ศรชัย สินสุวรรณ : การผลิตและคุณลักษณะของโปรตีเนสจากสายพันธุ์ของแบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นปานกลางในสกุล *VIRGIBACILLUS* ที่คัดแยกจากการหมักน้ำปลา (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF PROTEINASES FROM MODERATELY HALOPHILIC *VIRGIBACILLUS* STRAINS ISOLATED FROM FISH SAUCE FERMENTATION) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล, 154 หน้า.

แบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 และ SK33 ซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างเดือนแรกของการหมักน้ำปลามีความสามารถในการย่อยสลายปลากะตักและเคซีน (Casein) ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 10 และ 25 จึงอาจเป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพเป็นกล้าเชื้อสำหรับกระบวนการหมักน้ำปลา ซึ่งแนวทางดังกล่าวจะนำไปสู่การพัฒนากระบวนการลดระยะเวลาการหมัก ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีของโปรตีเนสที่หลั่งนอกเซลล์ (Extracellullar proteinase) และที่ตรึงอยู่กับเซลล์ (Cell-bound proteinase) ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 และ SK33

โปรตีเนสที่ตรึงอยู่กับเซลล์และหลั่งนอกเซลล์จาก *Virgibacillus* sp. SK37 สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นสังเคราะห์ ซัคซินิล-อะลานีน-อะลานีน-โพรลีน-ฟีนิลอะลานีน-4-เมทิล-7-คลูมารินเอไมด์ (Succinyl(Suc)-Ala-Ala-Pro-Phe-Arg-4-methyl-7-coumarylamides(AMC)) ได้ดี แสดงถึงคุณลักษณะของเอนไซม์สับทิลิซิน (Subtilisin) โปรตีเนสที่หลั่งนอกเซลล์จากแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งกิจกรรมของเอนไซม์คือที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และพีเอช 8 กิจกรรมย่อยสลายโปรตีนเพิ่มขึ้นประมาณ 5 เท่าในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 25 แสดงว่าเป็นโปรตีเนสที่ถูกเร่งกิจกรรมด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ นอกจากนั้นเมื่อวิเคราะห์กิจกรรมด้วยการปรากฏของแถบใสบนแผ่นอะคริลาไมด์ (Activity staining) ทั้งในสภาวะที่ไม่มีและมีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 25 พบโปรตีเนสที่มีมวลโมเลกุลขนาดต่าง ๆ คือ 81 67 63 50 38 และ 18 กิโลดาลตัน สำหรับโปรตีเนสที่ตรึงอยู่กับเซลล์จากแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK37 สามารถแสดงกิจกรรมสูงสุดที่ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 7 และ 9.5 โปรตีเนสนี้สามารถย่อยสลายแอคโตมัยโอซินจากปลากะตักที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 5-20 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เอนไซม์มีเสถียรภาพที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 25 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Virgibacillus sp. SK33 สามารถผลิตโปรตีเนสได้สูงสุดในอาหารเหลวสูตรฮาโลแบคทีเรียมดัดแปลง (Modified halobacterium broth) ที่มีแหล่งไนโตรเจนคือสารสกัดจาก

ยีสต์ (Yeast extract) เพปโทน (Peptone) หรือกรดคาซามิโน (Casamino acid) เพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง สภาวะเหมาะสมต่อการสร้างโปรตีเนสสำหรับ *Virgibacillus* sp. SK33 คือ ที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 5 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สำหรับโปรตีเนสที่หลั่งนอกเซลล์จาก *Virgibacillus* sp. SK33 สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นสังเคราะห์ ซัคซินิล-อะลานีน-อะลานีน-โพรลีน-ฟีนิลอะลานีน-4-เมทิล-7-คลูมารินเอไมด์ ได้ดี แสดงถึงคุณลักษณะของเอนไซม์สับทิลิซิน และพบกิจกรรมสูงสุดที่ 50 องศาเซลเซียส และ พีเอช 8 10 และ 11 กิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนต่อสารตั้งต้นสังเคราะห์และปลากะตักเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์จนถึงร้อยละ 25 บ่งชี้ว่าเป็นโปรตีเนสที่ถูกเร่งกิจกรรมด้วยเกลือ สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีการการปรากฏของแถบใสบนแผ่นอะคริลาไมด์ ในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 25 ซึ่งพบโปรตีเนสที่มีมวลโมเลกุลขนาดต่างๆ คือ 56 46 42 32 25 และ 19 กิโลดาลตัน โดยเฉพาะโปรตีเนสขนาด 19 กิโลดาลตันพบแถบใสขนาดใหญ่แสดงถึงกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนในสภาวะความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์สูง จึงเลือกทำบริสุทธิ์เอนไซม์ดังกล่าวด้วยหลักการแยกสารอันตรกิริยาไฮโดรฟอบิก (Hydrophobic interaction chromatography) และด้วยไฮดรอกซีเอพาไทท์ (Hydroxyapatite) พบว่าโปรตีเนสบริสุทธิ์ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย (Dimer) โดยแต่ละหน่วยย่อยมีขนาด 19 กิโลดาลตันเชื่อมติดกันด้วยอันตรกิริยาไฮโดรฟอบิก สภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งกิจกรรมคือที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และพีเอช 7.5 เอนไซม์บริสุทธิ์มีเสถียรภาพที่อุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0-25 กิจกรรมย่อยสลายโปรตีนต่อสารตั้งต้นสังเคราะห์และปลากะตักเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์จนถึงร้อยละ 25 ค่าไอโซอิเลคติค (Isoelectric point) ของเอนไซม์บริสุทธิ์คือ 4.28 บ่งชี้ว่ามีปริมาณกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นกรด (Acidic amino acids) มาก จึงอาจเป็นเหตุผลให้เอนไซม์สามารถแสดงกิจกรรมภายใต้ความเข้มข้นเกลือสูง เนื่องจากประจุลบบนโครงสร้างเอนไซม์สามารถเกิดอันตรกิริยากับน้ำได้ จึงไม่สูญเสียโครงร่างธรรมชาติ จากงานวิจัยนี้ *Virgibacillus* sp. SK37 และ SK33 เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสร้างโปรตีเนสที่เร่งกิจกรรมด้วยโซเดียมคลอไรด์ซึ่งเป็นคุณลักษณะที่สำคัญต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในการหมักภายใต้สภาวะความเข้มข้นเกลือสูง ทั้งสองสายพันธุ์อาจมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายโปรตีนในการกระบวนการหมักน้ำปลา และมีศักยภาพในการพัฒนาเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักน้ำปลาต่อไป

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

SORNCHAI SINSUWAN : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF PROTEINASES FROM MODERATELY HALOPHILIC *VIRGIBACILLUS* STRAINS ISOLATED FROM FISH SAUCE FERMENTATION. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JIRAWAT YONGSAWATDIGUL, Ph.D. 154 PP.

VIRGIBACILLUS STRAINS/BACTERIAL PROTEINASE/NaCl-ACTIVATED PROTEINASE/FISH SAUCE

Virgibacillus sp. SK37 and SK 33 isolated from fish sauce fermented for 1 month showed high proteolytic activity towards anchovy and casein substrates at 10% and 25% NaCl. They could be the potential strains for starter culture development aiming at reducing fermentation time. Overall objective of this study was to elucidate biochemical characteristics of extracellular and cell-bound proteinases produced by these strains.

Extracellular and cell-bound proteinases from *Virgibacillus* sp. SK37 preferably hydrolyzed succinyl (Suc)-Ala-Ala-Pro-Phe-4-methyl-7-coumarylamides (AMC), suggesting a subtilisin-like characteristic. Extracellular proteinase from *Virgibacillus* sp. SK37 showed optimum condition at 65 °C and pH 8. Proteolytic activity was increased about 5 times in the presence of 20% NaCl, indicating the characteristic of NaCl-activated proteinase. Based on activity staining, several proteinases with molecular mass of 81, 67, 63, 50, 38 and 18 kDa were observed both in the absence and presence of 25% NaCl. Cell-bound proteinase from *Virgibacillus* sp. SK37 showed the maximum activity at 65 °C, pH 7 and 9.5. The proteinase

effectively hydrolyzed anchovy actomyosin at 5-20% NaCl. In addition, the enzyme remained stable at 30 °C, 25% NaCl for 24 h.

Virgibacillus sp. SK33 showed maximum proteinase production in the modified halobacterium broth containing only a single nitrogen source of either yeast extract, peptone or casamino acid. Optimal proteinase production for *Virgibacillus* sp. SK33 was at 5% NaCl, 40 °C. Extracellular proteinase of *Virgibacillus* sp. SK33 efficiently hydrolyzed Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC, suggesting a subtilisin-like characteristic. The proteinase exhibited optimum activity at 50 °C and pH 8, 10 and 11. Proteolytic activity towards a synthetic substrate and anchovy increased with NaCl concentration up to 25%, indicating the characteristic of NaCl-activated proteinase. Several proteinases with molecular weight (MW) of 56, 46, 42, 32, 25 and 19 kDa showed caseinolytic activity at 25% NaCl. Proteinase with MW of 19 kDa exhibited large proteolytic band indicating high activity at high NaCl concentration. Therefore, it was further purified to electrophoretic homogeneity using hydrophobic interaction chromatography and hydroxyapatite. The enzyme had a dimer with a monomer of 19 kDa. The dimer was stabilized by hydrophobic interactions. Temperature and pH optimum of the purified proteinase was at 55 °C and pH 7.5. The enzyme was stable at 30-60 °C and 0-25% NaCl. Proteinase activity towards both synthetic and anchovy substrates was activated by NaCl up to 25%. Isolectric point (pI) of the purified proteinase was 4.28, indicating that it contained high acidic amino acids. It should be postulated that negative charges on external structure interacting to hydrate NaCl resulted in halophilic enzyme characteristic. Based on these results, *Virgibacillus* sp. SK37 and SK33 were potential sources of NaCl-activated proteinases. They would play an important role in protein hydrolysis

during fish sauce fermentation and might be applicable for starter culture development.

School of Food Technology Student's Signature _____

Academic Year 2006 Advisor's Signature _____