ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การตรึงเซลล์และสมบัติของโปรติเอสที่ส่งออกนอกเซลล์ของเทอร์มอฟิลิคแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่แยกจากบ่อน้ำร้อนสันกำแพง

ชื่อผู้เขียน นางสาวสุมนต์ทิพย์ จันทร์ฟัก

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ :

รองศาสตราจารย์ ดร.ภาวิณี คณาสวัสดิ์ ประธานกรรมการ

รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีย์ ฟูตระกูล กรรมการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิทธิโชค แสงโสดา กรรมการ

บทคัดย่อ

การผลิตโปรติเอสของเทอร์มอฟิลิคแบคทีเรีย Thermus 2S ที่อุณหภูมิ 65 °ซ ในอาหารที่ประกอบด้วย Nitrilotriacetic acid เป็นแหล่งให้ไนโตรเจน สิ่งสกัดจากยีสต์ ทริปโทน และแร่ธาตุที่จำเป็น ในสารละลายพีเอช 7.2 จะได้แอคติวิตี้สูงสุดของโปรติเอส 8.5 U/มล เมื่อเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 32 ชั่วโมง และได้ปริมาณเซลล์เปียก 3.02 กรัม/อาหาร 1 ลิตร โปรติเอสจาก Thermus 2S ทำงานด้วยประสิทธิภาพสูงสุดที่พีเอช 7.0 และที่อุณหภูมิ 65 °ซ โดยมีค่า K_m และ V_{max} เมื่อใช้เคซีนเป็นสับสเตรทเท่ากับ 0.35 µg/ml และ 5.6 µg/min ตามลำดับ ประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาสลายเคซีนจะเร็วขึ้นเมื่อมี Ca^{2+} เป็นโคแฟคเตอร์ และเร็วกว่าการสลายฮีโมโกลบินและเจลาตินตามลำดับ ผลการศึกษาตาม Hill equation คาดว่าโปรติเอสชนิดนี้เป็น allosteric enzyme ที่มีหน่วยย่อย 2 หน่วย ส่วนผลของอิเลคโตรฟอริซีส SDS-PAGE แสดงว่าโปรติเอสนี้มีมวลโมเลกุลประมาณ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

13,700 ดาลตัน การใช้อะซิโตน เอธานอล แอมโมเนียมซัลเฟต และการเปลี่ยนพีเอช ไม่สามารถทำให้โปรติเอสของ Thermus 2S ตกตะกอนได้เกิน 2 % และทำให้แอคติวิตี้ของโปรติเอสลดลงมาก ส่วนการใช้ ultrafiltration สามารถทำให้โปรติเอสมีความความเข้มข้นมากขึ้น แต่มีแอคติวิตี้ลดลงเหลือ 16-17% ของแอคติวิตี้เริ่มต้น

การศึกษาการตรึงเซลล์ Thermus 2S เพื่อการผลิตโปรติเอส โดยใช้สารพาหะ 5 ชนิด ได้แก่ calcium alginate, alginate - agar, polyacrylamide, PAAH - alginate และ crosslinked-PAAH ด้วยการตรึงแบบ entrapment ที่ทำให้ได้เซลล์ตรึงมีลักษณะเป็นเม็ดกลม พบว่า เซลล์ตรึงด้วย calcium alginate มีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่ 65 °ซ ได้นานกว่า 2 เดือน ซึ่งมากกว่าเซลล์ตรึงด้วยพาหะชนิดอื่น แม้ว่าจะมีการหลุดของเซลล์ตรึงออกจากเม็ดเซลล์ตรึงของ calcium alginate มากกว่าเซลล์ตรึงด้วยพาหะชนิดอื่น แต่ระบบเซลล์ตรึงด้วย calcium alginate ซึ่งมีเซลล์ 20 % เป็นระบบที่มีการผลิตโปรติเอสได้สูงสุด คือ 8.9 และ 8.2 U/มล ในเครื่องปฏิกรณ์แบบแบทช์และแบบต่อเนื่องตามลำดับ ในขณะที่ระบบเซลล์ตรึงด้วย crosslinked-PAAH จะช่วยลดการหลุดของเซลล์ตรึงได้ดีที่สุด และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 65 °ซ เพียง 25 วัน โดยมีการผลิตโปรติเอสได้ 6.3 และ 5.6 U/มล ในเครื่องปฏิกรณ์แบบแบทช์และแบบต่อเนื่องตามลำดับ

การผลิตโปรติเอสโดยเซลล์ตรึงของ Thermus 2S ในแคลเซียมอัลจิเนต จะแปรตามปริมาณเซลล์ที่ถูกตรึง เมื่อใช้ปริมาณเซลล์ตรึง 5% ในแคลเซียมอัลจิเนต สามารถทำให้เซลล์ตรึงผลิตโปรติเอสได้ 7.1 U/มล ซึ่งใกล้เคียงกับระบบเซลล์อิสระที่ใช้ 10% หัวเชื้อ ที่ผลิตโปรติเอสได้ 9.1 U/มล ระบบเซลล์ตรึงที่มีปริมาณเซลล์มากขึ้นเป็น 10 และ 20% ผลิตโปรติเอสได้มากขึ้นเป็น 15.9 และ 31.8 U/มล ตามลำดับ เซลล์ตรึงที่ใช้งานซ้ำอีกครั้งในระบบแบทช์ได้โปรติเอสลดลง 50% แต่ในระบบต่อเนื่องมีโปรติเอสใกล้เคียงกับการใช้ครั้งแรก การศึกษาการกระจายของเซลล์ในเม็ดเซลล์ตรึงโดยกล้องจุลทรรศน์ยืนยันการหลุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ของเซลล์ตรึงในระหว่างการผลิตโปรติเอสในเครื่องปฏิกรณ์ ปัญหาการรั่วและหลุดของเซลล์ตรึงควรที่จะได้มีการศึกษาต่อไปเพื่อพัฒนาการใช้เซลล์ตรึงของ Thermus 2S เพื่อผลิตโปรติเอสให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Immobilization of Cells and Properties of Extracellular Proteases of a Thermophilic Bacterium Isolated from San Khampaeng Hot Spring

Author Ms. Sumonthip Janphuk

M.S. Chemistry

Examining Committee :

Assoc. Prof.Dr. Pawinee Kanasawud **Chairman**

Assoc. Prof.Dr. Suree Phutrakul **Member**

Assist. Prof.Dr. Siddhichoke Sangsoda **Member**

Abstract

Protease production from thermophilic bacteria Thermus 2S at temperature 65 °C in a medium contained nitrilotriacetic acid as nitrogen source, yeast extract, tryptone and essential mineral salt in solution of pH 7.2 gave the maximum activity 8.5 U/ml and wet cells 3.02 g/l after 32 hours The optimum pH and temperature of protease from Thermus 2S were 7.0 and 65 °C respectively. When casein was used as a substrate, K_m and V_{max} of the protease were 0.35 µg/ml and 5.6 µg/min respectively. The effciency of casein hydrolysis in the presence of Ca^{2+} was faster than in the absence of cofactor, and also faster than hydrolysis

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

of haemoglobin and gelatin respectively. Protease was expected as an allosteric enzyme consisted of 2 subunits by Hill equation. The result from SDS-PAGE showed that the molecular weight of protease was approximately 13,700 dalton The precipitation of protein by acetone, ethanol, ammonium sulphate and pH was unsuccessful for protease from Thermus 2S, less than 2% yield was obtained and protease activity was highly decreased. Concentrated protease could be obtained by ultrafiltration with lowering of activity to 16-17% of initial activity.

Studied on cell immobilization of Thermus 2S for production of protease using five supports; calcium alginate, alginate-agar, polyacrylamide, PAAH-alginate and crosslinked-PAAH by entrapment method providing the immobilized beads indicated that the stability of cells entrapment with calcium alginate at 65 °C was more than 2 months and higher than the immobilized cells with other supports. Although entrapped cells leaked from calcium alginate immobilized beads more than from the other supports, maximum protease activity was produced in the system containing 20% wet cells, 8.9 and 8.2 U/ml for batch and continuous reactor respectively. Crosslinked-PAAH was the best support for protection of cell leaking from immobilized beads. However, the stability at 65 °C was only 25 days. Production of protease from this immobilized cells system was 6.3 and 5.6 U/ml in batch and continuous reactor respectively.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Production of protease by immobilized cells from Thermus 2S in calcium alginate beads depended on cells content in immobilized beads. When the immobilized cells contained 5% wet cells, protease of 7.1 U/ml culture was found in the system. This production yield quite approached to free cell system with 10% innocula, 9.1 U/ml Wherease the immobilized cells system containing 10 and 20% wet cells produced protease 15.9 and 31.8 U/ml respectively. In batch system, the reused immobilized cells yielded only 50% of protease production wherease in continuous system, protease activity was close to the first use. The microscopic study of cells distribution in immobilized beads a microscope confirmed the leakage of cells during protease production in the reactor. The problem of leakage of immobilized cell should be studied furthermore for the improvement of protease production from immobilized Thermus 2S system.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved