เอกราช พรมเหมา : การศึกษาลักษณะของโปรติเนส ยีนโปรติเนส และจีโนมของ *VIRGIBACILLUS* SP. SK37 ที่แยกได้จากน้ำปลาไทย (CHARACTERIZATION OF PROTEINASES, PROTEINASE GENES, AND GENOME OF *VIRGIBACILLUS* SP. SK37 ISOLATED FROM THAI FISH SAUCE) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล, 248 หน้า.

Virgibacillus sp. SK37 เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ชอบเกลือปานกลางซึ่งแยกได้จากน้ำปลาไทย แบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีศักยภาพในการใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการผลิตน้ำปลาเนื่องจากมีความสามารถสูงในการผลิตโปรติเนส วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือเพื่อระบุ ศึกษาลักษณะ และโคลนโปรติเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ รวมถึงการวิเคราะห์จีโนมและยีนที่มีส่วนร่วมในการปรับตัวในแหล่งอาศัยที่มีเกลือและโปรตีนสูง

โปรติเนสที่ปลดปล่อยออกมาหกชนิดจากทั้งหมดสิบสองชนิด เป็นเอนไซม์ที่คล้ายสับทิลิซิน โปรติเนสสามชนิดจากหกชนิดดังกล่าวมีขนาดมวลโมเลกุลเท่ากับ 19, 34, และ 44 กิโลดาลตัน เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแสดงกิจกรรมที่เหมาะสมที่พีเอช 8 และอุณหภูมิ 55 ถึง 65 องศาเซลเซียส โซเดียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์โดยให้ค่ากิจกรรมสูงสุดที่ความเข้มข้นร้อยละ 30 และ 10 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ การตรวจวิเคราะห์เปปไทด์ที่ถูกย่อยโดยทริปซินด้วยเทคนิคลายพิมพ์มวลเปปไทด์และเทคนิคการหาลำดับเปปไทด์บางส่วนด้วยเทคนิค MALDI-TOF และ Tandem Mass พบว่าทั้งสามเอนไซม์เป็นชนิดใหม่และมีความคล้ายคลึงกับบาซิลโลเปปทิเดสเอฟ (bacillopeptidase F) คลังจีโนมของเชื้อ SK37 สร้างใน *E. coli* DH10B และคัดเลือกเพื่อค้นหายีนโปรติเนส ซึ่งพบหนึ่งยีนที่ถอดรหัสได้เอนไซม์ที่คล้ายสับทิลิซินและมีความเหมือนกับ AprX จากบาซิลลัสสายพันธุ์อื่นๆ เอนไซม์รีคอมบิแนนท์ซึ่งมีชื่อว่า AprX-SK37 แสดงกิจกรรมที่พีเอช 9.5 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1.0 โมลาร์ เอนไซม์นี้จำเป็นต้องมีแคลเซียมเพื่อแสดงกิจกรรมโดยระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 15 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์มีความต้านทานต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 5 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมบ่งชี้ว่า AprX-SK37 เป็นวงศ์ใหม่ในวงศ์ใหญ่ (superfamily) ของซับทิเลส และมีความเสถียรต่อการเกิดออกซิเดชั่นและสามารถทนเกลือในระดับปานกลาง จีโนมทั้งหมดของสายพันธุ์ SK37 ประกอบด้วยโครโมโซมขนาด 3.8 เมกะเบส และสามพลาสมิดขนาด 4.1, 4.4, และ 12.1 กิโลเบส และประกอบด้วยลำดับรหัสพันธุกรรมของโปรตีน 3,823 ชนิด การวิเคราะห์จีโนมแสดงการนำเข้ากรดอะมิโนอย่างมีประสิทธิภาพและวิถีการสังเคราะห์ของสารให้กลิ่นรสในน้ำปลาจากอนุพันธ์ของกรดอะมิโน ผลการวิเคราะห์จีโนมแสดงถึงความสามารถใน

การปรับตัวในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือสูงของสายพันธุ์ SK37 เนื่องจากมียีนเพื่อการควบคุมและนำเข้าโพแทสเซียม โซเดียม และสารควบคุมความดันออสโมติก (osmoprotectants) การขาดยีน *hpr* และ *scoC* ที่ผลิตโปรตีนที่หน่วงการแสดงออกของโปรติเนสอาจอธิบายได้ถึงความสามารถในการผลิตโปรติเนสที่สูงของสายพันธุ์ SK37 จีโนมของ SK37 แสดงถึงยีนร่วมบรรพบุรุษ (orthologs) ที่คล้ายกับบาซิลลัสสายพันธุ์อื่นๆ โดยพบค่าความเหมือนสูงสุดในในแบคทีเรียแกรมบวกที่ชอบเกลือสายพันธุ์ *Oceanobacillus iheyensis* ความรู้เกี่ยวกับคุณลักษณะของโปรติเนสและจีโนมของ SK37 มีความสำคัญต่อความเข้าใจในสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือและโปรตีนสูงและการนำไปใช้ในการหมักน้ำปลา

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

EKKARAT PHROMMAO : CHARACTERIZATION OF PROTEINASES, PROTEINASE GENES, AND GENOME OF *VIRGIBACILLUS* SP. SK37 ISOLATED FROM THAI FISH SAUCE. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JIRAWAT YONGSAWATDIGUL, Ph.D., 248 PP.

SUBTILISIN-LIKE PROTEINASES/HALOTOLERANCE/BACILLOPEPTIDASE F/APRX/GENOMIC LIBRARY CONSTRUCTION/GENOME SEQUENCE/ *VIRGIBACILLUS*/ FISH SAUCE

Virgibacillus sp. SK37 is a Gram-positive moderately halophilic bacterium isolated from Thai fish sauce. This bacterium has the potential for use as a starter culture for fish sauce production as it shows high proteinase production. Objectives of this study were to identify, characterize, and clone proteinases from this strain. Complete genome sequence of this bacterium was determined and genes involved in adaptation to high saline and protein-rich niche of fish sauce were analyzed.

Six out of twelve extracellular proteinases were identified as subtilisin-like enzymes, three of which with molecular mass of 19, 34, and 44 kDa were partially-purified. All three enzymes showed optimum activity at pH 8 and at 55-60ºC. These enzymes were activated by NaCl and $CaCl_2$ showing maximal activity at 30% NaCl and 100 mM $CaCl_2$. Peptide mass fingerprint and *de novo* peptide sequencing of tryptic digested peptides analyzed by MALDI-TOF and tandem mass spectrometry, respectively, suggested that all three enzymes were novel and homologous to bacillopeptidase F. Genomic library of SK37 was constructed in *E. coli* DH10B and screened in order to identify proteinase gene. One gene encoding a subtilisin-like

enzyme with a high homology to AprX of *Bacillus* species was obtained. The recombinant enzyme designated as AprX-SK37 exhibited activity at pH 9.5, 55°C, and 1.0 M NaCl. The enzyme was absolutely calcium-dependent showing optimum activity at 15 mM $CaCl_2$. The enzyme had a resistance to H_2O_2 up to 5%. Phylogenetic analysis suggested that AprX-SK37 belongs to a novel family of subtilases superfamily with oxidant stable and moderately halotolerant properties. The genome of SK37 consists of 3.8 Mbp of a circular chromosome and 4.1-, 4.4-, and 12.1-kbp plasmids with 3,823 protein coding sequences. Analysis of the genome sequence shows efficient uptake and utilization of amino acids and pathways for the synthesis of fish sauce flavors from amino acid derivatives. The genome reveals that SK37 is well equipped for adaptation to high saline environments by possessing genes for regulation and uptake of potassium, sodium, and osmoprotectants. The lacks of *hpr* and *scoC* genes, encoding proteinase repressors, may explain the high proteinase production ability of SK37. Genome of strain SK37 shows highly conserved orthologous genes to *Bacillus* species with highest similarity to Gram positive halophilic *Oceanobacillus iheyensis*. Knowledge about proteinase characteristics and genome sequence of SK37 is critical for understanding life in saline and protein-rich environments and applications in fish sauce fermentation.

School of Food Technology

Academic Year 2010

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature _____