การเตรียมให้บริสุทธิ์บางส่วนและสมบัติของไคทิเนสจาก *Bacillus cereus*

นางสาว มณีรัตน์ มีพลอย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-334-504-3

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

24 ก.ย. 2546

I19018405

PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CHITINASE FROM *Bacillus cereus*

Miss Maneerat Meeploy

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master Science in Biochemistry
Department of Biochemistry
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 1999

ISBN 974-334-504-3

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การเตรียมให้บริสุทธิ์บางส่วนและสมบัติของไคทิเนสจาก *Bacillus cereus*

โดย นางสาว มณีรัตน์ มีพลอย

ภาควิชา ชีวเคมี

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. พีรดา มงคลกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พีรดา มงคลกุล)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุกัญญา สุนทรส)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มณีรัตน์ มีพลอย: การเตรียมให้บริสุทธิ์และสมบัติบางประการของไคทิเนสจาก *Bacillus cereus* (PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CHITINASE FROM *Bacillus cereus*) อ.ที่ปรึกษา: ผศ.ดร. พีรดา มงคลกุล, 105 หน้า. ISBN 974-334-504-3

Bacillus sp. ที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็น *Bacillus cereus* สามารถผลิตไคทิเนสและขับไคทิเนสออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำที่มีคอลลอยดัลไคทินเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตไคทิเนสพบว่าแบคทีเรียจะผลิตไคทิเนสได้ก่อนที่จะสังเกตเห็นการเจริญของเซลล์ เอนไซม์จะมีแอคติวิตีสูงสุดที่ 32 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์เข้าสู่ระยะการเจริญคงที่และระดับเอนไซม์ยังคงสูงอยู่ตลอด 120 ชั่วโมงที่ทำการศึกษา pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์อย่างหยาบในการย่อยคอลลอยดัลไคทินคือ 5.0 และ 60-65 องศาเซลเซียส ตามลำดับ การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยโครมาโตกราฟีคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินพบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 27.78 เท่า และมีผลผลิตเอนไซม์ 28.89 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาสมบัติของไคทิเนสจาก *Bacillus cereus* หลังจากผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทินพบว่าไคทิเนสที่เชื้อผลิตได้สามารถย้อมติดสีย้อมไคทิเนสในเอสดีเอส-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีสได้ทั้งหมด 5 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 45 58 60 70 และ 80 กิโลดาลตัน ในขณะที่แยกได้เพียง 2 แถบในดิสค์-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีส นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์มีสมบัติเป็นไกลโคโปรตีน pH และอุณหภูมิที่ เหมาะสมของเอนไซม์ผสมที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนในการย่อยคอลลอยดัลไคทินคือ 4.0-6.0 และ 40-50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์ค่อนข้างเสถียรในช่วง pH ที่กว้างคือ pH 4-10 เอนไซม์สามารถไฮโดรไลซ์คอลลอยดัลไคทิน รีเจนเนอเรทเทดไคทิน ไกลคอลไคทิน ไคทินผงที่บริสุทธิ์ ไกลคอลไคโตแซน และ flaked chitosan (~90% deacetylation) ได้ดีตามลำดับจากมากไปน้อย และไม่ไฮโดรไลซ์ไคทินผง (ที่ไม่บริสุทธิ์ ขนาด 60 mesh) เซลลูโลส และคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส มีค่า Km ของเอนไซม์ต่อการย่อยคอลลอยดัลไคทินเท่ากับ 0.922 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการตรวจสอบชนิดของไคทิเนสพบว่าเอนไซม์มีแอคติวิตีของไคโทไบโอซิเดสและเอ็นโดไคทิเนสในอัตราส่วน 24.60:2.43 และไม่มีแอคติวิตีของเอ็น-อะซิทิลกลูโคซามินิเดส

ภาควิชา...ชีวเคมี... ลายมือชื่อนิสิต...มณีรัตน์ มีพลอย...

สาขาวิชา...ชีวเคมี... ลายมือชื่ออาจารย์...

ปีการศึกษา...2542... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม...-...

3971327623: MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD: CHITINASE / REGENERATED CHITIN / *Bacillus cereus*

MANEERAT MEEPLOY: PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CHITINASE FROM *Bacillus cereus*. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. PEERADA MONGKOLKUL, Ph.D. 105 pp. ISBN 974-334-504-3.

Bacillus sp.was identified to be *Bacillus cereus*. The bacterium produced chitinases and secreted them into culture medium when the bacterium was grown at 37°C in minimum medium supplemented with 0.2 % colloidal chitin. Kinetic studies on growth and chitinase production showed that the bacteria synthesized chitinase prior to cell growth. The enzyme activity reached maximum at 32 hr which was early stationary phase. Maximum activity was observed throughout the 120 hr studied. The optimum pH and temperature of the crude enzyme using colloidal chitin as substrate were 5.0 and 60-65°C, respectively. Chitinase from the culture supernatant was partially purified up to 27.78 folds with 28.89 % yield by regenerated chitin column chromatography. Subsequent studied by activity staining in SDS-PAGE showed 5 active bands with molecular weights of approximately 45, 58, 60, 70 and 80 KDa; whereas there were only 2 active bands from native PAGE. Staining with PAS showed that they were glycoproteins. The optimum pH and temperature of the partially purified enzyme mixture for colloidal chitin were 4.0-6.0 and 40-50°C, respectively and was quite stable in a wide pH range between 4 and 10. The enzyme mixture hydrolyzed colloidal chitin, regenerated chitin, glycol chitin, purified chitin, glycol chitosan and 90% deacetylation flaked chitosan but did not hydrolyze powdered chitin (60-mesh), cellulose and carboxymethyl cellulose (CMC). The Km value for colloidal chitin was 0.922 $mg.ml^{-1}$. Characterization of the enzyme showed that they are endochitinase and chitobiosidase. N-acetylglucosaminidase was not detected in the mixture.

ภาควิชา.....ชีวเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต.....มณีรัตน์ มีพลอย.....

สาขาวิชา.....ชีวเคมี..... ลายมือชื่ออาจารย์.....Peerada Mongkolkul.....

ปีการศึกษา.....2542.. ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....-.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พีรดา มงคลกุล เป็นอย่างยิ่งที่ท่านได้ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ทั้งในด้านงานวิจัยและด้านอื่นๆ ตลอดมา ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุกัญญา สุนทรส ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. รัฐ พิชญางกูร ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อและไคโตแซนที่ใช้ในการวิจัย

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีวเคมีที่ให้ความรู้และประสบการณ์แก่ผู้เขียน

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และบุคคลากรทุกท่านในภาควิชาชีวเคมีที่ให้ความสะดวกในด้านการวิจัยในครั้งนี้

และเนื่องด้วยทุนการวิจัยครั้งนี้บางส่วนได้รับจากทุนอุดหนุนการวิจัย บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบคุณ นางสาว เกื้อการุณย์ ครูส่ง ที่เป็นผู้คัดแยกเชื้อที่ใช้ในการทดลองรวมทั้งและขอขอบคุณนิสิตปริญญาโท-เอก ภาควิชาชีวเคมีและเทคโนโลยีชีวภาพทุกคน

ท้ายนี้ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา ซึ่งสนับสนุนในด้านการเงินและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ฌ
สารบัญรูป.....ญ
คำย่อ.....ฐ

บทที่

1. บทนำ.....1
2. เครื่องมือ วัสดุภัณฑ์ และเคมีภัณฑ์.....22
3. วิธีการทดลอง.....26
    3.1 แบคทีเรีย.....26
    3.2 การวัดแอคติวิตีของไคทิเนสด้วยวิธีวัดสี (Colorimetric method).....29
    3.3 การวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford.....30
    3.4 การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์อย่างหยาบ
        จาก *Bacillus cereus*.....30
    3.5 การทำไคทิเนสให้บริสุทธิ์บางส่วน.....30
    3.6 การศึกษาสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีบางประการของเอนไซม์.....35
4. ผลการทดลอง.....41
    4.1 ผลการตรวจสอบความสามารถในการเจริญและ
        การผลิตไคทิเนสจาก *Bacillus* sp.....41
    4.2 ผลการจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ในการทดลอง.....41
    4.3 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อติดตามการเจริญและ
        เวลาที่เหมาะสมในการผลิตไคทิเนส.....43
    4.4 สมบัติของเอนไซม์อย่างหยาบที่แยกได้จาก *Bacillus cereus*.....43

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.5 ผลการเตรียมไคทิเนสจาก *Bacillus cereus* ให้บริสุทธิ์บางส่วน.....46
4.6 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไคทิเนส
โดยดิสค์-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีส.....48
4.7 สมบัติทางกายภาพและชีวเคมีบางประการของ
ไคทิเนสที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน.....51
5. วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง.....68
รายการอ้างอิง.....80
ภาคผนวก.....87
ประวัติผู้เขียน.....105

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. ไคทิเนสจากแหล่งต่างๆ 15
2. ผลการทำไคทิเนสจาก *Bacillus cereus* ให้บริสุทธิ์บางส่วน.....50
3. ความจำเพาะของไคทิเนสต่อ p-nitrophenyl chitooligosaccharides.....66

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.	โครงสร้างของไคทิน	2
2.	โครงสร้างของ α-ไคทิน ก.bc projection ข. ab projection	3
3.	โครงสร้างของ β-ไคทิน ก. ab projection ข. ac projection ค. bc projection	4
4.	โครงสร้างของไคโตแซน	6
5.	ก. รูปแบบของ endochitinase ที่เข้าตัดพันธะ β-1,4 glycosodic ของไคทินและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น	9
	ข. รูปแบบของ chitobiosidase ที่เข้าตัด พันธะ β-1,4 glycosodic ของไคทินและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น	10
	ค. รูปแบบของ N-acetylglucosaminidase และ chitobiase ที่เข้าตัดพันธะ β-1,4 glycosidic ของไคทินและไคโทไบโอส ตามลำดับและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น	11
6.	ขั้นตอนการทำไคทิเนสจาก *Bacillus cereus* ให้บริสุทธิ์บางส่วน	32
7.	ผลการตรวจสอบความสามารถในการเจริญและผลิตไคทิเนสของ *Bacillus* sp. ในอาหารวุ้นแข็งที่มีคอลลอยดัลไคทินอยู่ 0.2 เปอร์เซ็นต์ (W/V) ที่อุณหภูมิ 37 42 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	42
8.	ก. รูปแบบการเจริญและแอคติวิตีของไคทิเนสจาก *Bacillus cereus* ที่เลี้ยงใน chitin medium pH 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	44
	ข. รูปแบบของโปรตีน แอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะของไคทิเนสจาก *Bacillus cereus* ที่เลี้ยงใน chitin medium pH 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	44
9.	ผลของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์อย่างหยาบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	45
10.	ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์อย่างหยาบ	47

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

11. ผลของการแยกเอนไซม์ด้วยคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน.....49

12. รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆ ของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน แยกโดยดิสค์-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีส.
ก. ผลการย้อมโปรตีน ข. ผลการย้อมแอคติวิตี.....52

13. รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆ ของการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วน แยกโดยเอสดีเอส-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีส
ก. ผลการย้อมโปรตีน ข. ผลการย้อมแอคติวิตี.....53

14. ความสัมพันธ์ระหว่าง relative mobility และ log ของน้ำหนักโมเลกุล ของโปรตีนมาตรฐานในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของไคทิเนสโดย วิธีเอสดีเอส-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีส.....54

15. ผลการตรวจสอบไกลโคโปรตีนของไคทิเนสที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทไคทิน หลังจากแยกโดยดิสค์-พอลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีส
ก. ผลการย้อมไกลโคโปรตีน ข. ผลการย้อมโปรตีน.....56

16. ผลของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์รีเจนเนอเรทเทดไคทิน อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....57

17. ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์ รีเจนเนอเรทเทดไคทิน.....58

18 ก.ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการบ่มสารละลายเอนไซม์และ NAG ที่เกิดขึ้น.....60
ข. ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของคอลลอยดัลไคทินและ NAG ที่เกิดขึ้น.....60
ค. Linewaver-Burk Plot ของ 1/V และ 1/[colloidal chitin].....61

19. ผลการศึกษาความเป็นกรด-ด่างต่อความเสถียรของไคทิเนสที่ ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้ว.....62

20. ผลการศึกษาความสามารถของไคทิเนสต่อสับสเตรทชนิดต่างๆ 65

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

21. ผลการตรวจสอบแอคติวิตีของไคทิเนสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้ว จาก *Bacillus cereus* เปรียบเทียบกับแอคติวิตีของไคทิเนสจาก *Serratia marcescens* ที่ใช้ในทางการค้า.....67

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

NAG	=	N-acetylglucosamine
pNP	=	p-nitrophenol
BSA	=	bovine serum albumin
DEAE	=	diethylaminoethyl
CM	=	carboxymethyl
min	=	minute
µmol	=	micromole
ml	=	millilitre
mM	=	millimolar
M	=	molar
A	=	Absorbance
MW	=	Molecular Weight
kDa	=	kilodalton
°C	=	degree celsius
TEMED	=	tetramethylethylenediamine

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย