อังควิภา มนตรีวงษ์ : การศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินและโปรตีนจากแบคทีเรียชอบเกลือปานกลาง *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลา (CHARACTERIZATION OF FIBRINOLYTIC AND PROTEOLYTIC ENZYMES FROM A MODERATELY HALOPHILIC BACTERIUM, *VIRGIBACILLUS* SP. SK1-3-7, ISOLATED FROM FISH SAUCE FERMENTATION) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล, 93 หน้า.

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อเปรียบเทียบกิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินและโปรตีนที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 กับแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำปลาที่หมักในระยะเวลา 1-12 เดือน ทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีของเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 แบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 แสดงกิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินและโปรตีนได้สูงสุด เมื่อเทียบกับเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด 25 ไอโซเลท ซึ่งคัดแยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลาเมื่อวิเคราะห์ด้วยไฟบรินเพลทและเอโซเคซีน เมื่อทำบริสุทธิ์เอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินและโปรตีนโดยใช้เทคนิคการแยกตามความไม่มีขั้วและการแลกเปลี่ยนประจุ พบว่าโปรติเอสจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 มีน้ำหนักโมเลกุล 20 และ 36 กิโลดาลตัน เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมโดยเทคนิคไฟบรินและเคซีนไซโมแกรมเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินมีเสถียรภาพที่พีเอชช่วง 4-10 และที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นอกจากนี้เอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินถูกกระตุ้นกิจกรรมโดยแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ นอกจากนี้เอนไซม์ยังคงแสดงกิจกรรมได้สูงที่ระดับแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2 โมลาร์ เอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินมีกิจกรรมคงเหลือ 61% ที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 4 โมลาร์ แสดงว่าเอนไซม์ยังคงแสดงกิจกรรมได้สูงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของไอออนเกลือสูง เอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินถูกยับยั้งด้วยฟีนิล-เมธิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (Phenylmethylsulfonyl fluoride) และสามารถย่อยสลายสารตั้งต้นสังเคราะห์ Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA ซึ่งบ่งชี้คุณลักษณะของโปรติเอสกลุ่มซีรีนที่คล้ายซับทิลิซิน (Subtilisin-like serine protease) ซึ่งเป็นลักษณะที่คล้ายกับนัตโตะไคเนสจาก *Bacillus natto* เอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 สามารถย่อยสลายไฟบรินได้สูงกว่าพลาสมิน ยิ่งไปกว่านั้นเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เพปซินและทริปซิน ดังนั้นเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อสุขภาพซึ่งสามารถลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดและหัวใจ

เอนไซม์ย่อยสลายเอโซเคซีนจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งกิจกรรมของเอนไซม์คือที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และพีเอช 9 กิจกรรมย่อยสลายโปรตีนเพิ่มขึ้น

ประมาณ 2 และ 1.2 เท่า ในสภาวะที่มีแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ตามลำดับ กิจกรรมของโปรติเอสถูกกระตุ้นด้วยเกลือแคลเซียมคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์ ยิ่งไปกว่านั้นเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนยังคงแสดงกิจกรรมได้ทั้งในสภาวะที่ไม่มีและมีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 4 โมลาร์ และเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนมีเสถียรภาพในสภาวะมีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ และแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนมีเสถียรภาพที่พีเอชช่วง 4-10 และที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เอนไซม์ถูกยับยั้งด้วยฟีนิลเมธิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ และสามารถย่อยสลายสารตั้งต้นสังเคราะห์ Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA แสดงถึงลักษณะของเอนไซม์โปรติเอสกลุ่มซีรีนที่คล้ายซับทิลิซิน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชา เทคโนโลยีอาหาร ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2554 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

AUNGKAWIPA MONTRIWONG : CHARACTERIZATION OF FIBRINOLYTIC AND PROTEOLYTIC ENZYMES FROM A MODERATATELY HALOPHILIC BACTERIUM, *VIRGIBACILLUS* SP. SK1-3-7, ISOLATED FROM FISH SAUCE FERMENTATION. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JIRAWAT YONGSAWATDIGUL, Ph.D., 93 PP.

FIBRINOLYTIC ENZYME/ *VIRGIBACILLUS* SP./ FISH SAUCE/ PARTIALLY PURIFIED/ PLASMIN/ PROTIOLYTIC ENZYME

Objectives of this study were to compare fibrinolytic and proteolytic activities produced from *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 with those of bacteria isolated from fish sauce samples fermented for 1-12 months. In addition, biochemical characteristics of fibrinolytic and proteolytic enzymes from *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 were characterized. *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 exhibited the highest fibrinolytic and proteolytic activities among 25 strains tested based on the fibrin plate and azocasein assay, respectively. Fibrinolytic and proteolytic enzymes from *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 were partially purified using hydrophobic and ion-exchange chromatography. The enzymes with molecular weight of 20 and 36 kDa showed fibrinolytic activity on fibrin and casein zymograms. The fibrinolytic enzymes were stable between pH 4-10 and below 60 ^{o}C for 1 h. The enzymes were activated by 20 mM $CaCl_2$ and 0.15 M NaCl. In addition, these enzymes showed high activity at $CaCl_2$ and NaCl concentrations up to 100 mM and 2 M, respectively. In addition, the residual fibrinolytic activity of 61% was found at 4 M NaCl, suggesting that these enzymes

remained relatively high catalytic activity at extremely high ionic strength conditions. The enzymes were completely inhibited by Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and preferably hydrolyzed Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, suggesting that the enzymes were a subtilisin-like serine protease, similar to nattokinase from *Bacillus natto*. *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 enzymes hydrolyzed fibrin to a greater extent than did plasmin. In addition, the enzymes were resistant to pepsin and trypsin digestion. The fibrinolytic enzymes from *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 could be utilized as a part of nutraceutical products to reduce the risk of cardiovascular diseases.

The proteolytic enzymes of *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 showed optimum condition at 60 °C and pH 9. Proteolytic activity was increased about 2 and 1.2 times in the presence of 10 mM $CaCl_2$ and 0.5 M NaCl, respectively, indicating the characteristic of $CaCl_2$ and NaCl-activated proteases. In addition, proteolytic activity still remained in the absence and presence of NaCl up to 4 M. These enzymes exhibited stability in the presence of 0.5 M NaCl and 10 mM $CaCl_2$, pH 9 at 37 °C for 24 h. The proteolytic enzymes were stable between pH 4-10 and below 60 ^{o}C for 1 h. The enzymes were completely inhibited by PMSF and preferably hydrolyzed Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, suggesting that it is a subtilisin-like serine protease.

School of Food Technology Student's Signature _____

Academic Year 2011 Advisor's Signature _____