บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันการศึกษาเอนไซม์เพื่อการใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมมีแนวโน้มสูงมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งด้านอาหารและการบริโภค เอนไซม์ทำหน้าที่ย่อยสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น แป้ง โปรตีน ฯลฯ ให้เป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง การย่อยของเอนไซม์ต่างจากการย่อยโดยสารเคมีจำพวกกรดหรือเบส โดยเป็นการย่อยที่บริเวณจำเพาะกับชนิดของเอนไซม์และสับสเตรทไม่ได้เป็นการย่อยทั้งหมด ทั้งการยุติปฏิกิริยาก็สามารถทำได้สะดวก เพียงให้ความร้อนหรือสารบางอย่างเพื่อทำลายสภาพธรรมชาติของเอนไซม์เท่านั้น และที่สำคัญเอนไซม์ส่วนใหญ่ก็มิได้มีความเป็นพิษ หรืออันตรายต่อผู้ผลิตและผู้บริโภค

โปรตีเอส (Protease, E.C.3.4.1) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทมากในอุตสาหกรรมหลายประเภท โดยจะทำหน้าที่ต่าง ๆ กันไปในแต่ละประเภทของอุตสาหกรรม ตัวอย่างเช่นใช้ย่อยสลายโปรตีนในอุตสาหกรรมฟอกหนัง การทำขนมปัง และอาหารเด็กอ่อน ใช้ป้องกันการออกซิเดชันของแป้งและตกตะกอนโปรตีนคาเซอีนจากน้ำนมในการทำเนยแข็งจากนมวัว นอกจากนี้ยังนิยมใช้ในอุตสาหกรรมผลิตสารซักฟอก ยา เส้นใยทอผ้า กระดาษ การผลิตน้ำยางพาราที่มีคุณภาพดี การผลิตธัญญพืช เบียร์และสารปรุงแต่งรส เป็นต้น ในสารซักฟอกมักใส่โปรตีเอสลงไปเพื่อช่วยกำจัดสิ่งสกปรกที่อยู่ในรูปโปรตีน ดังนั้นจึงเป็นที่ต้องการในอุตสาหกรรมนี้ โปรตีเอสมีชื่อสามัญหลายชื่อ ได้แก่ เปปติเดส โปรตีเอส โปรตีเนส เปปไทด์ไฮโดรเลสและ เอนไซม์โปรตีโอไลติก (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535)

ประโยชน์ของโปรตีเอสในอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ แตกต่างกันออกไปตามชนิดของอุตสาหกรรม ตารางที่ 1 แสดงการใช้ประโยชน์ของโปรตีเอส

ชนิดของอุตสาหกรรม	ตัวอย่างการนำไปใช้
การซักล้าง/ทำความสะอาด	สารเติมแต่งในการผลิตสารซักฟอก
การฟอกหนัง	การทำให้ขนน้อยลง
การย่อยสลาย	ใช้ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท (protein hydrolysate) จากถั่วเหลือง เนื้อและปลาซึ่งใช้เป็นอาหารสำหรับผู้ป่วย
	การทำให้เนื้อนุ่ม

การสังเคราะห์สารอินทรีย์	ใช้สังเคราะห์ Aspartame
การผลิตเครื่องดื่ม	การทำให้ไวน์และเบียร์มีความใสเมื่อเย็น
การทำโรงสี	ใช้สังเคราะห์ gluten
ด้านเภสัชกรรม	ยาช่วยย่อยอาหาร การบำบัดรักษาแผลไฟไหม้แผลเป็นหนอง
การถ่ายรูป	การเตรียมสารเงิน (Ag) จากอิมัลชันของการล้างฟิล์ม
การผลิตผลิตภัณฑ์นม	ใช้เพื่อทำความสะอาดระบบกรองในกระบวนการผลิตนม

โดยปกติโปรตีเอสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์ของโปรตีน (สลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนในภาวะที่มีน้ำอยู่ในสารละลายที่ทำปฏิกิริยา) ทำให้โพลิเปปไทด์สายยาวสั้นลงได้ การสลายพันธะเปปไทด์นี้บางกรณีเป็นการกระตุ้นให้เอนไซม์ ฮอร์โมนและสารพิษบางชนิด เปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่พร้อมจะทำงานได้ นอกจากนี้โปรตีเอสยังสามารถสร้างพันธะเปปไทด์ได้ในภาวะที่มีน้ำปริมาณน้อยในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น การสังเคราะห์ acetylphenylalanine (Ac-Phe-Ala-NH_2) จาก alanine (Ala-NH_2) และ acetylphenyl methyl ester (Ac-Phe-me) โดยการเร่งปฏิกิริยาด้วยโปรตีเอสชนิดหนึ่งคือ chymotrypsin ในตัวทำละลายอินทรีย์ dimethyl formamide (DMF) ดังนี้ (Jukubke และ Konnocke, 1987)

$$Ala\text{-}NH_2 + Ac\text{-}Phe\text{-}me \xrightarrow[\text{chymotrypsin}]{\text{DMF}} Ac\text{-}Phe\text{-}Ala\text{-}NH_2$$

ในอดีตมนุษย์ทราบเพียงว่าสามารถเตรียมโปรตีเอสขึ้นมาได้จากแหล่งที่เป็นพืชและสัตว์ เช่นในสับปะรดมีเอนไซม์โบรมีเลน ยางมะละกอมีเอนไซม์ปาเปน กระเพาะลูกวัวมีเอนไซม์เรนนิน ซึ่งจะเตรียมได้ในปริมาณน้อย กระบวนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ค่อนข้างยุ่งยากและจำเป็นต้องใช้แรงงานจำนวนมาก ต่อมาหลังจากมีความพยายามค้นหาแหล่งผลิตเอนไซม์ทดแทนพืชและสัตว์ จึงพบว่าจุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ โดยเฉพาะการผลิตด้วยกระบวนการหมัก (Fermentation) เนื่องจากการเพาะเลี้ยงและการควบคุมทำได้ง่ายใช้เวลาน้อยและสะดวกกว่า อีกทั้งให้ผลผลิตสูงและสม่ำเสมอ เชื้อราและแบคทีเรียบางชนิดสามารถสังเคราะห์โปรตีเอสเช่นกัน

