Thesis Title Thermostable Protease Enzymes

Author Miss Ni-orn Chomsri

M.S. Biotechnology

Examining Committee

Assoc. Prof. Dr. Naiyatat Poosaran	Chairman
Asst. Prof. Dr. Sittisin Bavonsombat	Member
Dr. Somchai Jomduang	Member

ABSTRACT

Isolated *Bacillus* sp. F603.1 from soil, Amphur Sarpee, Chiangmai Province, Thailand was studied in this report. The effects of temperature (40-55 ^{O}C) and pH (4-10) on growth of F603.1 and enzyme production were investigated. It was found that less growth was obtained at higher temperature. Maximum specific growth rate and specific product formation rate at 40 ^{O}C were 1.71 h^{-1} and 24.87 $Ug^{-1}h^{-1}$, respectively. The highest protease activity of 32.31 U was achieved after fermentation at 40 ^{O}C for 36 h. At cultivation temperature of 45 ^{O}C, it was revealed that F603.1 could grow in the pH range 6-9, and the maximum growth was found in the initial medium pH 6. In this culture condition, the maximum specific growth rate was 1.19 h^{-1}. In addition, the optimal pH for enzyme production was 7 (22.40 $Uml^{-1}min^{-1}$), while specific product formation rate was 17.62 $Ug^{-1}h^{-1}$. In the study of adding of ammonium sulfate 60, 70 and 80% saturation to recover enzyme, it was found that at 70% saturation of ammonium sulfate, the partial purified protease activity increased 24.6 folds. The highest specific activity and activity yield were 666 U/mg protein and 77.03%, respectively. Temperature and pH profiles as well as temperature and pH stabilities of partial purified proteases were investigated. It was revealed that the relative activity of 100% was obtained in the pH range 7.0-10.0. For pH stability, relative activity of 100%

was gained at pH 8.0, 8 ^{O}C for 120 min. The optimal temperature was 60 ^{O}C. For thermal stability, it was observed that relative activity of 50% was found after incubation at 60 ^{O}C, pH 8.0, for 120 min. The half live of the partial purified enzyme was 18 h at 8 ^{O}C, pH 8.0, and 90 min at 60 ^{O}C, pH 8.0. Proteases were purified using a combination of ammonium sulfate precipitation, ultrafiltration, ion exchanger, and gel filtration. The pooled fraction of ion exchanger chromatography and gel filtration showed 4.95-fold with a specific activity of 135.81 Umg^{-1} of protein and 5.93-fold with a specific activity of 162.65 Umg^{-1} of protein, respectively. Analysis of the purified enzyme with SDS-PAGE and native-PAGE revealed the enzyme had not yet been completely purified with estimated molecular weight about 24 kDa for the lowest and 50 kDa for the highest. Proteolytic activity was totally inhibited by 1 mM of phenylmetanesulfonyl fluoride showed that it seems to be serine proteases.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ เอนไซม์โปรติเอสที่ทนอุณหภูมิสูง

ชื่อผู้เขียน นางสาวนิอร โฉมศรี

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
รศ.ดร.นัยทัศน์ ภู่ศรัณย์ ประธานกรรมการ
ผศ.ดร.สิทธิสิน บวรสมบัติ กรรมการ
ดร.สมชาย จอมดวง กรรมการ

บทคัดย่อ

การศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอส จากจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. F603.1 ที่ คัดแยกจากตัวอย่างดิน อำเภอสารภี จังหวัดเชียงใหม่ โดยศึกษาผลของอุณหภูมิ (40-55 องศาเซลเซียส) และค่าความเป็นกรดด่าง (pH 4-10) ต่อการเจริญและการผลิตโปรติเอส จากผลการทดลองพบว่า *Bacillus* sp. F603.1 มีอัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด 32.31 หน่วย มิลลิลิตร$^{-1}$นาที$^{-1}$ มีอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อสูงสุดเท่ากับ 1.71 ชั่วโมง$^{-1}$ และอัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์เท่ากับ 24.87 หน่วย กรัม$^{-1}$ชั่วโมง$^{-1}$ ที่ 40 องศาเซลเซียส และจากการเพาะเลี้ยง F603.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่างๆ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรีย สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 6-9 โดยมีอัตราการเจริญสูงสุด และอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 1.19 ชั่วโมง$^{-1}$ ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 6 และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่พีเอช 7 เท่ากับ 22.40 หน่วย มิลลิลิตร$^{-1}$นาที$^{-1}$ โดยมีอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะเท่ากับ 17.62 หน่วย กรัม$^{-1}$ชั่วโมง$^{-1}$ เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้มาศึกษาการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัว 60 70 และ 80% พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับอิ่มตัว 70 % ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้นอีก 24.6 เท่า และให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity) และผลผลิตของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 666 หน่วย มิลลิกรัม$^{-1}$ และ 77.03 % ตามลำดับ เมื่อนำเอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วนไปหาค่าอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม และความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็น

กรดด่าง พบว่าที่ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0-10.0 เอนไซม์ให้ค่ากิจกรรมสัมพันธ์ (relative activity) 100 % ในขณะที่เอนไซม์มีความเสถียรที่ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0, 8 องศาเซลเซียส นาน 120 นา ที โดยให้ค่ากิจกรรมสัมพันธ์ 100 % อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำกิจกรรมของเอนไซม์คือ 60 องศาเซลเซียส และเอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 นาน 120 นาที โดยให้ค่ากิจกรรมสัมพันธ์ 50 % เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนมีค่าครึ่งชีวิตนาน 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 และนาน 90 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 และเอนไซม์โปรติเอสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนโดยการใช้วิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต การกรองผ่านเมมเบรน การแยกด้วยตัวแลกเปลี่ยนประจุ และเจลฟิลเตรชั่น ให้ค่าความบริสุทธิ์ที่เพิ่มขึ้น (purification fold ; เท่า) และให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะ (หน่วย มิลลิกรัม$^{-1}$ ของโปรตีน) เท่ากับ 13.37 และ 366.81 ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้โดยวิธี SDS-PAGE และ native-PAGE พบว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้ เป็นเอนไซม์ที่บริสุทธิ์บางส่วน โดยมีค่ามวลโมเลกุลต่ำสุดประมาณ 24 กิโลดาลตัน และค่ามวลโมเลกุลสูงสุดประมาณ 50 กิโลดาลตัน เอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงานโดยการเติม phenylmethanesulfonyl fluoride 1 มิลลิโมลลาร์ แสดงว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้น่าจะเป็นโปรติเอสเซรีน (serine proteases)