Thesis Title Optimization of a Thermostable Lipase for Industrial Applications

Author Mr. Supachok Sinchaikul

Ph.D. Biotechnology

Examining Committee

Assoc. Prof. Dr. Suree Phutrakul	Chairman
Prof. Dr. Shui-Tein Chen	Member
Assoc. Prof. Dr. Kanit Krisnangkura	Member
Asst. Prof. Dr. Sirirat Sarawek	Member
Lect. Dr. Dararat Tongkao	Member

ABSTRACT

An expression library was generated from a partial *Nco* I and *Hind* III digestion of plasmid DNA from the thermophilic bacterium *Bacillus stearothermophilus* P1 cloned in *E. coli* DH5α using pUC-19 vector that had an open reading frame of 1,254 nucleotides coding a 29 amino acid signal sequence and a mature sequence of 388 amino acids. The DNA fragment was cut in part of the mature sequence and cloned into the pQE-60 expression vector and expressed in *E. coli* M15 [pREP4]. Based on secondary structure predictions and multiple sequence alignment with the homologous lipases knowing three-dimensional (3-D) structure, the 3-D structure model of this enzyme was constructed and revealed the topological organization of the fold corroborating our predictions. This enzyme was hypothesized the α/β-hydrolase fold typical of several lipases and identified Ser-113, Asp-317, and

His-358 as the putative members of the catalytic triad that was confirmed by site-directed mutagenesis. The recombinant lipase was overexpressed by 0.4 mM IPTG induction for 3 h at 37°C. It was purified to homogeneity using ammonium sulphate precipitation, strongly anion-exchange chromatography (Poros 20 HQ) and Sephacryl S-200HR. The molecular mass of the purified lipase was determined to be approximately 43 kDa by SDS-PAGE and mass spectrometry. The purified lipase had an optimum pH of 8.5 and showed maximal activity at 55°C. It was stable for 1 h at pH 8.5-9.0 and 55°C and highly stable in the temperature range of 30-65°C. The highest activity was found with *p*-nitrophenyl caprate as the synthetic substrate and tricaprylin as the triacylglycerol. Its activity was strongly inhibited by 10 mM PMSF and 1-hexadecanesulfonyl chloride indicated that it contained a serine residue which plays a key role in the catalytic mechanism. In addition, it was stable for 1 h at 37°C in 0.1% CHAPS and Triton X-100. It was also stable in various organic solvents (30%v/v) at 37°C for 1 h except acetonitrile and butanol. In addition, the purified lipase was crystallized in a suitable form for X-ray diffraction analysis using the hanging drop method of vapor diffusion with 20% saturated ammonium sulphate as the precipitating agent at 16°C. Moreover, the chiral separation of the lipase on 3-phenoxy-1,2-propanediol showed the lipase had a preference on S(–) form especially in dichloromethane.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การออพติไมซ์เอนไซม์ไลเปสทนความร้อนเพื่อใช้ในอุตสาหกรรม

ชื่อผู้เขียน นายศุภโชค สินไชยกุล

วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

รศ.ดร.สุรีย์ ฟูตระกูล	ประธานกรรมการ
ศ.ดร.สุ่ยเทียน เฉิน	กรรมการ
รศ.ดร.คณิต กฤษณังกูร	กรรมการ
ผศ.ดร.ศิริรัตน์ สาระเวก	กรรมการ
อ.ดร.ดารารัตน์ ทองขาว	กรรมการ

บทคัดย่อ

พลาสมิดดีเอ็นเอของยีนไลเปสจากแบคทีเรียทนความร้อน *Bacillus stearothermophilus* P1 ซึ่งโคลนใน *E. coli* DH5α โดยใช้ pUC-19 เป็นเวกเตอร์และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ 1,254 เบส ซึ่งแยกออกเป็น signal sequence 29 กรดอะมิโน และ mature sequence 388 กรดอะมิโน ได้นำมาตัดย่อยส่วน mature sequence ออกด้วยเอนไซม์ตัดยีน *Nco* I และ *Hind* III แล้วนำมาเชื่อมต่อกับ pQE-60 ซึ่งเป็นเวกเตอร์ที่ใช้ในการแสดงออก และย้ายไปใส่ในเซลล์เจ้าบ้าน *E. coli* M15[pREP4] และจากข้อมูลศึกษาการทำนายโครงสร้างสองมิติและเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนกับเอนไซม์ไลเปสชนิดอื่นที่รู้โครงสร้างสามมิติแล้ว โครงสร้างสามมิติจำลองของเอนไซม์ไลเปสชนิดนี้ได้สร้างขึ้นเป็นต้นแบบซึ่งมีโครงสร้างเป็นแบบ α/β-hydrolase คล้ายกับเอนไซม์ไลเปสชนิดอื่น และยังพบว่ากรดอะมิโนที่ตำแหน่ง Ser-113, Asp-317 และ His-358 เป็นกรดอะมิโนที่มีอยู่ในตำแหน่งที่เร่งการทำงานของเอนไซม์ซึ่งได้ตรวจสอบด้วยการทำ site-directed mutagenesis โคลนยีนไลเปสสามารถแสดงออกอย่างมากในสภาวะที่มีการเร่งด้วย 0.4 mM IPTG เป็นเวลา 3 ชม. ที่อุณหภูมิ 37°ซ จากนั้นเอนไซม์ไลเปสได้นำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โครมาโทรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออนลบด้วยคอลัมม์ Poros 20HQ และเจลฟิลเตรชันด้วยเจล Sephacryl S-200HR มวลโมเลกุลของเอนไซม์ไลเปสประมาณ 43 kDa ซึ่งได้ตรวจสอบด้วยวิธี

SDS-PAGE และ mass spectrometry เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์ได้นำมาศึกษาลักษณะเฉพาะต่างๆพบว่า สามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 8.5 และอุณหภูมิ 55°ซ นอกจากนี้ยังสามารถทนทานได้ดีในสภาวะที่มีพีเอชและอุณหภูมิประมาณ 8.5-9 และ 55°ซ ตามลำดับ เอนไซม์สามารถย่อยสารตั้งต้นได้ดีที่สุดเมื่อใช้สารตั้งต้นสังเคราะห์ *p*-nitrophenyl caprate และ สารตั้งต้นที่เป็น triacylglycerol คือ tricaprylin แอคติวิตีของเอนไซม์จะถูกยับยั้งอย่างมากเมื่อใช้ 10 mM PMSF และ 1-hexadecanesulfonyl chloride ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโน serine มีส่วนสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ เอนไซม์ไลเปสสามารถทนทานในสภาวะที่มี 1% CHAPS และ Triton X-100 เป็นเวลา 1 ชม. ที่อุณหภูมิ 37°ซ และยังสามารถทนทานในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิดในความเข้มข้น 30%v/v เป็นเวลา 1 ชม. ที่อุณหภูมิ 37°ซ ยกเว้น acetonitrile และ butanol นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสได้ถูกมาตกผลึกด้วยวิธี hanging drop โดยใช้ แอมโมเนียม ซัลเฟตอิ่มตัว 20% เป็นตัวตกผลึกที่อุณหภูมิ 16°ซ ซึ่งจะได้ผลึกที่สามารถนำไปวิเคราะห์หาโครงสร้างสามมิติเบื้องต้นโดยการเบี่ยงเบนแสง X-ray บนผลึกโปรตีน และยังสามารถนำเอาไปใช้ในการแยกสารประกอบไครัล 3-phenoxy-1,2-propanediol โดยมีความจำเพาะต่อ S(−) form ในสภาวะที่มี dichloromethane