การคัดกรองและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตโพรทิเอสจากปลาร้า

๒๓๖๑

นางสาวนิชชา จำเริญศักดิ์ศรี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-53-2307-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4672301423

SCREENING AND IDENTIFICATION OF PROTEASE-PRODUCING HALOPHILIC BACTERIA FROM FERMENTED FISH, PLA-RA

Miss Nitcha Chamreonsaksri

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-53-2307-1

Thesis Title	Screening and identification of protease - producing halophilic bacteria from fermented fish, Pla-ra
By	Miss Nitcha Chamreonsaksri
Field of Study	Industrial Microbiology
Thesis Advisor	Assistant Professor Ancharida Acharacharanya, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Somboon Tanasupawat, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Wonnop Visessanguan, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillments of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Science

(Professor Piamsak Menasveta, Ph. D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairperson

(Associate Professor Pairoh Pinphanichakarn, Ph. D.)

.....Thesis Advisor

(Assistant Professor Ancharida Acharacharanya, Ph. D.)

.....Thesis Co-advisor

(Associate Professor Somboon Tanasupawat, Ph.D.)

.....Thesis Co-advisor

(Wonnop Visessanguan, Ph.D.)

.....Member

(Associate Professor Kanjana Juntongjin, Ph.D.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นิชชา จำเริญศักดิ์ศรี : การคัดกรองและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตโพรทิเอสจากปลาร้า (SCREENING AND IDENTIFICATION OF PROTEASE - PRODUCING HALOPHILIC BACTERIA FROM FERMENTED FISH, PLA-RA) อาจารย์ที่ปรึกษา: ผศ.ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ และ ดร.วรรณพ วิเศษสงวน : จำนวน 107 หน้า.ISBN 974-53-2307-1

การคัดกรองแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตโพรทิเอสจากตัวอย่างปลาร้า 65 ตัวอย่างที่เก็บรวมรวมจากตลาด พบว่าเชื้อ 46 ไอโซเลท แสดงกิจกรรมสลายเคซีน และได้คัดเลือกเชื้อ 12 ไอโซเลทที่ให้ผลการสลายเคซีนได้ดีบนอาหาร JCM No.168 ที่เติมเกลือ 15% และสคิมมิลค์ 1% จากผลการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์และอนุกรมวิธานเคมีรวมทั้งความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอของเชื้อที่คัดเลือก 12 สายพันธุ์นี้สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่หนึ่ง 5 สายพันธุ์ (A, BN1-1, HUT1-1, NB2-1 และ NB3-1) กลุ่มที่สอง 6 สายพันธุ์ (BKN1-1, PL1-1, PL3-1, PR5-1, SS1-1 และ TSY4-4) และกลุ่มที่สาม 1 สายพันธุ์ (ND1-1) พบว่าเชื้อที่ทดสอบมี *meso*-diaminopimelic acid เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ มี menaquinone-7 เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ มีปริมาณ G + C ของดีเอ็นเออยู่ในช่วง 36.2 – 49.6 โมลเปอร์เซ็นต์ จากผลการศึกษาความคล้ายคลึงของลำดับเบสในช่วง16S rDNA ของสายพันธุ์ตัวแทนของกลุ่ม พบว่าเชื้อBN1-1 มีความคล้ายคลึง 99.8% กับ *Virgibacillus marismortui* เชื้อ SS1-1 และ PR5-1 มีความคล้ายคลึง 99.7% กับ *V. halodenitrificans* ดังนั้นจึงสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อกลุ่มแรกได้เป็น *V. marismortui* และกลุ่มที่สองเป็น *V. halodenitrificans* ส่วนกลุ่มที่สามยังไม่ระบุชื่อได้ เลือก NB2-1 ที่จัดเป็น *V. marismortui* เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโพรทิเอสพบว่าเชื้อ NB2-1 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีเกลือ 15% สามารถผลิตโพรทิเอสได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหาร halobacterium medium JCM No. 168 ที่ปรับสูตรซึ่งไม่มี casamino acid แต่ประกอบด้วย yeast extract 0.5% และ เกลือ15% ที่ pH 9 และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า โพรทิเอสนี้มีกิจกรรมเหมาะสมที่ pH 10 และที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ค่อนข้างชอบร้อนและพบว่าทำปฏิกิริยาได้ดีที่สุดในสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือ 5% และถูกยับยั้งได้ด้วยphenylmethylsulphonyl-fluoride (PMSF) ดังนั้นจึงจัดเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อ NB2-1 เป็นซีรีนโพรทิเอส

ภาควิชา จุลชีววิทยา
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา 2547

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

#4672301423 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORDS : FERMENTED FISH / HALOPHILIC BACTERIA / PROTEASE / *VIRGIBACILLUS* /PLA-RA

NITCHA CHAMREONSAKSRI : SCREENING AND IDENTIFICATION OF PROTEASE - PRODUCING HALOPHILIC BACTERIA FROM FERMENTED FISH, PLARA. THESIS ADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR ANCHARIDA ACHARACHARANYA, PH.D., THESIS COADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR SOMBOON TANASUPAWAT, PH.D. AND MR. WONNOP VISESSANGUAN, PH.D. 107 pp. ISBN. 974-53-2307-1

The screening of protease-producing halophilic bacteria from 65 pla-ra (fermented fish) samples collected at the markets was carried out. Forty-six isolates exhibited caseinolytic activity and 12 strains with high activity on JCM No. 168 agar with 15% NaCl containing 1% skim milk were selected for further characterization. On the basis of the phenotypic and chemotaxonomic characteristics including DNA-DNA similarity, they were separated into 3 groups, 5 strains (A, BN1-1, HUT1-1, NB2-1, NB3-1) in Group I; 6 (BKN1-1, PL1-1, PL3-1, PR5-1, SS1-1 and TSY4-4) in Group II; and 1 (ND1-1) in Group III. All the tested strains contained *meso*-diaminopimelic acid in the cell wall, except ND1-1. Menaquinone with 7 isoprene units was a major component. The G+C content of the tested strains ranged from 36.2 – 49.6 mol%. The 16S rDNA sequences similarity of the representative strains, BN1-1 was almost identical (99.8%) with *Virgibacillus marismortui* and SS1-1 and PR5-1 was 99.7% with *V. halodenitrificans*. Therefore, Group I strains were identified as *V. marismortui*, Group II were *V. halodenitrificans*, and Group III was left unidentified. The strain, NB2-1 identified as *V. marismortui* was selected for the further optimization of protease production. This strain had an optimum growth in the medium containing 15% NaCl and produced the highest protease activity at the stationary growth phase when cells were cultivated in a modified halobacterium medium JCM. No. 168 without casamino acid but containing 0.5% yeast extract and 15% NaCl, at pH 9 and at 30 °C. The optimum pH and temperature of the crude protease was pH 10 and 50 °C Thus, the enzyme was slightly or moderately thermophilic. The protease showed the highest activity in the presence of NaCl at 5 %. The phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF) was found to inhibit the protease activity strongly, suggesting that the crude enzyme from NB2-1 was serine type protease.

Department Microbiology
Field of study Industrial Microbiology
Academic year 2004

Student's signature.....
Advisor's signature.....
Co-Advisor's signature.....
Co-Advisor's signature.....

Acknowledgements

I wish to express sincere thanks and gratitude to my thesis advisor, Assist Professor Dr. Ancharida Acharacharanya and my thesis co-advisor, Associate Professor Dr. Somboon Tanasupawat, and Dr. Wonnop Visessanguan for their tireless efforts as well as valuable advice and comments throughout the course of this study.

I would also like to thank Associate Professor Dr. Pairoh Pinphanichakarn for serving as the thesis committee chairperson and Associate Professor Dr. Kanjana Juntongjin for serving as thesis committee members and their recommendations for the research.

Special thanks are given to student members in laboratory 405, all friends, and all staff members in the Department of Microbiology, especially, Mr.Weerasak Jungfeungprinya, for their help and friendship during my study.

This research was partially funded by a grant from the Graduate School, Chulalongkorn University which is gratefully acknowledged.

I would like to thank all the staff members of the Food Biotechnology Laboratory of the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), Thailand, for his or her help and encouragement. They were always nice and friendly.

The last, but most important, is my sincere and deepest gratitude to my parents and everyone in my family for their great love, constant support, understanding and heartfelt encouragement extended throughout my study.

