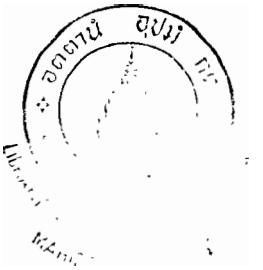
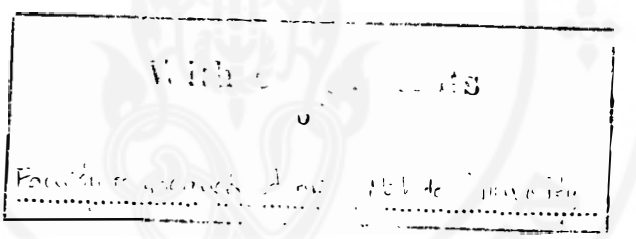


SCREENING, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A THERMOPHILE LIPASE

AMONLAYA JATURAPAT



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(BIOCHEMISTRY)

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1995

Copyright by Mahidol University

TH
A533Q
1995

ชื่อวิทยานิพนธ์ การแยก การทำให้บริสุทธิ์ และการศึกษาคุณสมบัติ ของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อจุลินทรีย์ทนความร้อน

ผู้วิจัย อมลยา จตุรภัทร

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

ประหยัด โกมารทัต, Ph.D.

พิชิต โตสุโขวงศ์, Ph.D.

ประพนธ์ วิไลรัตน์, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 11 ธันวาคม พ.ศ. 2538

บทคัดย่อ

ได้ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ทนความร้อนที่ผลิตไลเปสจากน้ำพุร้อนในภาคเหนือของประเทศไทย ได้รวมทั้งสิ้น 7 สายพันธ์ สายพันธ์ที่ผลิตไลเปสสูงสุด (55 หน่วย/ลิตร) คือ TP404 ซึ่งสร้างไลเปสที่ทนความร้อนและทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 เซลเซียส และทนต่อความเป็นกรดด่างในช่วง pH 7-10.

เนื่องจาก TP404 สร้างไลเปสในปริมาณที่ไม่สูงนัก การแยกไลเปสให้บริสุทธิ์จึงจำเป็นต้องใช้เอนไซม์ที่สร้างโดย *E.coli* ที่ได้มีการโคลนยีนไลเปสจาก TP404 เข้าไป (*E.coli* pUCTL4) ขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์ประกอบด้วย การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และ การแยกโดยเทคนิคคอลัมน์โครมาโตกราฟีโดยใช้ DEAE-Sephadex A-25, Sephadex G-100 และ Phenyl Sepharose CL4B ตามลำดับ. ไลเปสที่เตรียมได้ประกอบด้วยโปรตีนเพียงชนิดเดียว ทั้งนี้โดยการตรวจสอบโดยวิธีอีเลคโตร

Copyright by Mahidol University

โฟรีซีส (SDS-PAGE) และ ไอโซอีเลกตริกโฟคัสซิ่ง มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 40-43 กิโลดาลตัน เมื่อหาโดยวิธี SDS-PAGE และ Sephadex G-100 column ไลเปสที่เตรียมจาก *E.coli* pUCTL4 มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับไลเปสจาก TP404 ในด้านการทนความร้อนและการทนต่อความเป็นกรด-ด่าง เมื่อได้ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ พบว่า ถูกกระตุ้นได้โดย Ca^{2+} และถูกยับยั้งได้โดย Zn^{2+} และ Fe^{2+} ในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่ง acetone และ acetonitrile (20-80%) เอนไซม์จะมี activity ลดลง. เมื่อได้ทดสอบคุณสมบัติกับสารดีเทอร์เจ้นท์ในปริมาณระหว่าง (0.1-5%) พบว่า CHAPS, Triton X-100 และ Brij W-1 กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ได้ดีขึ้น ในขณะที่ AOT, DOC และ SDS ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ในด้านความจำเพาะต่อสับสเตรท. ไลเปสจาก *E.coli* pUCTL4 สลายไตรกลีเซอไรด์ที่มีกรดไขมันขนาดกลาง (C_{12}-C_{14}) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว ($C_{18:1}$,- $C_{18:2}$) ได้ดีกว่ากรดไขมันอิ่มตัวขนาดใหญ่ (C_{16}-C_{20}) และสามารถตัดพันธะเอสเตอร์ที่ตำแหน่ง 1- และ 3- ได้ดีกว่าที่ตำแหน่ง 2- เมื่อนำเอนไซม์มาตรึงบน celite พบว่าสามารถเร่งปฏิกิริยา Transesterification ในเฮกเซนได้ จากคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้น ไลเปสที่เตรียมได้สามารถจะนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้เป็นอย่างดี.

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Screening, Purification and Characterization of a Thermophile Lipase
Name	Amonlaya Jaturapat
Degree	Master of Science (Biochemistry)
Thesis Supervisor Committee	
	Prayad Komaratat, Ph.D.
	Pichit Tosukhowong, Ph.D.
	Prapon Wilairat, Ph.D.
Date of Graduation	11 December B.E. 2538 (1995)

ABSTRACT

Thermophilic microorganisms producing lipase were screened from hot springs in northern Thailand. Seven strains exhibiting lipase activity were isolated. Among these, the strain TP404 produced the highest lipase activity (55 unit/liter culture medium) and was chosen for further study. The crude lipase had an optimum temperature at 60°C, pH stability 7-10 and was relatively thermostable since 80% of initial activity remained after 24 hr at 60°C.

Purification of the thermostable lipase was performed on the enzyme produced by *E.coli* cloned lipase gene of TP404 (pUCTL4). The enzyme was purified to homogeneity as judged by SDS-PAGE and

Copyright by Mahidol University

isoelectric focusing. The purification included ammonium sulfate fractionation and sequential column chromatographies on DEAE-Sephadex A-25, Sephadex G-100 and phenyl Sepharose CL4B. The purified enzyme was found to be a monomeric protein with molecular weight of 43 kDa by SDS-PAGE and 40 kDa by gel filtration. The optimum temperature was at 60°C when p-nitrophenylpalmitate was used as substrate. The pH and temperature stabilities were similar to those of native TP404. The enzyme was activated by Ca^{2+} but was inhibited by various cations including $Zn^{2+}$and Fe^{2+}. The enzyme was deactivated in the presence of organic solvents, among those tested, acetonitrile and acetone showed markedly effect. In the presence of low concentration of detergents (0.1-0.5%), CHAPS, Triton X-100 and Brij W-1 had the stimulatory effect whereas AOT, DOC and SDS showed inhibitory effect. The enzyme showed high lipolytic activity toward trimyristin and trilinolein and preferentially hydrolyzed ester bond of 1- and 3-position of triolein. In the form of immobilized enzyme on celite, the lipase was able to catalyze transesterification of trimyristin and soybean oil in organic solvent system. As judged from its properties, this lipase would be useful for biotechnological application.

Copyright by Mahidol University