Thesis Title Proteomic Analysis of Lipase Producing Soil-Isolated Bacteria

Author Miss Angkhameen Buranarom

Degree Master of Science (Biotechnology)

Thesis Advisor Asst. Prof. Dr. Hataichanoke Niamsup

ABSTRACT

Forty strain bacteria were isolated from oil-contaminated soil. These bacteria were screened for lipase production on selective medium using neutral red as an indicator. Nine bacterial isolates could form red area around their colonies. These bacteria were further measured for lipase activity by using *p*-NPL (*p*-nitrophenyl laurate) as substrate. The isolate CFS 14 could produce the highest enzyme activity of 163.51 U/ml. Thus this bacterium was chosen for this experiment. By 16s rDNA sequencing technique, the bacterial isolate CFS 14 was identified to be *Psuedomonas xinjiangensis* with 99.6% similarity. The optimal condition for lipase production of this bacterium was determined. The optimum temperature and pH were 37ºC and 8.0, respectively. Among various divalent cations tested, $MgCl_2$ was found to be a good enhancer for this bacterium to produce lipase. At 0.5% $MgCl_2$ the highest activity was observed at 270.27 U/ml which was higher than control. Confirmed by native-polyacrylamide gel electrophoresis, lipase protein band specifically stained as red by FastRed/TR Salt was more intensed in bacteria grown in 0.5% $MgCl_2$ than without $MgCl_2$. Due to the property to enhance lipase production of Mg^{2+}, this condition was chosen for proteomic analysis using 2DE technique coupled with MALDI-ToF/MS to identify differentially expressed proteins. *Psuedomonas xinjiangensis* strain CFS 14 was cultured in 2 different media containing 0% and 0.5% $MgCl_2$. The proteome analysis revealed 6 highly expressed proteins, 1 lower expressed protein and 8 protein spots expressed only in 0.5% $MgCl_2$ condition. Five spots were chosen to annotate by MALDI-ToF/MS. Only 2 protein spots could be identified which were likely to be lipoprotein and hypothetical protein cdivTM_18888.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การวิเคราะห์โปรติโอมิกส์ของแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสซึ่งแยกได้จากดิน

ผู้เขียน นางสาวอังคมีน บูรณารมย์

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ. ดร. หทัยชนก เนียมทรัพย์

บทคัดย่อ

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากดินทั้งหมด 40 ไอโซเลท โดยทดสอบบนอาหารแข็งจำเพาะ (selective medium agar) ที่มีส่วนผสมของสีอินดิเคเตอร์ neutral red พบว่า มี 9 ไอโซเลท ซึ่งย่อยสลายไขมันได้โดยเปลี่ยนสีอาหารจากสีส้มอมเหลืองให้เป็นสีแดงรอบโคโลนีได้ เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 9 ไอโซเลทมาวัดแอคติวิตีของไลเปสโดยใช้สับสเตรทสังเคราะห์ *p*NPL (*p*-nitrophenyl laurate) พบว่า เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท CFS 14 มีแอคติวิตีสูงสุดเป็น 163.51 U/ml จึงเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มาศึกษาต่อ จากการจัดจำแนกสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ 16s rDNA พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท CFS 14 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับ เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas xinjiangensis* โดยเหมือนกัน 99.6% จากนั้นจึงศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากเชื้อชนิดนี้ เชื้อ *P. xinjiangensis* strain CFS 14 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิ 37ºC และ pH 8.0 และจากการศึกษาผลของไอออนประจุคู่ต่อความสามารถในการผลิตไลเปส พบว่าการเติม $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.5% ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถเพิ่มการผลิตไลเปสได้เป็น 270.27 U/ml ซึ่งยืนยันได้จากการทำ native-polyacrylamide gel electrophoresis โดยพบว่าแถบโปรตีนไลเปสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี 0.5% $MgCl_2$ เมื่อย้อมด้วย Fast Red/TR salt ซึ่งจำเพาะต่อไลเปสจะแสดงแถบสีแดงออกมามากกว่าโปรตีนที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารปกติ นอกจากนี้ในการศึกษาผลของ Mg^{2+} ในเชิงโปรติโอมิกส์ พบว่าโปรตีนที่ได้จากเชื้อ *P. xinjiangensis* srain CFS 14 มีการแสดงออกแตกต่างกันเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ต่างกัน โดยพบโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 6 จุด ลดลง 1 จุด และพบเฉพาะสภาวะที่มี $MgCl_2$ ทั้งหมด 8 จุด จึงได้เลือกโปรตีน 5 จุดที่พบเฉพาะในสภาวะที่มี Mg^{2+} ไปวิเคราะห์หาชนิดของโปรตีนด้วย MALDI-ToF/MS ทำให้ทราบชนิดโปรตีนได้ 2 จุด พบว่าเป็น lipoprotein และ hypothetical protein cdivTM_18888