ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การทำให้บริสุทธิ์และการหาลักษณะเฉพาะของเอนไซม์โปรติเอสนอกเซลล์ที่ผลิตโดยเทอร์โมฟิลิคแบคทีเรียสายพันธุ์ ทีแอลเอส 33

ชื่อผู้เขียน นายศุภโชค สินไชยกุล

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ : รศ.ดร.สุรีย์ ฟูตระกูล ประธานกรรมการ
อาจารย์ ดร.ดารารัตน์ ทองขาว กรรมการ
อาจารย์ ดร.มณี ผู้กาญจนทวีป กรรมการ

บทคัดย่อ

แบคทีเรียทนความร้อนสายพันธุ์ ทีแอลเอส33 เป็นแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสที่ส่งออกนอกเซลล์ ซึ่งแยกได้จากน้ำพุร้อนเทพพนม จังหวัดเชียงใหม่ แบคทีเรียนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีและผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณสูงเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย 0.1% w/v yeast extract และ 0.25% w/v skim milk ใน 80% v/v base mixture ที่อุณหภูมิ 65 ํซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โปรติเอสสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 5.0-8.0 และ 70-80 ํซ ตามลำดับ และเสถียรในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 เมื่อบ่มที่ 75 ํซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นอกจากนี้ $CaCl_2$จะช่วยทำให้ความคงทนต่อความร้อนของทั้งสารละลายเอนไซม์ที่มีและไม่มีสารประกอบทิไวต่อหมู่ไธออลเพิ่มขึ้น โปรติเอสสามารถคงทนต่อความร้อนได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ Diisopropyl ether, Cyclohexane และ Hexane และโปรติเอสสามารถย่อยสลายโปรตีนได้หลายชนิดดังนี้ casein, lysozyme, skim milk, ovalbumin, hemoglobin, BSA, soybean, azocasein , creatinine และ gelatin นอกจากนี้แอคติวิตีของโปรติเอสจะหมดไปเมื่อมี 40 mM EDTA อยู่ในสารละลายซึ่งทำให้จัดประเภทเอนไซม์เป็นพวกนิวทรัลเมตาโลโปรติเอสและการเติมแคทไอออนที่มีความเข้มข้นต่ำ (< 10mM) ได้แก่ Mg^{2+} , Ca^{2+} และ K^{+} จะช่วยทำให้แอคติวิตีของโปรติเอสเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะการเติม 1 mM Zn^{2+} นอกจากจะทำให้แอคติวิตีเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนแล้ว ยังช่วยทำให้แอคติวิตีของ

apoenzyme กลับคืนมา 64.94% จึงสรุปได้ว่าโลหะที่อยู่ในโมเลกุลของโปรติเอสคือ Zn^{2+} โปรติเอสได้ถูกทำให้เข้มข้นและบริสุทธิ์ขึ้นบางส่วน โดยการทำ freeze-dry, ไดอะไลซีล, โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน และเจลฟิลเตรชัน ในการตรวจหามวลโมเลกุลของโปรติเอสโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน พบว่ามีค่าประมาณ 21,843 ดาลตัน และเมื่อนำมาศึกษาลักษณะเฉพาะต่าง ๆ พบว่าจะใกล้เคียงกับผลการศึกษาโดยใช้ crude enzyme คือสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 5.0-8.0 และ 70-80°ซ ตามลำดับ และจะเสถียรที่อุณหภูมิ 70°ซ โปรติเอสสามารถคงทนต่อความร้อนได้ดีเมื่ออยู่ในตัวทำละลายอินทรีย์ได้แก่ Diisopropyl ether, Cyclohexane และ Hexane ส่วนการศึกษาผลของตัวยับยั้งและแคทไอออนพบว่า EDTA ในความเข้มข้นต่ำเพียง 5 mM ก็สามารถยับยั้งการทำงานของโปรติเอสได้เกือบสมบูรณ์ และการเติมแคทไอออนที่มีความเข้มข้นต่ำ (1 mM) ได้แก่ Mg^{2+}, Ca^{2+} และ K^{+} จะทำให้แอคติวิตีของโปรติเอสเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะการเติม Zn^{2+} นอกจากนี้ยังพบว่าโลหะที่เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างโมเลกุลของโปรติเอสที่แยกบริสุทธิ์บางส่วนนี้คือ Zn^{2+} และโปรติเอสนี้จะมีค่า K_m และ V_{max} เมื่อใช้ azocasein เป็นสับสเตรทเท่ากับ 0.14 %w/v และ 0.108 U/ml/min ตามลำดับ

Chiang Mai University

Thesis Title Purification and Characterization of Extracellular Protease Produced by Thermophilic Bacteria Strain TLS33

Author Mr. Supachok Sinchaikul

M.S. Biotechnology

Examining Committee:

Associate Prof. Dr. Suree Phutrakul	Chairman
Dr. Dararat Tongkao	Member
Dr. Manee Pookanjanatavip	Member

Abstract

Thermophilic bacteria strain TLS33 producing extracellular thermostable protease was isolated from Thephanom hot spring in Chiang Mai. The bacteria grew and secreted high protease activity when cultured in a medium containing 0.1% w/v yeast extract and 0.25% w/v skim milk in 80% v/v base mixture at 65°C for 48 h. This protease exhibited the optimum pH and temperature for activity at 5.0-8.0 and 70 - 80°C , respectively. It was stable in a buffer solution pH 7.0. after incubated at 75°C for 1 h. Thermostabilities of the proteases in the presence and absence of thiol-reactive reagents were increased by the addition of $CaCl_2$. Diisopropyl ether, cyclohexane and hexane protected this protease from heat denaturation. The protease could hydrolyse a number of substrates including casein, lysozyme, skim milk, ovalbumin, hemoglobin, BSA, soybean, azocasein, creatinine and gelatin, respectively. It was completely inactivated by 40 mM EDTA which could be classified as a neutral metalloprotease. Furthermore, the proteolytic activity of the enzyme was enhanced by low concentration (< 10 mM) of Ca^{2+} , Mg^{2+} and K^{+} ,especially the addition of 1mM Zn^{2+} activated the higher activity of the enzyme and restored the activity of the apoenzyme up to 64.94%. From these results, this protease could be classified as neutral metalloprotease containing Zn^{2+} in its molecule.

The protease was concentrated and partially purified by freeze-dry, dialysis, ion-exchange chromatography and gel filtration and its molecular weight determined by gel filtration was about 21,843 dalton. The characterizations of the partially purified protease was the same as the crude protease which exhibited the optimum pH and temperature for its activity at 5.0-8.0 and 70-80°C , respectively. It was stable up to 70°C and stable in 50% v/v organic solvents such as diisopropyl ether, cyclohexane and hexane. Its activity was almost completely loss in the presence of 5 mM EDTA and it was enchanced by low concentration (1 mM) of Ca^{2+}, Mg^{2+} and K^{+} ,especially the addition of Zn^{2+}. Thus, the metal ion in the partially purified protease molecule was Zn^{2+}. The kinetic parameters of the partially purified protease (K_m and V_{max} values) when azocasein was used as substrate were 0.14 %w/v and 0.108 U/ml/min, respectively.