

PENULENAN DAN PENCIRIAN ENZIM SERINE  
PROTEASE MIRIP TRIP SIN, F14 DARIPADA  
LISAT AMOEBOSIT DARAH BELANGKAS,  
*TACHYPLEUS TRIDENTATUS*

NIK MOHD HAFIZ BIN ABDULLAH

SARJANA SAINS  
UNIVERSITI MALAYSIA TERENGGANU  
2016



***Dedikasi Istimewa***

*Abdullah bin Noh (Ayahanda)*

*Tuan Nor Meheran binti Tuan Mat (Bonda)*

*Ainatun Nadrah binti Zulkefli (Isteri)*

***Dedikasi Khas***

*Allahyarhamah*

*Izzatul Huda binti Abdul Ghaffar*

*Detik perpisahan...*

*Semoga Allah menyayangi kita semua & menempatkan kita di liang persinggahan yang menghala ke pintu syurga terbuka indah. Menyentuh kerinduan indah tatkala menanti tibanya hari pertemuan sekalian manusia. Semoga rahmat & kasihNya milik kita jua. Semoga roh arwah tenang di sana.*

*Al-Fatihah...*

Abstract of thesis presented to the Senate of Universiti Malaysia Terengganu in fulfillment of the requirement for the degree of Master of Science

**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF TRYPSIN-LIKE SERINE  
PROTEASE ENZYME, F14 FROM AMOEBOCYTE LYSATE OF  
HORSESHOE CRAB BLOOD, *TACHYPLEUS TRIDENTATUS***

**NIK MOHD HAFIZ BIN ABDULLAH**

**2016**

**Main Supervisor : Associate Prof. Noraznawati Binti Ismail, Ph.D.**

**School : Fundamental Science**

Protease is well known as an important enzyme group in the field of research and industrial application. Serine protease contained in the amoebocyte lysate (AL) of horseshoe crab which is known as factor C, has been widely used in the detection of endotoxin. However, the fluctuations of AL sensitivity in the endotoxin detection were reported and became problem in the endotoxin screening. Therefore, this study is performed to purify and characterize the enzymes in the AL which can potentially increase the AL sensitivity. AL crude sample was purified by Hi Trap Benzamidine FF (High Sub) column followed by Hi Prep 26/60 Sephacryl S-200 High Resolution (HR). Crude AL and purified enzyme were profiled by using Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel (SDS-PAGE) and visualized by using Coomassie Brilliant Blue (CBB) G-250 staining. This enzyme was sequenced by mass spectrometry (LC-MS/MS) for identification while the characterization was done by azocasein, serine protease, aldolase and transaldolase assays. The enzyme's potential was determined by AL chromogenic assay. SDS-PAGE result shows that the 72 kDa enzyme was successfully purified and designed as F14 enzyme according to the gel filtration fraction's position. LC-MS/MS results suggested two apparent enzymes which were transaldolase and uncharacterized protein. However, aldolase and transaldolase assays did not coincide with the first suggested sequence results, thus the F14 enzyme might be the uncharacterized protein. The results of azocasein inhibitory assays showed that F14 enzyme was trypsin-like with  $V_{max}$  and  $K_m$  was  $0.34 \text{ U}\cdot\text{s}^{-1}$  and  $1 \text{ mM}$  ( $9.969 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) respectively. This result was parallel with serine protease assay which approved that the F14 was able to hydrolyzed trypsin substrates namely  $N\alpha$ -benzoyl-DL-Arg-p-nitroanilide (BAPNA)

and *N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilide (SAPNA) with optimum reaction at pH 10 and 40°C. F14 enzyme was identified and characterized as trypsin-like enzyme which falls in the serine endopeptidase group by both azocasein and serine protease assays results. Furthermore, AL chromogenic assay approved that the F14 enzyme has the potential to increase the AL sensitivity in the endotoxin detection. As the conclusion, a trypsin-like F14 enzyme was successfully purified, characterized and approved to possess a great potential in enhancing the AL sensitivity.

Abstrak tesis yang dikemukakan kepada Senat Universiti Malaysia Terengganu sebagai memenuhi keperluan untuk ijazah Sarjana Sains

**PENULENAN DAN PENCIRIAN ENZIM SERINE PROTEASE MIRIP  
TRIPSIN, F14 DARIPADA LISAT AMOEBOCIT DARAH BELANGKAS,  
*TACHYPLEUS TRIDENTATUS***

**NIK MOHD HAFIZ BIN ABDULLAH**

**2016**

**Penyelia Utama : Profesor Madya Noraznawati Binti Ismail, Ph.D.**

**Pusat Pengajian : Sains Asas**

Protease terkenal sebagai kumpulan enzim yang penting di dalam bidang penyelidikan dan industri. Serine protease yang terkandung di dalam lisat amoebosit (LA) belangkas yang dikenali sebagai faktor C, telah digunakan secara meluas di dalam pengesanan endotoksin. Bagaimanapun, sensitiviti LA sentiasa dilaporkan tidak stabil dan menyebabkan masalah di dalam penyaringan endotoksin. Oleh itu, kajian ini telah dijalankan bagi tujuan menuliskan dan mencirikan enzim dalam LA yang berpotensi untuk meningkatkan sensitiviti LA. Sampel LA dituliskan menggunakan turus Hi Trap Benzamidine FF (High Sub) diikuti dengan turus Hi Prep 26/60 Sephacryl S-200 Resolusi Tinggi (HR). Ekstrak kasar LA dan enzim yang dituliskan, diprofil menggunakan gel poliakrilamida sodium dodesil sulfat (SDS-PAGE) dan diwarnakan menggunakan Coomasie Brilliant Blue (CBB) G-250. Enzim ini telah ditentukan jujukan peptida melalui spektrometri jisim (LC-MS/MS) untuk pengenalpastian, manakala penciriannya adalah melalui asai azokasein, serine protease, aldolase dan transaldolase. Potensi enzim yang dituliskan telah ditentukan melalui asai kromogenik LA. Keputusan SDS-PAGE menunjukkan enzim dengan berat molekul 72 kDa telah berjaya dituliskan dan dinamakan sebagai enzim F14 berdasarkan kedudukan fraksi dalam penurasan gel. Keputusan LC-MS/MS telah mencadangkan dua enzim berbeza iaitu transaldolase dan protein tidak dicirikan. Walau bagaimanapun, keputusan asai aldolase dan transaldolase tidak bertepatan dengan cadangan jujukan peptida tersebut dan ini sekaligus menunjukkan enzim F14 mungkin adalah protein tidak dicirikan. Keputusan asai perencat azokasein menunjukkan enzim F14 adalah mirip kepada tripsin dengan  $V_{max}$  dan  $K_m$  masing-masing adalah  $0.34 \text{ U.s}^{-1}$  dan

1 mM ( $9.969 \times 10^{-4}$  M). Keputusan azokasein tersebut adalah selari dengan asai serine protease yang menunjukkan enzim F14 berupaya menghidrolisis substrat tripsin iaitu *N* $\alpha$ -benzoil-DL-Arg-p-nitroanilida (BAPNA) dan *N*-suksinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida (SAPNA) dengan tindakbalas optimum pada pH 10 dan suhu 40°C. Menerusi asai azokasein dan serine protease, enzim F14 telah dikenalpasti dan ditakrifkan sebagai enzim mirip tripsin yang tergolong dalam kumpulan serine endopeptidase. Selain itu, keputusan asai kromogenik LA juga menunjukkan bahawa enzim F14 meningkatkan sensitiviti LA dalam pegasanan endotoksin. Kesimpulannya, enzim mirip tripsin, F14 telah berjaya dituliskan, dicirikan dan dibuktikan berpotensi meningkatkan sensitiviti LA.