี้มี pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 4-4.5 และเป็น endoprotease

2. Alkaline Protease เร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH 7- 11 พบทั้งในแบคทีเรีย รา และยีสต์ มีสมบัติคล้ายเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินในสัตว์ น้ำหนักโมเลกุลในช่วง 15,000-30,000 มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท โดยเฉพาะใช้มากในอุตสาหกรรมผงซักฟอก อัลคาไลน์โปรตีเอสที่มีผู้สนใจศึกษาและนำมาใช้มากในอุตสาหกรรมคืออัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากแบคทีเรียตระกูลบาซิลลัส และเป็นเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโนเซรีนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ เรียกเอนไซม์นี้ว่า Subtilisin ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชนิด (Keay และคณะ ,1970) ดังนี้

2.1 Subtilisin Carlsberg เป็นเอนไซม์โปรตีเอสจากจุลชีพตัวแรกที่พบโดย Linderstrom Lang & Ottesen ในปี คศ.1947 เริ่มมีการนำมาใช้ทางอุตสาหกรรมครั้งแรกในปี คศ.1960 เมื่อพบว่าเป็นเอนไซม์ที่มีสมบัติเหมาะในการใช้เติมในผงซักฟอก (Detergent) ปัจจุบันมีการนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมผงซักฟอกและอุตสาหกรรมอื่นๆอีกหลายชนิด

Subtilisin Carlsberg นี้ผลิตโดย B.licheniformis มีแอคติวิตีดีที่สุดที่ pH ใกล้ๆ 10 มีความเสถียรในช่วง pH กว้าง คือ pH 5-10 ที่ 25°ซ เอนไซม์นี้ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว มีกรดอะมิโน 274 ตัว ไม่มีกรดอะมิโนซิสเตอีนและพันธะไดซัลไฟด์ ที่บริเวณเร่งมีกรดอะมิโน Ser 221, His 64 และ Asp 32 มีน้ำหนักโมเลกุล 27,000 ถูกยับยั้งโดยสารที่ทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนเซรีน เช่น Diisopropyl fluorophosphate (DFP) และ Phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF) เป็นต้น และเป็นเอนไซม์ที่ไม่ค่อยมีความจำเพาะต่อสับสเตรทชนิดใด (broad specificity) สามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์เกือบทุกชนิด และสามารถย่อยพันธะเอสเทอร์ได้ด้วย นอกจากนี้ยังสามารถพบเอนไซม์ชนิดนี้ใน B.pumilus (Markland & Smith.1971)

2.2 Subtilisin BPN เอนไซม์ชนิดนี้แยกได้จากเอนไซม์ทางการค้าชนิดหนึ่ง คือ Bacterial Protease Nagarase มีการแยกให้บริสุทธิ์และทำให้ตกผลึกเป็นครั้งแรกในปี คศ.1954 โดย Hagihara และในปี คศ.1960 Ottesen & Spector ได้แยกเอนไซม์ชนิดนี้ได้จากเอนไซม์ทางการค้าอีกตัว คือ Bacterial Protease Novo ซึ่งพบว่ามี amino acid sequence เหมือนกับ Subtilisin BPN (Smith และคณะ ,1968) จึงเรียกชื่อเอนไซม์นี้อีกอย่างว่า Subtilisin Novo เอนไซม์นี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 275 ตัว และการเรียงตัวของกรดอะมิโนส่วนใหญ่มีลักษณะเหมือน(homology) กับของ Subtilisin Carlsberg โดยมีแตกต่างกันเพียง 58 ตัว และไม่มีกรดอะมิโนซิสเตอีนเหมือนกัน ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์มี Ser 221 ,His 54 และ Arg 32 และไม่ค่อยจำเพาะกับสับสเตรท เอนไซม์นี้ต้องการแคลเซียมไอออนช่วยทำให้เอนไซม์เสถียรเมื่ออุณหภูมิสูงหรือที่ pH ต่ำหรือสูงมากๆ และCa^{++}มีผลต่อเอนไซม์นี้มากกว่า Subtilisin Carlsberg คุณสมบัติทั่วไปคล้ายกับเอนไซม์ Subtilisin Carlsberg แต่ Subtilisin BPN นี้ไม่ค่อยนิยมนำมาใช้ในทางการค้า

3. Neutral protease เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH เป็นกลาง พบทั่วไปทั้งในแบคทีเรียและรา มีผู้ศึกษาไว้ในแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัสหลายชนิด เช่น จาก Bacillus subtilis, B.cereus, B.megaterium, B.stearothermophilus (Keay,1972) B.thuringiensis (Li & Yousten, 1975), B.pumilus (Tran Chau & Uranek, 1974), B.thermoproteolyticus (Thermolysin) (Keay & Wildi, 1970)และ B.polymyxa (Fogarty & Griffin, 1973) ในแบคทีเรีย B.polymyxa, B.megaterium, B.cereus, และ B.thermoproteolyticus มีการผลิตเฉพาะเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสเท่านั้น แต่ใน B.subtilis พบว่าผลิตทั้งเอนไซม์นิวทรัลและอัลคาไลน์โปรตีเอส นอกจากในแบคทีเรียกลุ่มนี้แล้วยังมีการศึกษาในเชื้อราและแบคทีเรียอีกหลายชนิด เช่ น Streptomyces naraensis (Hiramatsu , 1967) , S. griseus (Nomoto & Narashashi,1959) P.aeruginosa (Morihara & Tsuzuki,

1967) และ Aspergillus oryzae (Nakadai และคณะ,1973)

เอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอส มีลักษณะและสมบัติทางด้านต่างๆ สรุปได้ดังต่อไปนี้

สมบัติทางกายภาพและเคมี (Physical & Chemical Properties)

เอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสมีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 35,000-45,000 จากการศึกษาหาน้ำหนักโมเลกุล โดยเทคนิค Ultracentrifugation ใน B.subtilis NRRLB 3411 , B.subtilis var.amylosaccharitcus และ Thermolysin จาก B.thermoproteolyticus พบว่าเอนไซม์มีขนาด 44,700 , 33,800 และ 37,500 ตามลำดับ (Tsuru และคณะ, 1966 ; Ohta และคณะ , 1966) D.Tsuru และคณะ (1965) รายงานว่าเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสเกิดการ autolysis ได้ง่าย โดยพบว่าค่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก B. subtilis ซึ่งหาด้วยวิธี Sedimentation equilibrium ขึ้นกับระยะเวลาหลังจาก full speed ของ sedimentation run ถ้าเขียนกราฟระหว่างเวลากับค่าน้ำหนักโมเลกุลจะได้ค่าความชันเป็นลบและจะยิ่งเป็นลบมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจจะเกิดจากการ autolysis ของเอนไซม์ ดังนั้นการหาน้ำหนักโมเลกุลที่แท้จริงของ native intact enzyme ควรใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ำที่สุด

นิวทรัลโปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่มีลักษณะเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวไม่มี พันธะไดซัลไฟด์ เอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก B.subtilis NRRLB3411 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 325 ตัว (Keay & Wildi,1970) มีไกลซีนและลิวซีนอยู่ที่ปลายสายโพลีเปปไทด์ด้านปลาย N และปลาย C ตามลำดับ เอนไซม์จากสายพันธุ์อื่นมีกรดอะมิโนที่ปลาย N ต่างออกไปเช่น เอนไซม์จาก B.subtilis var.amylosaccharitcus เป็นอะลานีน (D.Tsuru และคณะ,1966) และเอนไซม์จาก B.thermoproteolyticus เป็นไลโซลิวซีน-ทรีโอนีน-ไกลซีน-ทรีโอนีน และพบว่าส่วนประกอบของกรดอะมิโนในสายโพลีเปปไทด์จาก B.subtilis NRRLB3411 คล้ายกับของ B.subtilis var.amylosa

chariticus แต่ต่างจากของ B.thermoproteolyticus (ตารางที่ 1) (Keay & Wildi, 1970)

เอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสเป็น metallo-endoprotease คือ มีไอออนโลหะเป็นส่วนประกอบในโมเลกุล และมีความสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ไอออนส่วนใหญ่ที่พบ คือ Zn^{++} มีการศึกษาลักษณะของ Zn^{++} ในโมเลกุลของ Thermolysin ซึ่งเป็นโมเลกุลพับ (folded) ทำให้เกิดเป็น 2 lobes แยกจากกันโดยร่องลึก (deep cleft) (Matthew ,1977) ซึ่งเป็นส่วนที่มีอะตอมของสังกะสีอยู่ (รูปที่ 1) โครงสร้างของเอนไซม์ Thermolysin ที่บริเวณจับกับสับสเตรท (binding site) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 6 ตัว ใกล้กับอะตอมของสังกะสี (Morihara & Oka,1968) และพบว่าเมื่อเอา Zn^{++} ออกจากโมเลกุลของเอนไซม์ทำให้มีการเปลี่ยนโครงรูป (conformation) ของโมเลกุลเพียงเล็กน้อย ดังนั้น Zn^{++} จึงไม่น่ามีความสำคัญต่อความเสถียร (stability) ของเอนไซม์ (Weaver และคณะ, 1976) การศึกษาถึงความสำคัญของ Zn^{++} ในนิวทรัลโปรตีเอสต่อปฏิกิริยาการเร่งของเอนไซม์ โดยใช้สารคีเลตตั้ง เช่น EDTA ดึง Zn^{++} ออกจากโมเลกุลเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตี (inactivated) และเมื่อเติม Zn^{++} เข้าไปใหม่ทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีกลับคืน (reactivated) ประมาณ 40-80 % แม้จะเติม Zn^{++} จนถึงปริมาณที่มากเกินพอ (D.Tsuru และคณะ,1964) ปริมาณ Zn^{++} ในโมเลกุลของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก B.subtilis NRRLB 3411, B.thermoproteolyticus, B.subtilis var. amylosaccharitícus มี 1.4, 1.5 และ 1.5 ไมโครกรัม/มิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ คือมี 1 หรือ 2 อะตอมสังกะสี/โมเลกุลเอนไซม์ (Keay & Wildi,1970) นอกจากนี้ในโมเลกุลของนิวทรัลโปรตีเอสยังมีไอออนของแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ เช่น ในโมเลกุลของนิวทรัลโปรตีเอสจาก B. amyloliquefaciens และ B. thermoproteolyticus ประกอบด้วยแคลเซียม 2 และ 4 อะตอม/โมเลกุลเอนไซม์ ตามลำดับ (Ward,1983)

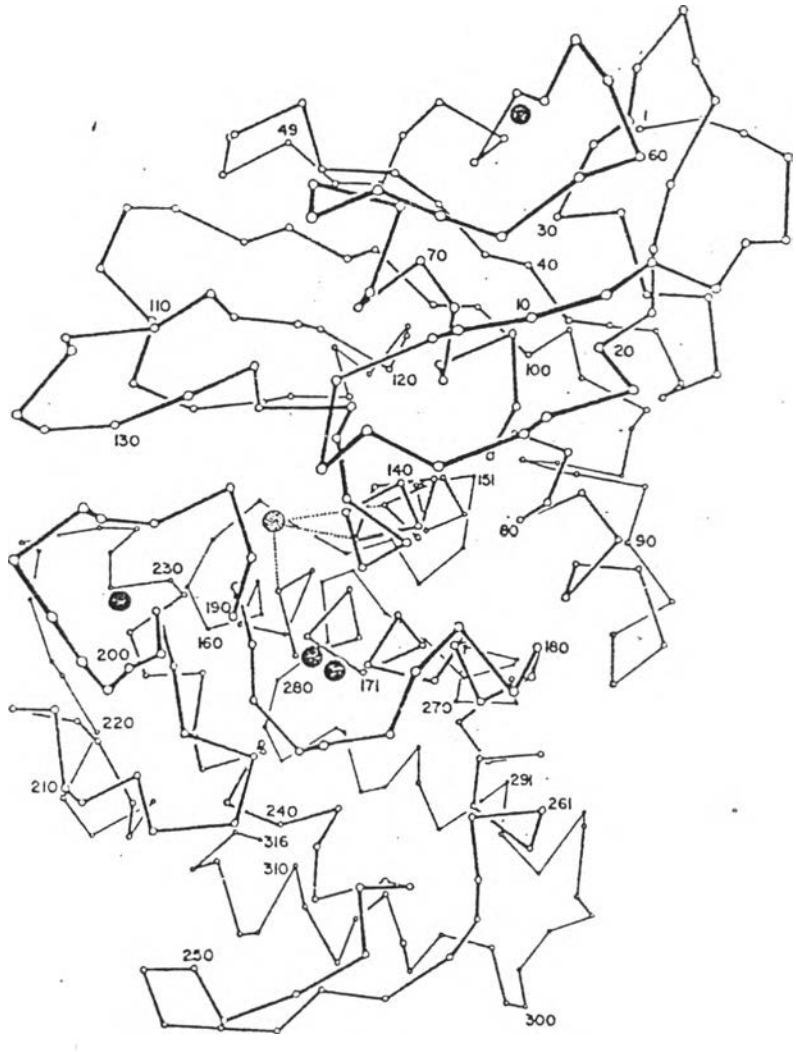
ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบของกรดอะมิโนในสายโพลีเปปไทด์ของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสชนิดต่างๆ (Kaey & Wildi, 1970)

	B.subtilis NRRL B3411		B.subtilis var. amylosacchariticus	Thermolysin
	Found	Calculated from data of McConn[b]	Found	Calculated from data of Ohta[c]
Lys	17	16	17	12
His	5	5	5	9
Arg	8	8	9	10
Asp	48	48	49	44
Thr[a]	29	29	31	24
Ser[a]	31	32	32	24
Glu	27	26	26	21
Pro	9	11	12	8
Gly	30	29	30	37
Ala	28	27	28	29
Cys	0	0	0	0
Val	19	19	17	25
Met	4	4	2	2
Ile	13	14	13	19
Leu	21	20	23	17
Tyr	22	23	24	30
Phe	11	11	10	10
Try	3	3	3	5

[a] Serine and Threonine values are extrapolated to zero hydrolysis time, other values are mean of 24, 48 and 72 hr. values

[b] McConn และคณะ, 1964

[c] Ohta และคณะ, 1966



รูปที่ 1 แสดงลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์ Thermolysin
(Matthew, 1977)

วงกลมสีเทา แสดงอะตอมของสังกะสี 1 อะตอมที่บริเวณเร่งของเอนไซม์

วงกลมสีดำ แสดงอะตอมของแคลเซียม 4 อะตอมในโมเลกุลของเอนไซม์

เอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่มีความเสถียรน้อยมากเมื่อเทียบกับโปรตีเอสชนิดอื่นๆ ถ้าอินคิวเบตนิวทรัลโปรตีเอสจาก B.subtilis ที่ pH 7 25°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจะยังคงมีแอคติวิตีเหลือ 80% แต่จะสูญเสียแอคติวิตีไปถึง 90% เมื่ออินคิวเบตที่ 60°ซ 15 นาที เอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสที่มีความเสถียร ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีที่สุดคือ Thermolysin จาก B.thermoproteolyticus โดยพบว่าเอนไซม์ยังคงมีแอคติวิตีอยู่ 50% หลังการอินคิวเบตที่อุณหภูมิ 80°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Endo, 1965; Ohta, 1966) ซึ่งการที่เอนไซม์สามารถทนร้อนได้ดีกว่านิวทรัลโปรตีเอสชนิดอื่นอาจเนื่องจาก Thermolysin มีเปอร์เซนต์ของกรดอะมิโนชนิดที่เป็นไฮโดรโฟบิคมากกว่าและมีแคลเซียม/โมเลกุลเอนไซม์มากกว่า (Aunstrup,1980) มีรายงานยืนยันว่าCa^{++} ช่วยเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ นอกจากทำให้เอนไซม์ทนร้อนได้ดีขึ้น ที่ความเข้มข้นของ Ca^{++}มากกว่า $2x10^{-3}$โมลาร์ จะช่วยลดการเกิด autolysis ของเอนไซม์ได้ (McConn,1964) นอกจากนี้ Ca^{++}ยังสามารถทำให้เอนไซม์ที่ถูก inactivated ด้วย EDTA มีแอคติวิตีกลับคืนได้มากขึ้น เมื่อ reactivate ด้วย Zn^{++}(Tsuru และคณะ,1966)

สมบัติทางด้านเอนไซม์ (Enzymic Properties)

นิวทรัลโปรตีเอสเป็น metalloenzyme จึงถูกยับยั้งโดยสารพวกคีเลตติ้ง เช่น EDTA, O-Phenanthroline, Dithizone แต่ไม่ถูกยับยั้งโดย DFP,Sulfhydryl reagent, Soybean trypsin inhibitor หรือ potato protease inhibitor Yasunobu และคณะ (1964) พบว่าเอนไซม์ที่ถูกยับยั้งโดยสารคีเลตติ้ง จะมีแอคติวิตีกลับคืนประมาณ 38-82% เมื่อเติม Zn^{++},Co^{++} และ Mn^{++}ในช่วงความเข้มข้น $1x10^{-4}$ โมลาร์ โดยที่แอคติวิตีจะกลับคืนมากหรือน้อยขึ้นกับหลายปัจจัย เช่นความเข้มข้นของสารคีเลตติ้ง ช่วงเวลาของการ treat ด้วยสารยับยั้งแอคติวิตี และชนิดของไดวาเลนท์ เมทัลไอออนที่ใช้ในการ reactevate เป็นต้น (Tsuru และคณะ,1966)

ในแง่ความจำเพาะของปฏิกิริยาการไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์โดยเอนไซม์ พบว่านิวทรัลโปรตีเอสมีความจำเพาะต่อปลายด้าน N ของสับสเตรทที่เป็นกรดอะมิโนชนิดไฮโดรโฟบิคหรือ bulky amino acid เช่นกรดอะมิโนลิวซีน หรือกรดอะมิโนฟีนิลอลานีน

แต่จากการศึกษาของ Matsubara และคณะ (1969) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ Thermolysin ไม่สามารถย่อยพันธะเปปไทด์ที่ด้าน คาร์บอนิล ของกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิค ที่ติดกับด้าน N ของกรดอะมิโนโปรลีน ผลการทดลองนี้มีการยืนยันในนิวทรัลโปรตีเอส จาก B.subtilis ในอีกรายงานหนึ่ง (Benson & Yasunobu,1968) ซึ่งแสดงว่าความจำเพาะของเอนไซม์ต่อกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิคชิ้นกับกรดอะมิโนตัวถัดไปด้วย จากรายงานการศึกษาการตัดพันธะเปปไทด์ในสายอินซูลิน (insulin chain) โดยนิวทรัลโปรตีเอสจาก B.sutilis (Feder & Lewis , 1967; Morihara และคณะ , 1968 ; Tsuru และคณะ, 1967),B.thermoproteolyticus (Matsubara และคณะ, 1966; Morihara &Tsuzuki,1966),B. megaterium,(Millet&Acher,1969)และA.oryzae(Morihara และคณะ.1968) พบว่ามีจุดที่ถูกตัดในสายอินซูลินเหมือนกัน คือ ที่ตำแหน่งระหว่าง His 5-Leu 6, His 10-Leu 11. Ala 14-Leu 15, Try 16-Leu17,Gly 23-Phe 24 และ Phe 24-Phe 25 ซึ่งจากการทดลองนี้จะเห็นว่าตำแหน่งที่ถูกตัดบนสายอินซูลิน คือ ปลายด้าน N ของกรดอะมิโนลิวซีนและฟีนิลอลานีนนั่นเอง และจากการศึกษาความจำเพาะกับสับสเตรทซินธิติกที่มีพันธะเอสเทอร์ พบว่าเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสไม่สามารถย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ได้ (Boyer,1971)

ประโยชน์ของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอส

มีการนำเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอส มาใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมหลายประเภท (Ward,1985) เช่น ใช้ย่อยโปรตีนในอุตสาหกรรมเบียร์,ปอกหนัง,ซีอิ๊ว,น้ำปลา, การผลิต Yeast extract และใช้ในอุตสาหกรรมทำเนยแข็งและขนมปังต่างๆ พบว่านิวทรัลโปรตีเอสจาก B.subtilis ช่วยปรับคุณภาพของแป้งทำขนมปังประเภท crackerและbiscuit. ทำให้สามารถแผ่เป็นแผ่นบางได้โดยไม่ฉีกขาดและลดฟองอากาศที่เกิดระหว่างการอบ (Barrett.,1975) และเมื่อใช้นิวทรัลโปรตีเอสร่วมกับเอนไซม์ไลเปส(Lipase)ในการทำเนยแข็งพบว่าช่วยเพิ่มรสชาติของเนยแข็งและไม่ทำให้เกิดรสขม (Godfrey,1983)

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

จากการศึกษาเบื้องต้น (พงษ์สวัสดิ์ & สิริจินดากานต์, 1987) พบว่า B. subtilis TISTR 25 ที่แยกได้จากดินในประเทศไทยสามารถผลิตโปรตีเอสในระดับสูงกว่าสายพันธุ์มาตรฐาน B. licheniformis ATCC 21415 (เป็นสายพันธุ์หนึ่งที่ใช้ในการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสระดับอุตสาหกรรม) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับค่าที่เติมด้วย 0.1% กลูคาเมท pH 6 ที่อุณหภูมิ 30°ซ และพบว่าในสภาวะนี้แบคทีเรียสายพันธุ์ทั้งสองนี้จะผลิตนิวทรัลต่ออัลคาไลน์โปรตีเอส ในอัตราส่วน 1:3 โครงการวิจัยต่อมา (จิโรจน์กุลกิจ, 1989) ได้แยกและทำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากสายพันธุ์นี้ให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส สำหรับโครงงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอส ดังนี้

1. ศึกษาวิธีการแยกเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสให้บริสุทธิ์

2. ศึกษาสมบัติทางกายภาพ เคมี และจลนศาสตร์ ของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสที่แยกได้

3. ศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสที่แยกได้ ในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์

4. ศึกษาชนิดและความสำคัญของไอออนโลหะ ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

5. เปรียบเทียบเอนไซม์ที่แยกได้ กับเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสที่ใช้ทางการค้าซึ่งได้รับการศึกษาไว้แล้ว