# การศึกษาสมบัติของอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus spp.* ชนิดทนต่อสภาวะด่าง

นางสาว กฤษณา โพธิสารัตนะ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2535

ISBN 974-581-479-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

019164 i172000 64

# CHARACTERIZATION OF ALKALINE PROTEASE FROM ALKALOPHILIC *Bacillus spp.*

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Miss Kritsana Potisarattana

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Sciences

Biotechnolgy Program

Graduate School

Chulalongkorn University

1992

ISBN 974-581-479-2

| | |
|---|---|
| **หัวข้อวิทยานิพนธ์** | การศึกษาสมบัติของอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus spp.* ชนิดทนต่อสภาวะด่าง |
| **โดย** | นางสาว กฤษณา โพธิสารัตนะ |
| **หลักสูตร** | เทคโนโลยีชีวภาพ |
| **อาจารย์ที่ปรึกษา** | ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ ขาวิวรรธน์ |
| **อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม** | รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีนา ชวนิชย์ |

---

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพาพร สิมปเสนีย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ ขาวิวรรธน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีนา ชวนิชย์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

กฤษณา โพธิสารัตนะ : การศึกษาสมบัติของอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก Bacillus spp. ชนิดทนต่อสภาวะด่าง (CHARACTERIZATION OF ALKALINE PROTEASE FROM ALKALOPHILIC Bacillus spp.) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.วินิจ ขำวิวรรธน์. 80 หน้า. ISBN 974-581-479-2

Bacillus sp. B-2 เป็น Alkalophilic bacillus ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานฟอกหนัง สามารถเจริญได้ตั้งแต่ pH 8 ขึ้นไป และที่อุณหภูมิ 35-55°ซ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย 3% กลูโคส และ 3% กากถั่วเหลือง สามารถสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอสได้สูงสุด ที่ 56 ชม. วัดแอคติวิตีได้ 380 หน่วย/มล. ปริมาณกลูโคสที่มากเกินจะยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์สามารถทำได้ภายใน 2 ขั้นตอน โดย วิธีคอลัมน์โครมาโตรกราฟีบน DEAE-sephadex A-50 และ CM-sephadex C-50 ให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะ 46.3 หน่วย/มก.โปรตีน ที่ pH 10.5 55°ซ เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์ และ แคลเซียมอิออน 2 มิลลิโมลาร์ ช่วยในการรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์ สารยับยั้ง PMSF และ EDTA 10 มิลลิโมลาร์ ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้สมบูรณ์ และอิออนโลหะของโคบอลท์สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ จึงจัดเอนไซม์นี้อยู่ในกลุ่ม Alkaline metalloprotease เอนไซม์สามารถไฮโดรไลส์ได้ทั้งสับสเตรทธรรมชาติ และ สังเคราะห์ ให้ค่า $K_m$ ของ casein, BSA, BAEE และ BAPNA เท่ากับ 22.5, 5 มก./มล. และ 1.5, 0.2 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ประมาณจากวิธีเจลฟิลเตรชันได้เท่ากับ 26,000 ดาลตัน และ 24,000 ดาลตัน โดยวิธีเอสดีเอสโพลีอะคลิลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซีส

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต กฤษณา โพธิสารัตนะ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

## C126035 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD : ALKALINE PROTEASE/BACILLUS spp.

KRITSANA POTISARATTANA : CHARACTERIZATION OF ALKALINE PROTEASE FROM ALKALOPHILIC Bacillus spp. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. VINICH KHAMVIWATH, Ed.D. 80 pp. ISBN 974-581-479-2

An alkalophilic Bacillus sp. B-2 was isolated from tanning waste water and shown to produce an alkaline metalloprotease. It could grow at pH higher than 8 and at 35-55°C. The enzyme production reached its maximum level of 380 U/mi after 56 hours of cultivation in alkaline medium (pH 10.5) containing 3% glucose and 3% soybean meal. Excessive amount of glucose reduced protease production by this organism which might be due to catabolite repression production of protease. The protease was easily purified from culture fluid by only two steps which were consecutively passing through DEAE-sephadex A-50 and CM-sephadex C-50. The specific activity of the enzyme toward casein was about 46.3 U/mg of protein. The optimum pH and temperature for the enzyme activity were 10.5 and 55°C in the presence of 2 mM calcium ions. The enzyme was not completely inactivated by PMSF and EDTA but was activated by $Co^{2+}$. Substrate specificity ($K_m$) for casein, BSA, BAEE and BAPNA were 22.5, 5 mg/ml, 1.5 and 0.2 mM, respectively. The molecular weight of the enzyme estimated by gel filtration method was about 26,000 dalton. The SDS-PAGE method gave about 24,000 dalton.

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต กฤษณา โพธิสารัตนะ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2534 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

# กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รองศาสตราจารย์ ดร. สุรีนา ชวนิชย์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วินิจ ขาวิวรรธน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆของการวิจัยมาด้วยดีตลอด คุณปวีณา พงษ์ดนตรี พี่ เพื่อน และน้อง รวมทั้งบุคคลากรในภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ได้ให้กำลังใจ และความช่วยเหลือเป็นอย่างมาก จึงขอขอบพระคุณ และขอบคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ท้ายนี้ ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา ซึ่งสนับสนุนในด้านการเงินและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

# สารบัญ


หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญรูป ..... ญ

คำย่อ ..... ฏ

บทที่

1 บทนำ ..... 1

2 ครุภัณฑ์ และเคมีภัณฑ์ ..... 12

3 วิธีดำเนินงานวิจัย .....

- การคัดเลือก การเก็บรักษา และการจำแนกสกุลของแบคทีเรีย ..... 14
- การเลี้ยงเชื้อ และการศึกษาสภาวะเหมาะสมในการชักนำให้แบคทีเรียสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอส ..... 16
- การเตรียม และเก็บรักษาเอนไซม์ ..... 17
- การศึกษาสภาวะเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ก่อนทำให้บริสุทธิ์ ..... 18
- การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ..... 18
- การศึกษาสมบัติของอัลคาไลน์โปรตีเอสหลังการทำให้บริสุทธิ์ ..... 20

4 ผลการทดลอง

- การคัดเลือกแบคทีเรีย ..... 23
- การจำแนกสกุลของแบคทีเรีย B-2 ..... 23
- การศึกษาสภาวะการเจริญของ *Bacillus sp.* B-2 ..... 23
- การศึกษาส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชักนำให้แบคทีเรียสังเคราะห์

เอนไซม์โปรตีเอส ..... 27
- การศึกษาสภาวะเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส ..... 34
- การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ ..... 35
- การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยวิธีโพลีอะคลิลาไมด์เจล อิเลคโตรโฟรีซิส ..... 40
- การศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรตีเอสที่แยกได้ ..... 40
5 วิจารณ์ และสรุปผลการทดลอง ..... 59
บรรณานุกรม ..... 67
ภาคผนวก ..... 73
กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด ..... 78
กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณไทโรซีน ..... 79
ประวัติผู้เขียน ..... 80

# สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง

ก. สมบัติของ Subtilisin Carlsberg และ Subtilisin BPN ..... 9

ข. สมบัติของ Thiol protease จากพืชที่ใช้ในอุตสาหกรรม ..... 10

1 ความสามารถของแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสภาวะต่าง ๆ ในการย่อยสลายโปรตีน และ โปรตีเอสแอคติวิตี จากตัวอย่างดิน และน้ำ ..... 24

2 ลักษณะทางกายภาพ และผลการตรวจสอบทางชีวเคมีของ *Bacillus sp.* B-2 . 25

3 ผลของแคลเซียมอิออนต่อการทำงานของเอนไซม์ ..... 36

4 สรุปขั้นตอนการทำเอนไซม์โปรตีเอสให้บริสุทธิ์ ..... 42

5 ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์ ..... 44

6 ผลของสารยับยั้ง PMSF และ EDTA ต่อการทำงานของเอนไซม์ ..... 45

7 ผลของสารยับยั้งบางชนิดต่อการทำงานของเอนไซม์ ..... 46

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญรูป

หน้า

รูปที่

1 และ 2 ลักษณะของเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus sp.* B-2 และตำแหน่งสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า ..... 26

3 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของ *Bacillus sp.* B-2 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ I ..... 28

4 ผลของ pH ต่อการเจริญของแบคทีเรีย เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ I ..... 29

5 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมด้วยแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ..... 30

6 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่แปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ..... 31

7 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เติมด้วยแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ..... 32

8 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงที่แปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ..... 33

9 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ (crude enzyme)..... 37

10 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์ (crude enzyme) ..... 38

11 การเจริญ แอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส และ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เวลาต่างๆ ..... 39

12 รูปแบบของโปรตีน และแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสจากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ . 41

13 รูปแบบของโปรตีนจากขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ..... 43

14 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์ ..... 48

15 ผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ ..... 49

16 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ ..... 50

17 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ ..... 51

18 Lineweaver Burk Plot ของเอนไซม์โปรตีเอส เมื่อใช้เคซีนเป็นสับสเตรท ... 53

19 Lineweaver Burk Plot ของเอนไซม์โปรตีเอส เมื่อใช้ BSA เป็นสับสเตรท .. 53

20 Lineweaver BurK Plot ของเอนไซม์โปรตีเอส เมื่อใช้ BAEE เป็นสับสเตรท . 54

21 Lineweaver Burk Plot ของเอนไซม์โปรตีเอส เมื่อใช้ BAPNA เป็นสับสเตรท 54

22 รูปแบบของโปรตีนเมื่อผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-75 ..... 55

23 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนมาตรฐาน กับ
ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์จากวิธีเจลฟิลเตรชัน ..... 56

24 รูปแบบของโปรตีนมาตรฐาน และเอนไซม์โปรตีเอส จากการทำเอสดีเอสโพลี
อะคลิลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิส ..... 57

25 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนมาตรฐาน กับ
ค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ที่ได้จากการทำเอสดีเอสโพลีอะคลิลาไมด์เจล
อิเลคโตรโฟรีซิส ..... 58

# คำย่อ

ชม. = ชั่วโมง

°ซ = องศาเซลเซียส

มก. = มิลลิกรัม

ก. = กรัม

ซม. = เซนติเมตร

มม. = มิลลิเมตร

*B.* = *Bacillus*

BSA = Bovine Serum Albumin

CM = Carboxymethyl

DEAE = Diethylaminoethyl

A = Absorbance

EDTA = Ethylenediaminetetraacetic acid

PMSF = Phenylmethylsulfonylfluoride

Km = Michaelis-Menten Constant

Vmax = Maximum velocity

MW = Molecular weight

TEMED = Tetramethylethylenediamine

BAEE = Nα- Benzoyl-L-Arginine Ethyl Ester

BAPNA = Nα- Benzoyl-DL-Arginine p-Nitroanilide