การคัดแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียทนร้อนที่สร้างโปรติเอส

นายเจษฎา บูรณ์ประเสริฐ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545
ISBN 974-17-3116-7
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEASE PRODUCING THERMOTOLERANT BACTERIA

Mr. Jessada Boonprasert

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2002
ISBN 974-17-3116-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียทนร้อนที่สร้างโปรติเอส
โดย	นายเจษฎา บูรณ์ประเสริฐ
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิชญางกูร)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เจษฎา บูรณ์ประเสริฐ : การคัดแยกและลักษณะสมบัติของแบคทีเรียทนร้อนที่สร้างโปรติเอส (ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEASE PRODUCING THERMOTOLERANT BACTERIA.) อ. ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์, 80 หน้า, ISBN 974-17-3116-7

จากตัวอย่างน้ำ 9 ตัวอย่างและตัวอย่างดิน 15 ตัวอย่างที่เก็บจากแหล่งที่มีอุณหภูมิสูง 14 แห่ง สามารถแยกแบคทีเรียชอบร้อน 65 องศาเซลเซียส ได้ 42 ไอโซเลต เมื่อทดสอบการสร้างวงใสรอบโคโลนีบนอาหารแข็ง BY ที่มี skim milk 1 % พบว่ามีเพียง 12 ไอโซเลต ที่ให้วงใสรอบโคโลนีที่มีความกว้างตั้งแต่ 2.5 มม. ขึ้นไป เลือกไอโซเลตที่มีโปรติเอสแอคติวิตีสูงสุดคือ RW 60-6 มาศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีโดยอาศัย Bergey's Manual of Systematic Bacteriology พบว่าน่าจะเป็น *Bacillus stearothermophilus*

นำโปรติเอสจากเชื้อ RW60-6 มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และผ่านคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุดีอีเออี ไบโอเจล-เอ พบว่าแยกโปรติเอสได้ 2 ชนิด คือ โปรติเอส U (โปรติเอสที่ไม่จับกับตัวกลาง) และ โปรติเอส B (โปรติเอสที่จับกับตัวกลาง) มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 13.16 เท่า และ4.77 เท่าตามลำดับ และมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 10.68 % และ 8.28 % ของ crude เอนไซม์ตามลำดับ เมื่อนำมาตรวจหาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์ทั้งสองประกอบด้วยโปรติเอสที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน 2 ชนิด ดังนี้ โปรติเอส U ประกอบด้วยโปรติเอสขนาด 200,000 และ 33,000 ดาลตัน ส่วนโปรติเอส B ประกอบด้วยโปรติเอสขนาด 197,000 และ 35,000 ดาลตัน

จากการศึกษาลักษณะสมบัติของโปรติเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน พบว่า โปรติเอสทั้งสองคล้ายคือมีอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ที่ 65 องศาเซลเซียส และ 7.0 ตามลำดับ โปรติเอสทั้งสองมีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที และเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่าง 7.0-8.5 เป็นเวลา 30 นาที นอกจากนี้โปรติเอสทั้งสองถูกยับยั้งได้ด้วย EDTA จึงจัดเป็น นิวทรัลเมทัลโลโปรติเอส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา 2545

ลายมือชื่อนิสิต.....เจษฎา.....บูรณ์ประเสริฐ.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4372419623 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: Thermophilic bacteria, Thermostable protease, *Bacillus* sp., Partially purification.

JESSADA BOONPRASERT: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEASE PRODUCING THERMOTOLERANT BACTERIA. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. DR. CHARNWIT KOSITANONT, 80 pp. ISBN 974-17-3116-7

From 9 water samples and 15 soil samples, 42 protease producing bacterial isolates were obtained at 65 degree Celsius. Only 12 isolates could produce clear zone of 2.5 mm or more on BYmedium with 1%. The isolate RW60-6 gave the highest enzyme activity and was identified as *Bacillus stearothermophilus*, according to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

The extracellular proteases of the isolate RW60-6 were partially purified by ammonium sulfate fractionation and DEAE Biogel A ion-exchange chromatography. Ion-exchange chromatography resulted in separation of the enzyme preparation into one major (protease U) and one minor (protease B) peak. The two-step purification scheme resulted in 13.16-fold purification and an overall recovery of 10.68 % of protease U and 4.77-fold purification and 8.28% recovery of protease B. SDS-PAGE assay showed two bands with neutral protease activity, at 33 and 200 kDa of protease U and at 35 and 197 kDa of protease B.

Both of partially purified proteases had optimum temperature and pH of 65 degrees Celsius and 7.0. Protease U and B, when together, retained 100% activity at 65 degrees Celsius for 30 min. and 80% activity at pH 7.0-8.5 for 30 min. The enzymes activity was inhibited by metal chelating agents, EDTA. They can thus be classified as neutral-metalloproteases.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department Microbiology
Field of study Industrial Microbiology
Academic year 2002

Student's signature.....
Advisor's signature.....
Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษาให้คำแนะนำและแนวทางในการทำงานวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจทานแก้ไขและสนับสนุนในด้านต่าง ๆ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ จึงขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิชญางกูร, รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และรองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และช่วยปรับปรุงต้นฉบับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน รวมทั้งขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์ ที่กรุณาอนุเคราะห์ตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำในการทำวิจัย

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ความอนุเคราะห์ทุนอุดหนุนงานวิจัยนี้ รวมทั้งขอบคุณเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ความสะดวกต่างๆ

ขอขอบคุณคุณอุรัจฉวี อุณหเลขกะ, คุณโตมร ทองน้ำวน, คุณวทัญญุตา ภู่โยธิน, คุณนพรัตน์ วานิชสุขสมบัติ, คุณพัชรวิภา ใจจักรคำ, คุณอภิรักษ์ วิเศษศรีพงษ์, คุณเวฟุรีย์ ทองคำ, คุณวิชุตา เหล่าเรืองธนา, คุณปฏิมา เพิ่มพูนพัฒนา, คุณปวีณา รัตนมาศ, คุณอนันตพงษ์ สุขเกษ, คุณสุหทัยา จิระนันทิพร และคุณศิโรจน์ ศรีสรากรณ์ สำหรับคำปรึกษา คำแนะนำ เทคนิคในการทำงานวิจัย และความช่วยเหลือในการทำวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอกราบขอบพระคุณคุณแม่, คุณป้า และขอบคุณพี่น้องของข้าพเจ้าที่ให้การสนับสนุนทางด้านกำลังใจและกำลังทรัพย์ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... จ

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญรูป..... ฌ

อธิบายคำย่อ..... ญ

บทที่

1.บทนำ..... 1

2.เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3

2.1 เอนไซม์โปรติเอส.....3

2.2 แหล่งของโปรติเอส.....3

2.3 ชนิดของโปรติเอส..... 4

2.4 การประยุกต์ใช้โปรติเอสในเชิงอุตสาหกรรมและพานิชย์..... 8

2.5 การหาแอคติวิตีของโปรติเอส.....10

2.6 โปรติเอสจากแบคทีเรียชอบร้อน 11

2.7 การทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์..... 13

3.อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย..... 18

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย..... 18

สารเคมีที่ใช้วิจัย..... 19

วิธีดำเนินการวิจัย.....20

3.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสที่ทนอุณหภูมิสูง
จากตัวอย่างดิน และน้ำ..... 20

3.2 ศึกษาลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่คัดได้.....21

3.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตโปรติเอส.....24

3.4 การทำให้โปรติเอสให้บริสุทธิ์บางส่วน..... 25

3.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรติเอสและ
การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรติเอส..... 26
3.6 การศึกษาลักษณะสมบัติเบื้องต้นของโปรติเอส..... 27
4.ผลการวิจัย..... 29
4.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสที่ทนอุณหภูมิสูง..... 29
4.2 การศึกษาลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่คัดได้..... 34
4.3 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรติเอส..... 39
4.4 การทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์บางส่วน..... 44
4.5 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ และการหาน้ำหนักมวลโมเลกุล
ของโปรติเอส..... 47
4.6 ลักษณะสมบัติบางประการของโปรติเอส..... 50
5.สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... 55
สรุปผลการวิจัย..... 55
อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... 57
รายการอ้างอิง..... 61
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก สูตรอาหารและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 67
ภาคผนวก ข วิธีเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง..... 70
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน..... 79
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 80

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 จุลินทรีย์จำพวกชอบร้อนที่สร้างโปรติเอสที่เสถียรต่ออุณหภูมิสูง 12
2.2 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของโปรติเอสที่ได้จากจุลินทรีย์จำพวก
เอ็กทรีมเทอร์โมไฟล์, เทอร์โมไฟล์ และมีโซไฟล์..... 13
4.1 สถานที่เก็บและลักษณะของตัวอย่างที่จะนำมาทำการทดลอง..... 29
4.2 แสดงจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียที่แยกจากตัวอย่าง..... 30
4.3 แสดงขนาดความกว้าง Clear zone ring ของแต่ละไอโซเลต
บนอาหารแข็ง BY ที่มี1%skim milk.....30
4.4 ลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย
ไอโซเลตRW60-6,TA-1 และ TN4..... 34
4.5 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีเบื้องต้น ของแบคทีเรีย
RW60-6, TA-1 และ TN4.....37
4.6 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรีย RW60-6, TA-1 และ TN4.....38
4.7 การหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่เหมาะสม
ในการตกตะกอนโปรติเอส.....44
4.8 ขั้นตอนการทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์บางส่วน..... 47
4.9 ผลของตัวยับยั้งต่อการทำงานของโปรติเอส..... 54
5.1 สมบัติบางประการของโปรติเอสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน
จากเชื้อแบคทีเรีย RW60-6.....57

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 ปริมาณการขายเอนไซม์ชนิดต่างๆ.....3

4.1 กราฟแสดงแอคติวิตีของแบคทีเรียที่สร้าง clear zone ring ขนาดกว้างตั้งแต่ 0.25 ซม..... 32

4.2 กราฟแสดงแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะของRW60-6, TA-1 และ TN4.....33

4.3 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง และการติดสีแกรมบวกของไอโซเลต RW60-6..... 35

4.4 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง และการติดสีแกรมบวกของไอโซเลต TA-1..... 35

4.5 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง และการติดสีแกรมบวกของไอโซเลต TN4..... 36

4.6 กราฟแสดงการเจริญและแอคติวิตีของ RW60-6 ณ เวลาต่างๆ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และ 60 องศาเซลเซียส 40

4.7 กราฟแสดงการเจริญและแอคติวิตีของ RW60-6 ณ เวลาต่างๆ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ 70 องศาเซลเซียส.....41

4.8 กราฟแสดงการเจริญและแอคติวิตีของ RW60-6 ณ เวลาต่างๆ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้น 6.0..... 42

4.9 กราฟแสดงการเจริญและแอคติวิตีของ RW60-6 ณ เวลาต่างๆ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้น 7.0 และ 8.0..... 43

4.10 การทำโปรติเอสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ..... 46

4.11 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรติเอสโดยการทำ SDS-PAGE และการย้อมแอคติวิตี SDS-PAGE.....48

4.12 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล กับระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่บนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส..... 49

4.13 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของโปรติเอส.....50

4.14 ความเสถียรของโปรติเอสต่ออุณหภูมิ..... 51

4.15 อิทธิพลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการทำงานของโปรติเอส..... 52

4.16 ความเสถียรของโปรติเอสต่อค่าความเป็นกรดด่าง..... 53

อธิบายคำย่อ

คำย่อ	คำเต็ม
ชม.	ชั่วโมง
ซม.	เซนติเมตร
มก.	มิลลิกรัม
มม.	มิลลิเมตร
มล.	มิลลิลิตร
%	เปอร์เซ็นต์
M	โมลาร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย