การคัดเลือกและคุณลักษณะของเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียชอบเกลือสายพันธุ์ SM1

Screening and Characterization of Protease from Halophilic Bacterial Strain SM1

ธิดารัตน์ จุทอง

Thidarat Juthong

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology
Prince of Songkla University

2544

เลขหมู่ QP609.P78 ธ63 2544
Bib Key 217055
...../...../.....

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกและคุณลักษณะของเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียชอบเกลือสายพันธุ์ SM1
ผู้เขียน	นางสาวธิดารัตน์ จุทอง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2544

บทคัดย่อ

แยกแบคทีเรียชอบเกลือสายพันธุ์ SM1 จากตัวอย่างอาหารหมักดั้งเดิม (ปลาร้า) โดยใช้อาหารวุ้น skim milk ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 25 แบคทีเรียผลิตเอนไซม์โปรติเอสปรากฏเป็นวงใสรอบโคโลนีหลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน แบคทีเรียมีสีโคโลนีส้มแดง ติดสีแกรมลบ รูปร่างกลม ผลิตเอนไซม์คะตะเลส และต้องการเกลือโซเดียมคลอไรด์อย่างน้อยร้อยละ 15 สำหรับการเจริญ

ในการศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยทดลองใช้เคซีนเป็นสับสเตรทในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าอาหารที่เหมาะสมประกอบด้วยยีสต์สกัดร้อยละ 1 เคซามิโนแอซิค ร้อยละ 0.75 แมกนีเซียมซัลเฟต ร้อยละ 1 และเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 20 พีเอชเท่ากับ 6.5 สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ คือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที การผลิตเอนไซม์สูงสุดเมื่อการเจริญเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ และเอนไซม์ที่ผลิตได้ย่อยทั้งเคซีนและเจลาติน เมื่อทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โดยใช้เจลาตินเป็นสับสเตรท พบว่าการทำงานของเอนไซม์มีความเหมาะสมที่สุดที่พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และเกลือโซเดียมคลอไรด์ 4.3 โมลาร์ (ร้อยละ 27) เอนไซม์มีกิจกรรมเหลืออยู่ร้อยละ 100, 97.12, 89.75, 85.23 และ 72.23 หลังจากบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30, 37, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นอกจากนี้พบว่า แมกนีเซียมซัลเฟตความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์และแคลเซียมคลอไรด์ 20 มิลลิโมลาร์ส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ จากการเก็บเอนไซม์นาน 12 วัน ที่อุณหภูมิ 4 และ -20 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมเหลืออยู่ร้อยละ 37 และ 41.44 ตามลำดับ และเมื่อเติมกลีเซอรอล พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่ร้อยละ 47.75 และ 44.44 ตามลำดับ หลังจากทดลองทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยสารเอธานอลในอัตราส่วนเอนไซม์ต่อเอธานอล เท่ากับ 1 ต่อ 3 โดยปริมาตร พบว่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 3.27 เท่าและได้ผลผลิตร้อยละ 27.63

Thesis Title	Screening and Characterization of Protease from Halophilic Bacterial Strain SM1
Author	Miss Thidarat Juthong
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2001

Abstract

An extremely halophilic bacterium, designed as SM1 was isolated from traditional fermented fish (Pra-ra) using skim milk agar containing 25% NaCl. The isolate produced protease with clear zone appeared after 4 days cultivation. The bacterium colony was orange-red, Gram negative, coccus, catalase positive and required at least 15% NaCl for growth.

Casein was used as a substrate for measuring enzyme activity during medium optimization for protease production. The optimal culture medium contained 1% yeast extract, 0.75% casamino acid, 1% $MgSO_4$ $7H_2O$ and 20% NaCl, pH of 6.5. The conditions for protease production were 37°C, and shaking speed of 200 rpm. Protease production was highest at early stationary phase. The enzyme could hydrolyze both casein and gelatin. In the experiment for determination optimal conditions for enzyme activity gelatin was used as a substrate. The optimal conditions for protease activity were attained at pH 7.5, 55°C and 4.3 M NaCl (27% NaCl). Residual enzyme activity was 100, 97.12, 89.75, 85.23 and 72.23% after keeping the enzyme for 30 min at 30, 37, 40, 50 and 60°C, respectively. The results showed that 10 mM $MgSO_4$ $7H_2O$ and 20 mM $CaCl_2$ could activate enzyme activity. After storage at 4 and -20°C for 12 days without the addition of glycerol, the residual enzyme activities were 37 and 41.44%, respectively. Supplementation of 10% glycerol to the enzyme gave the residual enzyme activity of 47.75% and 44.44%, respectively. The enzyme was preliminary purified with ethanol in a ration of 1:3 vol/vol (enzyme to ethanol). The result revealed that the enzyme was purified 3.27 folds with a total yield of 27.63%.