Thesis Title PLA-degrading Enzyme by a Novel *Amycolatopsis thailandensis* : Optimization and Characterization

Author Miss Atchareeya Chomchoei

Degree Doctor of Philosophy (Applied Microbiology)

Thesis Advisory Committee Prof. Dr. Saisamorn Lumyong Advisor

Prof. Dr. Dieter Jendrossek Co-advisor

Assoc. Prof. Dr. Panuwan Chantawannakul Co-advisor

Asst. Dr. Chartchai Khanongnuch Co-advisor

ABSTRACT

The aims of this study were to isolate, identify and investigate on the PLA-degrading microorganisms and their enzymes. One hundred and twenty five soil samples from eight different locations including forest, farm, garden, buried, riverside, hot spring, compost and sediment were collected from northern Thailand. A total of 41 PLA-degrading microorganisms were isolated by clear zones method on emulsified PLA agar plate. Actinomycetes were the major group of PLA-degrading microorganisms and had a high ability to produce PLA-degrading enzyme. The isolates CMU-PLA03 and CMU-PLA07 had a high ability to degrade PLA by formed a large and clear hydrolytic zone on the PLA-emulsified agar. Moreover, the culture broth containing PLA emulsion were clearified after inoculation at 30°C for 14 days and the supernatant had a high PLA-degrading enzyme activity

These two isolates CMU-PLA03 and CMU-PLA07 were identifided belong to members of the genus *Amycolatopsis* in the family *Pseudonocardiaceae* on the basic

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

of the morphological, chemotaxonomical, biochemical characteristic and 16S rRNA analysis. They grew well on all International Streptomyces Project (ISP) medium by formed circular colonies that were covered with white to pale yellow aerial mycelium on different ISP media. The colony of strain CMU-PLA03 had wrinkled surfaces while CMU-PLA07 had smooth colony surface. The aerial mycelium color was white but the color of the substrate mycelium was pale yellow and yellowish brown for isolate CMU-PLA03 and CMU-PLA07, respectively. No diffusible pigments of both isolates were produced on any of the media tested. The spore morphology was fragmented into long strands and had smooth-surfaced spore. The cell wall of both strains were type III (*meso*-DAP) and not contained mycolic acids. Whole-cell sugars were arabinose and galactose. The predominant menaquinone is MK-9(H_4). The main phospholipid of two isolates were phospholipid type PII (phosphatidylethanolamine is the only nitrogen-containing phospholipid). The results of % identity and % average similarity of 16S rDNA analyzed by PHYDIT programe, isolate CMU-PLA03 and CMU-PLA07 showed 96-99% similarity with members of the genus *Amycolatospis*. The 16S rDNA nucleotide sequences of these isolates have been deposited in GenBank under accession numbers FJ556897 and FJ581021, respectively.

A neighbor joining tree of isolate CMU-PLA03 is highly related to *A. keratiniphila* subsp. *nogabecina* JCM 12671^T (98.8% similarity) and *A. keratiniphila* subsp. *keratiniphila* JCM 12683^T (98.8% similarity) whereas CMU-PLA07 showed 99.5% and 99.4% similarity to that of *A. coloradensis* JCM 9869^T and *A. alba* JCM 10030^T, respectively. DNA-DNA hybridization of isolate CMU-PLA03 showed high a DNA-DNA relatedness value of 89% with *A. keratiniphila* subsp. *nogabecina* whereas isolate CMU-PLA07 shared a 16S rDNA similarity of 99.5% and 99.4%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

but displayed low DNA-DNA relatedness value of 49% and 45% to *A. coloradensis* JCM 9869^T and *A. alba* JCM 10030^T, respectively. However, isolate CMU-PLA07 was proposed a novel species of the genus *Amycolatopsis* which designation name *Amycolatopsis thailandensis* sp. nov. CMU-PLA07 based on DNA-DNA relatedness and differentiated of phenotypic, biochemical properties and cellular fatty acid content.

Two isolates CMU-PLA03 and CMU-PLA07 were able to degrade PLA film in liquid medium. The weight of the film decreased and became whiten and some portions of the fragment edges were disintegrated. The surface changed to be rough and irregular holes under scanning electron microscope. PLA-degrading enzyme activity and cell growth were increased in culture broth during cultivation but no significant decreased in water-soluble total organic carbon (TOC) and pH.

The PLA-degrading isolate CMU-PLA07 was investigated on PLA-degrading enzyme production at different culture conditions including types of carbon source and complex nitrogen source, concentration of carbon source and complex nitrogen source, initial pH, temperature and incubation time were used to obtain the maximum levels of PLA-degrading productivity. The maximum activity of enzyme was detected when culture in basal medium containing glucose 0.3% (w/v) as carbon source and tryptose 0.1% (w/v) as complex nitrogen source at initial pH 7.0 when incubated at 30°C for 5 days. An increase of substrate concentration resulted in a decrease of PLA-degrading enzyme activity due to catabolic repression for enzyme synthesis.

The PLA-degrading enzyme produced from isolate CMU-PLA07 was purified by cation exchange chromatography and gel filtration chromatography method. The enzyme was purified up to 6.3 fold with a final recovery of 34%. The specific activity

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

of the purified enzyme was 26 U/mg protein. The final enzyme preparation was found to be homogenous as adjudicated by SDS-PAGE with a molecular weight of about 24 kDa. The *N*-terminal amino acids sequence of purified PLA-degrading enzyme was determined as Ala-Ile-Ala-Ser-Gly-Ala-Val-Asn-Gly-Ala. The comparison of terminal amino acid sequence with database showed significantly closed with one putative serine protease from *Corynebacterium kroppenstedtii* DSM 44385 (Accession number YP 002905804).

The purified enzyme has a pH optimum of 9.0 with good stability at pH range pH 4 to pH 12. The purified PLA-degrading enzyme obtained has maximal activity between 45°C and 55°C with a loss of activity above 60°C. The effect of different inhibitors and chelator agents on the activity of the purified PLA-degrading enzyme obtained from isolate CMU-PLA07 showed that the enzyme is a serine protease since its activity was completely inhibited by PMSF and DFP which is a specific inhibitor of serine proteases. DTT and 2-mercaptoethanol strongly inhibited the purified enzyme and indicated the presence of essential disulfide bonds. Some metal ions such as Zn^{2+} and Hg^{2+} had strongly inhibited effect on enzyme activity whereas Mn^{2+} and Co^{2+} were able to enhance the enzyme activity. The purified PLA-degrading enzyme from isolate CMU-PLA07 showed hydrolysis activity on ester bond of various substrate such as PLA, casein, BSA, skim milk and *p*NP- carboxylate substrates (C_2-C_{16}) but not PCL, PHB and tributyrin and triolein.

Overall, the research findings indicate that actinomycetes as the genus *Amycolatopsis* is an efficient microbe for PLA degradation based on culture based method. PLA-degrading enzyme of *A. thailandesis* strain CMU-PLA07 exhibits serine protease which is considered for applications in PLA recycling waste, the

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

agricultural, industrial, medical and other fields. However, the modification of its properties by protein engineering and the molecular background for the regulation at promoter level for understanding and requires in the future.

Keywords: Degradation, Poly-(L-Lactic Acid), Actinomycetes, Biodegradable polymer

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	เอนไซม์ย่อยสลายกรดพอลิแอลแลกติกโดยเชื้อสายพันธุ์ใหม่ *Amycolatopsis thailandensis* : การหาสภาวะที่เหมาะสมและการหาลักษณะเฉพาะ
ผู้เขียน	นางสาวอัจฉรียา ชมเชย
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (จุลชีววิทยาประยุกต์)
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ศ. ดร. สายสมร ลำยอง อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	Prof. Dr. Dieter Jendrossek อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	รศ. ดร. ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผศ. ดร. ชาติชาย โขนงนุช อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาจุลินทรีย์และเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแอลแลคติคแอซิดจากการเก็บดิน 125 ตัวอย่างจากสภาพแวดล้อมบริเวณต่างๆ 8 แห่งได้แก่ ป่า, ไร่-นา, สวน, ตลิ่งแม่น้ำ-ลำคอง, น้ำพุร้อน, กองขยะทับถม, และจากตะกอนบ่อบำบัดในเขตภาคเหนือ ประเทศไทย พบเชื้อ 41 ไอโซเลทที่สามารถย่อยพอลิแอลแลคติคแอซิดโดยเกิดวงใสบนอาหารแข็งสูตร basal medium ที่เติมอิมัลชั่นพอลิแอลแลคติคแอซิด โดยแอคติโนมัยซีทเป็นจุลินทรีย์ที่จำนวนมากที่สุดและมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ดีเยี่ยม ไอโซเลทที่สามารถย่อยสลายพอลิแอลแลคติคแอซิดได้ดีที่สุดโดยมีขนาดวงใสกว้างและใสที่สุด คือ ไอโซเลท CMU-PLA03 และไอโซเลท CMU-PLA07 ที่แยกได้จากดินบริเวณป่าอุทยานแห่งชาติแม่จริม จังหวัดน่าน และอุทยานแห่งชาติผาแดง จังหวัดเชียงใหม่ ตามลำดับ เป็น เชื้อทั้งสองไอโซเลทยังสามารถย่อยสลายอิมัลชั่นพอลิแอลแลคติคแอซิดในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 14 วันได้และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแอลแลคติคแอซิดสูงสุดจากการทดสอบโดยใช้น้ำเลี้ยงเซลล์

ตามคุณลักษณะเฉพาะของสัณฐานวิทยา องค์ประกอบทางเคมีของเซลล์ และยีนส่วน 16S rDNA สามารถจัดจำแนกชนิดและอนุกรมวิธานของเชื้อทั้งสองไอโซเลท อยู่ใน family *Pseudonocardiaceae*, genus *Amycolatopsis* ซึ่งมีค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของเบส 96-99% โดยลักษณะโคโลนีประกอบด้วยเส้นใยสีขาว ไอโซเลท CMU-PLA03 จะมีผิวหน้าโคโลนีย่น ขณะที่ไอโซเลท CMU-PLA07 มีผิวหน้าโคโลนีเรียบ เส้นใยที่เจริญในอาหารแข็งระบบ ISP medium เป็นสีเหลืองอ่อนและสีเหลืองน้ำตาลตามลำดับ ไม่มีการสร้างสารละลายสีแผ่ออกมาในอาหารแข็ง สปอร์มีลักษณะเป็นท่อนยาวผิวเรียบ ที่ผนังเซลล์พบ amino acid เป็นชนิด type III

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(*meso*-DAP) ไม่พบ mycolic acids และพบน้ำตาล arabinose และ galactose, menaquinone ชนิด MK-9(H_4) และ phospholipid ชนิด type PII ที่พบเป็นส่วนประกอบหลักของเซลล์ โดยที่ไอโซเลท CMU-PLA03 จัดอยู่ในสายพันธุ์ *A. keratiniphila* subsp. *nogabecina* ขณะที่ไอโซเลท CMU-PLA07 บ่งชี้เป็นสายพันธุ์ใหม่ *Amycolatopsis thailandensis* sp. nov. CMU-PLA07 จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง DNA ด้วยเทคนิค DNA-DNA hybridization และเปรียบเทียบจากคุณลักษณะทางชีวเคมีและทางกายภาพ โดยมีลำดับหมายเลขในระบบฐานข้อมูลของ GenBank FJ556897 และ FJ581021 ตามลำดับ

จากการทดสอบการย่อยสลายแผ่นฟิล์มพอลิแอลแลคติคแอซิดด้วยเชื้อไอโซเลท CMU-PLA03 และ CMU-PLA07 ในอาหารเหลวสูตร basal medium ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 21 วัน พบว่า น้ำหนักของแผ่นฟิล์มหายไปจากน้ำหนักเริ่มต้น และลักษณะของแผ่นฟิล์มเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่น ขอบยุ่ย พื้นผิวแผ่นฟิล์มภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนมีลักษณะขรุขระเป็นหลุมเล็กๆ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่มีเซลล์ และนอกจากนี้ยังพบว่าค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแอลแลคติคแอซิดมและการเจริญของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น แต่ค่าของสารอินทรีย์ทั้งหมดที่ละลายในอาหารเหลวและความเป็นกรด-เบสไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ

การผลิตและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแอลแลคติคแอซิดโดยเชื้อ *Amycolatopsis thailandensis* strain CMU-PLA07 พบว่า เอนไซม์ย่อยสลายพอลิแอลแลคติคแอซิดมีค่ากิจกรรมสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในอาหารเหลวสูตร basal medium ที่ประกอบด้วยน้ำตาล glucose 0.3% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนและ tryptose 0.1% (w/v) เป็นแหล่ง สารประกอบอินทรีย์ที่ pH เริ่มต้น 7.0 เมื่อเลี้ยงภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน โดยพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเชิงซ้อนซึ่งเป็นผลจากกระบวนการ catabolic repression ภายในเซลล์ เอนไซม์ที่ย่อยพอลิแอลแลคติคแอซิดจาก *Amycolatopsis thailandensis* strain CMU-PLA07 ทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี cation exchange chromatography และ gel filtration chromatography ตามลำดับ พบว่า เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้คิดเป็น 34% ซึ่งมีความบริสุทธิ์เป็น 6.3 เท่า ด้วยค่ากิจกรรมจำเพาะ เท่ากับ 26 U/mg โปรตีน มวลโมเลกุลของเอนไซม์บริสุทธิ์มีค่า 24 กิโลดาลตันจากวิธี SDS-PAGE และมีลำดับกรดอะมิโน Ala-Ile-Ala-Ser-Gly-Ala-Val-Asn-Gly-Ala บนปลาย *N*-terminal โดยมีความใกล้เคียงกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ serine protease จากเชื้อ *Corynebacterium kroppenstedtii* DSM 44385 (YP 002905804)

เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้มีค่ากิจกรรมสูงสุดที่ pH 9.0 ที่อุณหภูมิช่วง 45°C ถึง 55°C และมีความเสถียรทุกช่วง pH ทดสอบ โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิมากกว่า 60°C ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งด้วย PMSF, DFP, DTT และ 2-mercaptoethanol

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อิออนของสังกะสีและเมอร์คิวริกมีผลยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ แต่อิออนของแมงกานีสและโคบอลต์มีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ เอนไซม์บริสุทธิ์สามารถย่อยสลายสับสเตรท PLA, casein, BSA, skim milk และ *p*NP- carboxylate (C_2-C_{16}) แต่ไม่ย่อยสลาย PCL, PHB, tributyrin และ triolein ซึ่งจากคุณสมบัติที่กล่าวมาสามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์ย่อยสลายพอลิแอลแลคติคแอซิดจากเชื้อ *Amycolatopsis thailandensis* strain CMU-PLA07 เป็นชนิด serine protease

คำสำคัญ: การย่อยสลาย, พอลิแอลแลคติคแอซิด, แอคติโนมัยซีท, พอลิเมอร์ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved