รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การศึกษาเอนไซม์ย่อยโปรตีนของแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง

(Studies of Proteolytic Enzyme Produced from Alkalophilic Bacteria)

โดย

ผศ. ดร. ประเสริฐ สันตินานาเลิศ[1]

และ

รศ. ดร. นงพร โตวัฒนะ[2]

ภาควิชาจุลชีววิทยา[1] และ ภาควิชาชีวเคมี[2]

คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ. 2538-2539

Order Key 17830
BIB Key 153487

PSU
เลขหมู่ QR82.B3 P72 1998
22 ส.ค. 2542

การผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนจาก *Bacillus* sp. PS719 ที่ชอบด่างและอุณหภูมิสูง

ประเสริฐ สันตินานาเลิศ[1] สุดเอื้อม พัฒนใหญ่ยิ่ง[2] และ นงพร โตวัฒนะ[3]

Abstract

Suntinanalert, P., Pattanayaiying, S. and Hutadilok-Towatana, N.
Production of protease from thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. PS719
Songklanakarin J. Sci. Technol., 1998, 20(3) : 333-345

A thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. strain PS719 isolated from hot spring soil sample grew optimally between pH 9.0-11.0 and at the temperature of 50°C. *Bacillus* sp. PS719 produced extracellular protease in the pH range of 9.0-11.5 at 55°C. It exhibited the highest activity on azocasein, haemoglobin and casein, respectively. Surfactants at concentration of 0.15% could inhibit the enzyme activity up to 25%. The enzyme was identified to be a serine proteinase since it was completely inhibited by phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF) and 3,4-dichloroisocoumarin (DCI) at 10 mM.

***Bacillus* sp. PS719 showed a doubling time of 82 minutes with specific growth rate (μ) of 0.51 per hour and produced the enzyme to a maximum of 27 units/ml under shaking flask conditions. In batch culture using 2-L fermentor at constant pH of 9.0, *Bacillus* sp. PS719 showed a doubling time of 57 minutes with specific growth rate of 0.73 per hour and produced the highest enzyme activity of 76 units/ml. Under repeated batch culture conditions in the fermentor at constant pH of 9.0, the bacterium showed a doubling time of 40 minutes with specific growth rate of 1.03 per hour and produced the enzyme to a maximum of 49 units/ml. Additionally, when *Bacillus* sp. PS719 was cultivated in a continuous system, it**

[1,2]Department of Microbiology, [3]Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla 90112, Thailand.

[1]Ph.D.(Microbiology), ผู้ช่วยศาสตราจารย์, [2]วท.บ.(ชีววิทยา), ภาควิชาจุลชีววิทยา, [3]Ph.D.(Biochemistry), ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112
รับต้นฉบับ 10 พฤศจิกายน 2540 รับลงพิมพ์ 10 พฤษภาคม 2541

showed continuous production of enzyme with the average enzyme activity of 45 units/ml throughout 120 hours without any mutation.

Key words : protease, alkaline protease, thermostable protease, *Bacillus*

บทคัดย่อ

ประเสริฐ สันตินานาเลิศ สุดเอื้อม พัฒนใหญ่ยิ่ง และ นงพร โตวัฒนะ

การผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนจาก *Bacillus* sp. PS719 ที่ชอบด่างและอุณหภูมิสูง

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2541 20(3) : 333-345

Bacillus สายพันธุ์ PS719 ที่แยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณน้ำพุร้อน เป็นแบคทีเรียที่ชอบด่างและอุณหภูมิสูง ที่เติบโตได้ดีที่พีเอช 9.0-11.0 อุณหภูมิ 50°ซ และสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนออกสู่นอกเซลล์ได้ดีที่พีเอช 9.0-11.5 และอุณหภูมิ 55°ซ เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับสเตรทเอโซเคซีนมากที่สุด รองลงมาคือ ฮีโมโกลบินและเคซีน ตามลำดับ นอกจากนี้สารลดแรงตึงผิวที่ระดับความเข้มข้น 0.15% มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้ไม่เกิน 25% เอนไซม์ย่อยโปรตีนนี้จัดเป็นซีรีนโปรติเนส เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งด้วย phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF) และ 3,4-dichloroisocoumarin (DCI) ที่ระดับความเข้มข้น 10 mM

Bacillus สายพันธุ์ PS719 ที่เพาะเลี้ยงโดยวิธี batch culture ในฟลาสก์เขย่า มีเวลาเติบโตเป็นสองเท่า 82 นาที อัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) 0.51 ต่อชั่วโมง และกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 27 หน่วยต่อมล. ขณะที่การเพาะเลี้ยงโดยวิธี batch culture ในถังหมักที่ควบคุมพีเอช 9.0 เชื้อแบคทีเรียมีเวลาเติบโตเป็นสองเท่า 57 นาที อัตราเติบโตจำเพาะ 0.73 ต่อชั่วโมง และกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 76 หน่วยต่อมล. การเพาะเลี้ยงโดยวิธี repeated batch culture ในถังหมักที่ควบคุมพีเอช 9.0 เชื้อแบคทีเรียมีเวลาเติบโตเป็นสองเท่ากับ 40 นาที อัตราเติบโตจำเพาะเท่ากับ 1.03 ต่อชั่วโมง และกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 49 หน่วยต่อมล. ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่ควบคุมพีเอชที่ 9.0 พบว่า เชื้อแบคทีเรียนี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยไม่มีการกลายพันธุ์ และกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนโดยเฉลี่ยเท่ากับ 45 หน่วยต่อมล.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF AN EXTRACELLULAR PROTEASE FROM ALKALOPHILIC AND THERMOPHILIC *BACILLUS* sp. PS719

NONGPORN HUTADILOK-TOWATANA,[1*] ANONGNAT PAINUPONG,[1] and PRASERT SUNTINANALERT[2]

Department of Biochemistry[1] and Department of Microbiology[2], Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat-Yai 90112, Thailand

* Corresponding author.

ABSTRACT

An alkaline protease was purified to apparent homogeneity from culture supernatants of *Bacillus* sp. PS719, a novel alkalophilic and thermophilic bacterium isolated from a thermal spring soil sample, by ammonium sulfate precipitation followed by DEAE-cellulose and α-casein agarose columns, respectively. The purified enzyme migrated as a single protein band of 42 kDa during both denaturing and non-denaturing gel electrophoresis, suggesting that it consists of a single polypeptide chain. Its isoelectric point was found to be about 4.8. The protease exhibited maximum activity towards azocasein at pH 9.0 and

at 75 °C. The enzyme activity was stimulated by Ca^{2+}, but was inhibited in the presence of Fe^{2+} or Cu^{2+}. The enzyme was stable in the pH range of 8.0 to 10.0 and up to 80 °C in the absence of Ca^{2+}. Since phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 3,4-dichloroisocoumarin (DCI) as well as N-α-*p*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) completely inhibited the activity, this enzyme appears to be trypsin like-serine protease. Among various oligopeptidyl-*p*-nitroanilides tested, the protease showed a preference for arginine on the carboxylic side of the scissile bond of the substrate, liberating *p*-nitroaniline from N-carbobenzoxy (CBZ)-L-arginine-*p*-nitroanilide with the K_m and V_{max} values of 0.6 mM and 1.0 μmol.min^{-1}.mg protein^{-1}, respectively.

[Key words: *Bacillus* sp., alkalophilic, thermophilic, trypsin-like protease]