การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก

BACILLUS SUBTILIS TISTR 25

น.ส. อุดมลักษณ์ ธิติรักษ์พาณิชย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2534

ISBN 974-579-436-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

017901 i17339200

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NEUTRAL PROTEASE FROM *BACILLUS SUBTILIS* TISTR 25

MISS UDOMLUCK THITIRUKPANICH

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Sciences

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1991

ISBN 974-579-436-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก <u>Bacillus subtilis</u> TISTR 25
โดย	น.ส. อุดมลักษณ์ ธิติรักษ์พาณิชย์
ภาควิชา	ชีวเคมี
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. จริยา บุญยวัฒน์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นีรดา มงคลกุล)

บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เป็นบทคัดย่อที่ส่งเข้าฐานข้อมูลของบัณฑิตวิทยาลัย

อุดมลักษณ์ ธิติรักษ์พาณิชย์ : การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของเอนไซม์นิวทรัล โปรตีเอส จาก Bacillus subtilis TISTR 25 (PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NEUTRAL PROTEASE FROM BACILLUS SUBTILIS TISTR 25) อ.ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์, 90 หน้า. ISBN 974-579-436-8.

ทำการแยกเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก Bacillus subtilis TISTR 25 ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 40 - 70% แล้วผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟฟี 2 ชนิด คือ ดีเอ็ม เซลลูโลส และเซฟาเด็กซ์ จี 75 สามารถแยกเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4.6 เท่า ทดสอบความบริสุทธิ์โดยเทคนิค โพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิสได้แถบโปรตีนเพียงแถบเดียว นำไปหาขนาดและหน่วยย่อยของเอนไซม์ โดยวิธี เอสดีเอส โพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส พบว่าเอนไซม์เป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว มีขนาดโมเลกุล 37,000 ดาลตัน

สภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเคซีนดิที่สุดที่ pH 7 และอุณหภูมิ 50 °ซ. เอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์นี้ไม่สามารถย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ได้ และจากการศึกษาค่าคงที่ทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์ (K_m) ต่อสับสเตรท เคซีน อีโมโกลบิน และเอโซคอล มีค่าเท่ากับ 0.04, 0.06 มิลลิโมล/ลิตร และ 10 มก./มล. ตามลำดับ ซึ่งทำการทดลองเปรียบเทียบกับเอนไซม์ Thermolysin จาก B. thermoproteolyticus พบว่า Thermolysin มีความจำเพาะต่อสับสเตรททั้งสามชนิดดีกว่าเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์จาก TISTR 25 แต่เอนไซม์จาก TISTR 25 มีความเร็วสูงสุด (V_{max}) ในการเร่งปฏิกิริยาสับสเตรททั้งสามชนิดนี้ดีกว่า Thermolysin และเมื่อศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทที่เป็นเปปไทด์สังเคราะห์ พบว่านิวทรัลโปรตีเอสจาก TISTR 25 สามารถย่อยสับสเตรทที่มีขนาดตั้งแต่ tripeptide ขึ้นไป และมีความจำเพาะต่อปลายด้าน N ของกรดอะมิโนขนาดใหญ่ เช่น ลิวซีน, ฟีนิลอะลานีน หรือ อาร์จินีน เช่นเดียวกับเอนไซม์ Thermolysin

เอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก B. subtilis TISTR 25 มีปริมาณอะตอมสังกะสีในโมเลกุลเท่ากับ 1.5 อะตอม/โมเลกุล เอนไซม์ถูกยับยั้งปฏิกิริยาได้ด้วยสารคีเลตติ้ง EDTA และ Phenanthroline จากการทดลองใช้ EDTA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งปฏิกิริยาประมาณ 80% และแอคติวิตีจะกลับคืนได้ถ้ามีการเติมไดวาเลนท์ที่เหมาะสม ซึ่งจากการทดลองพบว่าเมื่อมีการเติม 1 มิลลิโมลาร์ของ Zn^{++}, Mn^{++} และ Co^{++} แอคติวิตีจะสามารถกลับคืนมาได้ดีกว่าเมื่อเติม 1 มิลลิโมลาร์ของ Ca^{++}, Fe^{++} และ Mg^{++}

ภาควิชา ชีวเคมี
สาขาวิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2533

ลายมือชื่อนิสิต .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

UDOMLUCK THITIRUKPANICH : PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF NEUTRAL PROTEASE FROM BACILLUS SUBTILIS TISTR 25. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PIAMSOOK PONGSAWASDI, Ph.D., 90 PP., ISBN 974-579-436-8

Neutral Protease from Bacillus subtilis TISTR 25 was purified 4.6 fold by using ammonium sulfate precipitation, CM-cellulose and Sephadex G-75 colum chromatography, respectively. The enzyme was highly purified and showed one band on polyacrylamide gel electrophoresis. The purified enzyme was proved to be a monomer with a molecular weight of 37,000 by SDS polyacrylamide gel electrophoresis.

The optimum pH and the optimum temperature were 7 and 50 ^{o}C. There was no esterase activity. Michaelis constant(K_m) for casein, hemoglobin and azocoll were 0.04, 0.06 mM and 10 mg/ml, respectively. Comparative studies with Thermolysin indicated that the purified enzyme has lower affinity but greater maximum velocity (Vmax) for these 3 substrates. The enzyme showed similar specificity with Thermolysin towards synthetic substrates. They hydrolysed peptide bonds at the amino end of bulky amino acids such as Leucine, Phenylalanine and Arginine.

The zinc content of neutral protease from B. subtilis TISTR 25 was approximately 1.5 atom/molecule enzyme. The enzyme was inactivated by chelating agents EDTA and Phenanthroline. Eighty percent of the enzyme was inactivated by 1 mM EDTA. The inactive enzyme could be better reactivated by the addition of 1 mM, Zn^{++}, Mn^{++} or Co^{++} than Ca^{++}, Fe^{++} or Mg^{++}.

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ชีวเคมี

ปีการศึกษา 2533 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ เป็นอย่างสูงที่กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา คอยให้คำแนะนำสั่งสอนและคอยช่วยเหลือผู้เขียนเป็นอย่างมาก ตลอดระยะเวลาที่ศึกษาอยู่ในภาควิชาชีวเคมี และช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. จริยา บุญยวัฒน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พีรดา มงคลกุล ที่คอยให้ความกรุณาแนะนำสั่งสอน และรับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่านที่ช่วยประสิทธิ์ประศาสตร์ความรู้ให้ศิษย์ จนมีความรู้ ความสามารถมาจวบจนถึงวันนี้

ขอขอบคุณ คุณบุณฑริกา วงค์ไวทยากูร และคุณพิภาภรณ์ จิโรจน์กุลกิจ ที่คอยให้ความเอื้อเฟื้อและคำแนะนำช่วยเหลือผู้เขียน และขอขอบคุณนิสิตหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิตและดุษฎีบัณฑิต ในภาควิชาชีวเคมี และเทคโนโลยีชีวภาพ และเพื่อนๆทุกท่านที่มีส่วนช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และรวมทั้งขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาชีวเคมี

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงสุดต่อ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้องทุกๆท่าน ที่ให้ทั้งกำลังทรัพย์ กำลังใจและความรักความเข้าใจต่อผู้เขียนมากมายคณประเมินค่ามิได้

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญรูป..... ฏ

คำย่อ..... ฑ

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 ครุภัณฑ์ และเคมีภัณฑ์

2.1 ครุภัณฑ์..... 12

2.2 เคมีภัณฑ์..... 13

2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง..... 14

3 วิธีการทดลอง

3.1 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง..... 15

3.1.1 การเก็บเชื้อระยะสั้น..... 15

3.1.2 การเก็บเชื้อระยะยาว..... 15

3.2 การเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสารละลาย crude enzyme..... 15

3.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 15

3.2.2 การเตรียมเชื้อตั้งต้น..... 16

3.2.3 การเตรียม crude enzyme เพื่อไปทำให้บริสุทธิ์..... 16

3.3 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส..... 16

3.3.1 การเตรียมสารละลายสำหรับหาเอนไซม์แอคติวิตี..... 17

3.3.2 วิธีการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส..... 17
3.4 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด..... 17
3.4.1 การเตรียมสารละลายสำหรับหาปริมาณโปรตีน..... 17
3.4.2 วิธีการวัดปริมาณโปรตีน..... 18
3.5 ขั้นตอนการทำเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสให้บริสุทธิ์..... 18
3.5.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต..... 18
3.5.2 การขจัดเกลืออกจาก crude enzyme โดยวิธี ไดอะไลซีส..... 18
3.5.3 การทำเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสให้บริสุทธิ์ด้วยการผ่าน คอลัมน์ ซีเอ็ม-เซลลูโลส..... 19
3.5.4 การทำเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วย เซฟาเด็กซ์ จี-75 เจลฟิลเตรชันคอลัมน์..... 19
3.6 วิธีแยกโปรตีนด้วยโพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส..... 20
3.6.1 การเตรียมสารละลายสำหรับโพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส..... 20
3.6.2 การเตรียมโพลีอะไครลาไมด์เจลชนิดแท่ง..... 21
3.6.3 การเตรียมสารละลายเอนไซม์..... 22
3.6.4 การทำอิเลคโตรโฟรีซีส..... 22
3.6.5 วิธีย้อมสีโปรตีนในแท่งโพลีอะไครลาไมด์ เจล..... 22
3.7 การศึกษาสมบัติของนิวทรัลโปรตีเอสที่บริสุทธิ์บางส่วน..... 22
3.7.1 การหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดย วิธีเจลฟิลเตรชัน (เซฟาเด็กซ์ จี-75)..... 22
3.7.2 การหาน้ำหนักโมเลกุลและหน่วยย่อยของเอนไซม์ โดย วิธี เอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส... 23

3.7.3 การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์..... 25

3.7.4 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์..... 25

3.7.5 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บเอนไซม์..... 26

3.7.6 การศึกษาผลของโปรตีนสับสเตรทต่อแอคติวิตีของเอนไซม์..... 26

3.7.7 การศึกษาผลของสับสเตรทเอสเทอร์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์..... 26

3.7.8 การศึกษาผลของไอออนโลหะ และตัวยับยั้งโปรตีเอส.... 26

3.7.9 การศึกษาความสำคัญของ Zn^{++} ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์.. 27

3.7.10 การหาความจำเพาะของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสต่อเปปไทด์สังเคราะห์..... 28

4 ผลการทดลอง

4.1 ผลการเตรียมเอนไซม์โปรตีเอส (crude enzyme)..... 30

4.2 ผลการทำเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสให้บริสุทธิ์..... 30

4.2.1 ผลการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต..... 30

4.2.2 ผลการแยกเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสด้วยคอลัมน์ ซี.เอ็ม เซลลูโลส..... 30

4.2.3 ผลการทำเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยวิธี เจล ฟิลเตรชัน..... 33

4.3 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสโดยวิธีโพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟริซิส..... 33

4.4 ผลการศึกษาสมบัติของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสที่มีความบริสุทธิ์สูง

4.4.1 ผลการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์โดยวิธีเจลฟิลเตรชัน..... 38

4.4.2 ผลการหาน้ำหนักโมเลกุลและหน่วยย่อยของเอนไซม์ โดยวิธี เอสดีเอสโพลีอะไครลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส.... 41

4.4.3 การศึกษา pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์..... 41

4.4.4 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บเอนไซม์..... 47

4.4.5 ผลการศึกษาปฏิกิริยาการเร่งการไฮโดรไลส์สับสเตรทธรรมชาติ..... 47

4.4.6 ผลการศึกษาผลของสับสเตรทเอสเทอร์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์..... 47

4.4.7 ผลการศึกษาผลของไอออนโลหะ และตัวยับยั้งโปรตีเอส..... 53

4.4.8 ผลการศึกษาความสำคัญของ Zn^{++}ต่อแอคติวิตีเอนไซม์.. 53

4.4.9 ผลการหาความจำเพาะของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสต่อเปปไทด์สังเคราะห์..... 58

5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 66

เอกสารอ้างอิง..... 78

ภาคผนวก..... 85

กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด..... 86

กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณไทโรซีน..... 87

กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ Zn^{++}..... 88

ประวัติผู้เขียน..... 89

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงส่วนประกอบของกรดอะมิโนในสายโพลีเปปไทด์ของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอส ชนิดต่างๆ.....	7
2	ผลการทำให้เอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสบริสุทธิ์.....	32
3	สรุปค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสกับ Thermolysin เมื่อใช้โปรตีนต่างชนิด.....	52
4	ผลของไอออนของโลหะต่อแอคติวิตีของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก B. subtilis TISTR 25.....	54
5	ผลของสารเคมีต่างชนิดต่อแอคติวิตีของนิวทรัลโปรตีเอสจาก B.subtilis TISTR 25.....	55
6	แสดงปริมาณและความสำคัญของ Zn^{++}ต่อนิวทรัลโปรตีเอส จาก TISTR 25..	56
7	แสดงผลการแทนที่ Zn^{++}ด้วยไดวาเลนท์ไอออนชนิดอื่น.....	58
8	ค่า R_fของ spot บนแผ่น TLC ของกรดอะมิโนมาตรฐาน และ enzyme hydrolysate ที่ได้จากการอินคิวเบตเอนไซม์ชนิดต่างๆกับสับสเตรทชนิดปลายอะมิโนไม่อิสระ.....	61
9	ค่า R_fของ spot บนแผ่น TLC ของกรดอะมิโนมาตรฐาน และ enzyme hydrolysate ที่ได้จากการอินคิวเบตเอนไซม์ชนิดต่างๆกับสับสเตรทชนิดปลายอะมิโนอิสระ.....	63
10	เปรียบเทียบการไฮโดรไลส์เปปไทด์สังเคราะห์ โดยเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก B.subtilis TISTR 25 และ Thermolysin.....	65

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แสดงลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์ Thermolysin.....	8
2	รูปแบบการแยกและทำโปรตีเอสให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ ซีเอ็ม-เซลลูโลส.....	31
3	รูปแบบการทำนิวทรัลโปรตีเอส จาก B.subtilis TISTR 25 ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-75.....	34
4	รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆในการทำเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอส ให้บริสุทธิ์ แยกโดยโพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส.....	35
5	แสดงตำแหน่งบนแท่งเจลโพลีอะไครลาไมด์ ที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส.....	36
6	แสดงผลของ เอทธานอล , PMSF และ O-Phenanthroline ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส จากแถบย่อยบนแท่งเจลโพลีอะไครลาไมด์...	37
7	รูปแบบการแยกโปรตีนในคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75	39
8	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง K_{av} และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสโดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75	40
9	รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสแยกโดยเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส.....	42
10	รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสแยกโดยเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซิส.....	43

รูปที่ หน้า

11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง Relative mobility และ log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน ในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสโดยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์เจล อีเลคโตรโฟรีซิส..... 44

12 ผลของ pH ต่อแอคติวิตีของนิวทรัลโปรตีเอสจาก B. subtilis TISTR 25 เปรียบเทียบกับเอนไซม์มาตรฐานจาก B.polymyxa และ Thermolysin... 45

13 ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของโปรตีเอสจาก B. subtilis TISTR เปรียบเทียบกับเอนไซม์มาตรฐานจาก B.polymyxa และ Thermolyisin... 46

14 ความเสถียรของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสจาก B. subtilis TISTR 25 48

15 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอส เปรียบเทียบกับ Thermolysin เมื่อใช้ casein เป็นซับสเตรท..... 49

16 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอส เปรียบเทียบกับ Thermolysin เมื่อใช้ hemoglobin เป็นสับสเตรท..... 50

17 Lineweaver-Burk plot ของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสเปรียบเทียบกับ Thermolysin เมื่อใช้ azocoll เป็นสับสเตรท..... 51

18 การติดตามจลน์ศาสตร์ของการไฮโดรไลส์เปปไทด์สังเคราะห์..... 60

19 ความจำเพาะในการไฮโดรไลส์เปปไทด์สับสเตรทชนิดปลายอะมิโนไม่อิสระของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอส..... 62

20 ความจำเพาะในการไฮโดรไลส์เปปไทด์สับสเตรทชนิดปลายอะมิโนอิสระของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอส..... 64

คำย่อ

ชม.	=	ชั่วโมง
°ซ	=	องศาเซลเซียส
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
A	=	Absorbance
B.	=	Bacillus
BSA	=	Bovine serum albumin
BTEE	=	Benzoyl tyrosine ethyl ester
CM	=	Carboxymethyl
DFP	=	Diisopropyl fluorophosphate
EDTA	=	Ethylenediamine tetraacitic acid
PMSF	=	Phenylmethylsulfonyl fluoride
K_m	=	Michaelis-Menten constant
V_{max}	=	Maximum velocity
NBZ	=	N-Benzoyl
N-Succ	=	N-succinyl
pNA	=	Para-nitroanilide
MW.	=	Molecular weight