| | |
|---|---|
| **Thesis title** | Isolation and Characterization of Proteolytic Enzymes from Salt-Tolerant and Thermophilic Bacteria for Application in Food Industry |
| **Author** | Miss Somkid Deejing |
| **Degree** | Doctor of Philosophy (Biotechnology) |
| **Thesis Advisory Committee** | Assoc. Prof. Dr. Saisamorn Lumyong Chairperson |
| | Assoc. Prof. Dr. Naiyatat Poosaran Member |
| | Assoc. Prof. Dr. Griangsak Chairote Member |
| | Prof. Dr. Mitsuaki Moriguchi Member |

## ABSTRACT

The isolation and characterization of proteases from salt-tolerant bacteria, and the application of aminopeptidase from thermophilic bacteria *Geobacillus thermoleovorans* 47b for hydrolysis of bitter peptides were investigated. One hundred and eighty two bacteria were obtained from Thai fermented foods, soil and sea water. Isolated bacteria included Gram-positive; rods, Gram negative; rods and Gram positive; cocci. The isolated bacteria showed excellent growth on nutrient agar (NA) in the presence of 0, 5 and 10 % NaCl but grew slowly in the medium containing 15, 20 and 25 % NaCl. One hundred and fifty five, and one hundred fourty three isolates gave a clear zone on skimmed milk agar (SMA) containing 0 and 5% NaCl, respectively. Not all of bacteria could produce clear zone on SMA containing 10, 15, 20 and 25% NaCl. Twelve isolates produced high protease activity in PY medium. Four *Bacillus* sp., K52 and K61 (isolated from Ka-pi), K53

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

and KK128 (isolated from Pla-ra) produced high protease activity in Medium 3 (1.0 % glucose, 0.25 % yeast extract and 0.05 % $CaCl_2.2H_2O$. The optimal medium for protease production contained 1.0 % glucose, 1.0 % peptone, 0.25 % yeast extract and 0.05 % $CaCl_2.2H_2O$. All of selected bacteria grew on NA containing 15 % NaCl, but activity was decreased with an increased in salt concentration.

The optimum pH and temperature of crude proteases from *Bacillus* sp. K52, K53, K61 and KK128 were at pH 8.0 and 50-55 $^oC$, respectively. The proteases were stable at 45 $^oC$ for 24 h and their activities decreased sharply after 30 min treatment at 60 $^oC$. The activity from these bacilli was inhibited EDTA, SDS, DTT, PMSF, $Fe^{2+}$, $Hg^{2+}$ and $Cu^{2+}$ and activated by $Co^{2+}$, glycerol, $Mn^{2+}$ and $Ca^{2+}$ except that the enzyme from *Bacillus* sp. K53 was not activated by $Co^{2+}$, and $K^+$ activated only the enzymes from *Bacillus* sp. K52 and K61. *Bacillus* sp. K61 showed the maximum specific activity of 0.39 U/mg. Egg albumin was the best substrate for protease activity from the *Bacillus* sp. K61.

The aminopeptidase (de-bitterness enzyme) from *Geobacillus thermoleo-vorans* 47B was purified by ammonium sulfate fractionation, DEAE, hydroxyapatite, MonoQ, gel filtration, second MonoQ and second hydroxyapatite column chromatographies, respectively. The purified enzyme had a molecular mass of 42,710 Da with SDS-PAGE, 46,773 Da with gel filtration and 42,977 Da with mass spectrometry indicating that this enzyme is monomer. It showed maximum activity at pH 7.6-7.8 and 60 $^oC$ and the enzyme was stable at 90 $^oC$ for 1 h. The enzyme were inhibited by metal chelating agents (EDTA, 0-phenanthroline, and dipiridyl). Apoenzyme was activated by addition of $Co^{2+}$. These results suggest that the purified enzyme was probably in metalloaminopeptidase group. Sodium chloride decreased the hydrolytic activity toward L-Leu-p-nitroanilide. The purified enzyme was highly specific for L-Leu-p-nitroanilide. After hydrolysis of the bitter peptides by *Geobacillus* cell free extracts , it was found that leucine was produced in the highest level.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** การแยกเชื้อ และการศึกษาคุณลักษณะของโปรติโอไลติคเอนไซม์จากแบคทีเรียทนเกลือและแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงเพื่อการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

**ผู้เขียน** นางสาวสมคิด ดีจริง

**ปริญญา** วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

**คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์**

| | |
|---|---|
| รศ. ดร. สายสมร ลำยอง | ประธานกรรมการ |
| รศ. ดร. นัยทัศน์ ภู่ศรัณย์ | กรรมการ |
| รศ. ดร. เกรียงศักดิ์ ไชยโรจน์ | กรรมการ |
| Prof. Dr. Mitsuaki Moriguchi | กรรมการ |

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ทำการแยกเชื้อ และศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียทนเกลือ และเอนไซม์อะมิโนเปปติเดสจากแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง *Geobacillus thermoleovorans* 47b และการประยุกต์ใช้เอนไซม์อะมิโนเปปติเดสในการย่อยเปปไทด์ที่ทำให้เกิดรสขม จากการแยกแบคทีเรียจากอาหารหมัก ดิน และน้ำทะเล ได้ทั้งหมด 182 ไอโซเลท พบแบคทีเรีย แกรมบวก รูปแท่ง แกรมลบ รูปแท่ง และแกรมบวก รูปกลม ซึ่งเจริญได้ดีบนอาหาร nutrient agar (NA) ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0, 5 และ 10 เปอร์เซนต์ แต่เจริญได้ช้าในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 15, 20 และ 25 เปอร์เซนต์ พบว่าจำนวน 155 และ 143 ไอโซเลท สร้างวงใสบนอาหาร skimmed milk agar (SMA) ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 5 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ทุกไอโซเลทไม่สร้างวงใสบนอาหาร SMA ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซนต์ เมื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในอาหาร PY medium พบว่า จำนวน 12 ไอโซเลท มีกิจกรรมของโปรติเอสสูงและมี 4 ไอโซเลทคือ K52 และ K61 (แยกได้จากกะปิ) ส่วน K53 และ KK128

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

(แยกได้จากปลาร้า) มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุดในอาหาร Medium 3(ประกอบด้วย กลูโคส 1.0 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด 0.25 เปอร์เซนต์ และ แคลเซียมคลอไรด์ 0.05 เปอร์เซนต์) อาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างโปรติเอส ประกอบด้วย กลูโคส 1.0 เปอร์เซนต์ ยีสต์สกัด 0.25 เปอร์เซนต์ เปปโตน 1.0 เปอร์เซ็นต์ และ แคลเซียมคลอไรด์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลท สามารถเจริญบนอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซนต์ แต่กิจกรรมของโปรติเอสลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น

กิจกรรมของโปรติเอสจาก *Bacillus* sp. K52, K53, K61 และ KK128 ทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 8.0 และอุณหภูมิ 50-55 $^{o}$C เอนไซม์โปรติเอสที่ได้มีความเสถียร 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 45 $^{o}$C และ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 60 $^{o}$C EDTA, SDS, DTT, PMSF, อิออนของ เหล็ก ปรอท และ ทองแดง มีผลยับยั้งกิจกรรมของโปรติเอสจาก *Bacillus* sp. ทั้ง 4 ไอโซเลทและอิออนของ โคบอล แมงกานีส แคลเซียม และกลีเซอรอล กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ยกเว้น โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. K53 ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยอิออนของโคบอล ส่วนโปตัสเซียมอิออนกระตุ้นการทำงานของโปรติเอสจาก *Bacillus* sp., K52 และ K61 กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสมีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.39 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน สับสเตรทที่ดีที่สุดสำหรับกิจกรรมของโปรติเอสของ *Bacillus* sp. K61 คือ อัลบูมินจากไข่

เอนไซม์อะมิโนเปปติเดส (เอนไซม์ย่อยเปปไทด์ที่ทำให้เกิดความขม) จาก *Geobacillus thermoleovorans* 47b ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี ammonium sulfate fractionation, คอลัมน์ DEAE, Hydroxyapatide, Mono Q, Gel filtration, Mono Q ครั้งที่ 2 และ hydroxyapatite ครั้งที่ 2 ตามลำดับ พบว่า มวลโมเลกุลของเอนไซม์บริสุทธิ์หาจากวิธี SDS-PAGE มีค่า 42,710 ดาลตัน จากวิธี gel filtration เท่ากับ 46,773 ดาลตัน และ โดยใช้แมสสเปกโตรเมทรี มีค่า 42,977 ดาลตัน ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์นี้เป็นโมโนเมอร์ เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้มีค่ากิจกรรมสูงสุดที่ pH 7.6-7.8 ที่อุณหภูมิ 60 $^{o}$C และมีความเสถียรเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 90 $^{o}$C สาร metal chelating agents เช่น EDTA, O-phenanthroline และ dipiridyl มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อะมิโนเปปติเดส และอิออนของโคบอลมีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ แสดงว่าเอนไซม์อะมิโนเปปติเดสนี้น่าจะเป็นชนิด metalloaminopeptidase นอกจากนี้ พบว่า โซเดียมคลอไรด์มีผลลดกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อใช้ L-Leu-p-nitroanilide เป็นสับสเตรท เมื่อนำเอนไซม์จากเซลล์สกัดมาย่อยสลายเปปไทด์ที่ทำให้เกิดความขม พบว่า ให้ปริมาณกรดอะมิโนชนิดลิวซีนสูงที่สุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved