50313205: MAJOR: (MICROBIOLOGY)
KEY WORDS: *ASPERGILLUS FUMIGATUS* / THERMOSTABLE ENZYME / PROTEASE / PURIFICATION

SANIRAT SANGMUANG: PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEASE PRODUCED BY THE THERMOPHILIC FUNGUS, *ASPERGILLUS FUMIGATUS* SS0509. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. EAKAPHUN BANGYEEKHUN, Ph.D. 106pp.

Eleven strains of thermophilic fungi were isolated from fertilized hay at Silpakorn University, Sanamchandra palace, Nakhorn Pathom. Of these, the fungus strain SS0509 showed maximum protease production on CHM media and was selected for further studied. This fungus was identified to be *Aspergillus fumigatus* based on morphology, growth characteristics in different culture media, ITS sequence and specific primers. The culture condition for protease production was studied in basal media, CHM, YHM and PHM at pH range from 5-10 and temperature range from 35-50°C for 3 days and the results indicated that the optimum culture condition was in YHM, pH 8 at 40°C. The enzyme activity assay was investigated at pH range from 5-10 and temperature range from 35-70°C. The result revealed that the optimum condition for protease activity assay was at pH 8 and 55°C. The protease was purified in a two-step procedure, (i) dialization and precipitation by polyethylene glycol 6000, and (ii) gel filtration, with a 4.2-fold increase in specific activity and the specific activity was 17.35 unit/mg proteins with 18.98% yield. The molecular weight of purified protease was estimated to be 42.4 kDa by SDS-PAGE and 83.6 kDa by Native-PAGE. These suggested that the purified protease might be a homodimeric protein. The effects of protease inhibitors showed that the enzyme appeared to be a serine protease, but neither trypsin nor chrymotrysin. Then, the purified protease was characterized. The optimum pH and temperature of the proteolytic activity was pH 8 and 55°C, respectively. The enzyme activity was stable at 55°C for 60 minutes and decrease afterward. The enzyme can be storage at -20°C and 4°C for at least 15 days.

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

Program of Microbiology Graduate School, Silpakorn University Academic Year 2010

Student's signature.....

Thesis Advisor's signature.....

50313205: สาขาวิชาจุลชีววิทยา

คำสำคัญ : *Aspergillus fumigatus* เอนไซม์ทนร้อน โปรติเอส การแยกบริสุทธิ์

สนิรัสมิ์ แสงเมือง : การแยกบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสจากราทนร้อน *Aspergillus fumigatus* SS0509. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผศ.ดร.เอกพันธ์ บางยี่ขัน. 106 หน้า.

แยกราทนร้อน 11 สายพันธุ์จากกองปุ๋ยหมัก มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม ราสายพันธุ์ SS0509 สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสในอาหาร CHM ได้มากที่สุดและนำไปใช้ในการศึกษา การศึกษาด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะการเจริญในอาหารต่างๆ ลำดับกรดนิวคลีอิกของ ITS และการใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจง ระบุได้ว่าราสายพันธุ์ SS0509 คือ *Aspergillus fumigatus* การศึกษาสภาวะสำหรับการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการสร้างเอนไซม์ในอาหาร basal medium CHM YHM และ PHM ความเป็นกรดด่างที่ 5-10 และที่อุณหภูมิ 35-60 องศาเซลเซียส พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือในอาหาร YHM ความเป็นกรดด่างที่ 8 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ศึกษาสภาวะสำหรับการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ความเป็นกรดด่างที่ 5-10 และที่อุณหภูมิ 35-70 องศาเซลเซียส พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือที่ความเป็นกรดด่างที่ 8 และที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส การแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ผ่านสองกระบวนการคือ (1) ทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการแยกโดยผ่านเยื่อเลือกผ่านและโพลีเอทิลีนไกลคอล 6000 และ (2) เจลฟิลเตรชั่น พบว่าให้ค่ากิจกรรมคิดเป็น 4.2 เท่า โดยมีค่ากิจกรรมพิเศษเท่ากับ 17.35 หน่วยต่อมิลลิกรัมและได้ผลผลิตคิดเป็นร้อยละ 18.98 มวลโมเลกุลของโปรตีน จาก SDS-PAGE พบว่ามีขนาดประมาณ 42.4 กิโลดาลตัน และจาก Native-PAGE พบว่ามีขนาดประมาณ 83.6 กิโลดาลตัน แสดงว่าเอนไซม์นี้เป็นโปรตีนที่มีสายโพลีเปปไทด์ 2 หน่วยเหมือนกัน การศึกษาผลของสารยับยั้งโปรติเอสสามารถระบุได้ว่าเอนไซม์ที่แยกบริสุทธ์ได้นี้ จัดอยู่ในกลุ่มเซอรีนโปรติเอส แต่ไม่ใช่ ทริปซินหรือไคโมทริปซิน เมื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ทำงานเหมาะสมที่ความเป็นกรดด่างที่ 8 และที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 ถึง 60 นาที และสามารถเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ -20 และ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 15 วัน

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศิลปากร ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ .....

ACKNOWLEDGMENTS

First of all, I want to thank my advisor Asst. Prof. Dr. Eakaphun Bangyeekhun for giving me the opportunity to perform the thesis. I would like to thank for excellent scientific guidance, helpful practice, excellent discussion, and moreover the suggestion to improvement my thesis.

I would like to thanks Assoc. Prof. Dr. Wirojne Kanoksilapatham, Assoc. Prof. Dr. Porntip Chaimanee and Dr. Teerada Wangsomboondee for advice, participation in thesis defense examination and kind suggestion on my thesis.

I gratefully thank to all teachers in the Department of Microbiology, Faculty of Science, Silpakorn University. And all members in laboratory as well as my friends for their friendship.

Finally, I am indepted to my parent for their continuing care and love. I also acknowledge to all teachers who taught me since my childhood.

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

Sanirat Sangmuang