Contents

Page

Abstract (in Thai).....iv

Abstract (in English).....v

Acknowledgements.....vi

Contents.....vii

Content of Figures.....ix

Content of Tables.....x

Abbreviations.....xi

Chapters

I. Introduction.....1

II. Literature Reviews.....4

Protease.....4

1. Classification of protease.....5

2. Industrial application.....8

3. Sources of proteases.....13

4. Halophilic bacteria.....17

5. Protease-producing halophilic bacteria.....21

III. Materials and Methods.....24

1. Screening of protease-producing halophilic bacteria.....24

1.1 Screening of protease-producing halophilic bacteria on agar plate.....24

1.2 Quantitative protease activity assay (caseinolytic activity).....24

2. Identification methods.....25

2.1 Cell morphology and cultural characteristics.....25

2.2 Physiological and biochemical characteristics.....26

2.3 Chemotaxonomy.....28

3. Optimization of crude protease production.....32

4. Characterization of crude protease.....32

Page

IV. Results and Discussion.....34
1. Screening of protease-producing halophilic bacteria.....34
1.1 Screening of protease-producing halophilic bacteria on agar plate.....34
1.2 Protease activity assay.....34
2. Identification of strains.....39
2.1 Cell morphology and cultural characteristics.....39
2.2 Chemotaxonomic characteristics and DNA base composition..39
2.3 Phylogenetic analysis.....40
2.4 DNA-DNA similarity.....48
3. Optimization of crude protease production.....51
4. Characterization of crude protease.....58
V. Conclusion.....61
References.....63
Appendices.....69
Appendix A : Instruments, materials, chemical reagent and media.....70
Appendix B : Culture media.....72
Appendix C : Reagents.....75
Appendix D : Reagent for DNA extraction and purification, DNA-DNA hybridization, and DNA base composition.....77
Appendix E : Comparison of 16S rDNA nucleotide sequences between the *Virgibacillus* sp. and other genera.....80
Biography.....107

Content of Figures

Page

Figure 1. Catalytic reaction of protease.....4

Figure 2. Piechart of the industrial proteinase market.....17

Figure 3. Salt-tolerance of halophilic organisms.....19

Figure 4. Protease activity of the 12 strains tested.....38

Figure 5. Dry weight cell of the 12 strains tested when grown in halobacterium JCM No.168 containing 10% or 15% (w/v) NaCl.....38

Figure 6. Scanning electron micrograph of strain BN1-1 grown on halobacterium agar medium JCM No. 168 containing 10% (w/v) NaCl at 37° C for 5 days.....40

Figure 7. Scanning electron micrograph of strain NB2-1 grown on halobacterium agar medium JCM No. 168 containing 10% (w/v) NaCl at 37° C for 5 days.....40

Figure 8 Neighbour-joining-tree showing the phylogenetic position of strain BN1-1 and representatives of some other related taxa based on 16S rDNA sequence.....47

Figure 9. Effect of NaCl concentration and cultivation time on protease production of strain NB2 -1.....53

Figure 10. Effect of NaCl concentration and cultivation time on growth of strain NB2-1.....53

Figure 11. Effect of initial pH on protease production and growth of strain NB2-1.....54

Figure 12. Effect of cultivation temperature on protease production (A) and growth (B)of strain NB2-1.....55

Figure 13. Effect of medium composition on protease production (A) and growth (B) of strain NB2-1.....56

Figure 14. Effect of yeast extract concentration on protease production of strain NB2-1.....57

Figure 15. Effect of pH on protease activity.....58

Figure 16. Effect of temperature on protease activity.....59

Figure 17. Effect of NaCl concentration on protease activity.....59

Content of Tables

Page

Table 1. Classification of protease.....7

Table 2. Markets for microbial proteases.....8

Table 3. Major detergent proteases.....9

Table 4. Saleint features of some genera of aerobic, endospor-foeming Bacteria and *Marinococcus*.....20

Table 5. Properties of protease from extreme halophiles.....23

Table 6. Conditions for high-performance liquid chromatography.....30

Table 7. Source of isolations.....35

Table 8. Protease activity of isolates on skim milk agar.....36

Table 9. Morphological, cultural and physiology characterization.....41

Table 10. Acid from carbohydrates.....44

Table 11. DNA-DNA similarity of 12 isolates and *V. halodenitrificans* JCM 12304^T.....48

Table 12. Differential characteristics of the12 isolates and *Virgibacillus* species.....49

Table 13. The effect of various kind of protease inhibitor on protease activity of strain NB2- 1.....60

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Abbreviations

Abbreviations or symbols	Term
%	percent
°C	degree centigrade or Celsius
µg	microgram
µl	microliter
/	per
BIOTEC	National center for Genetic Engineering and Biotechnology
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
JCM	Japan Collection of Microorganisms
LMG	Universiteit Gent, Laboratorium voor Mikrobiologie, Gent, Belgium
kDa	kilo dalton
v/v	volume by volume
v/w	volume by weight

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย