ศรชัย สินสุวรรณ : การผลิตโปรติเนสและการปรับตัวในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นปานกลางสายพันธุ์ *VIRGIBACILLUS* SP. SK37 ที่คัดแยกจากการหมักน้ำปลา (PROTEINASE PRODUCTION AND SODIUM CHLORIDE ADAPTATION RESPONSE OF MODERATELY HALOPHILIC *VIRGIBACILLUS* SP. SK37 ISOLATED FROM FISH SAUCE FERMENTATION) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล, 193 หน้า.

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อชีวมวลและการผลิตโปรติเนสภายนอกเซลล์ที่ทนเกลือของ *Virgibacillus* sp. SK37 ซึ่งมีศักยภาพในการเป็นกล้าเชื้อเพื่อการหมักน้ำปลา นอกจากนั้นเพื่อระบุสภาวะการเจริญที่กระตุ้นการตอบสนองเพื่อปรับตัวต่อโซเดียมคลอไรด์ และศึกษาพฤติกรรมการปรับตัวต่อโซเดียมคลอไรด์ดังกล่าวของแบคทีเรียอย่างสมบูรณ์ในระดับการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอด้วยเทคนิคดีเอ็นเอไมโครอาร์เรย์

จากแบบการทดลองแพลคเก็ตต์-เบอร์แมน (Plankett-Burman design, PBD) พบว่า ปลากะตักแห้ง สารสกัดจากยีสต์ และพีเอช เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อชีวมวลและการผลิต โปรติเนส การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อมาด้วยแบบการทดลองโรทาเทเบิล เซ็นทรัลคอมโพสิทดีไซน์ (rotatable central composite design, RCCD) แสดงให้เห็นว่าการเจริญของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นสูงสุดประมาณ 1.6 Log CFU/ml และการสร้างโปรติเนสเพิ่มขึ้น 1.4 เท่า ได้ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยปลากะตักแห้ง 1.5 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดจากยีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าพีเอช 8 สมการการทำนายที่ประกอบด้วยสมการถดถอยแบบคิวบิคพิสูจน์ได้ว่ามีความเหมาะสม ปัจจัยปลากะตักแห้งและสารสกัดจากยีสต์ไม่มีอิทธิผลต่อรูปแบบการหลั่งโปรติเนสจากการวิเคราะห์ด้วยการย้อมกิจกรรมเอนไซม์ด้วยสารตั้งต้นเปปไทด์สังเคราะห์ (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC) แต่พบขนาดโมเลกุลของโปรติเนสที่หลั่งออกมามีความผันแปรกับปริมาณโซเดียมคลอไรด์และพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ ระดับการย่อยสลายโปรตีนที่สูงกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์สูงสามารถตรวจวัดได้จากการวิเคราะห์เปปไทด์แมสฟิงเกอร์พรินทร์ (peptide mass fingerprint, PMF) โปรติเนสจาก *Virgibacillus* sp. SK37 ในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์สามารถย่อยสลายโปรตีนจากปลากะตักแห้งที่ตำแหน่งไลซีน อาร์จินีน และไทโรซีน ในขณะที่สภาวะปราศจากโซเดียมคลอไรด์พบการย่อยสลายที่จำเพาะต่อไลซีนและอาร์จินีนที่ตำแหน่ง P_1 ของเปปไทด์ตามผลวิเคราะห์ด้วย *de novo* sequencing

แม้ว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ไม่เจริญที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ แต่เซลล์สามารถอยู่รอดได้ที่สภาวะโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปสัมผัสกับโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ การวิเคราะห์ทรานสคริปโตม

แสดงให้เห็นว่ายีนที่ทำหน้าที่ปกป้องเซลล์จากโปรตีนที่โครงสร้างคลายตัว (*dnaK*, *grpE*, *groE*S, และ *groEL*) จากโปรตีนที่สูญเสียสภาพแบบไม่ผันกลับ (*clpP*, *clpC*, *clpE*, *clpX*, *lonA*, และ *ftsH*) และจากภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (*katE* และ *yfkM/yraA*) แสดงออกอย่างมีนัยสำคัญภายใต้โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ การตอบสนองทางสรีระของแบคทีเรียมีความเชื่อมโยงกับการเปลี่ยนกลไกเมทาบอลิซึมจากวัฏจักรกรดไตรคาร์บอกซิลิก (tricarboxylic acid cycle, TCA) และปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชันเป็นวิถีการหมักเอทานอล และการเหนี่ยวนำยีนที่จำเพาะต่อการตอบสนองต่อภาวะเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันภายใต้โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ มีการจัดเรียงตัวใหม่ของส่วนห่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียในสภาวะเครียดจากโซเดียมคลอไรด์ ยีนที่บันทึกรหัสโปรตีนที่ทำหน้าที่นำเข้าสาร compatible solute สู่เซลล์ ได้แก่ sodium/proline symporter, OpuA, OpuB/C, และ OpuD มีการเหนี่ยวนำให้สังเคราะห์อาร์เอ็นเออย่างมีนัยสำคัญ องค์ความรู้จากงานวิจัยนี้เป็นประโยชน์ต่อความเข้าใจในกลไกภายในเซลล์ของแบคทีเรียในการตอบสนองเพื่อปรับตัวในโซเดียมคลอไรด์และศักยภาพในการใช้เป็นกล้าเชื้อที่ผลิตโปรติเนสเพื่อหมักน้ำปลา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

SORNCHAI SINSUWAN : PROTEINASE PRODUCTION AND SODIUM CHLORIDE ADAPTATION RESPONSE OF MODERATELY HALOPHILIC *VIRGIBACILLUS* SP. SK37 ISOLATED FROM FISH SAUCE FERMENTATION. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JIRAWAT YONGSAWATDIGUL, Ph.D., 193 PP.

VIRGIBACILLUS/PROTEINASE PRODUCTION/RESPONSE SURFACE METHODOLOGY/SODIUM CHLORIDE ADAPTATION/DNA MICROARRAY/ FISH SAUCE

Objectives of this study were to optimize the medium components on biomass and extracellular NaCl-tolerant proteinase production of *Virgibacillus* sp. SK37, a potential starter culture strain of fish sauce fermentation. In addition, the growth condition to activate a NaCl-adaptive response was addressed. The NaCl adaptation behavior of the strain was thoroughly elucidated at the transcript levels using DNA microarray technique.

Based on Plankett-Burman design (PBD), dried anchovy, yeast extract, and pH were key factors affecting biomass and proteinase production. Further optimization using rotatable central composite design (RCCD) showed that the highest incremental yields of biomass of approximately 1.6 log CFU/ml and 1.4-fold increase in the proteinase production were achieved in the culture medium containing 1.5% dried anchovy, 0.5% yeast extract, and 2.5% NaCl, at pH 8. The predicted models obtained by cubic regression were proved to be adequate. Dried anchovy and yeast extract did not influence the proteinase secretion pattern based on the activity staining of a peptide synthetic substrate (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC), but molecular weight (MW) of the

secreted proteinases varied with NaCl contents and pHs of the medium. A greater extent of proteolysis at high NaCl medium was observed based on peptide mass fingerprint (PMF). *Virgibacillus* proteinases in the presence of NaCl preferably hydrolyzed dried anchovy proteins at Lys, Arg, and Tyr positions, while in the absence of NaCl, they exhibited a specificity for the basic residues Lys and Arg, located at P_1 position on the peptide as evidenced by *de novo* sequencing.

Although *Virgibacillus* sp. SK37 did not grow at 25% NaCl, it can survive when cells were pre-incubated in 15% NaCl for 15 min prior to exposure of the extreme condition of 25% NaCl. Transcriptome analysis revealed that genes expressed for a protective function against improper protein folding (*dnaK*, *grpE*, *groES*, and *groEL*), irreversible denatured proteins (*clpP*, *clpC*, *clpE*, *clpX*, *lonA*, and *ftsH*), and oxidative stress (*katE* and *yfkM/yraA*) were significantly induced under 15% NaCl. The physiological responses were associated with a metabolic shift from the tricarboxylic acid cycle (TCA) cycle and oxidative phosphorylation to the ethanol fermentative pathway, and the induction of specific oxidative response genes. The cell envelop of the strain was rearranged during the NaCl-stress condition. The genes, encoding compatible solute transporters, namely sodium/proline symporter, OpuA, OpuB/C, and OpuD, were significantly transcribed. The outcome of this research would lead to the understanding of the cellular mechanisms of *Virgibacillus* sp. SK37 in NaCl-adaptive response and proteinase-producing starter culture with the potential application for fish sauce fermentation.

School of Food Technology Student's Signature_____

Academic Year 2013 Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____