195796

สิรินภา ช่วงโอภาส 2550: การทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. A39 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา ประธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปทุมพร ฉิมเอนก, Dr.Eng. 121 หน้า

เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. A39 เป็นเอนไซม์ที่อยู่นอกเซลล์ ซึ่งการทดลองนี้ผลิตโดยวิธี constantly fed-batch culture ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BMSM ที่มี 2% กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนและ 0.25% skim milk เป็นสารเหนี่ยวนำ และควบคุม pH ที่ 11.0 อุณหภูมิ 30°C ได้ crude enzyme 0.87 U/mg แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วย 80% $(NH_4)_2SO_4$ แล้วผ่านคอลัมน์ phenyl sepharose และต่อด้วยคอลัมน์ mono Q พบว่าได้เอนไซม์บริสุทธิ์มีค่าความบริสุทธิ์เท่ากับ 66.88 เท่า และ yield เท่ากับ 3.52%

เมื่อนำเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้มาศึกษาคุณสมบัติต่างๆ พบว่ามวลโมเลกุลที่วิเคราะห์โดยวิธี SDS-PAGE คือ 35 kDa และโดยวิธี gel filtration คือ 79 kDa ดังนั้นเอนไซม์นี้เป็น dimeric enzyme และทำการยืนยันอีกครั้งด้วยวิธี MALDI-MS พบว่า monomer มีมวลโมเลกุล 26,964 Da และ dimer มีมวลโมเลกุล 53,973 Da ในการวิจัยนี้ใช้เคซีนเป็นสับสเตรทในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ เอนไซม์บริสุทธิ์มีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 11.0 และ 55°C ตามลำดับ โดยมีความคงตัวในช่วง pH ที่กว้างคือ 7.0 ถึง 12.0 และความคงตัวที่อุณหภูมิ 30°C ถึง 40°C มีค่า Km เท่ากับ 0.73 μmol/ml และ Vmax เท่ากับ 10.71 μmol/ml.min ตามลำดับ อิออนโลหะ Ca^{2+} และ Cu^{2+} กระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์อย่างเห็นได้ชัด เอนไซม์นี้จัดอยู่ในกลุ่ม metalloprotease ซึ่งมี Ca^{2+} จำเป็นสำหรับบริเวณเร่งของเอนไซม์ เพราะถูกยับยั้งอย่างรุนแรงด้วย EDTA และ EGTA เมื่อเปรียบเทียบเอนไซม์จาก *Bacillus* sp. A39 กับเอนไซม์ทางการค้า พบว่ามีค่ากิจกรรมจำเพาะต่ำกว่า thermolysin 1.74 เท่า แต่สูงกว่า proteinase K 1.42 เท่า crude enzyme สามารถประยุกต์ใช้ในการลอกกาว sericin ส่วนใหญ่จากเส้นไหมไทยโดยสามารถลอกกาวได้ประมาณ 27%

195796

Sirinapa Chungopast 2007: Purification and Characterization of Alkaline Protease from *Bacillus* sp. A39. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Assistant Professor Patoomporn Chim-anage, Dr.Eng. 121 pages.

An extracellular alkaline protease produced by *Bacillus* sp. A39 was grown by a laboratory constantly fed-batch fermentation. The BMSM medium was used for cultivation with 2% glucose and 0.25% skim milk as carbon source and inducible substrate, respectively. The cultivation was controlled at pH 11.0, 30°C, 300-550 rpm agitation and dissolved oxygen concentration of 70% air saturation. The crude enzyme of 0.87 U/mg was obtained. The enzyme was purified using 80% ammonium sulfate precipitation, phenyl sepharose column and mono Q column. The purified enzyme exhibited a 66.88 fold purification and yield of 3.52%

The molecular mass of the purified alkaline protease as revealed by SDS-PAGE was 35 kDa while the molecular mass was estimated to be 79 kDa on gel filtration therefore it is dimeric enzyme. Confirmation molecular mass by MALDI-MS was subsequently estimated to be 26,964 Da as monomer and 53,973 Da for dimer. In this experiment casein was used as the substrate for determination of enzyme activity. The enzyme exhibited pH and temperature optimal of 11.0 and 55°C, respectively. It was stable at a wide pH range of 7.0 to 12.0 and temperature between 30°C and 40°C. The Km was 0.73 µmol/ml and Vmax was 10.71 µmol/ml.min. Metal ions as Ca^{2+} and Cu^{2+} activated alkaline protease activity. The alkaline protease from *Bacillus* sp. A39 was classified as metalloprotease which required Ca^{2+} for active site because the enzyme was strongly inhibited by EDTA and EGTA. When compared the specific activity with commercial proteolytic enzymes, alkaline protease from *Bacillus* sp. A39 showed 1.74 times lower than thermolysin but 1.42 times higher than proteinase K. Moreover, the crude enzyme could be applicable for removing most of sericin contents from Thai silk yarn with the yield of 27%.