



รายงานการวิจัย เรื่อง

การคัดแยกจุลินทรีย์ผลิตโปรตีนเอสเพื่อใช้สำหรับเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์น้ำตาลเอสเทอร์ในตัวทำละลายอินทรีย์

ISOLATION OF PROTEASE PRODUCING MICROORGANISMS FOR CATALYZING SUGAR FATTY ACID
ESTERS IN ORGANIC SOLVENTS

สินธุ์วัฒน์ ฤทธิธรรม

SINTHUWAT RITTHITHAM

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

ปีที่ดำเนินการเสร็จ พ.ศ. 2559



Research Report

ISOLATION OF PROTEASE PRODUCING MICROORGANISMS FOR CATALYZING SUGAR FATTY ACID ESTERS IN ORGANIC SOLVENTS

การคัดแยกจุลินทรีย์ผลิตโปรติเอสเพื่อใช้สำหรับเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์น้ำตาลเอสเทอร์ในตัวทำละลายอินทรีย์

SINTHUWAT RITTHITHAM

สินธุ์วัฒน์ ฤทธิธรรม

This research is financially supported by
Silpakorn University Research and Development Institute
(Fiscal Year 2015)

Year of completion: 2016

สารบัญ

บทคัดย่อ	
Abstract	
บทนำ	1
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
วิธีดำเนินการวิจัย	17
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	
การคัดแยกจุลินทรีย์ผลิต protease ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์	22
การแยกบริสุทธิ์ protease ที่ผลิตจาก <i>Pseudomonas aeruginosa</i> สายพันธุ์ SU2	25
การศึกษาคุณลักษณะบางประการของ protease ที่แยกบริสุทธิ์แล้ว	29
การศึกษาการสังเคราะห์ trehalose ester ในตัวทำละลายอินทรีย์ด้วย protease	38
สรุปผลการทดลอง	41
บรรณานุกรม	43
ภาคผนวก	49
ประวัตินักวิจัย	50

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ 2558 จากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร และได้รับการสนับสนุนการใช้ห้องปฏิบัติการและเครื่องมือวิเคราะห์จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ **การคัดแยกจุลินทรีย์ผลิตโปรตีนเพื่อใช้สำหรับเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์น้ำตาลเอสเทอร์ ในตัวทำละลายอินทรีย์**

ชื่อผู้วิจัย **สินธุ์วัฒน์ ฤทธิธรรม** (หัวหน้าโครงการ)
คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร

แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดินประจำปี **2558**
สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีที่เสร็จ **2560**

ประเภทการวิจัย การวิจัยประยุกต์
สาขาวิชา (อ้างอิงตามวช.) เทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

การคัดเลือกจุลินทรีย์ผลิตโปรตีนที่มีความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์จากตัวอย่างดินสามารถคัดแยกจุลินทรีย์ได้ 8 สายพันธุ์ โดย *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2 เป็นจุลินทรีย์ผลิตโปรตีนที่มีความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ทดสอบมากที่สุด ผลการแยกบริสุทธิ์โปรตีนที่ผลิตจากจุลินทรีย์สายพันธุ์ดังกล่าว พบว่าสามารถแยกโปรตีนให้มีค่าความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 58.4 เท่า และมีผลได้ของกระบวนการแยกเท่ากับ 33.2% ขนาดโมเลกุลของโปรตีนเท่ากับ 33.86 kDa และมีค่า pI เท่ากับ 6.25 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเร่งปฏิกิริยาของโปรตีนที่ผ่านกระบวนการแยกบริสุทธิ์คือที่ pH 8.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความคงตัวในช่วง pH 6-8 อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส ไอออนของ Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} ให้ผลกระตุ้นการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ขณะที่ Co^{2+} , Cu^{2+} และ Zn^{2+} ยับยั้งเอนไซม์ โปรตีนจากจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้อยู่ในกลุ่มของ metalloprotease เนื่องจากถูกยับยั้งด้วย EDTA และ 1,10 phenanthroline โปรตีนบริสุทธิ์ที่แยกได้มีความคงตัวในสารลดแรงตึงผิว (30% v/v triton X, 50% v/v Tween 20, 50% v/v Tween 80) สารออกซิไดซ์ (30% v/v H_2O_2) และในตัวทำละลายอินทรีย์ (75% v/v toluene) โดยมีค่าครึ่งชีวิต (half-life) เท่ากับ 30 ชั่วโมง ผลการสังเคราะห์ trehalose ester ด้วยโปรตีนสกัดหยาบจาก *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ SU2 ใน DMF:DMSO (1:1 v/v) พบว่าเกิดผลิตภัณฑ์ที่มี retention time เท่ากับ 6.24 นาทีเมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC

คำสำคัญ : โปรตีน, ตัวทำละลายอินทรีย์, น้ำตาลเอสเทอร์, เทคโนโลยีสะอาด

Research Title ISOLATION OF PROTEASE PRODUCING MICROORGANISMS FOR CATALYZING
SUGAR FATTY ACID ESTERS IN ORGANIC SOLVENTS

Researcher SINTHUWAT RITTHITHAM

Faculty of engineering and industrial technology SILPAKORN UNIVERSITY

Research Grants Fiscal Year 2015

Research and Development Institute, Silpakorn University

Year of completion 2016.....

Type of research applied research

Subjects (based NRCT) Biotechnology.

ABSTRACT

Eight strains of bacteria producing organic solvent stable alkaline protease were isolated from soil samples. Among them, *Pseudomonas aeruginosa* strain SU2 could produce the protease highly stable in tested organic solvents. The protease was purified to homogeneity with the purification fold of 58.4 and 33.2% yield. The molecular mass and pI were determined to 33.86 kDa and 6.25, respectively. The protease had an optimum pH of 8.0 and optimum temperature of 50 °C. The enzyme was stable in pH range 6.0 to 8.0 and temperature below 20 °C. The protease activity was enhanced by Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , while the inhibitory effect of Co^{2+} , Cu^{2+} and Zn^{2+} was observed. The protease was inhibited by EDTA and 1,10 phenanthroline indicating that it belongs to the metalloprotease family. The purified protease was stable in 30-50% (v/v) of non-ionic detergents and 30% (v/v) oxidizing agent. The enzyme was stable in 75% (v/v) toluene with the half life of 30 hr. A crude protease from *Pseudomonas aeruginosa* SU2 could catalyze the synthesis of trehalose ester in DMF:DMSO (1:1 v/v) with the retention time of 6.24 min as analyzed by HPLC equipped with RI detector.

Key words: Protease, Organic solvents, Sugar Esters, Green Technology