โปรตีเอสเป็นหนึ่งในเอนไซม์ที่แบคทีเรียแกรมบวกชนิดสร้างสปอร์สายพันธุ์บาซิลลัส ผลิตออกมานอกเซลล์เมื่ออยู่ในช่วงปลายของการเจริญ (Priest, 1977) มีการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมมาเป็นเวลายาวนาน (He และคณะ, 1991) Sloma และคณะได้ทำการโคลนยีนและศึกษาแผนที่ของยีนที่ผลิตโปรตีเอสได้ 5 ชนิดแตกต่างกัน (Sloma และคณะ, 1990)- คือ แอลคาไลน์ (subtilisin) และนิวทรัลโปรตีเอสที่ควบคุมโดยยีน *apr* และ *npr* ตามลำดับ ทั้ง 2 เป็นเอนไซม์หลักมากกว่า 90 % ของแอคติวิตีของเอนไซม์ทั้งหมด ส่วนอีก 3 เอนไซม์รอง คือ bacillopeptidase F และ Epr protein ซึ่งผลิตโดยยีน *bpr* และ *epr* ตามลำดับ ซึ่งทั้งคู่เป็น serine protease ในขณะที่ Mpr protein ซึ่งเป็น minor metalloprotease นั้น ผลิตโดยยีน *mpr* (Sloma และคณะ, 1991) โปรตีเอสจะเริ่มถูกปล่อยออกมาสู่น้ำเลี้ยงเชื้อในระหว่างที่เซลล์เริ่มมีการสร้างสปอร์ (Dancer และ Mandelstam, 1975) พบว่า PMSF ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของแอลคาไลน์โปรตีเอสมีผลยับยั้งการสร้างสปอร์ของบาซิลลัสด้วย (Fahmey และ Gold, 1963, Goldberg, 1971)

ในสมัยแรก ๆ การแยกกลุ่มของโปรตีเอสแยกตามขนาดโมเลกุล ประจุ หรือความจำเพาะต่อสับสเตรท ต่อมาจึงมีการจัดจำแนกที่เป็นระบบยิ่งขึ้นโดยอาศัยการเปรียบเทียบบริเวณแร่ง กลไกการเร่งปฏิกิริยาและโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีกลุ่มของกรดอะมิโนที่บริเวณแร่งต่างกัน ทำให้เกิดโครงรูปที่จำเพาะของบริเวณเร่งนั้น ๆ ซึ่งเป็นผลให้โปรตีเอสมีความจำเพาะต่อการเร่งปฏิกิริยาได้แตกต่างกัน การจำแนกโปรตีเอสที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ได้ 4 กลุ่มใหญ่ตามกลไกการเกิดปฏิกิริยา และความแตกต่างของสภาวะในการเร่งปฏิกิริยา (Hartley, 1960) ได้แก่ กลุ่มที่ 1 แอลคาไลน์โปรตีเอส (alkaline protease) หรืออีกชื่อคือเซรีนโปรตีเอส (serine protease) กลุ่มที่ 2 เมทัลโลโปรตีเอส (metalloprotease) หรือนิวทรัลโปรตีเอส (neutral protease) กลุ่มที่ 3 แอซิด โปรตีเอส (acid protease) และ กลุ่มที่ 4 ไธออลโปรตีเอส (thiol protease) นอกจากนี้ยังอาจมีการแบ่งเป็นกลุ่มย่อย ๆ อีกตามสมบัติของบริเวณแร่ง (active center) ของเอนไซม์ (Morihara, 1974) แอลคาไลน์โปรตีเอส (E.C.3.4.21.14) จะมีเซรีนแรสซิดิวส์อยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ สามารถยับยั้งการทำงานด้วยการเติมสาร di-isopropyl fluorophosphate (DFP) และ phenylmethane sulfonylfluoride (PMSF) แต่จะทนต่อภาวะที่มี EDTA (Priest, 1977) ในปีค.ศ. 1988 Sloma และคณะ พบว่า PMSF เข้มข้นเพียง 1 mM สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีเอสชนิดนี้ได้ แคลเซียมอิออนช่วยให้เอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้น โปรตีเอสชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25,000-30,000 ดาลตัน

มีช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาที่ค่อนข้างกว้างคืออยู่ระหว่าง 7.0-11.0 ทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 10.0-11.0 แต่ยังสามารถทำงานได้แม้ว่า pH จะต่ำลงถึง 6.0 โปรตีเอสชนิดนี้มีความเสถียรสูงสุดในช่วง pH 5.0-9.0 พบได้ทั่วไปทั้งในเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราเป็นโปรตีเอสที่มีคุณสมบัติคล้ายกับทริปซินและไคโมทริปซินในสัตว์ มักจะพบแอลคาไลน์โปรตีเอสในเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์บาซิลลัสเป็นส่วนใหญ่ บาซิลลัสหลายสายพันธุ์ได้แก่ *Bacillus subtills, Bacillus lichenlformis* และ alkalophilic Bacillus สามารถจะสังเคราะห์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่เรียกว่า ซับทิลิซิน (subtilisin) ได้ปริมาณสูงกว่าเชื้อรา ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์แล้วจะถูกปล่อยออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อ นอกจากนั้นยังพบว่ามีการสังเคราะห์แอลคาไลน์โปรตีเอสพร้อม ๆ กับนิวทรัลโปรตีเอส หรือโดยสังเคราะห์นิวทรัลโปรตีเอสก่อนแล้วจึงสังเคราะห์แอลคาไลน์โปรตีเอสภายหลัง แอลคาไลน์โปรตีเอสเป็นที่รู้จักกันเป็นอย่างดีและนิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสารซักฟอก การฟอกหนัง และอุตสาหกรรมอาหาร มีความสำคัญในทางเศรษฐกิจมากที่สุด ส่วนลำดับรองลงมา คือเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มเมทัลโลโปรตีเอสหรือนิวทรัลโปรตีเอส (E.C.3.4.24) เป็นเอนไซม์ที่มีอะตอมของโลหะสังกะสี (Zinc) อยู่ภายในโครงสร้าง สามารถถูกยับยั้งการทำงานโดยการเติมสารจำพวก chelating agent เช่น ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) (Ward, 1983) ในปีค.ศ. 1988 Sloma และคณะ พบว่า EDTA เข้มข้นเพียง 10 mM สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีเอสชนิดนี้ได้ น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีเอสชนิดนี้เป็น 35,000-45,000 ดาลตัน มีความสามารถสูงสุดในการไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์ของโปรตีนที่ pH ประมาณ 7.0 แต่จะเสถียรในช่วง pH 5.0-10.0 และจะเสถียรมากขึ้นเมื่อมีแคลเซียมอิออน เนื่องจากมีความเสถียรน้อยกว่าแอลคาไลน์โปรตีเอสจึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ค่อนข้างจำกัด แต่ก็พบว่ามีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น อุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ การทำขนมอบ การฟอกหนังและอุตสาหกรรมอาหาร พบมากในทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย เช่น ราแอสเปอร์จิลลัส แบคทีเรียบาซิลลัสและสเตรปโตมัยซิส ซึ่งนิยมนำมาใช้ผลิตในระดับอุตสาหกรรม ตัวอย่างที่สำคัญเช่น เทอร์โมทริปซิน (thermotrypsin) กลุ่มต่อมาคือ **แอซิดโปรตีเอส** (E.C.3.4.23) จะทำปฏิกิริยาจำเพาะกับกรดอะมิโนที่มี side chain เป็นวงอะโรมาติก (aromatic amino acid) เช่น ไทโรซีน ทริปโตเฟน เฟนิลอะลานีน เป็นต้น ถูกยับยั้งการทำงานด้วยสารจำพวก diazoketone (Mizobe, 1973) แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วยสารจำพวก EDTA และ DFP สามารถสังเคราะห์ได้จากเชื้อรา ยีสต์และแบคทีเรียบางชนิด ได้แก่ รา *Aspergillus spp., Penicillium spp., Rhizopus spp., Mucor spp.* และ *Edothia spp.* เอนไซม์ทำงานได้ดีที่ช่วง pH 3.0-4.0 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000-40,000 ดาลตัน มีค่า isoelectric point ต่ำ และโครงสร้างคล้ายกับเอนไซม์เปปซิน เรนนินในสัตว์

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แบ่งออกเป็น 2 พวก โดยสมบัติทางกายภาพ คือ pepsin-like acid protease และ rennin-like acid protease เอนไซม์ในกลุ่มนี้นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเช่น การหมักถั่วเหลือง ข้าว และธัญพืช เพื่อเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการผลิตซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว รวมไปถึงอุตสาหกรรมขนมอบ และเนยแข็ง กลุ่มสุดท้ายคือ ไธออลโปรตีเอส (E.C.3.4.22) ซึ่งสามารถทำงานได้ดีในช่วง pH ที่เป็นกลาง ถูกยับยั้งการทำงานด้วยสารจำพวก sulfydryl reagent เช่น p-chloromercuribenzoate สารพวก DFP มีผลต่อการทำงานเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จะเร่งปฏิกิริยาได้ดีเมื่อมีสารรีดิวซ์บางตัว ได้แก่ HCN หรือกรดอะมิโนซิสเทอีน ร่วมอยู่ด้วย มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000-50,000 ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์เอนไซม์นี้ได้แก่ แบคทีเรีย *Clostridium spp.* และ *Streptococcus spp.*

จากการที่นำโปรตีเอสไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในอุตสาหกรรมด้านต่าง ๆ มากมายนั้น ทำให้มีความต้องการใช้เอนไซม์มากขึ้นเรื่อยๆ ปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้าของเอนไซม์หลายชนิด เพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมฟอกหนัง อาหารและเครื่องดื่ม เบียร์ ยา และอุตสาหกรรมผลิตสารซักฟอก เป็นต้น ซึ่งสามารถรวบรวมได้ดังแสดงในตารางข้างล่างนี้

ตารางที่ 2 แสดงมูลค่าการนำเข้าเอนไซม์ทุกชนิดของประเทศไทยตั้งแต่ปี คศ.1991-1995

ปีคศ.	มูลค่าการนำเข้า	
	ปริมาณ(ล้านตัน)	มูลค่า(ล้านบาท)
1991	1.27	136
1992	1.28	204
1993	1.60	250
1994	2.18	275
1995*	1.63	251

แหล่งที่มา : กรมศุลกากร ประเทศไทย

ปี 1995* : เก็บข้อมูลตั้งแต่ เดือนมกราคม-สิงหาคม

ปัจจุบันจะเห็นได้ว่าปริมาณการนำเข้าเอนไซม์ของประเทศไทยมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ทุกปี แสดงให้เห็นว่าความต้องการในการใช้เพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ ดังนั้นประเทศไทยจึงมีการสูญเสียเงินออกนอกประเทศเป็นจำนวนมากในแต่ละปีจากการนำเข้าเอนไซม์ เพื่อเป็นการลดต้นทุนการ

นำเข้าและสนองต่อความต้องการใช้เอนไซม์ที่มีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาถึงการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต เพื่อให้ได้เอนไซม์ปริมาณสูงขึ้นเพียงพอต่อความต้องการ โดยใช้กระบวนการหมักในอุตสาหกรรม (Industrial Fermentation Process) ซึ่งเป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารอินทรีย์เนื่องจากการทำงานของจุลินทรีย์โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ มีคุณค่าทางเศรษฐกิจในปริมาณมาก วิธีการนี้มีปัญหาและค่าใช้จ่ายน้อยกว่าที่จะผลิตจากพืชหรือสัตว์ เป็นการเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้นและสามารถผลิตได้ครั้งละมาก ๆ ในเวลาอันสั้น อีกทั้งได้ผลผลิตที่สม่ำเสมอแน่นอน วิธีการหนึ่งซึ่งนิยมทำกันและมีศักยภาพสูงในปัจจุบันคือ การใช้ความรู้ด้านพันธุวิศวกรรมหรือรีคอมบิแนนท์เทคโนโลยีเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ให้มีความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์นี้มากขึ้น

Bacillus subtilis TISTR25 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากดินในประเทศไทย สามารถสังเคราะห์ได้ทั้งแอลคาไลน์และนิวทรัลโปรตีเอส (ปกรณ์ วิโรจน์กุลกิจ, 2532) จึงเริ่มมีการศึกษาสมบัติและการทำให้บริสุทธิ์รวมถึงสมบัติในด้านกายภาพ เคมี จลนศาสตร์ ความจำเพาะในการไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์ของแอลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR25 นี้ เปรียบเทียบกับเชื้อมาตรฐานจากต่างประเทศ พบว่ามีสมบัติคล้ายคลึงกัน (ปกรณ์ วิโรจน์กุลกิจ, 2532) ลักษณะเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว น้ำหนักโมเลกุล 27,000 ดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 350 ตัว ยีนที่ใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์นี้มีขนาดประมาณ 1 กิโลเบส อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา คือ 55 °ซ และ 8.5 ตามลำดับ มีความจำเพาะในการไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์ที่ปลายคาร์บอกซิลของกรดอะมิโนอาร์จินีน อะลานีน ลูซีน เฟนิลอะลานีน และ เวลีน การศึกษาสมบัติและการทำให้บริสุทธิ์ของนิวทรัลโปรตีเอสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR25 พบว่าเอนไซม์นี้มีลักษณะเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวเช่นกัน มีน้ำหนักโมเลกุล 37,000 ดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโน 480 ตัว ยีนที่ใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์นี้มีขนาดประมาณ 1.4 กิโลเบส มีอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา คือ 50 °ซ และ 7.0 ตามลำดับ (อุดมลักษณ์ อิติรักษ์พาณิชย์, 2534) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์นี้ให้ได้ปริมาณมาก ๆ เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการใช้ในระดับอุตสาหกรรม จึงเริ่มมีการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อดังกล่าว (เกษม พงษ์มณี, 2536) โดยศึกษาการผลิตในถังหมักขนาดต่าง ๆ และในที่สุดมีการนำความรู้ทางพันธุวิศวกรรมมาใช้เพื่อการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ให้มีความสามารถผลิตโปรตีเอสได้ในระดับที่สูง โดยการโคลนยีนโปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 ลงบนพาหะดีเอ็นเอ pUC18 ที่ตำแหน่ง *BamHI* แล้วส่งรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้เข้า

สู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* JM109 เพื่อให้ผลิตโปรตีเอส และทำการศึกษาหาแผนที่เรสทริกชันของรีคอมบิแนนท์พลาสมิด (ดลนภา ตนุนาถ, 2538)

โดยปกติแล้วการเตรียมโปรตีนที่เซลล์เจ้าบ้านสังเคราะห์แล้วขับออกนอกเซลล์ ต้องผ่านกระบวนการแยกและทำให้โปรตีนนั้นบริสุทธิ์ ซึ่งมักจะต้องใช้สารเคมีที่มีความรุนแรงและภายใต้ภาวะนี้เองเป็นผลทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ ดังนั้นความสามารถในการทำงานของโปรตีนที่ต้องการจึงมีประสิทธิภาพต่ำลงหรือไม่มีเลย ในปี ค.ศ. 1965 ได้มีการกล่าวถึงการพัฒนา Gene Fusion เป็นครั้งแรก เริ่มจาก การเชื่อม *lac* operon กับยีนที่ผลิตโปรตีนเป้าหมายต่าง ๆ แล้วทรานสฟอร์มเข้าใน *E. coli* ทำให้ผลิต hybrid protein หรือ fusion protein ที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ β-galactosidase ร่วมอยู่ด้วย และแยกทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วยแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี (Ullmann, 1984 , Jacob และคณะ, 1965) และยังคงความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ทั้งคู่อยู่สูงได้สำเร็จ ทั้งนี้เพื่อให้ง่ายต่อการแสดงออกและการทำให้บริสุทธิ์ (Lowendler และคณะ, 1986, Shuman และคณะ, 1980, Shuman และ Silhavy, 1981, Sugita และคณะ, 1985) ต่อมาได้มีการเชื่อมยีนที่สร้างโปรตีนกับยีน β-galactosidase และแสดงออกใน *E. coli* เป็น *fusion* protein โดยอาศัย การแปลรหัสยีนและ ribosome-binding site เริ่มจากยีน *lac Z* และโปรตีนลูกผสมเหล่านี้สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วยแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี ที่มีการใช้แอนติบอดี ต่อ β-galactosidase (Chu และคณะ, 1988, Mania และคณะ, 1988)

การใช้ระบบของ Glutathione S-transferase Gene Fusion ซึ่งเป็นการหลอมยีนที่ต้องการกับยีนจีเอสที โดยใช้พาหะดีเอ็นเอ pGEX ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยตรงเพื่อใช้ในการสังเคราะห์พอลิเปปไทด์ที่ต้องการให้แสดงออกใน *E. coli* และเป็นพาหะเอื้อการแสดงออกของยีน (expression vector) ในการโคลนยีน (Smith and Johnson, 1988) เป็นผลให้มีการแสดงออกของยีนได้เป็นเอนไซม์ที่เชื่อมกัน (fusion protein) ระหว่างเอนไซม์หรือโปรตีนที่ต้องการ และเอนไซม์ glutathione S-transferase (E.C.2.5.1.18) หรือ จีเอสที (GST) ได้รับการเสนอครั้งแรกโดย Smith และคณะ ในปี ค.ศ. 1988 ซึ่งมีระดับการแสดงออกของยีนสูง (over expression) ทำให้ได้ผลผลิตสูง นอกจากนั้นการแยกเอนไซม์หรือโปรตีนที่ต้องการออกจาก GST และการทำให้บริสุทธิ์ก็สามารถทำได้อย่างรวดเร็วและง่าย ด้วยการผ่าน crude lysate (ของเหลวทั้งหมดที่ได้จากการทำให้เซลล์แบคทีเรียหรือเซลล์ยูคาริโอตแตกด้วย sonicator) ลงในคอลัมน์แอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี (Simons และ Vander Jagt, 1981) โดยตรง ซึ่งด้วยวิธีนี้โปรตีนที่ต้องการไม่ต้องเสี่ยงต่อการเสียสภาพที่เป็นผลจากการใช้สารเคมีในกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ปกติซึ่งค่อนข้างรุนแรง นอกจากนี้เอนไซม์ที่ได้ยังคงมีความสามารถในการทำงานได้ดีเพราะสามารถใช้สารเคมีที่

รุนแรงน้อยกว่าในกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ พาหะดีเอ็นเอที่นิยมใช้มี 2 ตัวคือ พลาสมิด pGEX-2T และ pGEX-3X ซึ่งทั้งสองเป็นอนุพันธ์ที่ได้รับการปรับปรุงจาก pGEX-1 เพื่อให้สามารถใช้ได้สะดวกขึ้นโดย Guan และ Dixon (1991) และ Hake และ Dixon (1992) ส่วนประกอบหลักที่สำคัญของพาหะดีเอ็นเอกลุ่มนี้ ได้แก่

1. *tac promoter* ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ลูกผสมระหว่าง *lac* และ *trp* promoters ควบคุมการแสดงออกของยีนที่โคลนเข้าไปได้ในระดับสูงเมื่อใช้ *E. coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน เนื่องจากมี -35 sequence และ Pribnow box sequence (De Boer, Comstock และ Vasser, 1983) มีความสามารถในการจับกับ RNA polymerase ได้ดีมาก จึงทำให้เกิดการแสดงออกแบบ over expression ได้

2. ยีน Sj26 เป็นส่วนของยีนที่ใช้สังเคราะห์ GST ตรง C-terminus (Smith และคณะ, 1986) และเป็น cDNA สังเคราะห์โดย mRNA ของแอนติเจนที่สกัดจากหนอนพยาธิ *Schistosoma japonicum*

3. **multiple cloning site** ตำแหน่งต่าง ๆ ที่ใช้ในการโคลน เป็นตำแหน่งที่สามารถถูกตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิดดังนี้ *Bam*HI, *Sma*I และ *Eco*RI เพื่อสอดแทรกชิ้นยีนของโปรตีนที่ต้องการผลิตใส่เข้าไป

4. **stop codons** รหัสหยุดการสังเคราะห์โพลิเปปไทด์

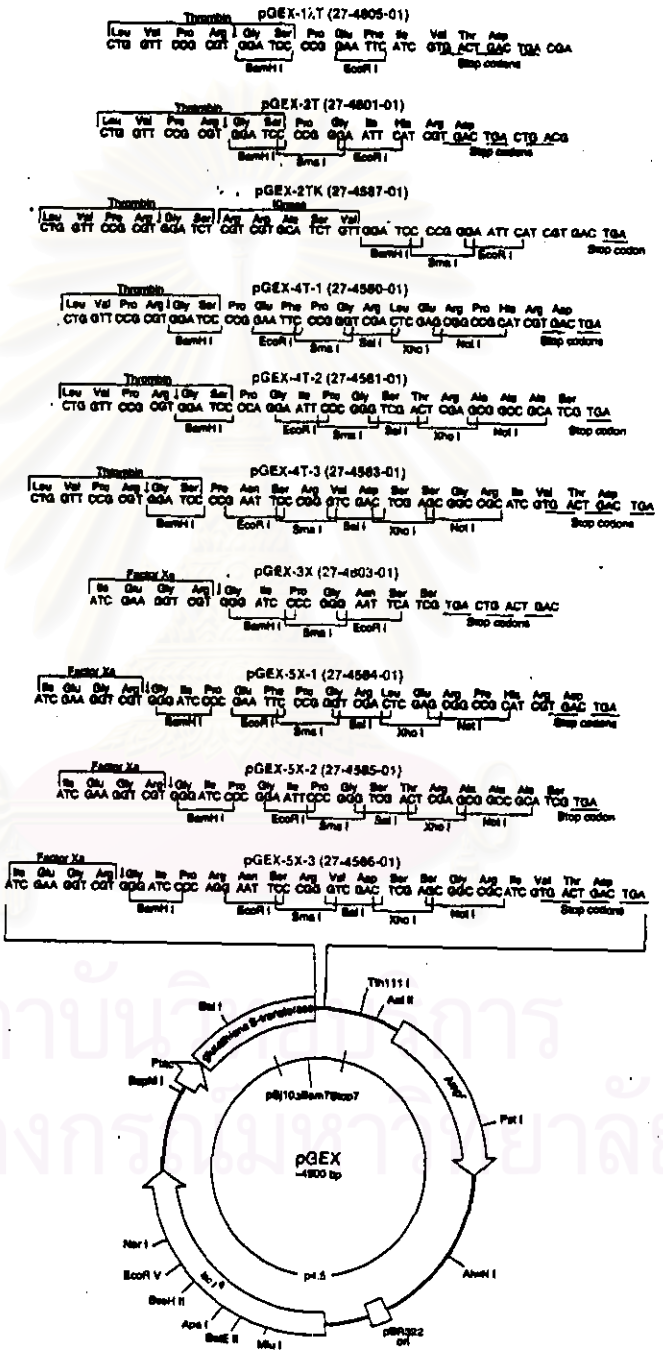
5. Amp^r ยีนต้านยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน สำหรับการคัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์ เนื่องจากบริเวณยีนนี้สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ β-lactamase ที่สามารถย่อยแอมพิซิลินได้

6. Ori (origin of replication) จุดเริ่มต้นของการลอกแบบจากพลาสมิด pBR322

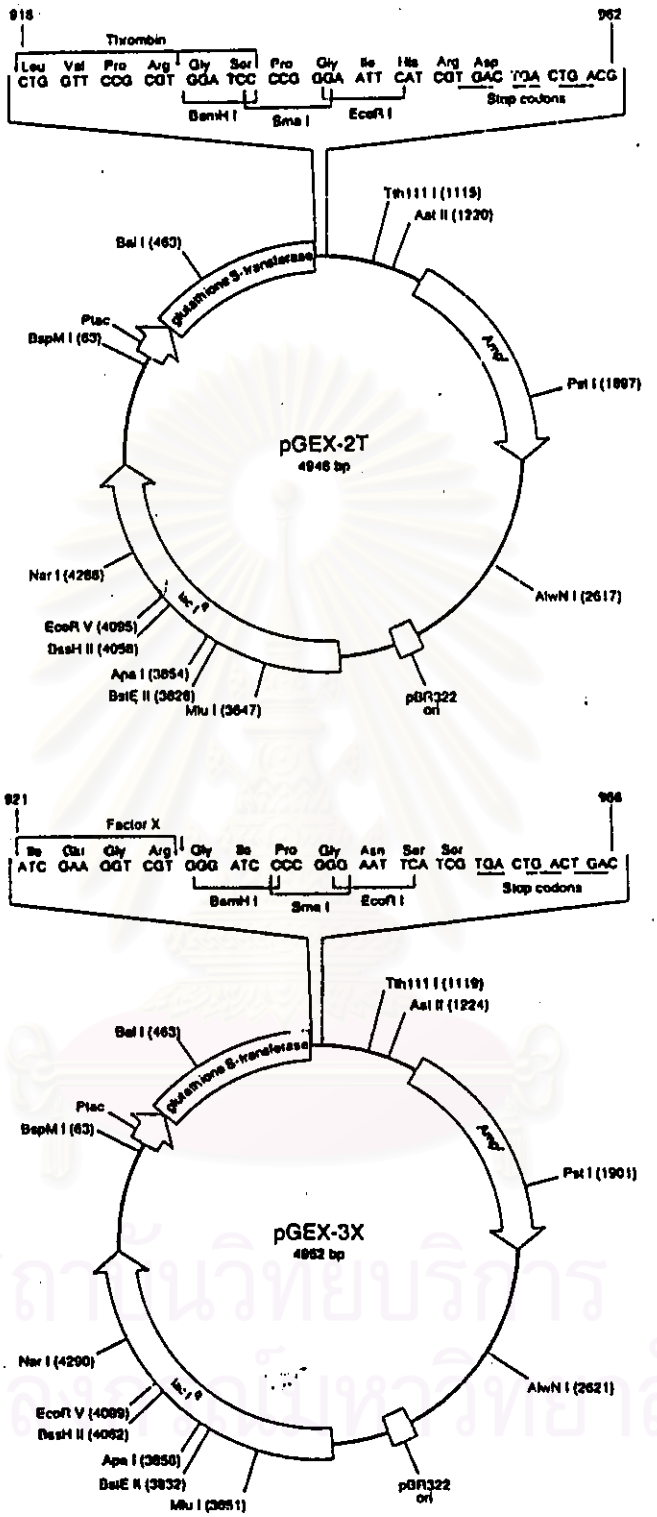
7. ส่วนของ *lac* operon ประกอบด้วย ยีน *lacI*^{q} ของ *lac* repressor ซึ่งมีผลให้มีระดับการแสดงออกสูง (over expression) ในที่ที่มีตัวเหนี่ยวนำ IPTG

ระหว่าง multiple cloning site และ ยีน Sj26 ของพลาสมิด pGEX-2T หรือ pGEX-3X จะมีตำแหน่งจำเพาะที่เอนไซม์ย่อยโปรตีนบางชนิดจะสามารถตัด fusion protein ที่ผลิตออกมา ตรงรอยต่อระหว่างโปรตีนที่ต้องการและ GST ได้ (proteolytic cleavage site) ทำให้สามารถแยกโปรตีนที่ต้องการออกจาก GST ที่ติดมาได้ เช่นใช้ Thrombin (E.C. 3.4.21.5) เป็น proteolytic cleavage enzyme เมื่อใช้พลาสมิด pGEX-2T เป็นพาหะดีเอ็นเอในการโคลน (Guan และ Dixon,1991; Hakes และ Dixon,1992 , Chang,1985) หรือใช้ Blood coagulation X_a (Factor X_a) เป็น proteolytic cleavage enzyme เมื่อใช้พลาสมิด pGEX-3X เป็นพาหะดีเอ็นเอใน

การโคลน เป็นต้น และมีการปรับปรุง pGEX-1 จนได้อนุพันธ์เพิ่มอีกหลายตัวดังแสดงในรูปที่ 1 และ 2 ตามลำดับ



รูปที่ 1 แผนที่เรสทริกชันของพาหะดีเอ็นเอ pGEX และอนุพันธ์



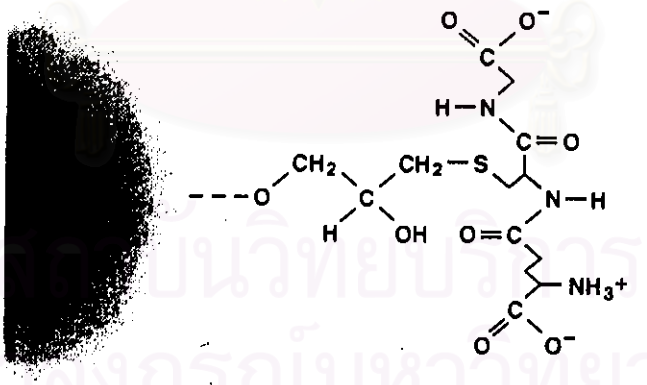
รูปที่ 2 แผนที่เรสทริกชันของพาหะดีเอ็นเอ pGEX-2T และ pGEX-3X

มีการนำระบบดังกล่าวไปประยุกต์ใช้อย่างกว้างขวาง เพื่อผลิตวัตถุดิบสำหรับการวิเคราะห์โครงสร้าง ชีวเคมี และชีววิทยาของโปรตีนต่าง ๆ เช่น การวิเคราะห์ปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับดีเอ็นเอ และ โปรตีนกับโปรตีน (Smith และคณะ, 1993) การผลิตสารภูมิคุ้มกัน เซรุ่ม และวัคซีน (Fikrig และคณะ, 1990) การแสดงออกของยีนในยีสต์ (Mitchell และคณะ, 1993) และการแสดงออกของยีนในเซลล์แมลง (Parker และคณะ, 1992, Davies และคณะ, 1993, Harris และ Coates, 1993) ได้มีการคิดค้นวิธีสำหรับการตรวจสอบ fusion protein ให้สะดวกรวดเร็วมากขึ้นด้วย (Kaelin และคณะ, 1992, Ron และ Dressler, 1992, Smith และคณะ, 1993) นอกจากนี้มีการใช้ประโยชน์จาก PCR (polymerase chain reaction) ร่วมกับระบบจีเอสที เพื่อสังเคราะห์สารประกอบใช้ในแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี (Kaelin และคณะ 1991) อุปสรรคของการใช้ระบบนี้มีบ้างคือ fusion protein บางส่วนหรือเกือบทั้งหมดจะไม่ละลายในน้ำเมื่อทำให้เซลล์แตกในสาร nonionic detergent จึงทำให้การทำให้บริสุทธิ์มีประสิทธิภาพไม่เต็มที่ ได้มีการปรับปรุงโดยการใช้เกลือโซเดียมของสารแอลคิล anionic detergent ที่ชื่อ Sarkosyl (N-laurylsarcosine) แทน พบว่ายังรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์อยู่ (Frangioni and Nell, 1992, Frankel และคณะ, 1991) การใช้ประโยชน์ยังคงมีเรื่อยมาจนกระทั่งในปัจจุบัน ปี ค.ศ. 1997 มีการวิจัยที่ใช้ระบบดังกล่าวมากมายซึ่งได้รับการตีพิมพ์กว่า 50 เรื่อง ตัวอย่างเช่น การเตรียมเซรุ่มสำหรับ plasmodium vivax duffy (Fraser, 1997) ได้ศึกษาการทำวัคซีนกระตุ้นให้มีการเพิ่มภูมิคุ้มกันจากแอนติเจนของ *Taennia ovis* (Rothel และคณะ, 1997) การวิจัยเกี่ยวกับโปรตีน Tat ซึ่งได้จากเซลล์ที่ได้รับสารพันธุกรรมจากไวรัส HIV-1 (Human immunodeficiency virus type I) โดยอาศัยคุณสมบัติแบบ Affinity ของระบบจีเอสที (Rusnati และคณะ, 1997) การศึกษาการแสดงออกในระดับสูง (over expression) ของเอนไซม์ protein tyrosine phosphatase (PTP I) (Gelderloos และ Anderson, 1997) เป็นต้น

ในงานวิจัยครั้งนี้ต้องการโคลนยีนที่ใช้ในการสังเคราะห์โปรตีเอสจาก ***Bacillus subtilis*** TISTR25 ลงบนพาหะดีเอ็นเอของระบบหลอมกับยีนจีเอสที (pGEX) แล้วทรานสฟอร์มรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่ได้เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* HB101 (Smith, 1993) เพื่อให้เกิดการแสดงออกเป็น fusion protein ระหว่างโปรตีเอสและ glutathione S-transferase จากนั้นทำการแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี เพื่อให้ได้โปรตีเอสที่ไม่เสียสภาพและยังคงประสิทธิภาพในการทำงานอยู่

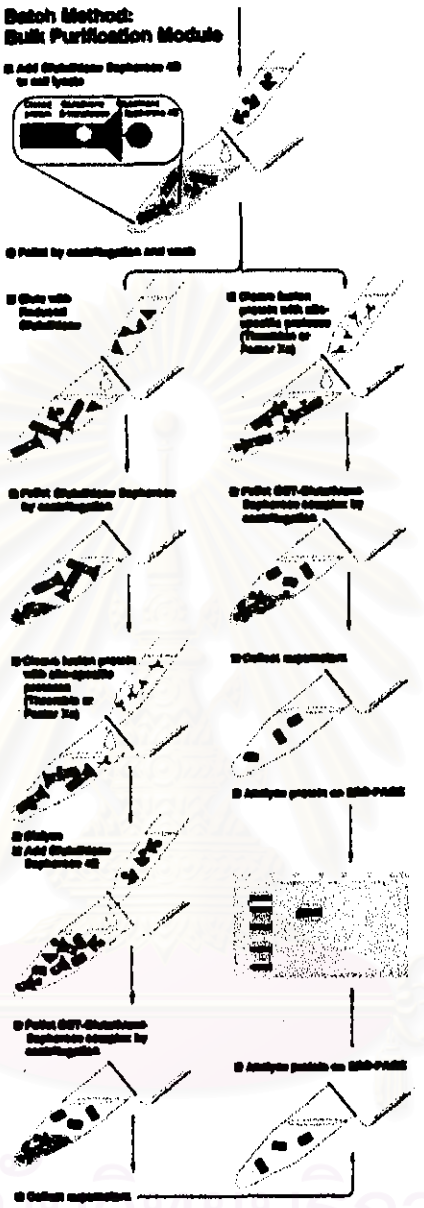
ในขั้นตอนการทดลองทำการเตรียมรีคอมบิแนนท์พลาสมิดที่มียีนโปรตีเอสด้วยพาหะดีเอ็นเอของระบบหลอมยีนแล้วจึงทรานสฟอร์มเข้าเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* HB101 ตรวจสอบความ

สามารถในการทำงานของทรานสฟอร์แมนท์ด้วยวิธีคัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีนมพร่องมันเนย และยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน วัดค่าแอคติวิตีด้วยวิธีทาง spectrophotometry และตรวจสอบชนิดของยีนจากทรานสฟอร์แมนท์โดยอาศัยดีเอ็นเอติดตามที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี คัดเลือกทรานสฟอร์แมนท์มาเลี้ยงในอาหารให้เจริญจึงเก็บเซลล์และทำให้เซลล์แตกด้วย sonicator นำของเหลวที่ได้ทั้งหมดผ่านลงในคอลัมน์ของกระบวนการทำให้โปรตีเอสบริสุทธิ์ด้วยวิธีแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี ซึ่งภายในคอลัมน์มีเจล Glutathione Sepharose ซึ่งมีส่วนของ glutathione ติดอยู่กับ Sepharose และโครงสร้างของ glutathione นี้จะจับกับบริเวณ binding site ของ GST ได้อย่างพอดี ดังนั้น fusion protein ที่มีส่วนของ GST เท่านั้นจะถูกจับไว้ภายในคอลัมน์ ส่วนโปรตีนอื่น ๆ ที่เซลล์สังเคราะห์ขึ้นนอกเหนือจากโปรตีเอสที่เราต้องการไม่สามารถจับกับคอลัมน์ได้จึงผ่านคอลัมน์ออกมาอันดับแรก จากนั้นชะด้วยบัฟเฟอร์ที่ผสมเอนไซม์ย่อย fusion protein ที่เหมาะสม ซึ่งอาจเป็น *Thrombin* หรือ Factor X_a จะทำให้โปรตีเอสขาดจากส่วน GST และหลุดออกมา ส่วนคอลัมน์เดิมนั้นสามารถนำกลับมาใช้ได้อีกหลายครั้งโดยชะ GST ที่ติดอยู่กับเจล ออกไปด้วยบัฟเฟอร์ เปรียบเทียบค่าแอคติวิตีจำเพาะกับโปรตีเอสที่อยู่ในรูป fusion protein แล้วหาค่าจำนวนเท่าของความบริสุทธิ์ (purification fold)



รูปที่ 3 โครงสร้างของ glutathione ที่ติดอยู่กับ Sepharose ภายในคอลัมน์ของแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี

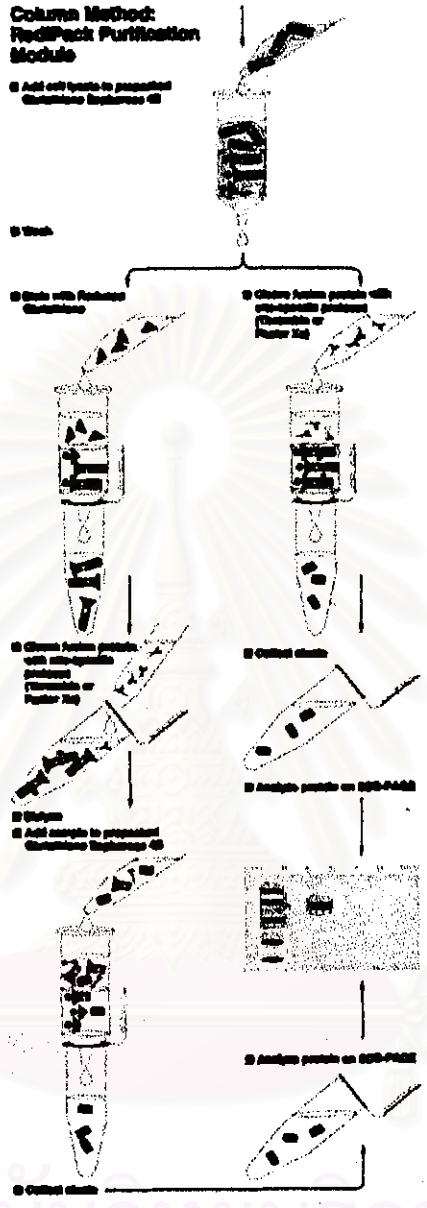
สามารถเตรียมแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี ได้ทั้งในคอลัมน์หรือในหลอดเซนตริฟิวจ์ตามรูปที่แสดงในหน้า 13 และ 14 ขึ้นอยู่กับความสะดวกและอุปกรณ์ที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการ



รูปที่ 4 ก) กระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วย Affinity chromatography แบบ Batch

(Pharmacia Biotech, 1996)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 ข) กระบวนการทำให้บริสุทธิ์ด้วย Affinity chromatography แบบคอลัมน์

(Pharmacia Biotech, 1996)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย