ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ลักษณะเฉพาะของโปรติเอสที่ขับออกมาโดยเทอร์โมฟิลิคแบคทีเรียสายพันธุ์เอฟ 13

ชื่อผู้เขียน นายไพฑูรย์ อบเชย

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร. ภาวิณี	คณาสวัสดิ์	ประธานกรรมการ
อาจารย์ ดร. บัณฑิต	ลีละศาสตร์	กรรมการ
อาจารย์ ดร. ไพโรจน์	กิจจนะพานิช	กรรมการ

บทคัดย่อ

เทอร์โมไฟล์ F13 เป็นแบคทีเรียกรัมบวกและจัดอยู่ในกลุ่ม *Bacillus* แบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตโปรติเอสที่เสถียรต่ออุณหภูมิสูงส่งออกนอกเซลล์ได้ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย TLS 43 และสูงกว่าแบคทีเรีย P2 การเพิ่มความเข้มข้นของสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนในช่วง 0.01-1% ในสารละลายอาหารที่มีพีเอช 7.2 ทำให้เชื้อแบคทีเรีย F13 เจริญเติบโตดีขึ้นเป็นลำดับที่อุณหภูมิ 65^{0}C โดยมีผลผลิตโปรติเอสสูงสุดที่ 574 UA (3,985 UC)/ลิตร ในอาหารที่มีสิ่งสกัดจากยีสต์และทริปโทนอย่างละ 0.1% และเมื่อทำไลโอฟิไลเซชันทำให้ได้ผงโปรติเอสดิบ 3.98 กรัม ซึ่งมีแอคติวิตีจำเพาะ 37.41 UA/มิลลิกรัมโปรตีน การแยกโปรติเอสจากผงโปรติเอสดิบด้วยคอลัมน์ Sephadex G100-120 ทำให้ได้โปรติเอสเพียงพีคเดียวเท่านั้น โปรติเอสนี้มีแอคติวิตีสูงสุดในสารละลายพีเอช 9.0 ที่อุณหภูมิ 80^{0}C และไฮโดรไลส์โปรตีนต่างชนิดกันเป็นลำดับจากเอโซเคซีน > นมพร่องมันเนย > เจลาติน > โปรตีนจากถั่วเหลือง > เคซีน > ฮีโมโกลบิน โดยมีร้อยละของพันธะเปปไทด์ที่ถูกตัด (% DH) ในช่วง 6.46-0.35 % ซึ่งต่ำกว่า Alcalase แอคติวิตีถูกกระตุ้นได้โดย Fe^{3+} และ Mn^{2+}และถูกยับยั้งด้วย Co^{2+} และ Zn^{2+} นอกจากนี้ยังพบว่าถูกยับยั้งด้วย EDTA และ PMSF ซึ่งแสดงว่าเป็นโปรติเอสในกลุ่มของ metallo และ serine การที่ไม่แสดงอะมิเดสแอคติวิตีต่อ BAPNA และ FAGLA และไม่มีเอสเทอเรสแอคติวิตีต่อ ATEE, ATpEE และ BAEE ยืนยันได้ว่าแบคทีเรีย F13

ผลิต metalloprotease และเนื่องจากพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 9.0 จึงจัดเป็นโปรติเอสในกลุ่มอัลคาไลน์ ในขณะที่การทำบริสุทธิ์โปรติเอสด้วยเจลฟิลเตรชันด้วยคอลัมน์ Sephadex G-75 พบว่าโปรติเอสที่แบคทีเรีย F13 ผลิตขึ้นนั้นมี 3 ชนิดที่มีปริมาณมาก และอีก 3 ชนิด มีปริมาณต่ำมาก จึงทำให้คาดว่าโปรติเอส 3 ชนิดแรกนั้นแสดงคุณสมบัติต่าง ๆ ดังปรากฏในการทดสอบกับโปรติเอสเพียงชนิดเดียวที่แยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G100-120 ผลผลิตของโปรติเอส 3 ชนิดที่แยกได้จากคอลัมน์ Sephadex G-75 เท่ากับ 15.10, 52.15 และ 4.95% โดยมีมวลโมเลกุลที่ 55,000, 27,000 และ 16,000 ดาลตัน ตามลำดับ ในขณะที่ SDS-PAGE แยกโปรตีนได้ 3 ชนิด ให้ปรากฏที่มวลโมเลกุล 46,000, 29,000 และ 16,000 ดาลตัน ดังนั้นจึงทำให้สรุปได้ว่าโปรติเอสบริสุทธิ์ 3 ชนิดที่ผลิตโดยแบคทีเรีย F13 มีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 55,000-46,000, 29,000-27,000 และ 16,000 ดาลตัน การแยกโปรติเอสด้วยไอโซอิเลคตริกโฟคัสซิงพบแถบโปรตีน 3 ชนิด ที่ pI 6.2, 6.6 และ 8.4 ในขณะที่การทำโครมาโตรโฟคัสซิงด้วยคอลัมน์ polybuffer exchanger ทำให้แยกโปรติเอสสามชนิดได้ที่ pI 6.3, 6.7 และ 7.5

Thesis Title Characterization of Proteases Secreted by Thermophilic Bacteria Strain F13

Author Mr. Paitoon Aobchey

M.S. Biotechnology

Examining Committee

Assoc. Prof. Dr. Pawinee	Kanasawud	Chairman
Lecturer Dr. Bundit	Leelasart	Member
Lecturer Dr. Pairoje	Kijjanapanich	Member

Abstract

Thermophile F13 was identified as a gram positive bacterium and classified in a group of *Bacillus*. It produced the thermostable extracellular protease nearly the same level as Bacteria TLS 43 but higher than Bacteria P2. The increment of the concentration of yeast extract and tryptone between 0.01-1% in the medium at pH 7.2, increased sequently the growth of Bacteria F13 at 65^{0}C. The maximum yield of protease was obtained at 574 UA (3,985 UC)/litre in the medium containing 0.1% of each yeast extract and tryptone. Lyophilization produced 3.58 grams of crude protease powder with the specific activity of 37.41 UA/mg. The separation of crude protease powder by a Sephadex G 100-120 column yielded only a peak of protease. This protease had the maximum activity in the medium of pH 9.0 at 80^{0}C and hydrolyzed the various proteins in order of azocasein > skim milk > gelatin > soy protein > casein > hemoglobin. The degree of hydrolysis (% DH) was 6.46-0.35 %. Its activity was activated by Fe^{3+} and Mn^{2+} and inhibited by Co^{2+} and Zn^{2+}. It was also inhibited by EDTA and PMSF which indicated that this protease should be classified in a group of metallo and serine. The absence of amidase activity on BAPNA and FAGLA, and esterase activity on ATEE, ATpEE and BAEE confirm that Bacteria F13

produced metalloprotease. It was classified as alkaline protease according to the optimum pH at 9.0. Whereas the purification of the protease by a Sephadex G-75 column indicated that Bacteria F13 produced three proteases with high activity and the others three proteases with very low activity. This suggested the expectation that the first three proteases showed the characteristic of a protease obtaining from the separation by the Sephadex G 100-120 column. The three high activities of proteases from Sephadex G-75 column were obtained with the yield of 15.10, 52.15 and 4.95%. Their molecular weight of 55,000, 27,000 and 16,000 daltons were determined by the Sephadex G-75 column. SDS-PAGE separated the three bands of protein with the molecular weight of 46,000, 29,000 and 16,000 daltons. Therefore, the conclusion of the molecular weight range of the three purified proteases produced by Bacteria F13 should be at 55,000-46,000, 29,000-27,000 and 16,000 daltons. The separation of proteases by isoelectric focusing indicated three types of protein at pI 6.2, 6,6 and 8.4. Whereas the chromatofocusing by a polybuffer exchanger column separated the three proteases at pI 6.3, 6.7 and 7.5.