

การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและลักษณะสมบัติของโปรตีน
จากป่านศรนารายณ์ *Agave sisalana*

นายสมบัติ คงวิทยา



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมี ภาควิชาชีวเคมี

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-332-508-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I19035548

PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEASE
FROM SISAL *Agave sisalana*

Mr. Sombat Kongwithtaya

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Sciences in Biochemistry

Department of Biochemistry

Graduate School

Chulalongkorn University

1998

ISBN 974-332-508-5

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้

สมบัติ คงวิทยา : การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและลักษณะสมบัติของโปรตีเอสจาก
ปานศรนารายณ์ *Agave sisalana* (PARTIAL PURIFICATION AND CHARAXCERIZATION
OF PROTEASE FROM SISAL *Agave sisalana*) อ.ที่ปรึกษา : ผศ. วินิจ ขำวิวรรณ
อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. นภา ศิวรังสรรค์, รศ.ดร. จรียา บุญญวัฒน์, 69 หน้า, 974-332-508-5

เมื่อทำโปรตีเอสจากปานศรนารายณ์ *Agave sisalana* ให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วย
แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัว 25-80 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปทำโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ด้วย Sephadex
G-100 และ DEAE-cellulose พบว่ามีแอกติวิตีจำเพาะ 4.32 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น
25.41 เท่า และให้ผลผลิตเอนไซม์ 185.65 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปทดสอบแอกติวิตีหลังจากทำอิเลกโตรโฟรีซิสแบบ
ไม่เสียสภาพด้วยเคซีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบแถบแอกติวิตีเพียง 1 แถบ และเมื่อนำไปหาน้ำหนักโมเลกุล
โดยวิธีเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟีโดยใช้คอลัมน์ Sephadex G-100 พบว่าขนาดโมเลกุลของเอนไซม์นี้เท่ากับ
21,800 ดาลตัน

pH และ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเคซีนของโปรตีเอสนี้ คือ pH 7.5 และ 65 °ซ
ตามลำดับ และมีความเสถียรที่ pH 8.3 และอุณหภูมิ 20-40°ซ จากการศึกษาด้านจลนศาสตร์พบว่าเอนไซม์นี้มีค่า
 K_m ต่อ เคซีน BSA และฮีโมโกลบิน เท่ากับ 0.084, 0.161 และ 0.877 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ เอนไซม์นี้
มีความจำเพาะต่อสับสเตรตที่เป็นเปปไทด์สังเคราะห์โดยจำเพาะต่อเปปไทด์ด้านคาร์บอกซิลของลิวซีน

Mn^{2+} และ Cd^{2+} สามารถยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ได้เช่นเดียวกับ $HgCl_2$, *p*-chloromercuricbenzoate
และ Iodoacetamide ในขณะที่ $Na_2S_2O_5$, diithiothetol และ 2-mercaptoethanol จะกระตุ้นแอกติวิตีของเอนไซม์
ผลข้างต้นนี้ ชี้ให้เห็นว่า โปรตีเอสจากปานศรนารายณ์นี้ควรจะเป็น sulfhydryl protease

ภาควิชา ชีวเคมี
สาขาวิชา ชีวเคมี
ปีการศึกษา 2541

ลายมือชื่อนิสิต [ลายมือ]
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา [ลายมือ]
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม [ลายมือ]
..... พ.ศ. ๒๕๔๑

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

๘26235 : MAJOR BIOCHEMISTRY

KEY WORD: PROTEASE, *AGAVE SISALANA*/ SISAL

SOMBAT KONWITHTAYA : PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEASE FROM SISAL *Agave sisalana*. THESIS ADVISOR : ASSIST.PROF. VINICH KHUMVIWAT, ASSIST.NAPA SIWARUNGSAN AND ASSOC.JIRIYA BUNYAWATH, Ph.D., 69 p.p. ISBN 974-332-508-5

Protease from *A. sisalana* was partial purified by precipitation by 25-80 % ammonium sulfate precipitation, Sephadex G-100 column and DEAE -cellulose column chromatography. The purification obtained was 25.41 fold with specific activity of 4.32 Units/mg protein and %yield of 186.65 %. Activity stain after non-denaturing gel electrophoresis with 0.5% casein as substrate showed a single band. The molecular weight of 21,800 was shown with Sephadex G-100 column chromatography. The pH optimum of this enzyme was 7.5 and the temperature optimum was 65 °C, the enzyme was stable at pH 8.3 and 20-40 °C, respectively. The kinetic study of partial purified enzyme showed K_m of 0.084, 0.161 and 0.877 % by weight for casein, BSA and hemoglobin respectively. The enzyme also showed specificity towards peptide of C-terminal side of leucine. Mn^{2+} , Cd^{2+} , $HgCl_2$, *p*-chloromercuribenzoate and iodoacetamid could inhibit protease activity while $Na_2S_2O_5$, diithiothreitol and 2-mercaptoethanol, activated the enzyme. These results suggested that the enzyme from *A. sisalana* was sulfhydryl protease

ภาควิชา.....ชีวเคมี.....

สาขาวิชา.....ชีวเคมี.....

ปีการศึกษา.....2541.....

ลายมือชื่อนิสิต.....[Signature].....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....[Signature].....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษารวม.....[Signature].....

ท.น. พ.ร. 5110



กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์วินิจ ขำวิวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์นภา ศิวรังสรรค์ และรองศาสตราจารย์ ดร. จริยา บุญญวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาแนะนำให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการดำเนินงานวิจัยด้วยดีตลอดมา ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงได้เป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ทิพาพร ลิ้มปเสนีย์ ที่ได้เป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และ อ.ดร. กนกทิพย์ ภักดีบำรุง ที่ได้รับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์มุกดา คูหิรัญ ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์แนะนำพันธุ์พืชป่านครนารายณ์สำหรับการทำวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ให้ความกรุณาและคำแนะนำสำหรับการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณนิสิตปริญญาโทชีวเคมีและเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่าน ที่ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดการทำงานวิจัยครั้งนี้

สุดท้าย ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่เคารพรัก และพี่ ๆ น้อง ๆ ทุกคนที่ได้ให้ความรัก ความเข้าใจ ความเป็นห่วงและกำลังใจ อย่างมากมาย จนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฅ
สารบัญรูป.....	ญ
คำย่อ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ	
1.1 โปรติเอส (Protease)	1
1.2 พืชในวงศ์ป่านครนารายณ์ (Agavaceae).....	5
1.3 ประโยชน์ของป่านครนารายณ์.....	6
1.4 การศึกษาโปรติเอสในป่านครนารายณ์.....	7
1.5 มุลเหตุจูงใจในงานวิจัย	8
1.6 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	9
2 เครื่องมือและเคมีภัณฑ์	
2.1 เครื่องมือ.....	12
2.2 เคมีภัณฑ์.....	12
3 วิธีการทดลอง	
3.1 การเตรียมสารละลาย	14
3.2 ขั้นตอนการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์.....	17
3.3 ตรวจสอบสมบัติของเอนไซม์ที่ได้ทำให้บริสุทธิ์แล้ว.....	20
4 ผลการทดลอง	
4.1 ผลการทำโปรติเอสจากป่านครนารายณ์ให้บริสุทธิ์บางส่วน	28
4.2 การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของโปรติเอส.....	31
4.3 ผลของการศึกษาสมบัติของโปรติเอสจากป่านครนารายณ์	35
5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	54
เอกสารอ้างอิง	63

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก

กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของแบรดฟอร์ด...67	
กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณไทโรซีน.....68	
ประวัติผู้เขียน	69

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	ข้อมูลเชิงพาณิชย์ของโปรตีนเอสทั่วโลกในปี 1981.....2
2	การนำเข้าเอนไซม์ของประเทศไทยในระหว่างปี 1991-1997 10
3	สรุปผลการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์.....29
4	สรุปค่า K_m และ V_{max} ของโปรตีนเอสจากป่านครนารายณ์ <i>Agave sisalana</i>45
5	แสดงผลของสารเคมีต่างๆ ต่อแอกติวิตีของโปรตีนเอส47
6	ค่า R_f ของจุดบนแผ่น TLC ของสารมาตรฐาน และ ผลิตภัณฑ์จากการย่อยของเอนไซม์.....52
7	การเปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของโปรตีนเอสจากป่านครนารายณ์ สายพันธุ์ต่างๆ ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย gel filtration chromatography56
8	การเปรียบเทียบ pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมของป่านครนารายณ์ สายพันธุ์ต่างๆ59

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1	รูปแบบการแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-100.....30
2	รูปแบบการแยกและทำให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ดีอีเออี-เซลลูโลส32
3	รูปแบบของโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนต่างๆ ในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น โดยพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตโฟริซิส33
4	รูปแบบของโปรตีนมาตรฐานและโปรตีนแยกโดยเอสดีเอส พอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตโฟริซิส34
5	กราฟแสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่าง K_{av} และ \log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน.....36
6	ผลของ pH ต่อความเสถียรของโปรตีน <i>Agave sisalana</i>38
7	ผลของอุณหภูมิ ต่อความเสถียรของโปรตีน <i>Agave sisalana</i>39
9	ผลของ pH ต่อแอกติวิตีของโปรตีนจาก ป่านครนารายณ์ <i>Agave sisalana</i>40
10	ผลของอุณหภูมิต่อแอกติวิตีของโปรตีนจาก ป่านครนารายณ์ <i>Agave sisalana</i>41
11	Lineweaver-Burk plot ของโปรตีน เมื่อใช้ hemoglobin เป็นซับสเตรต42
12	Lineweaver-Burk plot ของโปรตีน เมื่อใช้ BSA เป็นซับสเตรต43
13	Lineweaver-Burk plot ของโปรตีน เมื่อใช้ casein เป็นซับสเตรต44
14	การทำโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบางเมื่อใช้ NBz-Val-Gly-Arg-pNA เป็นซับสเตรตย่อยด้วยโปรตีนจาก <i>Streptomyces griceus</i>48
15	การทำโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบางเมื่อใช้ NBz-Val-Gly-Arg-pNA เป็นซับสเตรตย่อยด้วยโปรตีนจาก <i>Agave sisalana</i>49
16	การทำโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบางเมื่อใช้ NBz-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA เป็นซับสเตรตย่อยด้วยโปรตีนจาก <i>Streptomyces griceus</i>50
17	การทำโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบางเมื่อใช้ NBz-Ala-Ala-Pro-Leu-pNA เป็นซับสเตรตย่อยด้วยโปรตีนจาก <i>Agave sisalana</i>51

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่

หน้า

18 ความจำเพาะในการไฮโดรไลซ์เปปไทด์สังเคราะห์ของ

โปรตีนจากปานครนารายณ์ *Agave sisalana*.....53

คำย่อ.

°ซ	=	องศาเซลเซียส
มล.	=	มิลลิลิตร
มก.	=	มิลลิกรัม
กก.	=	กิโลกรัม
w/w	=	weight by weight
K_m	=	Michaelis-Menten constant
V_{max}	=	Maximum velocity
%	=	เปอร์เซ็นต์