ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การทำโปรติเอสจาก *Thermus* S2 ให้บริสุทธิ์และการหาลักษณะเฉพาะ
ชื่อผู้เขียน นางสาว วิภาภัทร กลัดวัง
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเคมี
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ :

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

บทคัดย่อ

แบคทีเรียกรัมลบ *Thermus* S2 ซึ่งแยกได้จากแหล่งน้ำพุร้อนสันกำแพง จังหวัดเชียงใหม่ สามารถผลิตโปรติเอสที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงและส่งออกนอกเซลล์ได้แอคติวิตีสูงสุดที่ 900 ยูนิต UA /ลิตร จากการเลี้ยงแบคทีเรียชนิดนี้ที่อุณหภูมิ 65°ซ ในอาหารที่ประกอบด้วย yeast extract และ tryptone อย่างละ 0.1% ในสารละลายเบสผสม พีเอช 7.2 ซึ่งมีอิออนของ Ca^{2+} Mg^{2+} และ Fe^{3+} ด้วยอัตราการเขย่าเท่ากับ 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การเติมตัวยับยั้งได้แก่ PMSF มากกว่า 5 mM หรือ EDTA และ Dithiothreitol อย่างละมากกว่า 1 mM ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลทำให้การเจริญเติบโตและการผลิตโปรติเอสลดลงเกือบหมด โปรติเอสที่ได้มีคุณสมบัติในการไฮโดรไลส์โปรตีนต่างชนิดกันเป็นลำดับจากเคซีน > โปรตีนจากถั่วเหลือง > ฮีโมโกลบิน > เจลาติน > โดยมีแอคติวิตีเท่ากับ 8.30, 2.45, 1.51, 0.70 ยูนิต/ลบ.ซม. ตามลำดับ แอคติวิตีของโปรติเอสชนิดนี้ถูกยับยั้งด้วย EDTA, 1,10-Phenanthroline, Phosphoramidon และ $ZnCl_2$ มากกว่า 8 mM ในขณะที่ 2-4 mM $CaCl_2$ เพิ่มแอคติวิตีได้สูงถึง 10% แต่ $MgCl_2$ และ $ZnCl_2$ ต่ำกว่า 8 mM ไม่มีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของโปรติเอส

การทำโปรติเอสดิบให้เข้มข้นขึ้น 3 เท่า โดยอัลตราฟิลเตรชันโดยมีเมมเบรนกั้นมวลโมเลกุลที่มีขนาดสูงกว่า 1,000 ดาลตัน ทำให้โปรติเอสมีแอคติวิตีคงเหลือ 76% การตกตะกอนโปรตีนที่เหลือด้วย 90% ของสารละลายอิ่มตัวแอมโมเนียมซัลเฟต และตามด้วยไดอะไลซิสตะกอนด้วย 0.02 Tris-HCl บัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 แอคติวิตีของโปรติเอสกลับคืนมา 73% และมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 4 เท่า การแยกไดอะไลส์โปรตีนด้วยคอลัมน์ของเซฟาเด็กซ์ จี-50 (2.0 x 73.0 ซม.) ได้โปรติเอส 2 ชนิดคือ โปรติเอส I และโปรติเอส II ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9.1 และ 2.8 เท่า ตามลำดับ ในขณะที่มีแอคติวิตีของโปรติเอสลดลงเหลือ 23 และ 21% ตามลำดับ

โปรติเอสบริสุทธิ์ที่ได้นี้มีมวลโมเลกุลประมาณ 23,900 และ 15,000 ดาลตัน โดยวิธีเจลฟิลเตรชัน

โปรติเอส I และ II มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 80 และ 65°ซ ตามลำดับ และมีค่าครึ่งชีวิตที่อุณหภูมินี้ที่ 4 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ แต่โปรติเอสทั้งสองชนิดมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากันที่พีเอช 8.0 คุณสมบัติในการไฮโดรไลส์โปรตีนชนิดต่างๆ แสดงว่าโปรติเอส I มีแอคติวิตีในการไฮโดรไลส์โปรตีนจากถั่วเหลืองชนิดอบ > เจลาติน > โปรตีนจากถั่วเหลืองชนิดไม่อบ > ฮีโมโกลบิน > เคซีน แต่โปรติเอส II ไฮโดรไลส์โปรตีนจากถั่วเหลืองชนิดอบ > เคซีน > โปรตีนจากถั่วเหลืองชนิดไม่อบ > ฮีโมโกลบิน > เจลาติน ในขณะที่โปรติเอสทั้งสองไม่สามารถไฮโดรไลส์ N-α-benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide แต่มีแอคติวิตีต่อ acetyl-tyrosine ethyl ester (ATEE), acetyl-tryptophan ethyl ester (ATpEE) และ benzoyl-arginine ethyl ester (BAEE) โดยมีแอคติวิตีต่อ ATpEE > ATEE > BAEE และ ATEE > ATpEE > BAEE สำหรับโปรติเอส I และ II ตามลำดับ โปรติเอสบริสุทธิ์ทั้งสองชนิดมีแอคติวิตีต่อไดเปปไทด์ 18 ชนิดเหมือนกัน และ Phe-Gly เป็นไดเปปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลส์ได้เฉพาะด้วยโปรติเอส II เท่านั้น การตรวจสอบมวลโมเลกุลของโปรติเอส I และ II ด้วย SDS-PAGE ซึ่งใช้ 10% โพลีอะคริลาไมด์ แสดงมวลโมเลกุลที่ประมาณ 22,900 และ 17,800 ดาลตัน ตามลำดับ

Thesis Tittle Purification and Characterization of Protease from *Thermus* S2

Author Miss Wipapat Kladwang

M.S. Chemistry

Examining Committee :

Assoc. Prof. Dr. Pawinee Kanasawud Chiarman

Dr. Pirote Kitchanapanitch Member

Dr. Bundit Leelasart Member

Abstract

A gram negative bacterium, *Thermus* S2, which was isolated from Sankhampang hot spring in Chiang Mai , could produce the thermostable extracellular protease. The activity of 900 Azocasein units per litre was obtained from the cultivation of the bacterium at 65°C in a medium containing 0.1% of each yeast extract and tryptone in base mixture pH 7.2 that consisted of Ca^{2+}, Mg^{2+} and Fe^{3+} with shaking of 150 rpm for 24 hours. Addition of protease inhibitors such as PMSF more than 5mM or EDTA and Dithiothreitol more than 1 mM each into cultivation medium induced the decrease of all growth and protease activity. The obtained protease had hydrolysis property on different proteins in order of casein > soybean protein > haemoglobin > gelatin with the activity of 8.30, 2.45, 1.51 and 0.70 unit/cm^3 respectively. Its activity was inhibited by EDTA, 1,10- phenantroline, phosphoramidon and $ZnCl_2$ more than 8 mM whereas 2-4 mM $CaCl_2$ enhanced the activity up to 10 % , but $MgCl_2$ and $ZnCl_2$ less than 8 mM had no effect on activity.

Three folds concentration of crudde protease by ultrafiltration with the membrane cut-off 1,000 daltons, provided 76% the residual activity of protease. Precipitation of residual protein by 90% saturated ammonium sulfate followed by dialysis the precipitated protein against 0.02 M Tris-HCl buffer pH 7.2 yielded 73% recovery of protease activity and 4 folds of purification. Separation of dialysed protein with a Sephadex G-50 column (2.0 x73.0 cm) gave two purified proteases namely protease I and II with the purification of 9.1

and 2.8 folds respectively whereas their recovery activities were 23 and 21 % recovery. The purified proteases had approximate molecular weight of 23,900 and 15,000 daltons by gel filtration.

Protease I and II had the optimum temperature at 80 and 65° C respectively, and their half life at these temperatures were 4 and 24 hoursrespectively. But both of them had the same optimum pH at 8.0. The property in hydrolysis of different proteins indicated that proteassse I had the hydrolytic avtivity on roasted soybean protein > gelatin > non-roasted soybean protein > haemoglobin > casein, but protease II hydrolysed roasted soybean protein> casein > non-roasted soybean protein > haemoglobin > gelatin. Whereas both of them could not hydrolyse N-α-benzzoyl-DL-arginine p-nitroanilide (BAPNA) but they had the activity on acetyl-tyrosine ethyl ester (ATEE), acetyl-tryptophan ethyl ester (ATpEE) and benzoyl - arginine ethyl ester (BAEE). The activity on ATpEE > ATEE > BAEE and ATEE > ATpEE > BAEE for protease I and II respectively. Both of purified proteases hydrolyse the same 18 dipeptides. Phe-Gly was a dipeptide hydrolysed by only protease II. The estimation of molecular mass of protease I and II by SDS-PAGE on 10% polyacrylamide indicated approximately at 22,900 and 17,800 daltons respectively.