

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ

การวิจัยเพื่อผลิตโปรตีนที่ทนอุณหภูมิสูงได้เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และ/หรือผงซักฟอก

ผู้เขียนรายงานวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.สุรีย์ พุตระกูล

แบคทีเรียทนความร้อนสายพันธุ์ ที่แอลเอส 33 เป็นแบคทีเรียที่ผลิตโปรตีนที่ส่งออกนอกเซลล์ ซึ่งแยกได้จากน้ำพุร้อนเทพพนม จังหวัดเชียงใหม่ แบคทีเรียนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีและผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณสูงเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย 0.1% w/v yeast extract และ 0.25% w/v skim milk ใน 80% v/v base mixture ที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โปรตีนสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 5.0 - 8.0 และ 70 - 80 °C ตามลำดับ และเสถียรในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 เมื่อต้มที่ 75 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นอกจากนี้ CaCl_2 จะช่วยทำให้ความคงทนต่อความร้อนของทั้งสารละลายเอนไซม์ที่มีและไม่มีสารประกอบที่ไวต่อหมู่ไทออลเพิ่มขึ้น โปรตีนสามารถทนต่อความร้อนได้ดีในตัวอย่างละลายอินทรีย์ ได้แก่ Diisopropyl ether, Cyclohexane และ Hexane และโปรตีนสามารถย่อยสลายโปรตีนได้หลายชนิดดังนี้ casein, lysozyme, skim milk, ovalbumin, hemoglobin, BSA, soybean, azocasein, creatinine และ gelatin นอกจากนี้แอกติวิตีของโปรตีนจะหมดไปเมื่อมี 40 mM EDTA อยู่ในสารละลายซึ่งทำให้จับประจุเอนไซม์เป็นพวกนิวคลีอิกไทด์โปรตีนและการเติมแคทไอออนที่มีความเข้มข้นต่ำ (< 10mM) ได้แก่ Mg^{2+} , Ca^{2+} และ K^+ จะช่วยทำให้แอกติวิตีของโปรตีนเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะการเติม 1 mM Zn^{2+} นอกจากจะทำให้แอกติวิตีเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจนแล้ว ยังช่วยทำให้แอกติวิตีของ apoenzyme กลับคืนมา 64.94% จึงสรุปได้ว่าโลหะที่อยู่ในโมเลกุลของโปรตีนคือ Zn^{2+} โปรตีนได้ถูกทำให้เข้มข้นและบริสุทธิ์ขึ้นบางส่วน โดยการทำให้ freeze-dry, โคอะไลซิส โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน และเจลฟิเลตรชัน ในการตรวจหาโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธีเจลฟิเลตรชัน พบว่ามีค่าประมาณ 21,843 ดาลตัน และเมื่อนำมาศึกษาลักษณะเฉพาะต่างๆ พบว่าจะใกล้เคียงกับผลการศึกษาโดยใช้ crude enzyme คือ สามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 5.0-8.0 และ 70-80 °C ตามลำดับ และจะเสถียรที่อุณหภูมิ 70 °C โปรตีนสามารถทนต่อความร้อนได้ดีเมื่ออยู่ในตัวอย่างละลายอินทรีย์ ได้แก่ Diisopropyl ether, Cyclohexane และ Hexane ส่วนการศึกษาผลของตัวบัฟเฟอร์และแคทไอออน

พบว่า EDTA ในความเข้มข้นต่ำเพียง 5 mM ก็สามารถยับยั้งการทำงานของโปรติเอสได้เกือบสมบูรณ์ และการเติมแคทไอออนที่มีความเข้มข้นต่ำ (1 mM) ได้แก่ Mg^{2+} , Ca^{2+} และ K^+ จะทำให้แอกติวิตีของโปรติเอสเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะการเติม Zn^{2+} นอกจากนี้ยังพบว่าโลหะที่เป็นส่วนประกอบในโครงสร้างโมเลกุลของโปรติเอสที่แยกบริสุทธิ์บางส่วนนี้ คือ Zn^{2+} และโปรติเอสนี้จะมีค่า K_m และ V_{max} เมื่อใช้ azocasein เป็นสับสเตรทเท่ากับ 0.14 % w/v และ 0.108 U/ml/min ตามลำดับ

Abstract

Title Production of Thermostable Proteases for Food Industry and/or Use as Biocatalyst in Detergents

Report by Assoc.Prof. Dr. Suree Phutrakul

Thermophilic bacterium strain TLS33 producing extracellular thermostable protease was isolated from Thephanom hot spring in Chiang Mai. The bacteria grew and secreted high protease activity when cultured in a medium containing 0.1% w/v yeast extract and 0.25% w/v skim milk in 80% v/v base mixture at 65 °C for 48 h. This protease exhibited the optimum pH and temperature for activity at 5.0-8.0 and 70-80 °C respectively. It was stable in a buffer solution pH 7.0 after incubated at 75 °C for 1 h. Thermostabilities of the proteases in the presence and absence of thiol-reactive reagents were increased by the addition of CaCl₂. Diisopropyl ether, cyclohexane and hexane protected this protease from heat denaturation. The protease could hydrolyse a number of substrates including casein, lysozyme, skim milk, ovalbumin, hemoglobin, BSA, soybean, azocasein, creatinine and gelatin respectively. It was completely inactivated by 40 mM EDTA which could be classified as a neutral metalloprotease. Furthermore, the proteolytic activity of the enzyme was enhanced by low concentration (< 10 mM) of Ca²⁺, Mg²⁺ and K⁺, especially the addition of 1mM Zn²⁺ activated the higher activity of the enzyme and restored the activity of the apoenzyme up to 64.94%. From these results, this protease could be classified as neutral metalloprotease containing Zn²⁺ in its molecule. The protease was concentrated and partially purified by freeze-dry, dialysis, ion-exchange chromatography and gel filtration and its molecular weight determined by gel filtration was about 21,843 dalton. The characterizations of the partially purified protease was the same as the crude protease which exhibited the optimum pH and temperature for its activity at 5.0-8.0 and 70-80 °C, respectively. It was stable up to 70 °C and stable in 50% v/v organic solvents such as diisopropyl ether, cyclohexane and hexane. Its activity was almost completely loss in the presence of 5 mM EDTA and it was enhanced by low concentration (1 mM) of Ca²⁺, Mg²⁺ and K⁺ especially the addition of Zn²⁺. The kinetic parameters of the partially purified protease (K_m and V_{max} values) when azocasein was used as substrate were 0.14 % w/v and 0.108 U/ml/min respectively.