

การศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินและโปรตีนจากแบคทีเรีย
ชอบเกลือปานกลาง *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ที่คัดแยกได้จาก
กระบวนการหมักน้ำปลา

นางสาวอังคิภา มนตรีวงษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2554

**CHARACTERIZATION OF FIBRINOLYTIC AND
PROTEOLYTIC ENZYMES FROM A MODERATELY
HALOPHILIC BACTERIUM, *VIRGIBACILLUS* SP.
SK1-3-7, ISOLATED FROM FISH SAUCE
FERMENTATION**

Aungkawipa Montriwong

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for
the Degree of Master of Science in Food Technology**

Suranaree University of Technology

Academic Year 2011

การศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินและโปรตีนจากแบคทีเรียชอบเกลือ
ปานกลาง *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็น ส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบบัณฑิตวิทยาลัย

(ผศ. ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก)

ประธานกรรมการ

(รศ. ดร.จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาบัณฑิตวิทยาลัย)

(ผศ. ดร.สุรสิทธิ์ รอดทอง)

กรรมการ

(ศ. ดร.ชูกิจ ลิมปิจำนงค์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

อังกวิภา มนตรีวงษ์ : การศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินและโปรตีนจาก
แบคทีเรียชอบเกลือปานกลาง *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมัก
น้ำปลา (CHARACTERIZATION OF FIBRINOLYTIC AND PROTEOLYTIC
ENZYMES FROM A MODERATELY HALOPHILIC BACTERIUM,
VIRGIBACILLUS SP. SK1-3-7, ISOLATED FROM FISH SAUCE FERMENTATION)
อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. จิรวัดน์ ยงสวัสดิ์กุล, 93 หน้า.

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อเปรียบเทียบกิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินและโปรตีนที่
ผลิตจากแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 กับแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำปลาที่หมัก
ในระยะเวลา 1-12 เดือน ทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีของเอนไซม์จาก *Virgibacillus*
sp. SK1-3-7 แบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 แสดงกิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินและ
โปรตีนได้สูงสุด เมื่อเทียบกับเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด 25 ไอโซเลท ซึ่งคัดแยกได้
จากกระบวนการหมักน้ำปลาเมื่อวิเคราะห์ด้วยไฟบรินเฟลทและเอโซเคซิน เมื่อทำบริสุทธิ์เอนไซม์
ย่อยสลายไฟบรินและโปรตีนโดยใช้เทคนิคการแยกตามความไม่มีขั้วและการแลกเปลี่ยนประจุ
พบว่าโปรตีนจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 มีน้ำหนักโมเลกุล 20 และ 36 กิโลดาลตัน เมื่อ
วิเคราะห์กิจกรรมโดยเทคนิคไฟบรินและเคซินโซโมแกรมเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินมีเสถียรภาพที่
พีเอชช่วง 4-10 และที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นอกจากนี้เอนไซม์ย่อย
สลายไฟบรินถูกกระตุ้นกิจกรรมโดยแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอ-
ไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ นอกจากนี้เอนไซม์ยังคงแสดงกิจกรรมได้สูงที่ระดับแคลเซียมคลอไรด์
เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2 โมลาร์ เอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินมี
กิจกรรมคงเหลือ 61% ที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 4 โมลาร์ แสดงว่าเอนไซม์ยังคงแสดงกิจกรรม
ได้สูงในสภาวะที่มีความเข้มข้นของไอออนเกลือสูง เอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินถูกยับยั้งด้วยฟีนิล-
เมธิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (Phenylmethylsulfonyl fluoride) และสามารถย่อยสลายสารตั้งต้น
สังเคราะห์ Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA ซึ่งบ่งชี้คุณลักษณะของโปรตีนเอสกลุ่มซีรีนที่คล้ายซับทิลิซิน
(Subtilisin-like serine protease) ซึ่งเป็นลักษณะที่คล้ายกับนัตโตโคโคเนสจาก *Bacillus natto*
เอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 สามารถย่อยสลายไฟบรินได้สูงกว่า
พลาสมิน ยิ่งไปกว่านั้นเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เพปซินและทริปซิน
ดังนั้นเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 สามารถนำไปประยุกต์ใช้ใน
ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อสุขภาพซึ่งสามารถลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดและหัวใจ

เอนไซม์ย่อยสลายเอโซเคซินจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่ง
กิจกรรมของเอนไซม์คือที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และพีเอช 9 กิจกรรมย่อยสลายโปรตีนเพิ่มขึ้น

ประมาณ 2 และ 1.2 เท่า ในสภาวะที่มีแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ตามลำดับ กิจกรรมของโปรตีนเอสถูกกระตุ้นด้วยเกลือแคลเซียมคลอไรด์ และโซเดียมคลอไรด์ 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 เอนไซม์ถูกยับยั้งด้วยฟิโนลเมธิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ และสามารถย่อยสลายสารตั้งต้นสังเคราะห์ Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA แสดงถึงลักษณะของเอนไซม์โปรตีนเอสกลุ่มซีรีนที่คล้ายซัพทิลิซิน



AUNGKAWIPA MONTRIWONG : CHARACTERIZATION OF
FIBRINOLYTIC AND PROTEOLYTIC ENZYMES FROM A
MODERATELY 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/ PROTEOLYTIC 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 °C for 1 h. The enzymes were activated by 20 mM CaCl₂ and 0.15 M NaCl. In addition, these enzymes showed high activity at CaCl₂ 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 CaCl₂ and 0.5 M NaCl, respectively, indicating the characteristic of CaCl₂ 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 CaCl₂, pH 9 at 37 °C for 24 h. The proteolytic enzymes were stable between pH 4-10 and below 60 °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

Academic Year 2011

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ช่วยชี้แนะและให้คำปรึกษาในการศึกษางานวิจัยด้วยดีตลอดมา รวมถึงให้คำแนะนำในการเขียนและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรศักดิ์ รอดทอง กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้ด้านวิชาการตลอดระยะเวลาที่ศึกษาอยู่ที่ มทส.

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่สนับสนุน อุปกรณ์และเครื่องมือในการวิจัย

ขอขอบคุณศูนย์พันธกิจวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติที่ให้เงินทุนสนับสนุนการศึกษา และการวิจัยตลอดการศึกษาในระดับปริญญาโท

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทุกท่านที่สละเวลาให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอบคุณเพื่อน ๆ ที่ ๆ ที่ร่วมเรียนระดับบัณฑิตศึกษา และผู้ช่วยวิจัย สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหารที่ให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ ให้คำปรึกษาและคำแนะนำตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา

ท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาและทุกคนในครอบครัวที่ให้การสนับสนุนทางการศึกษา อบรมสั่งสอน และให้กำลังใจมาโดยตลอด จนทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในชีวิตตลอดมา

อังควิภา มนตรีวงษ์

สารบัญ

หน้า

| | |
|---|----------|
| บทคัดย่อ (ภาษาไทย)..... | ก |
| บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)..... | ค |
| กิตติกรรมประกาศ..... | จ |
| สารบัญ..... | ฉ |
| สารบัญตาราง..... | ญ |
| สารบัญรูป..... | ฎ |
| คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... | ฏ |
| บทที่ | |
| 1 บทนำ..... | 1 |
| 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... | 4 |
| 1.3 สมมุติฐานของงานวิจัย..... | 4 |
| 1.4 ขอบเขตของการวิจัย..... | 5 |
| 1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ..... | 5 |
| 2 ปรัชญ่วรรณกรรมงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... | 6 |
| 2.1 น้ำปลา..... | 6 |
| 2.2 แบคทีเรียชอบเค็ม..... | 9 |
| 2.3 โปรติเอส..... | 10 |
| 2.4 คุณสมบัติทางชีวเคมีของโปรติเอสจากแบคทีเรียชอบเกลือ..... | 12 |
| 2.5 แบคทีเรียชอบเกลือปานกลาง <i>Virgibacillus</i> และโปรติเอสจาก <i>Virgibacillus</i> | 16 |
| 2.6 กลไกการแข็งตัวของเลือดและการสลายลิ่มเลือด..... | 18 |
| 2.6.1 ยาที่ใช้ในการสลายลิ่มเลือด..... | 20 |
| 2.6.2 เอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินและกลไกการย่อยสลายไฟบริน..... | 21 |
| 2.6.3 แหล่งเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน..... | 23 |

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

| | | |
|---------|---|----|
| 2.6.4 | คุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจากจุลินทรีย์..... | 26 |
| 3 | วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ..... | 30 |
| 3.1 | วัสดุอุปกรณ์..... | 30 |
| 3.2 | สารเคมี..... | 31 |
| 3.3 | วิธีการดำเนินการวิจัย..... | 31 |
| 3.3.1 | เปรียบเทียบกิจกรรมการย่อยสลายไฟบริน (Fibrinolytic activity) และโปรตีน (Proteolytic activity) ของเอนไซม์จากแบคทีเรีย <i>Virgibacillus</i> sp. SK1-3-7 กับแบคทีเรียที่คัดแยกได้จาก กระจวนการหมักน้ำปลา..... | 31 |
| 3.3.1.1 | การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและการเตรียมเอนไซม์จากแบคทีเรีย..... | 31 |
| 3.3.1.2 | การวิเคราะห์กิจกรรมการย่อยสลายไฟบริน โดยเทคนิคไฟบรินเพลท (Fibrin plate)..... | 33 |
| 3.3.1.3 | การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน..... | 34 |
| 3.3.1.4 | การวิเคราะห์กิจกรรมโปรติเอสโดยใช้โปรตีนเป็นสารตั้งต้น (Proteolytic activity)..... | 34 |
| 3.3.2 | การทำริสุทธีเอนไซม์..... | 35 |
| 3.3.3 | คุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน..... | 36 |
| 3.3.3.1 | วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์..... | 36 |
| 3.3.3.2 | พีเอชและอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน..... | 37 |
| 3.3.3.3 | ผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน..... | 37 |
| 3.3.3.4 | ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน..... | 38 |
| 3.3.3.5 | ผลของสารตั้งต้นจำเพาะต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน..... | 38 |

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

| | | |
|---------|--|----|
| 3.3.3.6 | ผลของสารยับยั้งและไอออนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ย่อยสลายไฟบริน..... | 38 |
| 3.3.4 | การย่อยสลายไฟบรินของเอนไซม์บริสุทธิ์..... | 39 |
| 3.3.5 | ความคงทนต่อการย่อยสลายโดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร..... | 39 |
| 3.3.6 | คุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน..... | 39 |
| 3.3.6.1 | วิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของเอนไซม์..... | 39 |
| 3.3.6.2 | การวิเคราะห์กิจกรรมโปรติเอสโดยใช้โปรตีนเป็นสารตั้งต้น..... | 40 |
| 3.3.6.3 | อุณหภูมิและพีเอชต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ โปรติเอส..... | 40 |
| 3.3.6.4 | ผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของ เอนไซม์โปรติเอส..... | 41 |
| 3.3.6.5 | ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของ โปรติเอส..... | 41 |
| 3.3.6.6 | เสถียรภาพของโปรติเอสที่ 37 องศาเซลเซียส ต่อกิจกรรมของ โปรติเอส..... | 41 |
| 3.3.6.7 | ผลของสารตั้งต้นจำเพาะต่อกิจกรรมของโปรติเอส..... | 42 |
| 3.3.6.8 | ผลของสารยับยั้งและไอออนต่อกิจกรรมของโปรติเอส..... | 42 |
| 4 | ผลการทดลองและวิจารณ์..... | 43 |
| 4.1 | การเปรียบเทียบกิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินและโปรตีนที่ผลิตจาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK1-3-7 กับแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำปลา..... | 43 |
| 4.2 | คุณลักษณะของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK1-3-7..... | 47 |
| 4.2.1 | การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน..... | 47 |
| 4.2.2 | คุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK1-3-7..... | 50 |
| 4.2.2.1 | พีเอชและอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์..... | 50 |

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

| | | |
|---------|---|----|
| 4.2.2.2 | ผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมและเสถียรภาพ ของเอนไซม์..... | 52 |
| 4.2.2.3 | ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของ เอนไซม์..... | 54 |
| 4.2.2.4 | ผลของสารตั้งต้นจำเพาะต่อกิจกรรมของเอนไซม์..... | 56 |
| 4.2.2.5 | ผลของสารยับยั้งและไอออนต่อกิจกรรมของเอนไซม์..... | 57 |
| 4.2.3 | การเปรียบเทียบกิจกรรมและรูปแบบการย่อยสลายไฟบรินระหว่าง เอนไซม์จาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK1-3-7 และพลาสมิน..... | 59 |
| 4.2.4 | ผลของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารต่อกิจกรรมของเอนไซม์..... | 61 |
| 4.3 | การศึกษาคุณลักษณะของโปรติเอส โดยใช้สารตั้งต้น โปรตีนเอ โซเคซิน..... | 64 |
| 4.3.1 | การทำบริสุทธิ์โปรติเอสและขนาดโมเลกุลของโปรติเอส..... | 64 |
| 4.3.2 | อุณหภูมิและพีเอชต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของโปรติเอส..... | 65 |
| 4.3.3 | ผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของโปรติเอส..... | 70 |
| 4.3.4 | ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของโปรติเอส..... | 72 |
| 4.3.5 | ผลของสารตั้งต้นจำเพาะต่อกิจกรรมของโปรติเอส..... | 75 |
| 4.3.6 | ผลของสารยับยั้งและสารเคมีต่อกิจกรรมของโปรติเอส..... | 76 |
| 5 | บทสรุปและข้อเสนอแนะ..... | 79 |
| 5.1 | บทสรุป..... | 79 |
| 5.2 | ข้อเสนอแนะ..... | 80 |
| | รายการอ้างอิง..... | 81 |
| | ประวัติผู้เขียน..... | 93 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | หน้า |
|----------|---|
| 2.1 | คุณสมบัติทางชีวเคมีของอัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่มชอบเกลือ.....14 |
| 2.2 | คุณสมบัติทางชีวเคมีของโปรติเอสจาก <i>Virgibacillus</i> จากแหล่งต่าง ๆ17 |
| 2.3 | คุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจากจุลินทรีย์.....27 |
| 3.1 | รหัสและสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลา.....32 |
| 4.1 | การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินที่ผลิตจาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK1-3-7.....47 |
| 4.2 | ความสามารถในการย่อยสารตั้งต้นจำเพาะของเอนไซม์จาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK1-3-7.....56 |
| 4.3 | ผลของสารยับยั้งและสารเคมีต่อกิจกรรมของเอนไซม์บริสุทธิ์จาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK1-3-7.....58 |
| 4.4 | ผลของไอออนและไอออนโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์จาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK1-3-7.....59 |
| 4.5 | การย่อยสลายสารตั้งต้นจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซินของเอนไซม์จาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK1-3-7 เอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์เพปซิน.....63 |
| 4.6 | ตารางทำบริสุทธิ์ของโปรติเอสที่ผลิตจาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK1-3-7.....64 |
| 4.7 | สารตั้งต้นจำเพาะของเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนจาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK1-3-7 ตรวจวิเคราะห์ที่ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 9 เป็นเวลา 30 นาที.....76 |
| 4.8 | ผลของสารยับยั้งและสารเคมีต่อกิจกรรมของโปรติเอสจาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK1-3-7.....77 |
| 4.9 | ผลของไอออนและไอออนโลหะต่อกิจกรรมของโปรติเอสจาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK1-3-7.....78 |

สารบัญรูป

| รูปที่ | หน้า |
|--------|--|
| 2.1 | ขั้นตอนการผลิตน้ำปลา.....8 |
| 2.2 | แผนภาพกลไกการแข็งตัวของเลือดและการสลายลิ่มเลือด.....19 |
| 4.1 | รูปแบบของการย่อยสลายไฟบรินของ 25 ไอโซเลท รหัสในรูปแบบคือ รหัสโคโลนีของ 3 ไอโซเลท Negative control คือ อาหารเหลวยีสต์สกัด Positive control คือ พลาสมิน (A), รหัสโคโลนีของ 9 ไอโซเลท Negative control คือ อาหารเหลวยีสต์สกัด (B, C) และรหัสโคโลนีของ 9 ไอโซเลท Negative control คือ MRS (D).....44 |
| 4.2 | เส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนใสที่เกิดจากการย่อยสลายไฟบรินในอาหารวุ้นด้วย เอนไซม์สกัดจากแบคทีเรีย <i>Virgibacillus</i> sp. ที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมักปลา.....45 |
| 4.3 | กิจกรรมการย่อยสลายเอโซเลซิน โดยเอนไซม์สกัดจากเชื้อแต่ละสายพันธุ์ ที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลา.....46 |
| 4.4 | รูปแบบของเอนไซม์ วิเคราะห์โดย SDS-fibrin zymogram; Crude enzyme (1), เอนไซม์จากการทำบริสุทธิ์โดย phenyl-Sepharose (2), DEAE-Sephacel (3) และ Source Q (4) S คือโปรตีนมาตรฐาน.....48 |
| 4.5 | การทำบริสุทธิ์ด้วย phenyl-Sepharose (A), DEAE-Sephacel (B) และ Source Q (C).....49 |
| 4.6 | ผลของพีเอช (A) และอุณหภูมิ (B) ต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK1-3-7 ผลของพีเอชศึกษาโดยบ่มเอนไซม์ที่ค่าพีเอชต่าง ๆ (พีเอช 2-12) ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ผลของอุณหภูมิศึกษา โดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (10-80 องศาเซลเซียส) พีเอช 7.4 เป็นเวลา 60 นาที วิเคราะห์กิจกรรมของตัวอย่างทั้งหมดที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที.....51 |
| 4.7 | ผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรม (A) และเสถียรภาพ (B) ของเอนไซม์บริสุทธิ์จาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK1-3-7 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอช 7.4 ที่ 37 องศาเซลเซียส ศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์โดยบ่มเอนไซม์ก่อนที่ระดับแคลเซียมคลอไรด์ต่าง ๆ กัน (0-100 มิลลิโมลาร์) พีเอช 7.4 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส และตรวจวัดกิจกรรม ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยมีแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์.....53 |

สารบัญรูป (ต่อ)

| รูปที่ | หน้า |
|---|------|
| 4.8 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรม (A) และเสถียรภาพ (B) ของเอนไซม์บริสุทธิ์จาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK1-3-7 ศึกษาผลต่อกิจกรรมที่พีเอช 7.4 ที่ 37 องศาเซลเซียส และศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์โดยบ่มเอนไซม์ที่ระดับโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ (0-4 โมลาร์) ที่พีเอช 7.4 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส และตรวจวัดกิจกรรมที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยมีแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์..... | 55 |
| 4.9 รูปแบบของการย่อยไฟบรินของเอนไซม์บริสุทธิ์จาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK1-3-7 (A) และพลาสมิน (B) ซึ่งวิเคราะห์โดย SDS-PAGE (12.5%T) F คือไฟบริน ตัวเลขแสดงเวลาการย่อยในหน่วยนาที่ S คือโปรตีนมาตรฐาน..... | 60 |
| 4.10 กิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินของเอนไซม์แต่ละชนิด วิเคราะห์โดย SDS-PAGE (12.5%T) แถวที่ 1 แสดงเอนไซม์จาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK1-3-7 แถวที่ 2 แสดงเอนไซม์เพปซินแถวที่ 3 แสดงเอนไซม์หลังจากผ่านการย่อยด้วยเพปซิน แถวที่ 4 แสดงทริปซิน แถวที่ 5 แสดงเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ผ่านการย่อยด้วยทริปซิน แถวที่ 6 แสดงเอนไซม์ที่ผ่านการย่อยด้วยเพปซินและตามด้วยทริปซิน..... | 62 |
| 4.11 รูปแบบของเอนไซม์วิเคราะห์โดย Activity staining; Crude enzyme (1), เอนไซม์จากการทำบริสุทธิ์โดย Phenyl-Sepharose (2), DEAE-Sephacel (3) และ Source Q (4) S คือโปรตีนมาตรฐาน..... | 65 |
| 4.12 ผลของอุณหภูมิ (A) และพีเอช (B) ต่อกิจกรรมการย่อยสารตั้งต้นเอโซเคซินของ โปรติเอสจาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK1-3-7..... | 67 |
| 4.13 ผลของอุณหภูมิ (A) และพีเอช (B) ต่อเสถียรภาพของโปรติเอสจาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK1-3-7 เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเอโซเคซิน ผลของอุณหภูมิศึกษาโดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (0-80 องศาเซลเซียส) พีเอช 7 เป็นเวลา 60 นาที ผลของพีเอชศึกษาโดยบ่มเอนไซม์ที่ค่าพีเอชต่าง ๆ (พีเอช 2-12) ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที..... | 69 |
| 4.14 ผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรม (A) และต่อเสถียรภาพ (B) ของโปรติเอสจาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK1-3-7 วิเคราะห์ด้วยเอโซเคซินที่พีเอช 9 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์โดยบ่มเอนไซม์ที่ระดับแคลเซียมคลอไรด์ | |

สารบัญรูป (ต่อ)

| รูปที่ | หน้า |
|---|------|
| ต่าง ๆ (0-100 มิลลิ โมลาร์) ที่พีเอช 9 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส และตรวจวัดกิจกรรมที่ 60 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยมีแคลเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์..... | 71 |
| 4.15 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรม (A) และต่อเสถียรภาพ (B) ของโปรตีนจาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK1-3-7 เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเอซเคซิน โดยศึกษาผลต่อกิจกรรม ที่พีเอช 9 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ศึกษาเสถียรภาพโดยบ่มเอนไซม์ที่ระดับ โซเดียมคลอไรด์ที่ต่างกัน (0-4 โมลาร์) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส ตรวจวัดกิจกรรมที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยมีแคลเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์..... | 73 |
| 4.16 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของโปรตีนโดยใช้สารตั้งต้นสังเคราะห์ Suc-Ala-Ala- Pro-Phe-pNA..... | 74 |
| 4.17 ผลของระยะเวลาในการบ่มต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายเอซเคซินที่ โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ และแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ 37 องศาเซลเซียส..... | 75 |

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

| | | |
|--------------------|---|--|
| Ala | = | Alanine |
| AMC | = | 4-Methyl-7-coumarylamides |
| Arg | = | Arginine |
| Asp | = | Aspartic acid |
| β -ME | = | 2-Mercaptoethanol |
| Boc | = | t-Butyloxycarbonyl |
| Benz | = | Benzoyl |
| $^{\circ}\text{C}$ | = | Degree Celsius |
| CFU/ml | = | Colonies forming unit per milliliter |
| cm | = | Centimeter |
| Cys | = | Cysteine |
| DEAE | = | Diethylaminoethyl |
| E-64 | = | Trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidine)-butane |
| EDTA | = | Ethylenediaminetetraacetic acid |
| $\times g$ | = | Relative centrifugal force |
| Gly | = | Glycine |
| h | = | Hour |
| His | = | Histidine |
| kDa | = | Kilodalton |
| Leu | = | Leucine |
| Lys | = | Lysine |
| M | = | Molar |
| min | = | Minute |
| ml | = | Milliliter |
| mM | = | Millimolar |
| MW | = | Molecular weight |

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

| | | |
|-------------|---|---|
| MWCO | = | Molecular weight cut-off |
| native-PAGE | = | Native-polyacrylamide gel electrophoresis |
| PAGE | = | Polyacrylamide gel electrophoresis |
| Phe | = | Phenylalanine |
| pI | = | Isoelectric point |
| % | = | Percent |
| PMSF | = | Phenylmethanesulfonyl fluoride |
| pNA | = | Nitroanilide |
| Pro | = | Proline |
| Q | = | Quaternary ammonium |
| rRNA | = | Ribosomal ribonucleic acid |
| S | = | Protein standard marker |
| SBTI | = | Soybean trypsin inhibitor |
| SDS-PAGE | = | Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis |
| Ser | = | Serine |
| Suc | = | Succinyl |
| TCA | = | Trichloroacetic acid |
| TLCK | = | N-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone |
| TPCK | = | N-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone |
| Tris | = | Tris(hydroxymethyl)aminomethane |
| FU | = | Fibrinolytic Unit activity |
| Val | = | Valine |

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โปรติเอสเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเพปไทด์ของโปรตีน ทำให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและขนาดโมเลกุล การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นมีผลทำให้โปรตีนแสดงคุณสมบัติแตกต่างไปจากเดิม เช่น ความสามารถในการละลาย ความสามารถในการจับกับน้ำ ความสามารถในการทำปฏิกิริยากับสารอื่น ๆ ความสามารถในการเกิดเจล และการเกิดโฟม (Rao, Tanksale, Ghatege, and Deshpande, 1998) ซึ่งโดยภาพรวมมีผลโดยตรงต่อลักษณะปรากฏของอาหารทั้ง กลิ่น รส สี และลักษณะเนื้อสัมผัส ในการย่อยสลายโปรตีนของโปรติเอสมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการหมักในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้แก่ กะปิ น้ำปลา ปลาร้า ซีอิ๊ว และน้ำต๋อ (Steinkraus, 1989) สำหรับการย่อยสลายโปรตีนเกิดได้โดยเอนไซม์ที่มีอยู่ในวัตถุดิบและเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ ซึ่งติดมากับวัตถุดิบเริ่มต้น ผลจากการย่อยสลายโปรตีนด้วยโปรติเอสได้เพปไทด์และกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีผลต่อรสชาติของอาหารหมักและเป็นสารตั้งต้นซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบอื่น ๆ ในอาหาร เช่น น้ำตาล ไขมัน เกิดเป็นสารใหม่ที่มีกลิ่น สี เฉพาะตัว

โปรติเอสมีบทบาทหรือเกี่ยวข้องกับชีวิตประจำวันของเราทุกคน โดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรีย มีการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องหนัง พงษ์กฟอก ยา ตลอดจนการกำจัดของเสียในโรงงานอุตสาหกรรม ส่งผลให้ความต้องการใช้โปรติเอสมีเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ (Rao et al., 1998) จะเห็นได้ว่าโปรติเอสที่มีคุณสมบัติทนเกลือและถูกกระตุ้นกิจกรรมด้วยเกลือนั้นกำลังได้รับความสนใจและมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องจนถึงปัจจุบัน เนื่องจากว่าแบคทีเรียชอบเค็มมีความสามารถในการทนเกลือมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ดังนั้นแบคทีเรียชอบเค็มกลุ่มนี้จึงน่าจะมีบทบาทสำคัญในอาหารหมักที่มีเกลือสูง เช่น น้ำปลา อีกทั้งแบคทีเรียชอบเค็มอาจเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีน และการสร้างสารให้กลิ่นรสที่เป็นลักษณะเฉพาะตัวของน้ำปลา ในกระบวนการผลิตน้ำปลานั้นมีจุลินทรีย์ชอบเกลือ (Halophilic) หรือทนเกลือ (Halotolerant) เป็นแหล่งของโปรติเอสที่สำคัญ จากรายงานของ Uchida et al. (2004) ได้คัดแยก *Bacillus subtilis* CN2 จากน้ำปลาของประเทศเวียดนามซึ่งผลิตโปรติเอสที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง Hiraga et al. (2005) ได้คัดแยก *Filobacillus* sp. RF-5 จากน้ำปลาของประเทศไทยซึ่งสามารถผลิตโปรติเอสที่มี

คุณสมบัติทนเกลือมีความเข้มข้นเกลือ 25% ต่อมา มีรายงานถึง *Halobacillus* sp. SR5-3 ที่คัดแยกจากน้ำปลาซึ่งผลิตโปรติเอสในกลุ่มซีรีน (Serine protease) และยังเป็นเอนไซม์ที่กระตุ้นกิจกรรมและมีเสถียรภาพในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูง (Namwong et al., 2006) นอกจากนี้มีแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างโปรติเอสซึ่งคัดแยกได้จากน้ำปลา ได้แก่ *Tetragenococcus halophilus*, *Corynebacterium* sp. *Brevibacterium* sp., *Staphylococcus* sp. และ *Virgibacillus* sp. (Nawong, 2006) สอดคล้องกับรายงานของ Sinsuwan, Rodtong, and Yongsawatdigul (2007, 2008a, 2008b, 2010a, 2010b) ที่พบแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. สามารถผลิตเอนไซม์ทนเกลือ ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่หลั่งออกนอกเซลล์และตรึงอยู่ในเซลล์จากสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 และ SK33 นอกจากนี้ Phrommao, Rodtong, and Yongsawatdigul (2011) ชี้ชัดว่าเอนไซม์ที่หลั่งออกนอกเซลล์จาก *Virgibacillus* sp. SK37 มีลักษณะเด่นที่สำคัญ เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ถูกกระตุ้นและมีเสถียรภาพในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูง (20-30%) เอนไซม์ดังกล่าวจัดอยู่ในกลุ่มคล้ายซบพิลิสิน (Subtilisin-like protease)

โปรติเอสอีกกลุ่มหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจและมีการศึกษาเกี่ยวกับคุณลักษณะทางชีวเคมีของโปรติเอสที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแข็งตัวของเลือด หรือที่เรียกว่าเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน (Fibrinolytic enzyme) การเกิดไฟบริน (Fibrin) เกิดจากไฟบริโนเจน (Fibrinogen) ถูกเปลี่ยนเป็นไฟบริน โดยเอนไซม์ทรอมบิน (Thrombin) (EC 3.4.21.5) เมื่อไฟบรินเกิดการสะสมและรวมตัวกันในเส้นเลือดจะส่งเสริมให้เกิดลิ่มเลือด (Thrombus) เกาะอยู่บริเวณผนังของหลอดเลือด (Wolberg, 2007) ลิ่มเลือดที่เกิดขึ้นในหลอดเลือดแดง เรียกว่า Arterial thrombosis และลิ่มเลือดที่เกิดในหลอดเลือดดำ เรียกว่า Venous thrombosis เมื่อลิ่มเลือดที่หลุดออกจากผนังของหลอดเลือดเข้าสู่ในกระแสเลือด เรียกว่า Embolus ซึ่งลิ่มเลือดนี้อาจทำให้หลอดเลือดที่อวัยวะอื่น ๆ เช่น ปอดหรือสมองเกิดการอุดตัน เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า Thromboembolism ปรากฏการณ์นี้เหนี่ยวนำให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดอุดตัน (Deng, Wu, Zhang, Zhang, and Wen, 2010) สาเหตุที่ส่งเสริมให้เกิดลิ่มเลือด ได้แก่ ผนังหลอดเลือดมีการอักเสบหรือฉีกขาดหรือผนังหลอดเลือดแข็งหรือเกิดการไหลเวียนของเลือดช้า เช่น ผู้ป่วยที่มีอาการหัวใจวาย ผู้ป่วยหลังคลอดหรือหลังผ่าตัด ผู้ป่วยเข้าเฝือก ผู้ป่วยหลอดเลือดดำขาด รวมทั้งการได้รับยาหรือสารบางอย่างที่มีผลทำให้เกิดการอักเสบหรือเกิดจากเลือดแข็งตัวง่าย (Hypercoagulability) ในกรณีที่มีเกล็ดเลือดหรือปัจจัยการแข็งตัวของเลือดบางชนิดมากกว่าปกติ เช่น ผู้ป่วยหลังผ่าตัด ผู้ป่วยเป็นมะเร็งชนิดต่าง ๆ หญิงมีครรภ์ และการได้รับยาหรือสารบางอย่าง เช่น ยาคุมกำเนิด เป็นต้น นอกจากนี้ เมื่อไขมันในเลือดเพิ่มขึ้นส่งผลให้กิจกรรมการย่อยสลายลิ่มเลือดลดลงจึงมีส่วนส่งเสริมให้เกิดลิ่มเลือดได้ (Werf and Janssens, 2004) ปัจจุบันพบว่าโรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้มีผู้เสียชีวิตก่อนวัยอันควร จากรายงานขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization) พบว่าประชากรโลกมี

อัตราการตายด้วยโรคหัวใจสูงขึ้นเป็นอันดับหนึ่ง ติดตามมาด้วยอุบัติเหตุและมะเร็ง ในปี พ.ศ. 2548 มีผู้เสียชีวิตด้วยโรคหัวใจและหลอดเลือดคุดันทั่วโลกโดยประมาณ 17.5 ล้านคน หรือ 30% จากอัตราการเสียชีวิตทั้งหมดทั่วโลก ประชากรเอเชียเสียชีวิตด้วยโรคหลอดเลือดและหัวใจเฉลี่ย 27% ของการเสียชีวิตทั้งหมด นอกจากนี้รายงานจากสำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข (2550) พบว่าคนไทยเสียชีวิตจากโรคหลอดเลือดและหัวใจในแต่ละปีเฉลี่ย 61,230 คนต่อปี คิดเป็น 17.7% ของการตายทั้งหมด

ไฟบรินที่เกิดขึ้นนั้นจะถูกย่อยสลายโดยพลาสมิน (Plasmin) (EC3.4.21.7) โดยสารที่ทำหน้าที่กระตุ้นพลาสมิโนเจน (Plasminogen) ให้เปลี่ยนเป็นพลาสมิน คือ สารกระตุ้นพลาสมิโนเจน (Plasminogen activator) ประกอบด้วยสารกระตุ้นพลาสมิโนเจนจากเนื้อเยื่อ (Tissue plasminogen activator; t-PA) ยูโรไคเนส (Urokinase) (EC 3.4.21.73) สแตปฟีโลไคเนส (Staphylokinase) (EC 3.4.99.22) และสเตรปโตไคเนส (Streptokinase) (EC 3.4.99.0) (Shah, Zahger, and Ganz, 1995) ซึ่งถูกนำมาใช้เป็นยาละลายลิ่มเลือด (Fibrinolytic agent) ที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน อย่างไรก็ตามยาละลายไฟบรินข้างต้นมีราคาค่อนข้างแพงและเกิดผลข้างเคียงเมื่อได้รับยา เช่น เกิดภาวะเลือดออกในระบบทางเดินอาหาร เกิดอาการแพ้ยา โดยมีอาการหนาว สั่น ไข้ ลมพิษ และคื่นชิว (Blann, Landray, and Lip, 2002; Bode, Runge, and Smalling, 1996; Turpie, Chin, and Lip, 2002) ในปัจจุบันพบว่ามีรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจากหลายแหล่ง รายงานเหล่านั้นได้มุ่งเน้นศึกษาเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน เพื่อนำองค์ความรู้ไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ (Nutraceutical products) และในปัจจุบันมีหลักฐานงานวิจัยมากมายยืนยันว่าผลิตภัณฑ์น้ำตาลโตะ สามารถรักษาหรือป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจได้ เนื่องจากว่าผลิตภัณฑ์น้ำตาลโตะมีเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินที่มีศักยภาพสูง ที่เรียกกันว่า น้ำตาลโตะไคเนส (Nattokinase; NK) (EC 3.4.21.62) ผลิตจาก *B. natto* (Sumi, Hamada, Tsushima, Mihara, and Muraki, 1987) ผลิตภัณฑ์ที่มีเอนไซม์น้ำตาลโตะไคเนสเป็นองค์ประกอบนั้นมีวางจำหน่ายในท้องตลาดอย่างแพร่หลาย และมีชื่อทางการค้าแตกต่างกันออกไป ได้แก่ Nattokinase NSK-SD, Jarrow NattoMax JR-154, และ Natto-K เป็นต้น (Peng, Yang, and Zhang, 2005) นอกจากนี้นักวิจัยยังค้นพบแหล่งของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินใหม่ ๆ จากจุลินทรีย์ ได้แก่ *Pseudomonas* sp., *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* และ *Streptomyces* sp. (Kim et al., 1997; Peng, Huang, Zhange, and Zhang, 2003; Simkhada, Mander, Cho, and Yoo, 2010; Wang, Chen, Liang, and Lin, 2009) อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจากแบคทีเรียทนเกลือ แม้ว่าจะมีรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรียทนเกลือ เช่น *T. halophilus*, *Corynebacterium* sp., *Brevibacterium* sp., *Staphylococcus* sp. และ *Virgibacillus* sp. ว่าสามารถสร้างโปรตีนเอสได้ก็ตาม (Nawong, 2006) และแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* เป็นที่รู้จักกันมาเป็นเวลาช้านานว่าสามารถสร้างเอนไซม์ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยสลายไฟบรินก็ตาม (Lack, 1948; Bokarewa, Jin, and

Tarkowski, 2006) ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาคุณลักษณะของโปรติเอสทนเกลือ และมีคุณสมบัติในการย่อยสลายไฟบริน เพื่อให้เกิดองค์ความรู้สำคัญที่จะพัฒนาไปสู่การนำเอนไซม์จากแหล่งใหม่ มาทดแทนสารที่ใช้สำหรับสลายไฟบริน เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้ต่อไป นอกจากนี้ยังเป็นแนวทางสำหรับการพัฒนาด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางอาหารของประเทศ ซึ่งจะนำไปสู่อุตสาหกรรมที่ผลิตเอนไซม์ให้มีมูลค่าสูงต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อเปรียบเทียบกิจกรรมการย่อยสลายไฟบริน (Fibrinolytic activity) และโปรตีน (Proteolytic activity) ของแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 กับแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำปลาที่หมักในช่วง 1-12 เดือน

1.2.2 เพื่อสกัดเอนไซม์และทำบริสุทธิ์เอนไซม์ (Purification) รวมถึงศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีของเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายไฟบริน (Fibrinolytic enzyme) และโปรตีนอื่น ๆ (Proteolytic enzyme)

1.2.3 เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายไฟบรินของเอนไซม์บริสุทธิ์กับพลาสมิน รวมถึงศึกษาความคงทนของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินต่อเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารจำลอง

1.3 สมมุติฐานของงานวิจัย

1.3.1 แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำปลามีความสามารถในการสร้างโปรติเอสที่ย่อยสลายโปรตีนและสามารถย่อยสลายลิมเลือดหรือไฟบรินได้

1.3.2 เอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 มีความสามารถในการย่อยสลายไฟบรินเทียบเท่าพลาสมินและมีเสถียรภาพในระบบย่อยอาหารแบบจำลองได้

1.3.3 เอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 มีความสามารถในการย่อยสลายสารตั้งต้นโปรตีนได้หลายชนิดทั้งในสถานะที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์และที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นสูงถึง 4 โมลาร์

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

นำแบคทีเรียที่คัดแยกจากตัวอย่างน้ำปลาที่หมักในช่วง 1-12 เดือน จากคลังเชื้อในห้องปฏิบัติการเชื้อพันธุจุลินทรีย์ สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จำนวน 25 ไอโซเลทมาศึกษากิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินและเอโซเคซีน จากนั้นเปรียบเทียบกิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินและเอโซเคซีนจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 กับแบคทีเรียทั้ง 25 ไอโซเลท จากนั้นทำบริสุทธิ์เอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยไฟบรินและเอโซเคซีน นอกจากนี้เปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายไฟบรินกับพลาสมิน ซึ่งเป็นสารที่ทำหน้าที่ย่อยสลายไฟบรินได้โดยตรง รวมทั้งศึกษาผลของสภาวะและเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารจำลองต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.5.1 เกิดองค์ความรู้เกี่ยวกับเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินที่ผลิตได้จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำปลาตลอดจนเป็นแนวทางในการนำเอนไซม์ไปใช้ในการย่อยสลายลิมเนื้อ
- 1.5.2 เกิดองค์ความรู้เกี่ยวกับโปรติเอสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำปลา สามารถพัฒนาและเพิ่มมูลค่าให้กับเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้
- 1.5.3 เป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเพื่อสุขภาพ (Nutraceutical product)

บทที่ 2

ปรัทัศนัวรรณกรรมงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

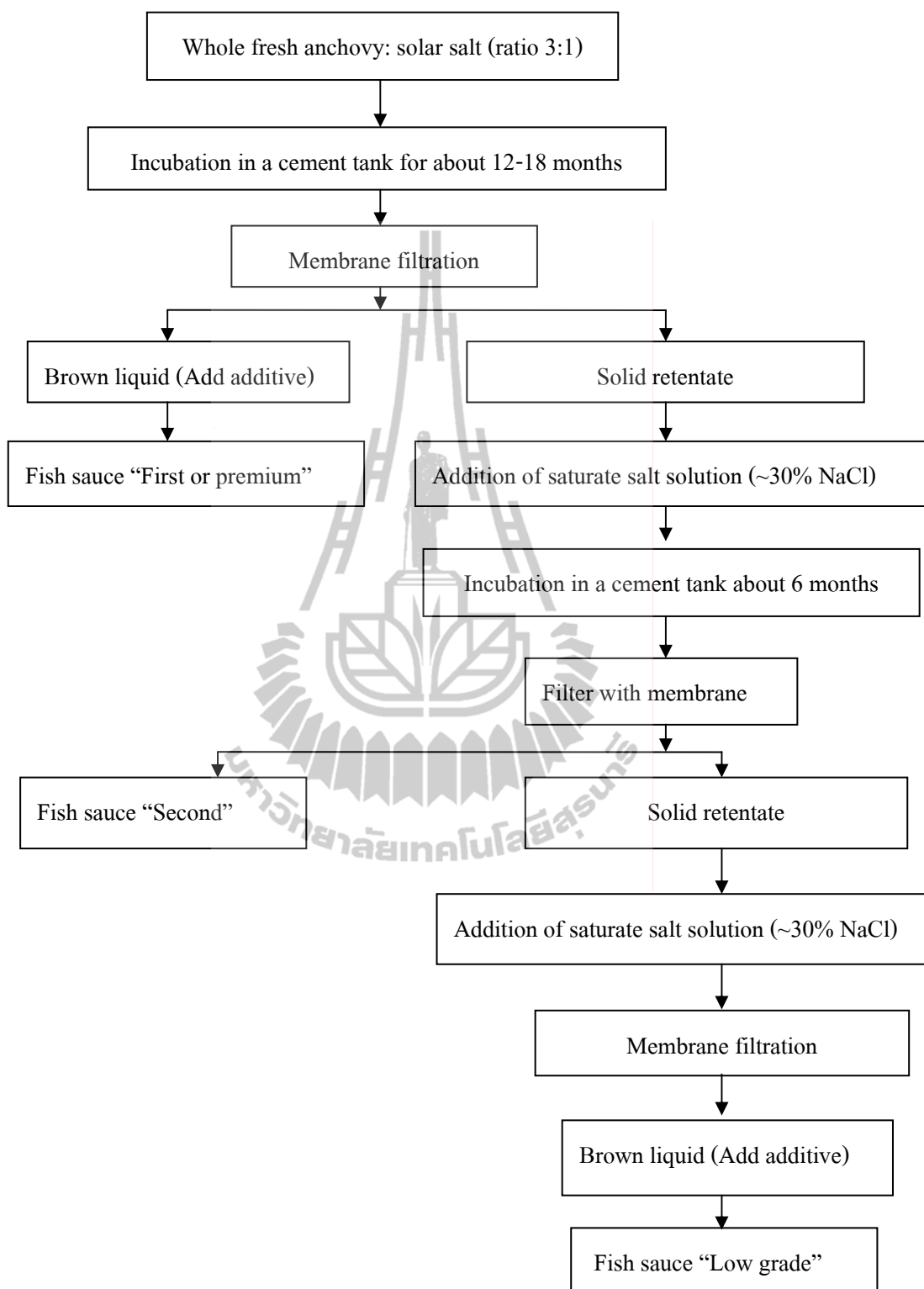
2.1 น้ำปลา

น้ำปลาเป็นผลิตภัณฑ์ปลาหมัก ซึ่งใช้เป็นเครื่องปรุงที่รู้จักกันมานาน โดยทั่วไปแล้วผลิตกันในแถบทวีปเอเชีย โดยมีชื่อที่แตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ เช่น ประเทศไทยและลาว เรียกว่า น้ำปลา ประเทศมาเลเซีย เรียกว่า บูดู (Budu) ประเทศอินโดนีเซีย เรียกว่า เคทจาบอิกาน (Ketjabin) ประเทศเวียดนาม เรียกว่า นอคนัม (Nouc-mam) ประเทศกัมพูชา เรียกว่า ตีกตริย (Teuk trei) ประเทศญี่ปุ่น เรียกว่า อิชิรุ (Ishiru) ประเทศพม่า เรียกว่า งมยายี (Ngam-ya-ye) ประเทศฟิลิปปินส์ เรียกว่า พาทิส (Patis) เป็นต้น (Lopetcharat, Choi, Park, and Daeschel, 2001) น้ำปลาเป็นของเหลวใส สีน้ำตาล มีรสชาติเค็ม ปลาที่นิยมใช้ในการผลิต ได้แก่ ปลาไส้ตัน (*Stolephorus* spp.) หรือ ปลากระตัก (*Clupeoides* spp.) โดยนำปลาผสมกับเกลือในอัตราส่วน 3:1 นำไปบรรจุในถังหมักและใช้เวลาหมักเป็นเวลา 12-18 เดือน ในสภาวะที่มีอากาศแบบจำกัด จากนั้นกรองเพื่อแยกส่วนตะกอนออกแล้วนำส่วนที่เป็นของเหลวทิ้งไว้ให้ตกตะกอนเป็นระยะเวลา 2-12 สัปดาห์ ได้น้ำปลาเกรดเอหรือเกรดที่ 1 ขั้นตอนการผลิตน้ำปลาแสดงในภาพ 2.1 ส่วนกากปลาที่เหลือจากการผลิตน้ำปลาเกรดที่ 1 จะนำมาใช้ผลิตน้ำปลาเกรดต่ำ โดยการเติมน้ำเกลือ การแต่งสีและเติมสารที่ไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคเพื่อเพิ่มสี และรสชาติ (Lopetcharat et al., 2001) น้ำปลาที่ได้มีลักษณะพิเศษเฉพาะตัว เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ทางเคมี และจุลินทรีย์ระหว่างการหมัก เช่น กลิ่นของน้ำปลาเกิดจากการย่อยโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติเอสจากตัวปลา และจากแบคทีเรียทำให้ได้เป็นเปปไทด์ และอาจถูกย่อยต่อไปได้อีกเป็นเอมีน กรดอะมิโน แอมโมเนีย และคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนพวกไขมันจะถูกย่อยโดยเอนไซม์ทำให้เกิดกรดไขมันทั้งที่ระเหยได้และระเหยไม่ได้ รวมทั้งสารพวกคีโตน และอัลดีไฮด์ (Raksakulthai and Haard, 1992; Beddows, Ardeshir, and Daud, 1979)

เนื่องจากแบคทีเรียชอบเค็มมีความสามารถในการทนเกลือมากกว่าจุลินทรีย์กลุ่มอื่น ๆ แบคทีเรียชอบเค็มกลุ่มนี้จึงมีบทบาทสำคัญในน้ำปลา ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีนและการสร้างสารให้กลิ่นรสที่เป็นลักษณะเฉพาะตัว (Raksakulthai and Haard, 1992; Beddows et al., 1979) Sasithi, Kasemasarn, Liston, and Dollar (1966) ได้คัดแยก *Bacillus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* และ *Coryneform* จากน้ำปลาและแบคทีเรียเหล่านี้ซึ่งจัดเป็นกลุ่ม

ชอบเกลือและสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นเกลือสูงประมาณ 20% ที่พีเอช 6.5-7.5 นอกจากนี้มีแบคทีเรียบางสายพันธุ์ ซึ่งพบในน้ำปลาเป็นแบคทีเรียที่ติดมากับเกลือสมุทรที่ใช้ในกระบวนการหมักน้ำปลา Nawong (2006) ได้แยกแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำปลาที่หมักในเดือน 1, 3, 5, 7, 9 และ 12 จากตัวอย่างน้ำคาวปลาและเกลือสมุทร ซึ่งพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้สามารถเจริญในสภาวะที่มีเกลือเข้มข้นสูงถึง 25% นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นก้ำเชื้อเพื่อเร่งกระบวนการหมักของน้ำปลา ได้แก่ *Staphylococcus*, *Virgibacillus*, *Brevibacterium*, *Halomonas*, *Coronebacterium* และ *Bacillus* ในกระบวนการผลิตน้ำปลายังพบแบคทีเรียกลุ่มที่ชอบเค็มปานกลาง กลุ่มชอบเค็มสูง และแบคทีเรียกรดแล็กติก ซึ่งแบคทีเรียพวกชอบเค็มปานกลาง ได้แก่ *B. vietnamensis* sp. nov. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้างเอนโดสปอร์ ชอบเกลือปานกลาง เจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือเข้มข้น 15% แต่เจริญได้ดีในสภาวะที่มีเกลือเข้มข้น 1% และพีเอช 6.5-10 (Noguchi et al., 2004) *Filobacillus* sp. RF 2-5 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำปลา ชอบเกลือปานกลาง สร้างโปรติเอสที่มีเสถียรภาพที่มีเกลือเข้มข้นสูง 25% (Hiraga et al., 2005) *Halobacillus* sp. SR5-3 ผลิตโปรติเอสที่มีเสถียรภาพที่เกลือเข้มข้น 20-35% (Namwong et al., 2006) *Virgibacillus* sp. SK33 และ SK37 เป็นแบคทีเรียชอบเกลือปานกลาง ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างน้ำปลาของไทยที่หมักได้ 1 เดือน เจริญได้ที่พีเอชค่อนข้างกว้างในช่วง 4-11 ที่อุณหภูมิ 20-45 องศาเซลเซียส และในสภาวะที่มีเกลือเข้มข้น 0-25% อีกทั้งยังมีศักยภาพในการผลิตโปรติเอสที่หลั่งออกมานอกเซลล์ (Extracellular proteases) ซึ่งโปรติเอสที่ผลิตได้นั้นถูกกระตุ้นการทำงานโดยเกลือที่ความเข้มข้นค่อนข้างสูง 20-30% นอกจากนี้โปรติเอสมีเสถียรภาพในเกลือที่มีความเข้มข้น 0-30% (Sinsuwan et al., 2007, 2008a, 2010a, 2010b; Phrommao et al., 2011) *B. licheniformis* RKK04 คัดแยกจากน้ำปลา เป็นแบคทีเรียที่ผลิตโปรติเอสซึ่งมีคุณสมบัติทนความร้อนสูงและมีเสถียรภาพในเกลือที่มีความเข้มข้นสูง 30% (Toyokawa et al., 2010)

แบคทีเรียกลุ่มชอบเค็มสูงที่แยกได้จากน้ำปลา ได้แก่ *Halobacterium salinarum* เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำปลาที่มีความเข้มข้นเกลือ 4.4-5.1 โมลาร์ ซึ่ง *Halobacterium salinarum* สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยหลั่งออกมานอกเซลล์ ซึ่งมีคุณสมบัติในการทนเกลือสูง (Thongthai, McGenity, Suntainalert, and Grant, 1992) และ *Halobacterium* sp. SP1 (1) ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบเค็มสูง (Akolkar, Durai, and Desai, 2010) ดังนั้นจึงสามารถเจริญและผลิตโปรติเอสที่ระดับความเข้มข้นของเกลือค่อนข้างสูงโดยประมาณ 25% ด้วยเหตุนี้ *Halobacterium* sp. SP1(1) สามารถใช้เป็นก้ำเชื้อเพื่อเร่งกระบวนการหมักน้ำปลา เมื่อนำแบคทีเรีย *Halobacterium* sp. SP1 (1) มาเป็นก้ำเชื้อในการหมักน้ำปลา พบว่าปริมาณเพปไทด์และแอลฟาอะมิโนมีค่าสูงในวันที่ 10 ของการหมัก (Akolkar et al., 2010) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรียกรดแล็กติกที่แยกได้จากน้ำปลา ได้แก่ *T. halophilus* และแบคทีเรีย *Staphylococcus saprophyticus* และ



รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการผลิตน้ำปลา

ที่มา : Lopetcharat et al. (2001)

Micrococcus varians ซึ่งยังไม่มีการศึกษาในรายละเอียดของแบคทีเรียกลุ่มนี้ (Steinkraus, 1989) ต่อมา Udomsil, Rodtong, Tanasupawat, and Yongsawadigul (2010) รายงานเกี่ยวกับแบคทีเรีย *T. halophilus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เจริญได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือในช่วง 0-25% ที่พีเอช 4.5-9.0 และพบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกนี้มีบทบาทในการผลิตสารระเหยที่หักกลิ่นในน้ำปลา

2.2 แบคทีเรียชอบเค็ม

แบคทีเรียชอบเค็ม สามารถจัดจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามความเข้มข้นของเกลือที่เจริญได้ดีที่สุด ได้แก่ แบคทีเรียชอบเค็มสูง (Extremely halophilic bacteria) และแบคทีเรียที่ชอบเค็มปานกลาง (Moderate halophilic bacteria) (Holt, Krieg, Sneath, Staley, and Williams, 1994; Ventosa and Nieto, 1995; Ventosa, Nieto, and Oren, 1998) แต่ Kushner (1993) ได้จัดจำแนกแบคทีเรียชอบเค็มตามการเจริญหรือการตอบสนองในสภาวะที่มีเกลือออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ 1) กลุ่มไม่ชอบเกลือ (Non-halophiles) ซึ่งเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารที่มีเกลือต่ำกว่า 1% ซึ่งบางทีแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถทนหรือเจริญได้ในเกลือสูงกว่า 1% 2) กลุ่มชอบเกลือเล็กน้อย (Slight halophile) แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญได้ดีในอาหารที่มีเกลือ 1-3% 3) กลุ่มชอบเกลือปานกลาง (Moderate halophile) แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญได้ดีในอาหารที่มีเกลือ 3-15% 4) กลุ่มชอบเกลือค่อนข้างสูง (Borderline extremely halophile) แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญได้ดีในอาหารที่มีเกลือ 9-25% และ 5) กลุ่มแบคทีเรียชอบเกลือสูง (Extremely halophile) แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญได้ดีในอาหารที่มีเกลือ 15-32% ซึ่งแบคทีเรียชอบเค็มสูงนี้ถูกค้นพบตั้งแต่ปี ค.ศ. 1980 เนื่องจากเกิดพื้นที่ที่มีสีแดงเป็นบริเวณกว้าง ณ บริเวณที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงเนื่องจากการระเหยของน้ำ โดยพบในทะเลสาบ Great salt lake มลรัฐ Utah ประเทศสหรัฐอเมริกา ทะเลสาบ Dead sea ประเทศจอร์แดน ทะเลสาบ Wadi natrun ประเทศอียิปต์ และทะเลสาบ Magadi ประเทศเคนยา และยังสามารถพบแบคทีเรียที่สร้างสารสีแดงในปลาและเครื่องหนัง (Oren, 2003) แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีความเข้มข้นอย่างน้อย 15% จนถึงอิ่มตัว (Saturated NaCl) และความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญคือประมาณ 20-25% แต่ไม่สามารถเจริญในสิ่งแวดล้อมที่ไม่มีเกลือ แบคทีเรียกลุ่มนี้มีทั้งรูปร่างกลม แท่ง และไม่แน่นอน แบคทีเรียชอบเค็มสูงสามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลา (Flagella) และไม่เคลื่อนที่ พบทั้งกลุ่มที่มีรูปร่างเซลล์เป็นท่อน (Rods) ดิคส์แกรมลบ เซลล์อาจเปลี่ยนเป็นลักษณะกลม และกลุ่มที่มีรูปร่างเซลล์กลมจะข้อมติคส์ทั้งแกรมลบและแกรมบวก (Variable) ลักษณะโคโลนิของแบคทีเรียชอบเค็มสูงมีสีแดงเนื่องจากการสร้างสารแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายจากแสงแดด จึงมักพบแบคทีเรียชอบเค็มสูงในบริเวณที่

มีแสงแดด โดยแสงแดดจะทำให้เกิดการระเหยของน้ำทำให้ความเข้มข้นของเกลือเพิ่มสูงมากจนเกือบอิ่มตัว ในบางครั้งมีการสร้างแวคิวโอลซึ่งสามารถทำหน้าที่เก็บสะสมแก๊ส (Gas vacuoles) ทำให้โคโลนิไม่มีสีชมพูหรือสีขาว (Oren, 2003)

รายงานการศึกษาลักษณะทางกายภาพและนิเวศวิทยาของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง ยังมีไม่มากเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียชอบเค็มสูง อีกทั้งแบคทีเรียกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เจริญในสภาพแวดล้อมที่มีเกลือ เช่น อาหารที่ดองเค็ม (Salted food) ทะเลสาบน้ำเค็ม (Hypersaline lakes) (Carrasco, Marquez and Ventosa, 2009) นาเกลือ (Salterns) (Wang, Chang, Ng, Chen, and Shyn, 2008) ดินเค็ม (Hypersaline soils) (Chen et al., 2009) น้ำทะเล (Sea water) (Peng et al., 2009) ส่งผลให้แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสามารถเจริญได้ในช่วงความเข้มข้นของเกลือที่กว้าง ประมาณ 3-30% และความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 3-15% นอกจากนี้แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางจะไม่สามารถเจริญในสภาพแวดล้อมที่ไม่มีเกลือ เช่นเดียวกับแบคทีเรียชอบเค็มสูง และยังพบว่าเซลล์จะหดสั้นหรือมีขนาดเล็กลงที่ความเข้มข้นของเกลือต่ำ (Oren, 2003)

2.3 โปรติเอส (Protease)

โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีน ซึ่งสามารถจำแนกประเภทตามตำแหน่งของพันธะเพปไทด์ที่ย่อยสลายได้เป็น 2 ประเภท คือ เอนโดโปรติเอส (Endoprotease) และเอกโซโปรติเอส (Exoprotease) โดยเอนโดโปรติเอสนั้นจะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเพปไทด์ที่อยู่ภายในสายโปรตีนทำให้เกิดเพปไทด์สายสั้น (Oligopeptide) ในขณะที่เอกโซโปรติเอสจะสลายพันธะเพปไทด์ที่อยู่ด้านนอกของสายโปรตีนได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะมิโน (Rawlings and Barrett, 1992) โปรติเอสสามารถจำแนกออกเป็น 4 ประเภท ตามชนิดของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งปฏิกิริยา (Active site) ได้เป็นซีรีน (Serine) ซิสตีอีน (Cysteine) แอสพาติก (Aspartic) และเมทัลโล (Metallo) โปรติเอส (Hartley, 1960) เอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินหรือโปรติเอสที่สามารถย่อยสลายไฟบรินโดยส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มซีรีนและเมทัลโลโปรติเอส ซึ่งซีรีนโปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีซีรีน (Ser) ตรงบริเวณเร่งปฏิกิริยา มีการตัดพันธะเพปไทด์แบบเอนโดเพปติเอสโดย Catalytic triad ประกอบด้วยซีรีน (Serine) ฮิสติดีน (Histidine) และ แอสพาเตท (Aspartate) นอกจากนี้ซีรีนโปรติเอส สามารถถูกยับยั้งโดย 3,4-Dichloro isocoumarin (3,4-DCI), L-3-Carboxytrans-2,3-epoxypropyl-leucylamido (4-guanidine) (E64), Diisopropylfluoro phosphate (DFP), Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) และ Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) นอกจากนี้ ซีรีนโปรติเอสยังสามารถจำแนกออกเป็น 4 กลุ่มย่อย ตามตำแหน่งการตัดพันธะบนสายพอลิเพปไทด์ ได้เป็นโปรติเอสกลุ่มซีรีนทำหน้าที่คล้ายทริปซิน (Trypsin-like serine protease)

หรือ พลาสมิน (Plasmin-like serine protease) โปรติเอสกลุ่มซีรีนที่ทำหน้าที่คล้ายเอนไซม์ไคโม-
 ทริปซิน (Chymotrypsin-like protease) หรือซบติลิสิน (Subtilisin-like serine protease) โปรติเอสที่
 ทำหน้าที่คล้ายอีลาสเตส (Elastase-like protease) และเมทัลโลโปรติเอส (Serine metalloprotease)
 (Moriyama, 1974)

โปรติเอสกลุ่มซีรีนที่ทำหน้าที่คล้ายกับพลาสมิน (Plasmin-like serine proteases) หรือคล้าย
 ทริปซิน (Trypsin-like serine protease) สามารถตัดพันธะเพปไทด์ตรงตำแหน่งที่หมู่คาร์บอกซิล
 ของพันธะเพปไทด์ที่มีโซ่ข้าง (Side chain) เป็นประจุบวก (Positive charge) เช่น ไลซีน (Lys) และ
 อาร์จินีน (Arg) แต่โปรติเอสที่ทำหน้าที่คล้ายกับทริปซินสามารถตัดพันธะเพปไทด์ตรงตำแหน่ง
 ของกรดอะมิโนอาร์จินีนได้สูงกว่าไลซีน (Craik et al, 1985) ในขณะที่โปรติเอสที่ทำหน้าที่คล้าย
 กับพลาสมินนั้นสามารถตัดพันธะเพปไทด์ตรงตำแหน่งของกรดอะมิโนไลซีนได้สูงกว่าอาร์จินีน ส่วน
 โปรติเอสกลุ่มที่ทำหน้าที่คล้ายไคโมทริปซิน (Chymotrypsin-like protease) หรือซบติลิสิน
 (Subtilisin-like protease) สามารถตัดพันธะเพปไทด์ที่มีโซ่ข้างเป็นกลุ่มอะโรมาติก (Aromatic
 group) หรือกลุ่มไม่มีขั้ว (Hydrophobic group) เช่น ไทโรซีน (Tyr) ฟีนิลอะลานีน (Phe) และลิวซีน
 (Leu) สำหรับโปรติเอสซีรีนที่ทำหน้าที่คล้ายอีลาสเตส (Elastase-like protease) มีความจำเพาะต่อ
 เพปไทด์ที่หมู่คาร์บอกซิลเป็นกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างเป็นพวกอะลิฟาติก (Aliphatic group) เช่น
 อะลานีน (Ala) และโปรติเอสกลุ่มซีรีนเมทัลโลโปรติเอส (Serine metalloproteases) เป็นโปรติเอส
 ที่ลักษณะจำเพาะคือต้องการโลหะที่มีประจุบวก 2 ประจุ (Divalent metal ions) ในการเร่งปฏิกิริยา

นอกจากนี้สามารถแบ่งประเภทของโปรติเอสตามค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา ได้
 เป็นโปรติเอสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาในสภาวะที่เป็นกรด (Acid protease) กลาง (Neutral protease)
 และด่าง (Alkaline protease) ซึ่งโปรติเอสจากแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส โดยส่วนใหญ่จำแนกออกเป็น
 2 กลุ่มหลัก ๆ คือ โปรติเอสที่แสดงกิจกรรมในสภาวะที่เป็นกลางและโปรติเอสที่แสดงกิจกรรมใน
 สภาวะที่เป็นด่าง (Godfrey and West, 1996) ซึ่งโปรติเอสที่แสดงกิจกรรมในสภาวะที่เป็นกลาง
 (Neutral protease) แสดงกิจกรรมได้ในช่วงพีเอชที่แคบ โดยมีช่วงพีเอช 5.0-8.0 สามารถทนความ
 ร้อนได้ดีส่งผลให้อัตราการเร่งปฏิกิริยาค่า และโปรติเอสกลุ่มนี้มีลักษณะที่สำคัญคือมีความจำเพาะ
 เจาะจงต่อกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว (Hydrophobic amino acid) ด้วยคุณสมบัติในการทนต่อความร้อนที่
 ต่ำของโปรติเอสกลุ่มนี้จึงสามารถใช้เพื่อควบคุมระดับการย่อยของโปรตีน (Degree of hydrolysis)
 ซึ่งสามารถทำการปรับอุณหภูมิให้สูงเพื่อชะลอหรือหยุดการเกิดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ (Godfrey and
 West, 1996) นอกจากนี้โปรติเอสที่แสดงกิจกรรมในสภาวะที่เป็นกลางบางชนิดเป็นเมทัลโลโปร-
 ตีเอส (Metalloprotease) ซึ่งมีความต้องการโลหะในการเร่งปฏิกิริยา ได้แก่ *B. licheniformis* BBRC
 100053 ผลิตโปรติเอสที่เร่งกิจกรรมที่พีเอช 8 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีความเสถียรในช่วง
 พีเอช 7-11 จัดอยู่ในกลุ่มเมทัลโลโปรติเอส (Nejad, Yanghmaei, and Hosseini, 2010) ในขณะที่

โปรติเอสที่แสดงกิจกรรมในสถานะที่เป็นกลางส่วนใหญ่จัดเป็นซีรีนโปรติเอส (Serine protease) ซึ่งโลหะไม่มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยา (Rao et al., 1998) ได้แก่ *B. subtilis* JB1 ผลิตเอนไซม์ที่หลังออกมานอกเซลล์ พีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งกิจกรรมคือที่ 7.5 และมีความเสถียรที่พีเอช 4-8 (Sung et al., 2010) *B. laterosporus* ผลิตโปรติเอสที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 7 (Usharani and Muthuraj, 2010)

โปรติเอสที่แสดงกิจกรรมที่มีค่าพีเอชที่เป็นด่าง (Alkaline protease) แสดงกิจกรรมได้สูงในช่วงพีเอช 8.1-12.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการแสดงกิจกรรมของโปรติเอสกลุ่มนี้คือประมาณ 50-80 องศาเซลเซียส และมีความจำเพาะเจาะจงกับสารตั้งต้นที่หลากหลาย ด้วยเหตุนี้ทำให้โปรติเอสกลุ่มนี้เหมาะสำหรับอุตสาหกรรมสารชำระล้าง (Detergent) (Roa et al., 1998; Maurer, 2004) เช่น *Bacillus* sp. B001 ผลิตเอนไซม์ที่มีค่ากิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนสูง เอนไซม์แสดงกิจกรรมได้สูงที่พีเอช 10 และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ คือ 60 องศาเซลเซียส (Deng et al., 2010) *Bacillus* sp. Y ผลิตเอนไซม์ที่แสดงกิจกรรมได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และพีเอช 12 ซึ่งเอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมเหลืออยู่ถึง 60% ที่พีเอช 12 เป็นเวลา 5 ชั่วโมง (Mala and Srividya, 2010) *Bacillus* sp. PN51 พบในอุจจาระค้างคาวเชื่อดังกล่าวมีศักยภาพในการผลิตโปรติเอสสูง และเอนไซม์แสดงกิจกรรมได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 10 จัดเป็นซีรีนโปรติเอส (Tanskul et al., 2009) *B. mojavensis* A21 ผลิตซีรีนโปรติเอส ซึ่งแสดงกิจกรรมได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมคือที่ 8.5 และเสถียรในช่วงพีเอช 7-12 (Haddar, Bougatef, Agrebi, Sellami-Kamoun, and Nasri, 2009) *B. laterosporus* AK1 ผลิตซีรีนโปรติเอสแสดงกิจกรรมได้ดีที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส และที่พีเอช 9 เอนไซม์มีเสถียรภาพที่อุณหภูมิสูง (Arulmani et al., 2007) *B. megaterium* ผลิตซีรีนโปรติเอส อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการแสดงกิจกรรมที่ 50 องศาเซลเซียส และพีเอช 10 นอกจากนี้ยังมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิ 30-45 องศาเซลเซียส และช่วงพีเอช 7.5-9.5 (Yossan, Reungsang, and Yasuda, 2006) นอกจากนี้ *B. clausii* GMBAE 42 ผลิตซีรีนโปรติเอส ซึ่งแสดงกิจกรรมได้สูงที่ 50 องศาเซลเซียส และพีเอช 11.3 (Kazan et al., 2005)

2.4 คุณสมบัติทางชีวเคมีของโปรติเอสจากแบคทีเรียชอบเกลือ

Halobacterium salinarium เป็นแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสซึ่งแสดงกิจกรรมได้ดีที่พีเอช 8 และมีความเสถียรที่เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% (Norberg and Hofsten, 1969) โปรติเอสจากแบคทีเรียชอบเกลือปานกลาง *Bacillus* sp. ซึ่งคัดแยกได้จากเกลือสมุทรที่ยังไม่มีการฟอกขาว ผลิตโปรติเอสที่แสดงกิจกรรมที่เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5

โมลาร์ (Kamekura and Onishi, 1974) อาร์เคียบคที่เรียสายพันธุ์ 172 P1 ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำทะเล สามารถผลิตซีรีน โปรติเอสซึ่งแสดงกิจกรรมได้สูงที่เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25-30% และเอนไซม์มีเสถียรภาพที่เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% และแสดงกิจกรรมได้ดีที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมต่อการแสดงกิจกรรมคือพีเอช 10.7 และเอนไซม์มีเสถียรภาพที่พีเอช 6.0-7.0 (Kamekura and Seno, 1990)

ยังมีรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่ชอบเกลือปานกลาง ที่คัดแยกได้จากน้ำเกลือและดินเค็ม โดย Sanchez-Porro, Mellado, Bertoldo, Antranikian, and Ventosa (2003) ได้คัดแยกแบคทีเรียชอบเกลือปานกลางที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งหลั่งออกนอกเซลล์ได้สูงที่สุดจากทั้งหมด 26 ไอโซเลท และระบุว่าเป็นแบคทีเรีย *Pseudoalteromonas* sp. CP76 เมื่อทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์แสดงกิจกรรมสูงที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 8.5 และมีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 7% ตลอดจนมีเสถียรภาพในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-4 โมลาร์ และพีเอช 6-10 มีขนาดโมเลกุล 38 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Karbalaee-Heidari, Ziaee, and Schaller (2007a) และ Karbalaee-Heidaria, Ziaee, Schallerb, and Amoozegar (2007b) ได้ทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีของเอนไซม์ที่หลั่งออกจากเซลล์ของ *Salinivibrio* sp. AF2004 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีขนาดโมเลกุล 31 กิโลดาลตัน ซึ่งเอนไซม์แสดงกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 และ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 8.5 และเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-0.5 โมลาร์ ยิ่งไปกว่านั้น เอนไซม์สามารถแสดงกิจกรรมได้ที่เกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 0-4 โมลาร์ เอนไซม์มีเสถียรภาพที่พีเอช 5.0-10.0 จัดอยู่ในกลุ่มเมทัลโลโปรติเอส (Metalloprotease) นอกจากนี้ยังมีเสถียรภาพในตัวทำละลายอินทรีย์ (Organic solvent) หรือ แอลกอฮอล์ จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นคุณสมบัติโดดเด่นของโปรติเอสจากแบคทีเรียชอบเกลือ *Salinivibrio* sp. AF2004 ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระบบที่มีสารละลายอินทรีย์ Dodia et al. (2008) รายงานเกี่ยวกับโปรติเอสที่ผลิตโดยแบคทีเรียชอบเกลือและด่าง Halophilic bacterium sp. AH-6 ซึ่งผลิตเอนไซม์มีขนาด 40 กิโลดาลตัน สามารถเร่งกิจกรรมในเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ และมีเสถียรภาพสูงในช่วงพีเอชที่เป็นด่างคือ 8-13 และมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการแสดงกิจกรรมที่ 9-11 มีเสถียรภาพในช่วงของเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-4 โมลาร์ Karbalaee-Heidaria, Amoozegar, Hajighasemi, Ziaee, and Ventosa (2009) ทำบริสุทธิ์เอนไซม์จาก *Halobacillus karajensis* MA-2 ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง โดยเอนไซม์แสดงกิจกรรมได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 9 ที่ระดับเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ อีกทั้งยังพบว่าเอนไซม์ยังคงแสดงกิจกรรมได้ในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 3 โมลาร์ และพีเอชที่เหมาะสมต่อการแสดงกิจกรรมอยู่ในช่วงพีเอช 5-12 เอนไซม์จัดเป็นซีรีนเมทัลโลโปรติเอส (Serine metalloprotease) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับโปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียชอบเกลือที่

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของโปรตีนเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่มซอบเกลื้อ

| Bacteria | MW (kDa) | | Optimum condition | | Stability | | Type | References |
|---|----------|--------|-------------------|-------|-------------|------|---------------------------|--------------------------|
| | SDS- | Native | Temperature | pH | Temperature | pH | | |
| | PAGE | PAGE | (°C) | | (°C) | | | |
| <i>B. licheniformis</i> BA17 | 19.7 | 45 | 60 | 10 | <40 | 8-10 | Serine protease | Osturk et al. (2009) |
| <i>B. licheniformis</i> BBRC 100053 | NA | NA | 45 | 8 | <50 | 7-11 | Serine protease | Nejad et al. (2010) |
| <i>B. licheniformis</i> RKK04 | 31 | NA | 50 | 10 | <50 | 8-10 | Serine protease | Toyokawa et al. (2010) |
| <i>B. subtilis</i> CN2 | 28 | NA | 50 | 10 | <60 | 7-11 | Serine protease | Uchida et al. (2004) |
| <i>Chromohalobacter</i> sp. TVSP101 | 66 | NA | 75 | 8 | <80 | 7-10 | Serine metalloprotease | Vidyasagar et al. (2009) |
| <i>Filobacillus</i> sp. RF2-5 | 49 | NA | 60 | 10-11 | <50 | 5-10 | Serine protease | Hiraka et al. (2005) |
| Halophilic archaeobacterium strain I72 P1 | 44-46 | NA | 75-80 | 10.7 | <80 | 6-7 | Serine protease | Kamekura and Seno (1990) |
| Halalkaliphilic bacterium sp. AH-6 | 40 | 40 | 50 | 9-11 | <50 | 8-13 | Serine protease | Dodia et al. (2008) |
| <i>Halobacillus</i> sp. SR5-3 | 43 | NA | 50 | 10 | <50 | 5-8 | Serine protease | Namwong et al. (2006) |

หมายเหตุ NA หมายถึง Not available

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางชีวเคมีของโปรตีนเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่มชออบเกลือ (ต่อ)

| Bacteria | MW (kDa) | | Optimum condition | | Stability | Type | References |
|--|-------------------|-------------|-------------------|-----|----------------|------------------------|--|
| | SDS-PAGE | Native PAGE | Temperature (°C) | pH | | | |
| <i>Halobacillus karajensis</i> MA-2 | 36 | NA | 50 | 9 | <60 5-12 | Serine metalloprotease | Karbalaei-Heidari et al. (2009) |
| <i>Pseudoalteromonas</i> sp. CP76 | 38 | NA | 55 | 8.5 | <55 6-10 | Metalloprotease | Sanchez-Porro et al. (2003) |
| <i>Salinivibrio</i> sp. AF 2004 | 31 | 29 | 60 | 8.5 | <70 5-10 | Metalloprotease | Karbalaei-Heidari et al. (2007); (2007b) |
| <i>Salinivibrio costicola</i> | 38 | 38 | 60 | 8 | <60 NA | Serine protease | Lama et al. (2005) |
| <i>Virgibacillus marismortui</i> | 17,19, 24, 29, 35 | NA | 30 | 9 | NA NA | Serine protease | Chamroensaksri et al. (2007) |
| <i>Virgibacillus</i> sp. SK33 | 19 | 43 | 55 | 7.5 | <60 6.5-8.5 | Serine protease | Sinsuwan et al. (2010a) |
| <i>Virgibacillus</i> sp. SK33 | 32 | 92 | 55 | 7.5 | <60 5-10 | Serine protease | Sinsuwan et al. (2010b) |
| <i>Virgibacillus</i> sp. SK37 | 19, 34, 44 | NA | 55-60 | 8 | <50 5.5-11 | Serine protease | Phrommao et al. (2011) |

หมายเหตุ NA หมายถึง Not available

คัดแยกได้จากอาหาร โดยรายงานของ Kim, Kim, Kim, Choi, and Kong (2009) พบโปรตีนเอสที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. SJ-10 คัดแยกได้จากปลาหมึกหมักแบบเกาหลี (Squid jetogal) โปรตีนเอสที่ผลิตได้ทนเกลือสูงและมีเสถียรภาพที่พีเอช 5.0-10.0 และสภาวะที่เหมาะสมต่อการแสดงกิจกรรมของเอนไซม์คือ พีเอช 8.0 ที่อุณหภูมิ 35 ± 5 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการแสดงกิจกรรมของเอนไซม์คือ 5% Vidyasagar, Prakash, Mahajan, Shouche, and Sreeramulu (2009) พบว่า *Chromohalobacter* sp. TVSP101 ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบเกลือสูงผลิตเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติทนความร้อนและทนด่างสูง เนื่องจากอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการแสดงกิจกรรมคือ 75 องศาเซลเซียส และพีเอช 8 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังแสดงกิจกรรมสูงที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส และมีเสถียรภาพในช่วงสภาวะที่เป็นด่างพีเอช 7-10 ยิ่งไปกว่านั้นเอนไซม์จาก *Chromohalobacter* sp. TVSP101 ยังแสดงกิจกรรมได้ดีและมีเสถียรภาพที่ความเข้มข้นเกลือสูง 4.5 โมลาร์

คุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียชอบเกลือสูงรูปได้ดังตารางที่ 2.1 ซึ่งโดยทั่วไปโปรตีนเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียชอบเกลืออื่นจัดเป็นซีรีนโปรตีนเอส เอนไซม์กลุ่มนี้แสดงกิจกรรมได้ดีในสภาวะด่าง (pH 8-11) มีขนาดอยู่ในช่วง 19-50 กิโลดาลตัน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการแสดงกิจกรรมคือ 30-60 องศาเซลเซียส มีเสถียรภาพในช่วงอุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส และช่วงพีเอช 5-13

2.5 แบคทีเรียชอบเกลือปานกลาง *Virgibacillus* และโปรตีนเอสจาก *Virgibacillus*

Hendrickx et al. (1998) เป็นผู้ให้ชื่อสกุลของแบคทีเรีย *Virgibacillus* ในซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ชอบเกลือปานกลาง สามารถสร้างเอนโดสปอร์ (Endospores) และให้ผลทดสอบบวกในปฏิกิริยา Catalase และ Oxidase เป็นแบคทีเรียที่สามารถเคลื่อนที่ได้ (Motile) รูปร่างเซลล์เป็นท่อน เจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน (Aerobic condition) สามารถเจริญได้ในช่วงพีเอชกว้างคือ 4-11 ที่อุณหภูมิ 20-45 องศาเซลเซียส และสภาวะที่มีเกลือเข้มข้น 0-25% พบได้ในดินเค็ม (Saline soil) น้ำทะเล (Sea water) นาเกลือ (Saltern) ทะเลสาบน้ำเค็ม (Saline lake) (Chen et al., 2009; Peng et al., 2009; Wang et al., 2008; Carrasco et al., 2009) นอกจากนี้ยังพบได้ในอาหารหมัก เช่น น้ำปลา (Nawong, 2006) และปลาข้าว (Chamroensaksri, Akaracharanya, Visessanguan, and Tanasupawat, 2008) มีรายงานที่แสดงถึงความสามารถในการผลิตโปรตีนเอสของ *Virgibacillus* sp. โดย Nawong (2006) พบ *Virgibacillus* sp. SK33 และ SK37 สามารถผลิตเอนไซม์ทั้งที่ตรึงอยู่กับเซลล์และที่หลั่งออกนอกเซลล์ ซึ่งสามารถย่อยปลากระดักและเคซีนได้ดี

และเชื่อด้งกล่าวสามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโปรตีนจากปลากระดูกเป็นองค์ประกอบสำคัญ และมีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% ดังนั้นผลที่ได้จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มในการใช้ประโยชน์แบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ เพื่อเร่งกระบวนการหมักน้ำปลา ต่อมา Sinsuwan et al. (2007, 2008a, 2008b, 2010a, 2010b) ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ที่หลั่งออกนอกเซลล์และที่ตรึงอยู่กับเซลล์จาก *Virgibacillus* sp. SK37 และเอนไซม์ที่หลั่งออกนอกเซลล์จาก *Virgibacillus* sp. SK33 อีกทั้ง Phrommao et al. (2011) ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ที่หลั่งออกนอกเซลล์จาก *Virgibacillus* sp. SK37 จากรายงานดังกล่าวพบว่าโปรติเอสจาก *Virgibacillus* sp. นั้นถูกกระตุ้นกิจกรรมที่ระดับความเข้มข้นของเกลือค่อนข้างสูงคือ 20-30% นอกจากนี้โปรติเอสมีความเสถียรในเกลือที่มีความเข้มข้นสูง 0-30% (ตารางที่ 2.2) เอนไซม์จัดอยู่ในกลุ่มโปรติเอส

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติทางชีวเคมีของโปรติเอสจาก *Virgibacillus* ที่คัดแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ

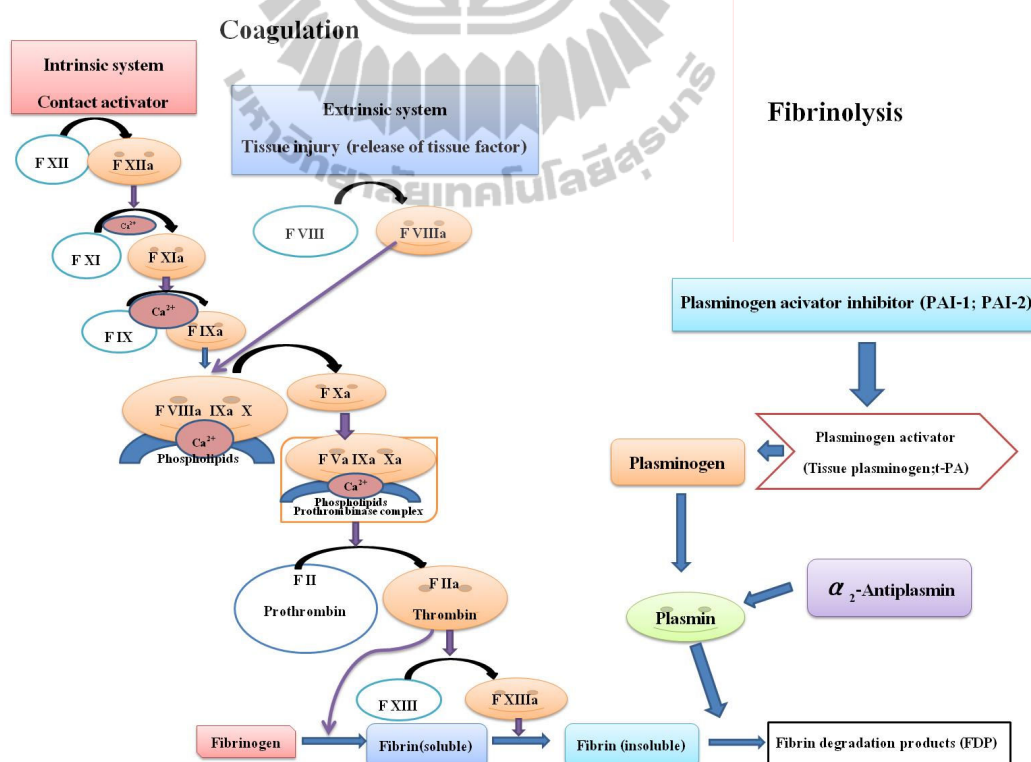
| Bacteria | Characteristic | Source | Reference |
|--|---|---------------------------|---|
| <i>Virgibacillus</i> sp. SK33 | Extracellular proteases showing activity and stability at high NaCl concentration (25%) Extracellular protease showing high stability in various organic solvents (25%, v/v) | Thai fish sauce | Sinsuwan et al. (2010a, 2010b) |
| <i>Virgibacillus</i> sp. SK37 | Extracellular proteases showed activity and stability at high NaCl concentration (20-30%) | Thai fish sauce | Phrommao et al. (2011); Sinsuwan et al. (2007) |
| <i>Virgibacillus marismortui</i> (NB2-1) | Extracellular proteases showing activity at 5% NaCl | Pla-ra | Chamroensaksri et al. (2008) |
| <i>Virgibacillus pantothenicus</i> | Thermostable alkaline protease | Fresh chicken meat sample | Gupta et al. (2008) |

ที่คล้ายซบพิลลิซิน (Subtilisin-like protease) ยิ่งไปกว่านั้น Yongsawatdigul, Rodtong, and Raksakulthai (2007) สามารถนำ *Virgibacillus* มาประยุกต์และพัฒนาเป็นกล้าเชื้อสำหรับกระบวนการหมักน้ำปลาเพื่อลดระยะเวลาการหมักให้สั้นลงจาก 12 เดือน เป็น 4 เดือน ได้สำเร็จ อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่ามีรายงานเกี่ยวกับโปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียชอบเกลื้อปานกลางอยู่มากมาย แต่มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาคุณสมบัติของโปรติเอสที่ผลิตจาก *Virgibacillus* น้อยมาก นอกจากนี้มีรายงาน *Virgibacillus pantothenicus* ซึ่งหลั่งโปรติเอสออกนอกเซลล์ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มซีรีนโปรติเอส มีคุณสมบัติทนร้อนและทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง (ตารางที่ 2.2) ซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างเนื้อไก่สดโดยเอนไซม์แสดงกิจกรรมได้สูงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และพีเอช 10 เอนไซม์มีเสถียรภาพที่ 50 องศาเซลเซียส และพีเอช 10 อีกทั้งพบว่าเอนไซม์มีการสูญเสียกิจกรรมเล็กน้อยเมื่ออยู่ในสภาวะด่างที่พีเอช 10 โดยมีค่ากิจกรรมเหลืออยู่ 85% และไม่มีการสูญเสียกิจกรรมเลยที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Gupta, Joseph, Mani, and Thomas, 2008) นอกจากนี้ Chamroensaksri et al. (2008) รายงานเกี่ยวกับเอนไซม์ที่หลั่งออกมาจากเซลล์จาก *Virgibacillus marismortui* (NB2-1) ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบเกลื้อปานกลางและคัดแยกจากปลาร้าว่ามีสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรติเอสที่ไซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 15% พีเอช 9 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กิจกรรมของโปรติเอสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ถูกกระตุ้นด้วยไซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5% (ตารางที่ 2.2) ที่พีเอช 10 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ดังนั้นจะเห็นได้ว่าโปรติเอสจาก *Virgibacillus* มีศักยภาพในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่มีเกลือสูง เนื่องจากมีความเสถียรต่อเกลือที่มีความเข้มข้นสูง

2.6 กลไกการแข็งตัวของเลือดและการสลายลิ่มเลือด

การแข็งตัวของเลือด (Blood coagulation) เป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่สำคัญของร่างกาย เพื่อให้เลือดแข็งตัวและปิดบาดแผลที่เกิดขึ้น ทั้งนี้ต้องอาศัยความสมดุลระหว่าง 2 กระบวนการ คือ กระบวนการแข็งเป็นลิ่มเลือด (Blood clotting) และกระบวนการสลายลิ่มเลือด (Blood clot dissolution หรือ Fibrinolysis) ซึ่งกลไกการห้ามเลือดเกิดขึ้นเมื่อหลอดเลือดเกิดบาดแผล เกล็ดเลือด (Platelet) จะมีการตอบสนองโดยเกาะติดกับคอลลาเจน (Collagen) ที่อยู่ชั้นในของเยื่อบุผิวของผนังหลอดเลือด (Subendothelial layer) จากนั้นกรานูลในเกล็ดเลือดจะหลั่งสารเคมี ได้แก่ Adenosine diphosphate (ADP), Thromboxane A2 (TXA2) และ Serotonin สารเคมีที่หลั่งออกมานี้จะไปกระตุ้นให้เกล็ดเลือดที่อยู่ข้างเคียงหลั่งสารออกมาเช่นกัน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเอง (Autolytic reaction) ซึ่งสารเคมีที่ปล่อยออกมาทำให้ผนังของเกล็ดเลือดเกิดการเปลี่ยนรูปร่างมีผลทำให้เกล็ดเลือดสามารถจับกับบริเวณยึดเกาะของเกล็ดเลือด (Platelet receptor; GPIIb/IIIa) เกิด

โครงสร้างที่เรียกว่า เพลทเลทพลัก (Platelet plug) ขึ้น ซึ่งมีผลอุดแผลบริเวณที่ขาดแต่การเกิดเพลทเลทพลักเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอต่อการอุดแผลที่เกิดขึ้น จึงมีกลไกขั้นทุติยภูมิ (Secondary hemostasis) เรียกว่า การเกิดลิ่มไฟบริน (Fibrin clot) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 ซึ่งประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ Intrinsic pathway หรือที่เรียกว่า Contact factor pathway และ Extrinsic pathway โดย Intrinsic pathway จะเกิดหลังจากเชื่อบุผิวของผนังหลอดเลือด (Endothelium cell) เกิดบาดแผล โดยใช้โปรตีนในกระแสเลือด ได้แก่ Factor XII, XI, X, II และ VIII เพื่อกระตุ้นเอนไซม์ ทรอมบิน (Thrombin) ให้อยู่ในรูปที่พร้อมทำงาน (Active form) จากนั้นเอนไซม์ ทรอมบินที่ถูกกระตุ้นสามารถเปลี่ยนไฟบริโนเจน (Fibrinogen) เป็นไฟบริน (Fibrin) ส่วน Extrinsic pathway จะเกิดขึ้นเมื่ออวัยวะได้รับบาดแผลโดยมี Factor III และ Factor VII เป็นปัจจัยสำคัญ โดย Factor III หรือที่เรียกว่าทิสซุแฟกเตอร์ (Tissue factor; TF) จะถูกปล่อยออกมาแล้วรวมตัวกับโปรตีนในกระแสเลือด เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่สามารถกระตุ้นเอนไซม์ ทรอมบินให้อยู่ในรูปที่พร้อมทำงานจนได้ลิ่มไฟบริน (Fibrin clot) ซึ่งมีผลอุดแผลบริเวณที่ขาดได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Walsh and Ahmad, 2002)



รูปที่ 2.2 แผนภาพกลไกการแข็งตัวของเลือดและการสลายลิ่มเลือด
ที่มา : Walsh and Ahmad (2002)

การสลายลิ่มเลือด (Fibrinolysis) เป็นกระบวนการทางชีวเคมีในร่างกายที่สำคัญ เนื่องจากว่าเมื่อมีการสร้างไฟบรินเกิดขึ้นบริเวณของหลอดเลือดที่ได้รับบาดเจ็บ ร่างกายต้องมีการสลายลิ่มเลือดออกเพื่อรักษาสมดุลให้ระบบการไหลเวียนของเลือดเป็นปกติ และป้องกันไม่ให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน ซึ่งมีกลไกของการสลายลิ่มเลือด (Fibrinolysis) โดยสารกระตุ้นพลาสมิโนเจนเนื้อเยื่อ (Tissue plasminogen activators) กระตุ้นให้พลาสมิโนเจน (Plasminogen) เปลี่ยนเป็น (Plasmin) ซึ่งเป็นเอนไซม์โปรติเอสที่ทำหน้าที่สลายไฟบรินเมื่อเกิดการอุดตันในหลอดเลือด (Werf and Janssens, 2004) ดังแสดงในรูปที่ 2.2

2.6.1 ยาที่ใช้ในการสลายลิ่มเลือด

ในปัจจุบันมีการนำยาที่มีผลเร่งการเปลี่ยนพลาสมิโนเจนให้เป็นพลาสมินหรือที่เรียกว่า ยาสลายลิ่มเลือด (Fibrinolytic agents) มาใช้รักษาโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน เช่น โรคกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลัน โรคหัวใจขาดเลือด เป็นต้น การรักษาโรคหลอดเลือด แบ่งได้เป็น 2 แนวทาง คือ การใช้ยาต้านการแข็งตัวของเลือด หรือ ใช้ยาที่ฉีดเข้าเส้นเลือด นอกจากนี้ยาสลายลิ่มเลือดจำแนกออกเป็น 2 ประเภท คือ ยาสลายลิ่มเลือดที่ทำหน้าที่กระตุ้นพลาสมิโนเจนเป็นพลาสมิน (Plasminogen activator) ซึ่งทำหน้าที่สลายไฟบรินเมื่อเกิดการอุดตันในหลอดเลือด และยาสลายลิ่มเลือดที่มีคุณสมบัติคล้ายกับพลาสมิน (Plasmin-like protein) ซึ่งยาสลายลิ่มเลือดที่มีคุณสมบัติคล้ายกับพลาสมิน คือ เอนไซม์ย่อยสลายลิ่มเลือด (Wang et al., 2006) สำหรับยากลุ่มต่าง ๆ ที่ใช้ในการรักษาโรคหลอดเลือดหัวใจมีดังต่อไปนี้ ยาต้านการทำงานของเกล็ดเลือด (Antiplatelet agents) ถูกใช้เพื่อป้องกันการเกิดลิ่มเลือดหรือขยายหลอดเลือด แอสไพริน (Aspirin) เป็นยาที่ใช้สลายลิ่มเลือดและยับยั้งการรวมตัวของเกล็ดเลือด เมื่อให้ยาเพียงครั้งเดียวจะทำให้การทำงานของเกล็ดเลือดเปลี่ยนแปลงไปได้ยาวนานถึง 7-10 วัน โดยปกติแล้วแอสไพรินจะถูกส่งให้กับผู้ที่เป็นโรคกล้ามเนื้อหัวใจตายเฉียบพลัน (กัปกมล เลาหเพ็ญแสง, 2542) ส่วนยาอื่น ๆ ที่ใช้ ได้แก่ ไดไพริดาโมล (Dipyridamole) โคลพิโดกรอล (Clopidogrol) และไทโดพิดีน (Ticlopidine) ยาเหล่านี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งปัจจัยที่ส่งเสริมการรวมตัวของเกล็ดเลือด และจะให้กับผู้ป่วยที่แพ้แอสไพริน ส่วนเฮปาริน (Heparin) และวาฟาริน (Warfarin) เป็นยาที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งทรอมบิน มีผลต่อการยับยั้งการเกิดลิ่มเลือด นอกจากนี้ยังมีกลุ่มยาที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นระบบการสลายลิ่มเลือด ได้แก่ ยูโรไคนาส (Urokinase) ซึ่งสกัดได้จากไตหรือน้ำปัสสาวะ สเตรปโตไคนาส (Streptokinase) ซึ่งสกัดได้จากแบคทีเรียสเตรปโตคอคไค (Streptococci) และแสตปฟีโลไคนาส (Staphylokinase) ซึ่งสกัดได้จากแบคทีเรียสแตปฟีโลคอคคัส (*Staphylococcus*) และ สารกระตุ้น พลาสมิโนเจนจากเนื้อเยื่อ (Tissue plasminogen activator, t-PA) สกัดได้จากเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ โดยเอนไซม์เหล่านี้มีคุณสมบัติตาม

ธรรมชาติเหมือนกับสารกระตุ้นพลาสมิโนเจน (Plasminogen activator) ที่ผลิตจากเยื่อบุผิวของผนังหลอดเลือด (กำแพง เลือดเพื่อแสง, 2542) กระบวนการสลายไฟบรินเป็นกระบวนการที่สำคัญในการป้องกันโรคเหล่านี้ได้

2.6.2 เอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินและกลไกการย่อยสลายไฟบริน

ในปัจจุบันมีการนำยาที่มีผลเร่งการเปลี่ยนพลาสมิโนเจนให้เป็นพลาสมิน เรียกว่า ยาละลายลิ่มเลือด มาใช้รักษาโรคหลอดเลือดอุดตัน เช่น โรคหัวใจขาดเลือด (Myocardial infarction) การสลายลิ่มเลือดไม่สามารถให้ผู้ป่วยได้รับพลาสมินเข้าสู่ร่างกายได้โดยตรง เนื่องจากในเลือดมีสารยับยั้งพลาสมิน (Antiplasmin) ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งการออกฤทธิ์ของพลาสมิน ดังนั้นยาหรือสารที่ใช้ในการสลายลิ่มเลือดจึงเป็นสารในกลุ่มกระตุ้นกิจกรรมของพลาสมิโนเจน เช่น สารกระตุ้นพลาสมิโนเจนจากเนื้อเยื่อ (Tissue-Plasminogen Activator; t-PA) สารกระตุ้นพลาสมิโนเจนจากปัสสาวะหรือยูโรไคเนส (Urokinase; u-PA) สเตรปโตไคเนส (Streptokinase) และแสตปฟีโลไคเนส (Staphylokinase)

พลาสมิน (Plasmin) (EC 3.4.21.7) เป็นซีรีนโปรติเอส ถูกยับยั้งด้วยสารยับยั้งโปรติเอสกลุ่มซีรีน ได้แก่ Di-iso-propyl-fluorophosphate (DFP) และ Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) มีขนาด 84 กิโลดาลตัน (Novokhatny, Taylor, and Zimmerman, 2003; Wiman, 1977) พลาสมินเกิดจากสารที่ทำหน้าที่กระตุ้นพลาสมิโนเจน (Plasminogen activator) เปลี่ยนพลาสมิโนเจน (Plasminogen) ให้เป็นพลาสมิน (Plasmin) ซึ่งพลาสมิโนเจนประกอบด้วย 791 กรดอะมิโน เป็นไกลโคโปรตีนสายเดี่ยว ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 1.5% มีขนาดโมเลกุล 90 กิโลดาลตัน (Collen and Lijnen, 1991) โมเลกุลของพลาสมิโนเจนจะมีโครงสร้างแบบห้าห่วงที่ เรียกว่า คริงเกิลลูป (Kringles loop) ซึ่งคริงเกิลลูปเหล่านี้จะมีตำแหน่งการเกิดอันตรกิริยากับไลซีน (Lysine binding site) ที่จะยึดจับกับไฟบรินหรือสารยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายไฟบริน (Fibrinolytic inhibitor) ซึ่งพลาสมิโนเจนจะถูกกระตุ้นโดยการถูกตัดที่พันธะเพปไทด์ตรงบริเวณตำแหน่ง Arg₅₆₁-Val₅₆₂ ด้วยสารกระตุ้นพลาสมิโนเจนหรือเอนไซม์ที่มีความจำเพาะกับพลาสมิโนเจนได้เป็นพลาสมินประกอบด้วยโครงสร้างที่สำคัญ 2 ส่วน คือ Heavy chain และ Light chain โดย Heavy chain เป็นส่วนที่ไม่เกิดการเร่งปฏิกิริยาซึ่งทำหน้าที่สำหรับควบคุมกิจกรรมของพลาสมิน โดยการเกิดอันตรกิริยากับโมเลกุลต่าง ๆ (Castellino, 1995) ในขณะที่ Light chain คือบริเวณเร่งปฏิกิริยาประกอบด้วยกรดอะมิโนที่สำคัญคือ His₆₀₃ Asp₆₄₆ และ Ser₇₄₁ นอกจากนี้ยังพบว่า พลาสมินมีความจำเพาะเจาะจงคล้ายทริปซิน (Trypsin-like protease) เนื่องจากมีความจำเพาะต่อพันธะเพป-

ไทด์ที่มีโซ่ข้างเป็นกรดอะมิโนอาร์จินีน (Arg) และ ไลซีน (Lys) (Castellino and Powell, 1981; Robbins, Summaria, Hsieh, and Shah, 1967)

สารกระตุ้นพลาสมิโนเจนจากเนื้อเยื่อ (Tissue-type Plasminogen Activator; t-PA) (EC 3.4.21.68) คือซีรีน โปรติเอส มีขนาดโมเลกุล 70 กิโลดาลตัน มีค่าพีไอ (pI) อยู่ที่ 7-8 ประกอบด้วย 572 กรดอะมิโน สารกระตุ้นพลาสมิโนเจนจากเนื้อเยื่อสกัดได้จากหลายแหล่ง เช่น หัวใจสุกรมดลูกของมนุษย์และหลอดเลือด ต่อมาพบว่าสารกระตุ้นพลาสมิโนเจนจากเนื้อเยื่อสามารถผลิตได้จากเซลล์เยื่อบุผิวของผนังหลอดเลือด (Endothelial Cell) เป็นหลัก (Rijken, Wijngaards, Zaal-de Jong, and Welbergen, 1979) ตำแหน่งของการเร่งปฏิกิริยาของสารกระตุ้นพลาสมิโนเจนจากเนื้อเยื่อคือ His₃₂₂ Asp₃₇₁ และ Ser₄₇₈ โดยตัดที่พันธะเพปไทด์ที่ตำแหน่ง Arg₅₆₁-Val₅₆₂ ของพลาสมิโนเจน (Pennica et al., 1983) นอกจากนี้พบว่า การเกิดปฏิกิริยาของสารกระตุ้นพลาสมิโนเจนจากเนื้อเยื่อนั้นมีความจำเพาะเจาะจงกับไฟบรินสูงมาก จึงส่งผลให้ปฏิกิริยาการกระตุ้นพลาสมิโนเจนเกิดได้อย่างรวดเร็วเมื่อมีไฟบริน เช่น โมเลกุลของสารกระตุ้นพลาสมิโนเจนจากเนื้อเยื่อ (t-PA) 1 โมเลกุล จะกระตุ้นพลาสมิโนเจน 1 โมเลกุล ในเวลา 30 นาที แต่เมื่อมีไฟบรินจะใช้เวลาเพียง 5 วินาที ด้วยเหตุนี้กระบวนการย่อยสลายไฟบรินจึงเกิดขึ้นเฉพาะตรงบริเวณที่มีไฟบรินเท่านั้น อย่างไรก็ตามสารกระตุ้นพลาสมิโนเจนจากเนื้อเยื่อ สามารถสังเคราะห์และเก็บไว้ในเซลล์เยื่อบุผิวของผนังหลอดเลือด (Endothelial cell) และพร้อมที่จะหลั่งเข้าสู่ระบบไหลเวียนของเลือด และการทำงานของสารกระตุ้นพลาสมิโนเจนจากเนื้อเยื่อจะถูกควบคุมด้วยโปรตีนที่สำคัญคือ Plasminogen activator inhibitor type I (PAI-1) และ type II (PAI-2) (Collen, 1980)

ยูโรไคเนส (Urokinase) หรือสารกระตุ้นพลาสมิโนเจนจากปัสสาวะ (Urine-type plasminogen activator; u-PA) (EC 3.4.21.73) เป็นโปรติเนสที่ทำหน้าที่คล้ายทริปซิน (Trypsin-like protease) มีขนาดโมเลกุล 54 กิโลดาลตัน ซึ่งสังเคราะห์ได้จากไตจึงพบเป็นส่วนมากในปัสสาวะ (Rijken et al. 1979) และสามารถสังเคราะห์ได้ 2 แบบ คือ Single chain (scu-PA, prourokinase) และ Two chain (tcu-PA) แต่ Single chain จะมีความสามารถในการกระตุ้นพลาสมิโนเจนได้น้อยกว่า (Pertesen, Lund, Nielsen, Dano, and Skriver, 1988) ยูโรไคเนสค่อนข้างมีความจำเพาะสูงต่อพลาสมิโนเจน โดยสามารถตัดพันธะเพปไทด์ตำแหน่ง Arg₅₆₁-Val₅₆₂ เพื่อเปลี่ยนพลาสมิโนเจนเป็นพลาสมินได้โดยตรงเช่นเดียวกับสารกระตุ้นพลาสมิโนเจนจากเนื้อเยื่อแต่กลไกการเกิดปฏิกิริยาของการย่อยสลายพลาสมิโนเจนของยูโรไคเนสนั้นไม่ต้องอาศัยไฟบรินเพื่อเปลี่ยนพลาสมิโนเจนเป็นพลาสมิน (Lijnen, Van Hoef, De Cock, and Collen, 1989)

สเตรปโตไคเนส (Streptokinase) (EC 3.4.99.0) พบตั้งแต่ปี ค.ศ. 1933 เป็นเอนไซม์ที่หลั่งออกนอกเซลล์ (Extracellular protein) โดยสเตรปโตคอคไค (Streptococci) มีขนาดโมเลกุล 47-50 กิโลดาลตัน มี 414 กรดอะมิโน (Colen and Lijnen, 1991) ซึ่งมีกลไกการออกฤทธิ์กระตุ้นพลาสมิ-

โนเจน 3 ขั้นตอนคือ ขั้นตอนที่ 1 เกิดการรวมตัวกับพลาสมิโนเจนในสัดส่วน 1:1 เกิดเป็น Streptokinase-plasminogen complex ซึ่งไม่สามารถย่อยพลาสมิโนเจนได้โดยตรงเหมือนสารกระตุ้นพลาสมิโนเจนจากเนื้อเยื่อ (t-PA) และสารกระตุ้นพลาสมิโนเจนจากปัสสาวะ (u-PA) จากนั้นพลาสมิโนเจนเปิดตัวออกบริเวณเร่งกิจกรรม ทำให้อยู่ในรูปที่สามารถแสดงกิจกรรมได้ ขั้นตอนที่ 2 บริเวณเร่งปฏิกิริยาของพลาสมิโนเจนถูกกระตุ้นให้เป็นพลาสมิน ในขั้นตอนที่ 3 เกิดโครงสร้างที่เรียกว่า Plasmin-SK complex ซึ่งบริเวณเร่งปฏิกิริยาของ Plasmin-SK complex เหมือนกับโมเลกุลของพลาสมิน (Plasmin) แต่ความแตกต่างระหว่างพลาสมิน และ Plasmin-SK complex คือพลาสมินสามารถเกิดอันตรกิริยาระหว่างพลาสมิโนเจนและกับสารยับยั้งการทำงานของพลาสมิน α_2 -Antiplasmin ในขณะที่ Plasmin-SK complex ไม่สามารถเกิดอันตรกิริยากับพลาสมิโนเจนและสารยับยั้งการทำงานของพลาสมิน α_2 -antiplasmin ในปัจจุบันสตรีปโตไคเนสถูกนำมาใช้ในผู้ป่วยที่เป็นโรคหัวใจตายเฉียบพลัน (Thelwell, 2010; Shah et al., 1995)

สเตปฟีโลไคเนส (Staphylokinase; SAK) เป็นโปรตีนที่หลั่งออกมาจากเซลล์ (Extracellular protein) โดย *Staphylococcus aureus* มีขนาดโมเลกุล 15.5 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย 136 กรดอะมิโน ซึ่งมีลำดับของกรดอะมิโนแตกต่างจากสตรีปโตไคเนส (Streptokinase) แต่ออกฤทธิ์คล้ายกับสตรีปโตไคเนสโดยเกิด Plasmin-SAK complex แต่แตกต่างกับ Plasmin-SK complex เนื่องจากสามารถเกิดอันตรกิริยากับพลาสมิโนเจนและสารยับยั้งการทำงานของพลาสมิน α_2 -antiplasmin ปัจจุบันสตรีปฟีโลไคเนสถูกนำมาใช้ในผู้ป่วยที่เป็นโรคหัวใจตายเฉียบพลัน (Lack, 1948; Bokarewa et al., 2006)

2.6.3 แหล่งเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน

เมื่อไม่นานมานี้มีนักวิจัยสนใจและศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินที่ผลิตจากจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มแบคทีเรียที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์อาหาร ได้แก่ ผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นเมืองในแถบเอเชีย เช่น กะปิ (Hua, Jiang, Mine, and Mu, 2008) ปลาหมัก (Jeotgal) (Kim et al., 1997) ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักเกาหลี (Doen-jong และ Chookook-jang) (Kim et al., 1996; Kim and Choi, 2000) ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักจีน (Douchi) (Peng et al., 2003) และผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักญี่ปุ่น (Natto) (Sumi, Hamada, Tsushima, Mihara, and Muraki, 1987) ซึ่งในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่เรียกว่านัตโตะ (Natto) นัตโตะคุณภาพดีนั้นต้องมีเมือกสีขาวปกคลุมอยู่บริเวณผิวหน้า ซึ่งเมือกมีลักษณะเหนียว ๆ เกิดจากการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียในระหว่างการหมัก นอกจากนี้ นัตโตะยังมีกลิ่นเฉพาะตัวเนื่องจากเกิดจากการย่อยสลายของโปรตีนถั่วเหลืองได้เป็นแอมโมเนีย (Wei, Wolf-Hall and Chang, 2001) วัตถุประสงค์ที่ใช้ในการผลิตนัตโตะคือถั่วเหลืองซึ่งนำมาต้มประมาณ 6 ชั่วโมง หมักกับเชื้อ *B. natto* (ที่เรียกในภาษาญี่ปุ่นว่า นัตโตะคิน (Nattokin)

ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เชื่อว่าอยู่ในฟางข้าว และมีแหล่งกำเนิดอยู่ในประเทศญี่ปุ่นตั้งแต่สมัยโบราณ แต่ปัจจุบันจะสเปรย์เชื้อ *B. natto* เข้าไป) บ่มที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน จากนั้นสามารถแช่เย็นเก็บไว้ได้เป็นเวลาหลายเดือน การหมักโดยใช้เชื้อแบคทีเรียนี้เป็นสิ่งที่ทำให้นัตโตะมีความแตกต่างจากอาหารถั่วเหลืองหมักชนิดอื่น ๆ ซึ่งนิยมใช้เชื้อรา เช่น เต้าเจี้ยว เป็นต้น (Steinkraus, 1989) ผลวิจัยทางการแพทย์เกี่ยวกับประโยชน์ของการบริโภคนัตโตะ เริ่มปรากฏตั้งแต่ในทศวรรษ 1980 โดย Sumi et al. (1987) พบว่า นัตโตะอุดมไปด้วยสารชีวภาพหลายชนิดที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ในกระบวนการหมักนัตโตะคินจะสร้างเอนไซม์โปรติเอสที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายไฟบริน (Fibrinolytic enzyme) ที่มีชื่อนัตโตะไคเนส (Nattokinase; NK) (Steinkraus, 1989) ซึ่งมีคุณสมบัติช่วยลดการอุดตันของหลอดเลือดอุดตันโดยออกฤทธิ์สลายลิ่มเลือดที่เกาะอยู่ภายในผนังของหลอดเลือด

เอนไซม์นัตโตะไคเนส (Nattokinase; NK) จัดเป็นซีรีนโปรติเอสประกอบด้วย 275 กรดอะมิโน มีขนาดโมเลกุล 28 กิโลดาลตัน มีค่า pI อยู่ที่ 8.7 และมีเสถียรภาพในสภาวะที่เป็นกลางและด่างคือที่พีเอช 6.0-12.0 และเกิดการสูญเสียกิจกรรมเมื่อพีเอชต่ำกว่า 5.0 (Fujita, 1993) การศึกษาในร่างกายมนุษย์ชี้ให้เห็นว่านัตโตะไคเนสไม่มีความเป็นพิษหรือผลข้างเคียงใด ๆ ต่อร่างกายมนุษย์ เอนไซม์มีขนาดเล็กจึงง่ายต่อการดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย (Fujita et al., 1993, 1995) และมีความจำเพาะเจาะจงกับไฟบรินสูง เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยไฟบรินของนัตโตะไคเนสกับพลาสมิน พบว่า นัตโตะไคเนสมีศักยภาพในการย่อยไฟบรินได้สูงกว่าพลาสมิน 4-5 เท่า (Fujita, Ito, and Nishimuro, 1995) ซึ่งในปัจจุบัน นัตโตะไคเนสได้รับการยอมรับและใช้เป็นทางเลือกในการป้องกันและรักษาโรคหลอดเลือดและหัวใจ โดยมีผลวิจัยทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลองตลอดจนในร่างกายมนุษย์ บ่งชี้ว่านัตโตะไคเนสสามารถสลายลิ่มเลือดอันตรายและยังยับยั้งการสะสมของไฟบรินในหลอดเลือดแดง ซึ่งกลไกในการสลายไฟบรินของนัตโตะไคเนส สามารถย่อยไฟบรินโดยตรง นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนพลาสมาตัวหนึ่งที่ทำหน้าที่ยับยั้งสารทำหน้าที่กระตุ้นพลาสมิโนเจน (Plasminogen activator inhibitor) (Sumi, Hamada, Nakanishi, and Hiratani, 1990) นอกจากนี้ นัตโตะไคเนสสามารถสลายลิ่มเลือดที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นได้ (Sumi et al., 1990) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Suzuki et al. (2003) ที่แสดงให้เห็นว่านัตโตะไคเนสสามารถทำลายการสะสมของลิ่มเลือดในผนังหลอดเลือดแดง (Intimal thickening) ของหนู นอกจากนี้ Sumi et al. (1990) ยังศึกษาการย่อยไฟบรินในมนุษย์ และความสามารถในการละลายลิ่มเลือดหลังจากการดูดซึมนัตโตะไคเนสในกระเพาะอาหาร โดยให้ผู้ทดสอบรับประทานนัตโตะในแต่ละมื้อก่อนอาหารเข้าในปริมาณ 200 กรัม เป็นเวลา 2 อาทิตย์ จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมการย่อยสลายไฟบริน และความสามารถในการละลายลิ่มเลือดของนัตโตะไคเนสในเลือด พบว่านัตโตะไคเนสยังคงแสดงกิจกรรมการย่อยไฟบรินได้เป็นเวลานานถึง 2-8 ชั่วโมง และมี

ความสามารถในการละลายลิ่มเลือดเพิ่มขึ้น โดยวัดเวลาการละลายของลิ่มเลือด (Euglobulin lysis time) อีกทั้ง Sumi et al. (1990) ให้ผู้ทดสอบรับประทานนัตโตะไคเนสที่บรรจุในแคปซูล (1.3 กรัม/แคปซูล) สามเวลาหลังอาหารเป็นเวลา 8 วัน พบว่ากิจกรรมการย่อยไฟบรินในเลือดเพิ่มขึ้นจากวันแรกจนถึงวันสุดท้าย ในขณะที่ปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยไฟบริน (Fibrin degradation product) เพิ่มขึ้นและปริมาณของกิจกรรมของสารกระตุ้นพลาสมินจากเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ นัตโตะไคเนสสามารถย่อยไฟบรินที่เกิดขึ้นโดยตรงแล้ว ยังช่วยกระตุ้นท่อเยื่อบุผิวของผนังหลอดเลือด (Vascular endothelial cells) ให้ผลิตสารกระตุ้นพลาสมินโนเจนจากเนื้อเยื่อ หลังจากการดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร (Sumi et al., 1990) Pais, Alexy, Holsworth, and Meiselman (2006) พบว่า นัตโตะไคเนสสามารถลดความหนืดในเลือดอันเกิดจากการรวมตัวของเม็ดเลือดแดง (BRC aggregation) ซึ่งเป็นตัวแปรที่สำคัญต่อการไหลเวียนของเลือด เป็นที่คาดการณ์ว่านัตโตะไคเนสสามารถลดหรือป้องกันปัจจัยเสี่ยงต่อสภาวะของการเกิดโรคหลอดเลือดและหัวใจ ด้วยหลายสาเหตุ จึงอาจใช้สำหรับการรักษาภาวะหลอดเลือดผิดปกติ ด้วยเหตุผลนี้ส่งผลให้นัตโตะไคเนสมีศักยภาพเพื่อเป็นทางเลือกในการรักษาและป้องกัน หรือลดอุบัติการณ์ของโรคหลอดเลือดหัวใจ เช่น โรคหลอดเลือดดำอุดตัน (Deep vein thrombosis) โรคหัวใจขาดเลือด (Myocardial infarction) ภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือดแดงของปอด (Pulmonary embolism) และโรคหลอดเลือดสมอง (Stroke)

หลายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินที่ผลิตจากแบคทีเรียซึ่งคัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักในแต่ละพื้นที่ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์อาหารที่เป็นถั่วเหลืองหมักประเภทเกาหลี เรียกว่า Chunggok-Jang และ Deon-Jang ในผลิตภัณฑ์ Chunggok-Jang พบเชื้อ *Bacillus* sp. CK11-4 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน และสามารถกระตุ้นพลาสมินโนเจนให้เป็นพลาสมินเพื่อเร่งกิจกรรมย่อยสลายไฟบรินเช่นกัน (Kim et al., 1996) และผลิตภัณฑ์ Doen-Jang พบเชื้อ *Bacillus* sp. DJ4 ที่มีบทบาทต่อการผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายไฟบริน และเอนไซม์ถูกกระตุ้นการทำงานด้วยเกลือเข้มข้น 2.5% (Kim and Choi, 2000, 2001) ส่วนผลิตภัณฑ์อาหารที่เป็นถั่วเหลืองหมักประเทศจีนที่เรียกว่า Dou-chi ที่พบ *B. amyloliquefaciens* DC-4 (Peng et al., 2003) และ *B. subtilis* DC33 (Wang et al., 2006) ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายไฟบริน ซึ่งเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อดังกล่าวมีชื่อว่า subtilisin DFE และ subtilisin FS33 ตามลำดับ subtilisin FS33 แสดงกิจกรรมในการย่อยสลายไฟบรินสูงกว่ายูโรไคเนสถึง 6 เท่า นอกจากนี้เอนไซม์มีกลไกย่อยไฟบรินได้โดยตรงแล้ว ยังพบว่าสามารถกระตุ้น พลาสมินโนเจนเพื่อเปลี่ยนไปเป็นพลาสมินในกระบวนการย่อยสลายไฟบรินได้ โดยทำหน้าที่คล้ายสารกระตุ้นพลาสมินโนเจนจากเนื้อเยื่อ (t-PA) ด้วยเช่นกัน (Wang et al., 2006) ซึ่งแตกต่างจาก subtilisin DFE ที่ไม่สามารถกระตุ้นพลาสมินโนเจนได้ (Peng et al., 2003)

2.6.4 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจากจุลินทรีย์

ในการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของโปรติเอสที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายไฟบริน ได้แก่ ขนาดโมเลกุล พีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการแสดงกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ และความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นสังเคราะห์ เอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินโดยส่วนใหญ่ผลิตจากจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย และ รา ซึ่งแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* มีบทบาทสำคัญในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน *B. natto* ผลิตเอนไซม์น้ำตาลโตะโคเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีขนาด 28 กิโลดาลตัน มีค่า pI 8.7 มีเสถียรภาพในสภาวะที่เป็นกลางและด่าง นอกจากนี้มีความสามารถในการตัดพันธะเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนและไลซีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำเพาะของเอนไซม์โคโมทรูปซินและพลาสมีน ตามลำดับ และถูกยับยั้งด้วย Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) ดังนั้นเอนไซม์น้ำตาลโตะโคเนสจัดอยู่ในกลุ่มซีรีน โปรติเอสมีคุณสมบัติคล้ายกับพลาสมีน (Plasmin-like serine protease) (Fujita et al., 1993 ; Sumi et al., 1987) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินหลายชนิดซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มซีรีน โปรติเอสที่มีคุณสมบัติคล้ายกับพลาสมีน เช่นเดียวกับน้ำตาลโตะโคเนส เช่น เอนไซม์ย่อยไฟบรินจาก *Bacillus* sp. CK11-4 และ *Bacillus* sp. DJ-4 ผลิตเอนไซม์ที่มีขนาด 28.2 และ 29 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (Kim et al., 1996; Kim and Choi, 2000) *B. subtilisin* BK17 ผลิตเอนไซม์ที่มีศักยภาพในการย่อยสลายไฟบรินสูงที่มีขนาด 31 กิโลดาลตัน (Jeong et al., 2001) ในขณะที่เอนไซม์ย่อยไฟบรินจากแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* โดยส่วนใหญ่จัดเป็นซีรีน โปรติเอสที่มีคุณสมบัติคล้ายซัพทิลิซิน เช่น *B. subtilis* IMR-NK1 ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินแสดงกิจกรรมได้ดีในช่วงพีเอช 7.8 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (Chang, Fan, Kuo, and Sung, 2000) *B. subtilis* DC33 ผลิตเอนไซม์ขนาด 30 กิโลดาลตัน แสดงกิจกรรมได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และพีเอช 8 นอกจากนี้ยังทำหน้าที่ในการกระตุ้นพลาสมีโนเจนให้เป็นพลาสมีน (Wang et al., 2006) *B. amyloliquefaciens* DC-4 ที่มีขนาด 28 กิโลดาลตัน แสดงกิจกรรมได้ดีที่สภาวะเป็นด่าง พีเอช 9.0 และที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส (Peng et al., 2003) ยังพบเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจาก *B. amyloliquefaciens* AN6 มีขนาด 30 กิโลดาลตัน ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และพีเอช 9.0 (Agribi et al., 2010) นอกจากนี้ Agribi et al. (2009) ยังพบเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจาก *B. subtilis* A26 ที่มีขนาด 28 กิโลดาลตัน เร่งกิจกรรมได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ส่วนเอนไซม์ย่อยไฟบรินจาก *Bacillus* sp. KA38 เป็นเมทาลโลโปรติเอส (Kim et al., 1997) นอกจากแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* จะสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินแล้วยังมีแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. TKU015 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินที่มีขนาด 21 และ 24 กิโลดาลตัน เอนไซม์ที่ผลิตได้เร่งกิจกรรมได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และพีเอช 7 และมีเสถียรภาพที่พีเอชค่อนข้างกว้างคือที่พีเอช 4-11 จัดเป็นโปรติเอสกลุ่มซีรีน (Serine protease) (Wang, Chen, Liang, and Lin, 2009) ยิ่งไปกว่านั้น พบว่าเชื้อรา

ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจากจุลินทรีย์

| Bacteria | Molecular Weight | | | Optimum condition | | | Stability | | Type | Mode of action | References |
|----------------------------|------------------|------------------|----|-------------------|--------|------------------|------------------------------|---|--------------------------|---------------------|------------|
| | (kDa) | Temperature (°C) | pH | Temperature (°C) | pH | Temperature (°C) | pH | | | | |
| <i>Bacillus natto</i> | 28 | NA | NA | <50 | 6–12 | 6–12 | Plasmin-like | Direct degrade of fibrin clot | Fujita et al. (1993) ; | | |
| <i>Bacillus</i> sp. CK11-4 | 28.2 | 70 | 10 | <50 | 7–10.5 | 7–10.5 | serine protease | and plasminogen activator | Sumi et al. (1987, 1990) | | |
| <i>Bacillus</i> sp. KA38 | 41 | 40 | 7 | <40 | 7–9 | 7–9 | Plasmin-like serine protease | Direct degrade of fibrin clot and plasminogen activator | Kim et al. (1996) | | |
| <i>Bacillus</i> sp. DJ4 | 29 | 40 | 10 | <50 | 4–11 | 4–11 | Metallo protease | Direct degrade of fibrin clot | Kim et al. (1997) | | |
| <i>B. subtilis</i> IMR-NK1 | 30 | 55 | 7 | <40 | 5–10 | 5–10 | Plasmin-like serine protease | Direct degrade of fibrin clot | Kim and Choi (2000) | | |
| <i>B. subtilis</i> BK17 | 31 | NA | NA | NA | 8 | 8 | Subtilisin-like protease | Direct degrade of fibrin clot | Change et al. (2000) | | |
| | | | | | | | | | | Jeong et al. (2001) | |

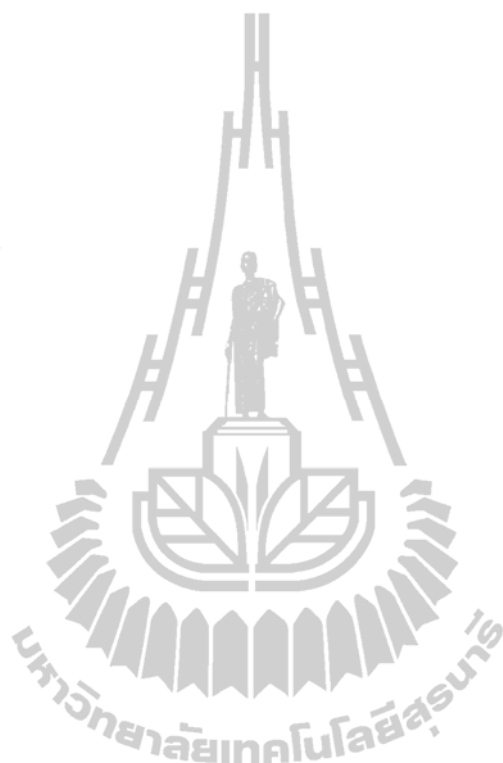
หมายเหตุ NA หมายถึง Not available

ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจากจุลินทรีย์ (ต่อ)

| Bacteria | Molecular Weight (kDa) | Optimum condition | | Stability | Type | Mode of action | References | |
|----------------------------------|------------------------|-------------------|-----|-----------|--------|--------------------------|--|------------------------|
| | | Temperature (°C) | pH | | | | | Temperature (°C) |
| <i>B. subtilis</i> DC33 | 30 | 55 | 8 | <60 | 5-12 | Subtilisin-like protease | Direct degrade of fibrin clot and plasminogen activator (2006) | Wang et al. (2006) |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> DC-4 | 28 | 48 | 9 | <50 | 7-10.5 | Subtilisin-like protease | Direct degrade of fibrin clot | Peng et al. (2003) |
| <i>B. amyloliquefaciens</i> AN6 | 30 | 60 | 9 | <50 | 6-11 | Serine protease | Direct degrade of fibrin clot | Agribi et al. (2010) |
| <i>Streptomyces</i> sp. CS684 | 35 | 45 | 7-8 | <40 | 4-9 | Serine metalloprotease | Direct degrade of fibrin clot | Simkhada et al. (2010) |
| <i>B. subtilis</i> A26 | 28 | 60 | 9 | <60 | 8-12 | Serine protease | Direct degrade of fibrin clot | Agribi et al. (2009) |
| <i>Pseudomonas</i> sp. TKU015 | 21, 24 | 50 | 7 | <50 | 4-11 | Serine protease | Direct degrade of fibrin clot | Wang et al. (2009) |

หมายเหตุ NA หมายถึง Not available

บางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินได้คือ *Streptomyces* sp. CS684 ซึ่งผลิตเอนไซม์ที่มีขนาด 35 กิโลดาลตัน แสดงกิจกรรมได้ดีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และที่พีเอช 7-8 ซึ่งเป็นโปรติเอสกลุ่มซีรีนเมทัลโลโปรติเอส (Serine metalloproteases) (Simkhada, Mander, Cho, and Yoo, 2010) ซึ่งคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2.3



บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

3.1 วัสดุอุปกรณ์

เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในศึกษาวิจัยมีดังนี้

- 3.1.1 เครื่องแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ (Fast Protein Liquid Chromatography; FPLC) (AKTA P900, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden)
- 3.1.2 คอลัมน์โครมาโตกราฟี (Columns XK16, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden)
- 3.1.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (Smartspec plus spectrophotometer, Bio-Rad, CA, USA)
- 3.1.4 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดัน (Autoclave) (Labo Autoclave MLS 3000, Sanyo Electric Co., Ltd., Japan)
- 3.1.5 ตู้ปั่นแบบเขย่า (Incubator shakers) (Excella® Benchtop Incubator Shakers, New Brunswick Scientific, NJ, USA)
- 3.1.6 ชุดกรองสาร (All-glass vacuum filter holder, Sartorius AG, Germany)
- 3.1.7 อุปกรณ์แยกโปรตีนด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิส (Mini-protein® 3 cell, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- 3.1.8 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath WNB 7-45, Memmert, Schwabach, Germany)
- 3.1.9 เครื่องทำแห้งแผ่นเจล (Slab Gel Dryer) (Drygel SR slab gel dryer model SE 1160, Hoefer Scientific Instruments, USA)
- 3.1.10 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge, Eppendorf 22331, Hamberg, Germany)
- 3.1.11 ชุดกรองโปรตีนผ่านเยื่อกรองอาศัยแรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง Molecular Weight Cut Off (MWCO) 30 กิโลดาลตัน (Centricon centrifugal filter devices) (Amicon Ultra; Millipore Corporation, Bedford, MA, USA)

3.2 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ Phenyl-Sepharose, DEAE-Sephadex และ Source 30Q จากบริษัท GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Sweden), ไฟบริโนเจน (Fibrinogen) พลาสมิน (Plasmin) ซึ่งสกัดจากพลาสมาของมนุษย์ (Human plasma) เอนไซม์เพปซิน (Pepsin) สกัดจากกระเพาะหมู (Hog stomach) เอโซเคซีน (Azocasein) Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, Tos-Gly-Pro-Arg-pNA, D-Val-Leu-Lys-pNA, Benz-L-Arg-pNA, Benz-Pro-Phe-Arg-pNA และ Benz-Val-Gly-Arg-pNA และสารยับยั้งโปรติเอส ได้แก่ Leupeptin, Trypsin inhibitor I (soybean), N-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TPCK), N-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK), Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), Bestatin, Pepstatin A, trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane (E64), β -mercaptoethanol (β -ME) จากบริษัท Sigma Chemical (Saint Louis, MO, USA) และ Thrombin สกัดจากพลาสมาของมนุษย์ เอนไซม์ทริปซินสกัดจากตับหมู (Hog pancreas) และ Bovine serum albumin (BSA) จากบริษัท Fluka (Buchs, Switzerland)

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 เปรียบเทียบกิจกรรมการย่อยสลายไฟบริน (Fibrinolytic activity) และโปรตีน (Proteolytic activity) ของเอนไซม์จากแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 กับแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลา

3.3.1.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและการเตรียมเอนไซม์จากแบคทีเรีย

เลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกจากกระบวนการหมักน้ำปลาเกลือสมุทร (Solar salt) และน้ำคาวปลา (Fish juice) ซึ่งเป็นของเหลวที่ซึมออกจากปลาหลังจากคลุกเคล้ากับเกลือเมื่อเริ่มการหมักปลา จากห้องปฏิบัติการเชื้อพันธุจุลินทรีย์ สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จำนวนทั้งหมด 25 ไอโซเลท ซึ่งได้จัดจำแนกตามฐานวิธาน สรีรวิทยา และตามลำดับนิวคลีโอไทด์ 16 rRNA gene ของแบคทีเรียเหล่านี้ โดยแบคทีเรียกรดแล็กติกคัดแยกจากอาหารแข็ง de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5% ส่วนแบคทีเรียชนิดอื่นถูกคัดแยกจากอาหารแข็ง Skim milk salt agar ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 25% (Nawong, 2006) แบคทีเรียที่ทดสอบ ได้แก่ *Staphylococcus* sp. จำนวน 8 ไอโซเลท *Virgibacillus* sp. จำนวน 8 ไอโซเลท *Brevibacterium* sp. จำนวน 1 ไอโซเลท *Corynebacterium* sp. จำนวน 1 ไอโซเลท และ *Tetragenococcus halophilus* 7 ไอโซเลท ดังแสดงรายละเอียดในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 รหัสและสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลา

| Source | Bacterial isolated code | Bacterial species |
|---------------------------------------|-------------------------|--|
| 1 st month fish sauce mash | SK25 | <i>Staphylococcus</i> sp. SK25 |
| | SK1-1-2 | <i>Staphylococcus</i> sp. SK1-1-2 |
| | SK1-1-1 | <i>Staphylococcus</i> sp. SK1-1-1 |
| | SK1-1-6 | <i>Corynebacterium</i> sp. SK1-1-6 |
| | SK32 | <i>Virgibacillus</i> sp. SK32 |
| | SK33 | <i>Virgibacillus</i> sp. SK33 |
| | SK37 | <i>Virgibacillus</i> sp. SK37 |
| | SK37-1 | <i>Virgibacillus</i> sp. SK37-1 |
| | SK39 | <i>Virgibacillus</i> sp. SK39 |
| | SK1-1-8 | <i>Virgibacillus</i> sp. SK1-1-8 |
| | SK35 | <i>Brevibacterium</i> sp. SK35 |
| | SK1-3-7 | <i>Virgibacillus</i> sp. SK1-3-7 |
| | MS33 | <i>Tetragenococcus halophilus</i> MS33 |
| M11 | | <i>T. halophilus</i> M11 |
| | MRC10-1-3 | <i>T. halophilus</i> MRC10-1-3 |
| 5 th month fish sauce mash | MRC5-5-2 | <i>T. halophilus</i> MRC5-5-2 |
| | MCD10-5-10 | <i>T. halophilus</i> MCD10-5-10 |
| | MCD10-5-15 | <i>T. halophilus</i> MCD10-5-15 |
| 7 th month fish sauce mash | MRC10-7-8 | <i>T. halophilus</i> MRC10-7-8 |
| Solar salt | SKS23 | <i>Staphylococcus</i> sp. SKS23 |
| | SKS20 | <i>Staphylococcus</i> sp. SKS20 |
| Fish juice | SKW19 | <i>Virgibacillus</i> sp. SKW19 |
| | SKW29 | <i>Staphylococcus</i> sp. SKW29 |
| | SKW23 | <i>Staphylococcus</i> sp. SKW23 |
| | SKW24-1 | <i>Staphylococcus</i> sp. SKW24-1 |

เตรียมเซลล์กล้าเชื้อ (Inoculum) ของแบคทีเรียที่ไม่ใช่แบคทีเรียกรดแล็กติก (18 ไอโซเลท) โดยถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ 1 loopful จากอาหารแข็ง JCM 168 (Yeast extract 0.5%, Casamino acid 0.5%, Sodium glutamate 0.1%, Trisodium citrate 0.3%, KCl 0.02%, MgSO₄ 2%, FeCl₂·4H₂O, MnCl₂·4H₂O และ NaCl 5%) ลงในอาหารเหลว Yeast extract ซึ่งประกอบด้วย Yeast extract 1%, Trisodium citrate 0.3%, Potassium chloride 0.2%, Magnesium sulfate 2.5% ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5% (Sinsuwan et al., 2008a) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ส่วนแบคทีเรียกรดแล็กติก *T. halophilus* เตรียมโดยใช้อาหารเหลว MRS ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 5% บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำกล้าเชื้อเจือจางให้ได้ค่าดูดกลืนแสง (Optical density, OD) 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ซึ่งมีจำนวนเทียบเท่า 10⁷ CFU/ml ถ่ายเซลล์กล้าเชื้อของแต่ละสายพันธุ์ที่เจือจางในปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงไปในอาหารเหลว Yeast extract หรือ MRS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร สำหรับแบคทีเรียที่ไม่ใช่แบคทีเรียกรดแล็กติกและแบคทีเรียกรดแล็กติกตามลำดับ ในกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่ใช่แบคทีเรียกรดแล็กติกบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ส่วนแบคทีเรียกรดแล็กติกบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นเก็บสารละลายส่วนใสซึ่งจัดเป็นเอนไซม์สกัด (Crude enzyme) โดยปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส วัตถุประสงค์การย่อยไฟบริน ดังรายละเอียดข้อ 3.3.1.2 และกิจกรรมการย่อยโปรตีน ดังรายละเอียดข้อ 3.3.1.4

3.3.1.2 การวิเคราะห์กิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินโดยเทคนิคไฟบรินเพลท (Fibrin plate)

ทดสอบกิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินของแต่ละสายพันธุ์ด้วยไฟบรินเพลท ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Astrup and Mullertz (1952) ไฟบรินเพลทประกอบด้วยไฟบริโนเจนเข้มข้น 0.12% (w/v) ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายทรอมบิน (0.5 NIH unit/ml) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และสารละลายอะกาโรส (Agarose) เข้มข้น 1.5% ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ พีเอช 7.4 ปริมาตร 12.9 มิลลิลิตร เทสารผสมลงในจานเพาะเชื้อ (Petri dish) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จนแข็งตัว จากนั้นเจาะหลุมด้วย Cock borer ขนาด 3 มิลลิเมตร เติมสารละลายเอนไซม์ (Crude enzyme) ลงในแต่ละหลุมปริมาตร 40 ไมโครลิตร เติมพลาสติกิน (0.72 NIH unit/ml) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นตัวอย่างควบคุมเชิงบวก (Positive control) และใช้อาหารเหลวยีสต์สกัดปริมาตร 40 ไมโครลิตร เป็นตัวอย่างควบคุมเชิงลบ (Negative control) ของแต่ละเพลท จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปย้อมสีด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 เข้มข้น 0.1 % กรดอะซิติกเข้มข้น 10% เมธานอลเข้มข้น 40% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้างสีออกด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้น 25% และกรดอะซิติก 10%

วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนใสที่เกิดขึ้นรอบหลุม ด้วยเวียร์เนียบคาลิปเปอร์ ส่วนใสที่เกิดขึ้น แสดงถึงกิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินของตัวอย่างเอนไซม์สกัด (Crude enzyme)

3.3.1.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน

วิเคราะห์ความสามารถในการย่อยสลายไฟบรินของเอนไซม์บริสุทธิ์ด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Wang, Chen, Liang, and Lin (2009) ในปริมาตรรวม 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย ไฟบริโนเจนเข้มข้น 0.024% ทรอมบิน (1 NIH unit/ml) และสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมเอนไซม์ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร บ่มต่อ 1 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 50% ปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร บั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg เป็นเวลา 10 นาที เตรียมสารละลายแบลงค์ เช่นเดียวกันยกเว้นเติมเอนไซม์หลังจากเติมกรดไตรคลอโรอะซิติก วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร กำหนดให้ 1 หน่วยกิจกรรม (Fibrin degradation unit) หมายถึง ค่าดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ที่เพิ่มขึ้น 0.1 ต่อนาที (A280) วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธีการ Bradford (1976) โดยมี Bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน

3.3.1.4 การวิเคราะห์กิจกรรมโปรติเอสโดยใช้โปรตีนเป็นสารตั้งต้น (Proteolytic activity)

วิเคราะห์กิจกรรมโปรติเอสโดยใช้โปรตีนเป็นสารตั้งต้นตามวิธีของ An, Seymour, Wu, and Morrissey (1994) ปฏิกิริยาประกอบด้วยเอโซเคซีน (Azocasein) เข้มข้น 1% ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร บัฟเฟอร์ McIlvaine ซึ่งประกอบด้วยไตรโซเดียมฟอสเฟตเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และโซเดียมซिटเรทเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ (Crude enzyme) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 50% ที่เย็นปริมาตร 0.7 มิลลิลิตร จากนั้นบั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนที่ 10,000xg เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 นอร์มัล ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ส่วนสารละลายแบลงค์ (Blank) เตรียมด้วยวิธีเดียวกันยกเว้นเติมเอนไซม์หลังจากเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก 50% แสดงค่ากิจกรรมจากผลต่างของค่าดูดกลืนแสงระหว่างตัวอย่างกับแบลงค์ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร (ΔA_{450}) ต่อนาที

3.3.2 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์

3.3.2.1 การสกัดและทำบริสุทธิ์

จากการทดสอบข้างต้น *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 เป็นแบคทีเรียที่แสดงกิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินและกิจกรรมการย่อยโปรตีนสูงที่สุดซึ่งเอนไซม์สกัดของ *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 เตรียมได้โดยถ่ายเชื้อ 1 loopfull ซึ่งเจริญในอาหารแข็ง JCM 168 (Yeast extract 0.5%, Casamino acid 0.5%, Sodium glutamate 0.1%, Trisodium citrate 0.3%, KCl 0.02%, MgSO₄ 2%, FeCl₂·4H₂O, MnCl₂·4H₂O, NaCl 5% และ agar 1.5%) ลงไปในอาหารยีสต์สกัด ซึ่งประกอบด้วย Yeast extract 1%, Trisodium citrate 0.3%, Potassium chloride 0.2%, Magnesium sulfate 2.5% ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5% (Sinsuwan et al., 2008a) และบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นเจือจางกล้าเชื้อเพื่อให้ได้ค่าความขุ่น (Optical Density) ประมาณ 0.1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ซึ่งมีจำนวนแบคทีเรียประมาณ 10⁷ CFU/ml จากนั้นนำกล้าเชื้อที่เจือจางปริมาตร 50 มิลลิลิตร ถ่ายไปในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์สกัดปริมาตร 400 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 2 ลิตร นำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบ/นาที เก็บสารละลายส่วนใสโดยปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที สารละลายส่วนใสคือเอนไซม์สกัด (Crude enzyme)

การทำบริสุทธิ์เริ่มจากการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงในเอนไซม์สกัด เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 1 โมลาร์ จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นแยกตะกอนออกที่ 10,000xg เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสไปผ่านเยื่อกรองเซลลูโลสแอซิเตต (Cellulose acetate) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำตัวอย่างที่ผ่านเยื่อกรอง (Filtrate) 60 มิลลิลิตร ไปผ่านคอลัมน์ phenyl-Sepharose (2.6 x 6.5 ซม.) ซึ่งคอลัมน์ถูก Equilibrate ด้วยสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 1 โมลาร์ ในสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 ชะโปรตีนส่วนที่ไม่ยึดเกาะคอลัมน์ออกด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 1 โมลาร์ ในสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 ในปริมาตร 2.5 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ (Bed volume) จากนั้นชะโปรตีนที่ยึดเกาะอยู่กับคอลัมน์โดยลดความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตจาก 1 ถึง 0 โมลาร์ ในสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 ในปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ (Bed volume) ด้วยอัตราการชะ 1 มิลลิลิตรต่อนาที แยกเก็บส่วนที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 5 มิลลิลิตร วัดกิจกรรมการสลายไฟบรินของแต่ละหลอดโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Wang et al. (2009) ตามรายละเอียดข้อ 3.3.1.3 และวัดกิจกรรมของโปรติเอสตามรายละเอียดข้อ 3.3.1.4 นำส่วนที่แสดงกิจกรรมแต่ละชนิดมารวมกันแล้วทำการ Dialyze เพื่อกำจัดเกลือโดยใช้ Dialysis membrane ที่มีขนาด MWCO 10 กิโลดาลตัน โดย Dialyze ผ่านสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ (20 มิลลิลิตร) ผ่านลงคอลัมน์ DEAE-Sepharose (2.6 ซม. x 6.5

ชม.) ส่วนโปรตีนที่ไม่ยึดเกาะกับคอลัมน์ถูกชะด้วยปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ด้วยสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 ส่วนโปรตีนที่ยึดเกาะอยู่กับคอลัมน์ถูกชะ โดยเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ในทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 จาก 0 ถึง 0.3 โมลาร์ ปริมาตร 1 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ (Bed volume) ต่อจากนั้นชะโดยเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ในทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 จาก 0.3 ถึง 0.8 โมลาร์ ปริมาตร 4 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ (Bed volume) ด้วยอัตราการชะ 1 มิลลิลิตรต่อนาที แยกเก็บส่วนที่ออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 5 มิลลิลิตร วัดกิจกรรมการสลายไฟบรินและกิจกรรมของโปรตีนเอสของแต่ละหลอด นำส่วนที่แสดงกิจกรรมมารวมกันแล้วทำการ Dialyze เพื่อกำจัดเกลือโดยใช้ Dialysis membrane ที่มีขนาด MWCO 10 กิโลดาลตัน โดย Dialyze ผ่านสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตตเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5 จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ (40 มิลลิลิตร) ผ่านลงในคอลัมน์ของ Source 30Q (2.6 x 6.5 ซม.) ส่วนโปรตีนที่ไม่ยึดเกาะกับคอลัมน์ถูกชะด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตตเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5 ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ในขณะที่โปรตีนที่ยึดเกาะอยู่กับคอลัมน์ถูกชะโดยเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์จาก 0 ถึง 1 โมลาร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตตเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5 ในปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ แยกเก็บส่วนที่ออกจากคอลัมน์หลอดละ 3 มิลลิลิตร วัดกิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินของแต่ละหลอดตามรายละเอียดข้อ 3.3.1.3 และวัดกิจกรรมของโปรตีนเอสตามรายละเอียดข้อ 3.3.1.4 นำส่วนที่แสดงกิจกรรมแต่ละชนิดมารวมกันแล้วทำให้เข้มข้นโดยกรองผ่านเยื่อกรองที่มี MWCO 30 กิโลดาลตัน จากนั้น Dialyze เพื่อกำจัดเกลือโดยใช้ Dialysis membrane ที่มีขนาด MWCO 10 กิโลดาลตัน จากนั้น Dialyze เอนไซม์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 ซึ่งเอนไซม์ที่ได้เป็นเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน (Partially-purified proteases)

3.3.3 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน

3.3.3.1 วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์

ประมาณขนาดของเอนไซม์โดยวิธีไฟบรินไซโมแกรม (Fibrin zymogram) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Kim and Choi (2000) โดยเตรียม Separating gel เข้มข้น 12.5%T ซึ่งมีไฟบริโนเจนเข้มข้น 0.036% (w/v) และทรอมบิน (100 NIH unit/ml) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ปริมาณของโปรตีนอยู่ในช่วง 0.02-1.4 ไมโครกรัม แยกโปรตีนภายใต้ความต่างศักย์ที่ 100 โวลต์ จากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์ประกอบด้วย Triton X-100 เข้มข้น 2.5% (v/v) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วล้าง Triton X-100 ด้วยน้ำกลั่น โดยมีฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ซึ่งประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ พีเอช 7.4 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นย้อมสีเจลด้วยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue R-250 เข้มข้น 0.1% เมธานอลเข้มข้น 40% และกรดอะซิติกเข้มข้น 10% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สังเกตแถบโปร่งใส (Clear zone) ที่เกิดขึ้นบนแผ่นเจลซึ่งแสดงถึงตำแหน่งของเอนไซม์ที่ย่อยสลายไฟบริน

3.3.3.2 พีเอชและอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน

ศึกษาผลของพีเอชต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน โดยบ่มเอนไซม์บริสุทธิ์ที่พีเอชต่าง ๆ คือที่พีเอช 2 (Glycine-HCl) พีเอช 3-6 (Sodium acetate) พีเอช 7-8 (Tris-maleate) พีเอช 9-10 (Sodium hydrogen carbonate) พีเอช 12 (Glycine-NaOH) โดยทุกบัฟเฟอร์มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิโมลาร์ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำตัวอย่างของแต่ละพีเอชผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์ (พีเอช 7.4) เข้มข้น 1 โมลาร์ อย่างรวดเร็วในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เพื่อให้พีเอชของตัวอย่างเป็น 7.4 เก็บตัวอย่างในที่เย็น วิเคราะห์กิจกรรมการย่อยสลายไฟบริน ดังรายละเอียดใน 3.3.1.3. จำนวนค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity, %) โดยกำหนดให้ตัวอย่างไม่ได้บ่มที่พีเอช 7.4 มีค่าเป็น 100 %

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน โดยนำเอนไซม์บริสุทธิ์บ่มในช่วงอุณหภูมิ 10-80 องศาเซลเซียส ในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำตัวอย่างให้เย็นโดยทันที วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ตามรายละเอียดในข้อ 3.3.1.3 จำนวนค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity, %) โดยกำหนดให้ตัวอย่างที่ไม่ได้บ่มมีค่าเป็น 100 %

3.3.3.3 ผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน

วิเคราะห์กิจกรรมในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 ที่ระดับความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 0-100 มิลลิโมลาร์ ตามรายละเอียดใน 3.3.1.3 ศึกษาผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ โดยนำเอนไซม์บ่มด้วยแคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (0-100 มิลลิโมลาร์) ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นแช่ในน้ำแข็งทันที วิเคราะห์กิจกรรมที่เหลืออยู่ของเอนไซม์ตามที่ระบุใน 3.3.1.3 โดยมีแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ ในสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 ในปฏิบัติการ จำนวนค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity, %) โดยกำหนดให้ตัวอย่างที่บ่มโดยปราศจากแคลเซียมคลอไรด์มีค่าเป็น 100 %

3.3.3.4 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน

วิเคราะห์กิจกรรมในสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ คือ 0-1 โมลาร์ ตามวิธีในข้อ 3.3.1.3 การศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อเสถียรภาพ โดยนำเอนไซม์บ่มที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ คือ 0-4 โมลาร์ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแช่ในน้ำแข็งทันที วิเคราะห์กิจกรรมที่เหลืออยู่ในปฏิกิริยาที่มีแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ ในสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.4 กำหนดค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity, %) โดยกำหนดให้ตัวอย่างที่บ่มโดยปราศจากโซเดียมคลอไรด์มีค่าเป็น 100 %

3.3.3.5 ผลของสารตั้งต้นจำเพาะต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน

วิเคราะห์โดยใช้สารตั้งต้นเพปไทด์สังเคราะห์ โดยในส่วนผสมของปฏิกิริยาปริมาตร 150 ไมโครลิตร ประกอบด้วยสารตั้งต้นสังเคราะห์ต่าง ๆ คือ Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, Benz-Val-Gly-Arg-pNA, Tos-Gly-Pro-Arg-pNA, Benz-Pro-Phe-Arg-pNA, D-Val-Leu-Lys-pNA และ Benz-L-Arg-pNA เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน สารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (พีเอช 7.4) โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยา โดยเติมสารละลายกรดอะซิติก 80% ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วิเคราะห์ปริมาณของ p-Nitroaniline ที่ถูกปลดปล่อยโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร โดย p-Nitroaniline เป็นสารมาตรฐาน กำหนดให้ 1 หน่วยกิจกรรม คือปริมาณ p-Nitroaniline ที่ถูกปลดปล่อยออกมา 1 นาโนโมล ต่อนาที

3.3.3.6 ผลของสารยับยั้งและไอออนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน

ศึกษาผลของสารยับยั้งโปรติเอส Leupeptin, Trypsin inhibitor I (soybean), TLCK, TPCK, PMSF, EDTA, Bestatin, Pestatin A, E64 ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สารรีดิวซ์ (β -ME) และโลหะทรานซิชัน (CuCl_2 , CoCl_2 , FeCl_3 , MnCl_2 , และ ZnSO_4) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และสารประกอบเกลือประจุเดี่ยวและประจุคู่ (LiCl , NaCl , KCl , MgCl_2 และ CaCl_2) ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ โดยใช้สารตั้งต้น Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA ตามรายละเอียดข้อ 3.3.3.5 โดยผลของสารประกอบเกลือประจุเดี่ยวและประจุคู่ที่วิเคราะห์กิจกรรมโดยไม่มีไอออนของโซเดียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์ในปฏิกิริยา กำหนดค่ากิจกรรมที่เหลืออยู่โดยกำหนดให้ตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ศึกษามีค่าเป็น 100 %

3.3.4 การย่อยสลายไฟบรินของเอนไซม์บริสุทธิ์

เปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายไฟบรินของเอนไซม์บริสุทธิ์กับพลาสมิน โดย ส่วนผสมของปฏิกิริยาปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย เอนไซม์บริสุทธิ์ (0.05 Unit/ml) และ สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (พีเอช 7.4) โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 30, 60 และ 90 นาที ส่วนปฏิกิริยาของพลาสมินนั้นเตรียมด้วยวิธีเดียวกันโดยปราศจากแคลเซียมคลอไรด์ หยุดปฏิกิริยาด้วยการให้ความร้อนในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยด้วย SDS-PAGE ที่ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ 12.5% T

3.3.5 ความคงทนต่อการย่อยสลายโดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร

ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินหลังจากบ่มในสถานะของระบบทางเดินอาหารจำลอง โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 3 สถานะ คือ สถานะที่ 1 เอนไซม์บริสุทธิ์ถูกนำไปบ่มโดยมีเอนไซม์เพปซินเข้มข้น 4% ในบัฟเฟอร์ไกลซีนไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มครบเวลา เติมสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ที่เย็นทันทีในอัตราส่วน 1:1 เพื่อปรับให้พีเอชของตัวอย่างได้ประมาณ 7.4 สถานะที่ 2 บ่มเอนไซม์บริสุทธิ์กับเอนไซม์ทริปซินเข้มข้น 0.2% ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (Phosphate buffer saline) พีเอช 8 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาทำให้เย็น สถานะที่ 3 บ่มเอนไซม์บริสุทธิ์กับเพปซินเข้มข้น 4% ในบัฟเฟอร์ไกลซีนไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 1 โมลาร์ พีเอช 7.4 ที่เย็นในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นเติมเอนไซม์ทริปซินให้ถึงความเข้มข้น 0.2% แล้วบ่มต่อสถานะเดียวกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นรีบทำให้เย็น วิเคราะห์กิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินที่คงเหลือตามวิธี 3.3.3.5 จากนั้นทำให้เข้มข้นด้วยเยื่อกรองที่มี MWCO 30 กิโลดาลตัน และวิเคราะห์การคงอยู่ของเอนไซม์อยู่ด้วยเทคนิค Fibrin zymography ดังรายละเอียดในข้อ 3.3.2.3

3.3.6 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน

3.3.6.1 วิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของเอนไซม์

วิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธี Activity staining (Carcia-Carreno et al., 1993) โดยใช้ Native-PAGE ที่ Stacking gel เข้มข้น 4%T และ Separating gel เข้มข้น 12.5%T โดยเตรียมสารผสมระหว่างเอนไซม์บริสุทธิ์กับสารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งประกอบด้วยทริสไฮโดรคลอ-

ไรต์เข้มข้น 0.125 โมลาร์ พีเอช 6.8 กลีเซอรอลเข้มข้น 20% และ โบรโมเฟีนอลบลูเข้มข้น 0.1% ในอัตราส่วน 1:1 แยกโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis) พร้อมกับโปรตีนมาตรฐาน จากนั้นนำเจลที่ได้แช่ลงในสารตั้งต้นเคซีนเข้มข้น 2% ในสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ พีเอช 8.0 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ กระตุ้นกิจกรรมของโปรติเอสด้วยการบ่มเจลในสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นย้อมเจลด้วยสารละลาย Coomassie Brilliant Blue R-250 เข้มข้น 0.1% เมธานอลเข้มข้น 40% และกรดอะซิติกเข้มข้น 10% แอปไซ (Clear zone) แสดงถึงตำแหน่งของโปรติเอส

3.3.6.2 การวิเคราะห์กิจกรรมโปรติเอสโดยใช้โปรตีนเป็นสารตั้งต้น (Proteolytic activity)

วิเคราะห์กิจกรรมโปรติเอสในสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9 ตามรายละเอียดในข้อ 3.3.1.4

3.3.6.3 อุณหภูมิและพีเอชต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์โปรติเอส

วิเคราะห์ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมโปรติเอสในสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 10-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามรายละเอียดใน 3.3.1.4 คำนวณค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity, %) โดยกำหนดให้ตัวอย่างที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 100%

ศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของโปรติเอสในสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่าง ๆ คือ พีเอช 2 (Glycine-HCl) พีเอช 3-6 (Sodium acetate) พีเอช 7-8 (Tris-maleate) พีเอช 9-10 (Sodium hydrogen carbonate) พีเอช 12 (Glycine-NaOH) ทุกบัฟเฟอร์มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิโมลาร์ คำนวณค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity, %) โดยกำหนดให้ตัวอย่างที่พีเอช 9 มีค่าเท่ากับ 100%

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของโปรติเอสโดยบ่มเอนไซม์ในช่วงอุณหภูมิ 10-80 องศาเซลเซียส ในสารละลายบัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำตัวอย่างให้เย็นทันที วิเคราะห์กิจกรรมคงเหลือตามรายละเอียด 3.3.6.2 คำนวณค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity, %) โดยกำหนดให้ตัวอย่างที่ไม่ได้บ่มมีค่าเป็น 100 %

ศึกษาผลของพีเอชต่อเสถียรภาพของโปรติเอส โดยบ่มเอนไซม์ที่พีเอชต่าง ๆ ประกอบด้วย พีเอช 2 (Glycine-HCl) พีเอช 3-6 (Sodium acetate) พีเอช 7-8 (Tris-maleate) พีเอช 9-10 (Sodium hydrogen carbonate) พีเอช 12 (Glycine-NaOH) ทุกบัฟเฟอร์มีความเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิโมลาร์ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 1 โมลาร์

พีเอช 9 อย่างรวดเร็ว ด้วยอัตราส่วน 1:1 เพื่อให้พีเอชของตัวอย่างเป็น 9 แล้วทำให้เย็น วิเคราะห์กิจกรรมของโปรตีนที่เหลืออยู่ตาม 3.3.6.2 คำนวณค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity, %) โดยกำหนดให้ตัวอย่างที่ไม่ได้บ่มมีค่าเป็น 100 %

3.3.6.4 ผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์โปรตีน

วิเคราะห์กิจกรรมในสารละลายบัฟเฟอร์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9 ที่ระดับความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ต่าง ๆ กัน คือ 0-100 มิลลิโมลาร์ ตามรายละเอียดใน 3.3.6.2 ศึกษาผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อเสถียรภาพ โดยบ่มเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ในระดับ 0-100 มิลลิโมลาร์ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา ทำตัวอย่างให้เย็นโดยทันที จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมที่เหลืออยู่ของเอนไซม์บริสุทธิ์ตาม 3.3.6.2 โดยปฏิกิริยามีแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9 คำนวณค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity, %) โดยกำหนดให้ตัวอย่างที่บ่มโดยปราศจากแคลเซียมคลอไรด์มีค่าเป็น 100 %

3.3.6.5 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของโปรตีน

วิเคราะห์ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0-4 โมลาร์ ตามรายละเอียดในข้อ 3.3.6.2 สำหรับผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อเสถียรภาพ บ่มเอนไซม์ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ คือ 0-4 โมลาร์ พีเอช 9 ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำตัวอย่างให้เย็นทันที วิเคราะห์กิจกรรมตามรายละเอียดใน 3.3.6.2 โดยปฏิกิริยามีแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9 คำนวณค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity, %) โดยกำหนดให้ตัวอย่างที่บ่มโดยปราศจากโซเดียมคลอไรด์มีค่าเป็น 100%

นอกจากนี้ศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของโปรตีน โดยใช้สารตั้งต้น Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA ที่มีระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ คือ 0-4 โมลาร์ วิเคราะห์กิจกรรมตามรายละเอียดในข้อ 3.3.6.7 คำนวณค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity, %) โดยกำหนดให้ตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ มีค่าเป็น 100 %

3.3.6.6 เสถียรภาพของโปรตีนที่ 37 องศาเซลเซียส ต่อกิจกรรมของโปรตีน

ศึกษาเสถียรภาพของโปรตีน โดยบ่มเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 4, 8, 12 และ 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ประกอบด้วยแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์

0.5 โมลาร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9 เมื่อบ่มครบเวลา ทำตัวอย่างให้เย็นทันที จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมตามรายละเอียดในข้อ 3.3.6.2 โดยวิเคราะห์ในสถานะที่เอนไซม์เร่งกิจกรรมได้สูงสุดซึ่งมีแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9 คำนวณค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ (Relative activity, %) โดยกำหนดให้ตัวอย่างที่ไม่บ่มมีค่าเป็น 100 %

3.3.6.7 ผลของสารตั้งต้นจำเพาะต่อกิจกรรมของโปรติเอส

ในปริมาตรของปฏิกิริยา 150 ไมโครลิตร ประกอบด้วยสารตั้งต้นสังเคราะห์ต่าง ๆ คือ Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA, Tos-Gly-Pro-Arg-pNA, D-Val-Leu-Lys-pNA และ Benz-L-Arg-pNA เอนไซม์บริสุทธิ์ สารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9 โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จากนั้นบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยเติมกรดอะซิติก 80% ปริมาตร 100 ไมโครลิตร วิเคราะห์ปริมาณ p-Nitroaniline ที่ถูกปลดปล่อยโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร กำหนดให้ 1 หน่วยกิจกรรม คือปริมาณสาร p-Nitroaniline ที่ถูกปลดปล่อยออกมา 1 นาโนโมลต่อนาที

3.3.6.8 ผลของสารยับยั้งและไอออนต่อกิจกรรมของโปรติเอส

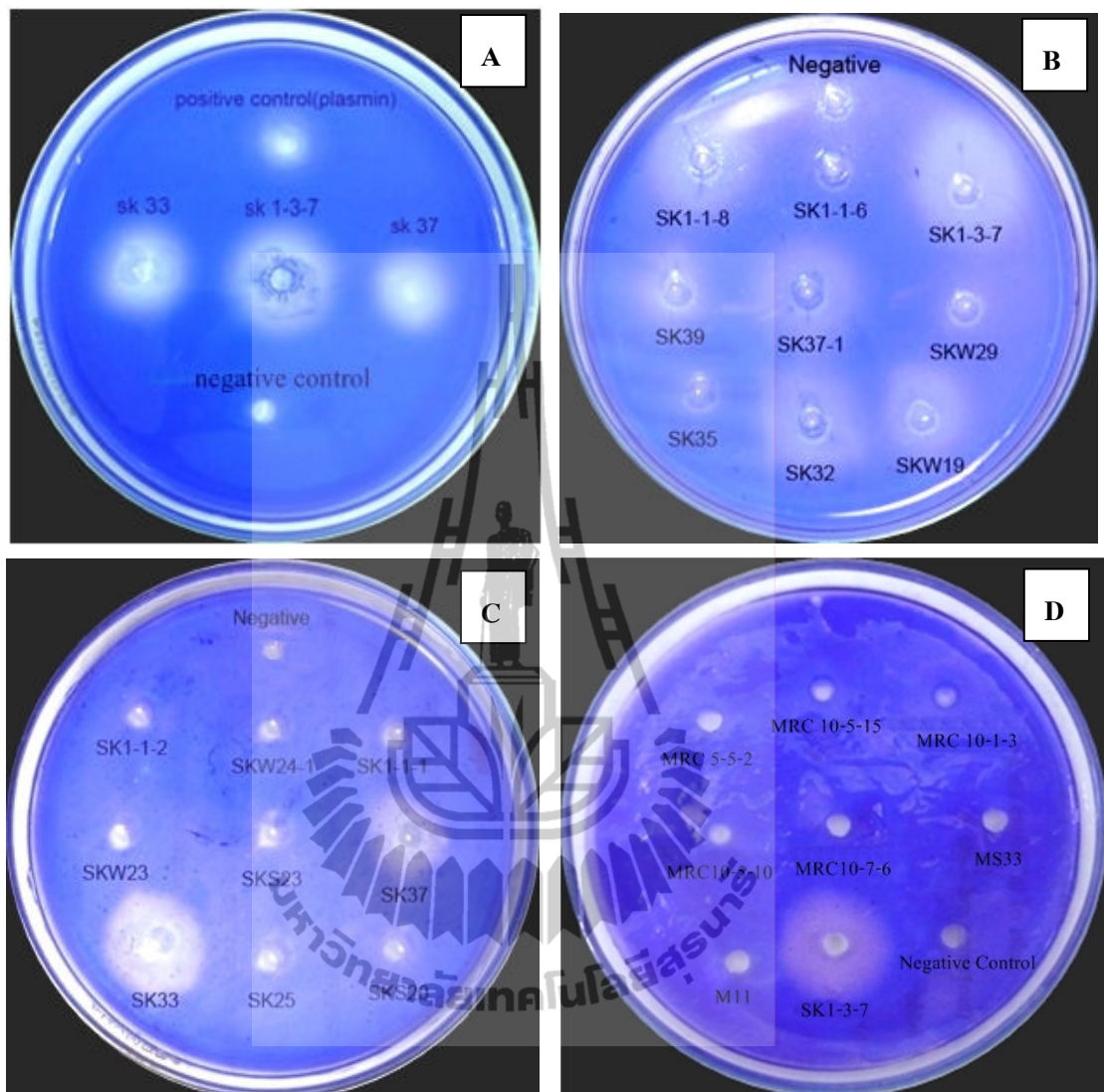
ศึกษาผลของสารยับยั้งโปรติเอส Leupeptin, Trypsin inhibitor I (soybean), TLCK, TPCK, PMSF, EDTA, Bestatin, Pestatin A, E64 ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สารรีดิวซ์ (β -ME) และโลหะทรานซิชัน (CuCl_2 , CoCl_2 , FeCl_3 , MnCl_2 , และ ZnSO_4) ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และสารประกอบเกลือประจุเดี่ยวและประจุคู่ (LiCl_2 , NaCl , KCl , MgCl_2 และ CaCl_2) ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยใช้สารตั้งต้น Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA ตามรายละเอียดในข้อ 3.3.6.7 โดยผลของสารประกอบเกลือประจุเดี่ยวและประจุนั้น วิเคราะห์กิจกรรมโดยไม่มีไอออนของโซเดียมคลอไรด์และแคลเซียมคลอไรด์ในปฏิกิริยา คำนวณค่ากิจกรรมที่เหลืออยู่โดยกำหนดให้ตัวอย่างที่ไม่มีสารที่ศึกษามีค่าเป็น 100 %

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การเปรียบเทียบกิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินและโปรตีนที่ผลิตจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 กับแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำปลา

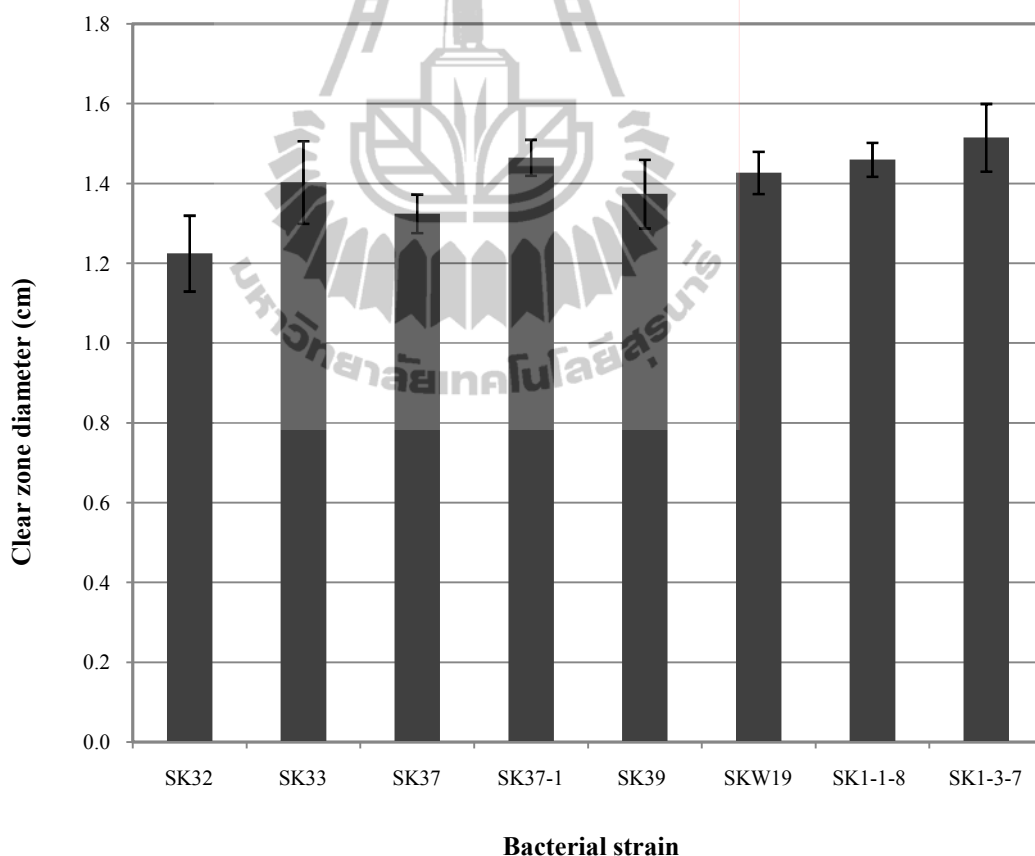
รูปที่ 4.1 แสดงส่วนใสที่เกิดจากการย่อยไฟบรินบนอาหารวุ้นของเอนไซม์จากแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมด 25 ไอโซเลท ซึ่งพบว่า *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 เป็นไอโซเลทที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินสูงสุดจากทั้งหมด 25 ไอโซเลท โดยส่วนใสที่เกิดขึ้นบนอาหารวุ้นไฟบรินมีขนาด 1.47 เซนติเมตร (รูปที่ 4.2) ความสามารถในการย่อยสลายไฟบรินพบเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม *Virgibacillus* sp. จำนวน 8 ไอโซเลทเท่านั้น ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มอื่น ๆ ที่ศึกษา ได้แก่ *Staphylococcus* sp., *Corynebacterium* sp., *Tetragenococcus halophilus* และ *Brevibacterium* sp. ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินได้ มีรายงานเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน ได้แก่ *Staphylococcus aureus* เชื่อดังกล่าวเป็นที่รู้จักตั้งแต่ปี ค.ศ. 1948 เป็นเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินที่มีชื่อว่าสแตปฟีโลไคเนส (Staphylokinase) โดยทำหน้าที่เปลี่ยนพลาสมิโนเจนเป็นพลาสมิน ซึ่งพลาสมินทำหน้าที่ในการย่อยสลายไฟบริน (Collen and Lijnen, 1991) แต่ผลการศึกษานี้พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Staphylococcus* sp. ที่คัดแยกได้จากน้ำปลานั้น ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินที่มีชื่อว่านัตโตไคเนส (Nattokinase) ซึ่งผลิตจาก *B. natto* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์นัตโต และถูกค้นพบครั้งแรกโดย Sumi et al. (1987) เอนไซม์นี้มีศักยภาพในการย่อยสลายไฟบรินได้สูงกว่าพลาสมิน ต่อมาเอนไซม์นัตโตไคเนสจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากลิ่มเลือด ยิ่งไปกว่านั้นยังมีรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินที่ผลิตจากแบคทีเรีย ซึ่งพบได้ในผลิตภัณฑ์อาหารโปรตีนหมัก ได้แก่ *B. subtilis* DC33 และ *B. amyloliquefaciens* DC-4 ซึ่งคัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักของประเทศจีน เรียกว่า Douchi (Wang et al., 2006; Peng et al., 2002) *Bacillus* sp. KA38 คัดแยกได้จากปลาหมักของประเทศเกาหลีที่เรียกว่า Jeotgal (Kim et al., 1997) *Bacillus* sp. CK11-4 คัดแยกได้จากถั่วเหลืองหมักของประเทศเกาหลี เรียกว่า Chungkook-jang (Kim et al., 1996)



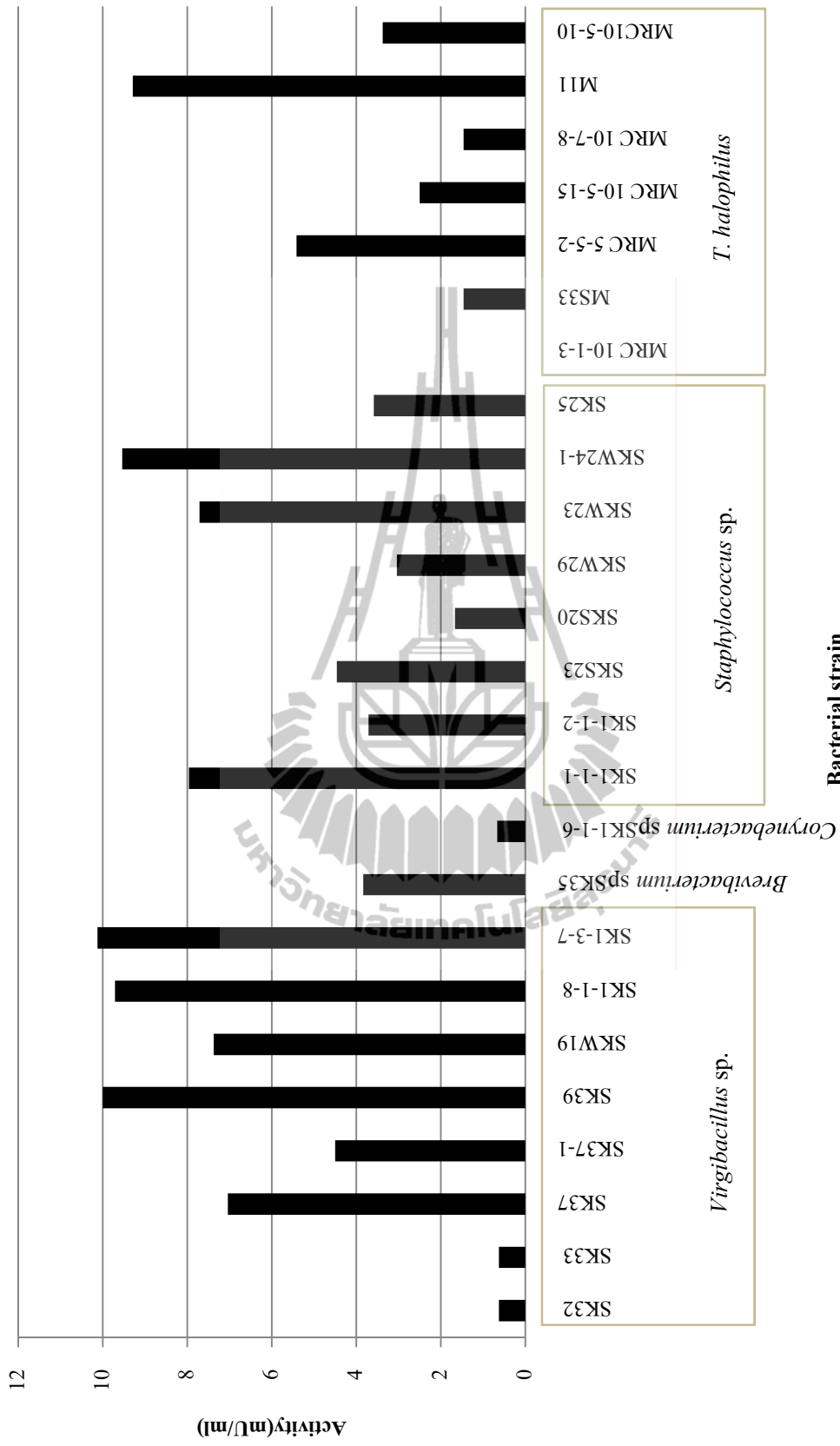
รูปที่ 4.1 รูปแบบของการย่อยสลายไฟบรินของ 25 ไอโซเลท รหัสในรูปคือ รหัสโคโลนีของ 3 ไอโซเลท Negative control คือ อาหารเหลวยีสต์สกัด Positive control คือ พลาสมิน (A), รหัสโคโลนีของ 9 ไอโซเลท Negative control คือ อาหารเหลวยีสต์สกัด (B, C) และ รหัสโคโลนีของ 9 ไอโซเลท Negative control คือ MRS (D)

เมื่อพิจารณากิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนโดยใช้เอโซเคซีน (Azocasin) เป็นสารตั้งต้น พบว่า *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 สามารถแสดงกิจกรรมการย่อยเอโซเคซีนได้สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียทั้งหมด 25 ไอโซเลท (รูปที่ 4.3) ผลการศึกษานี้พบว่าแบคทีเรียทั้ง 25 ไอโซเลทที่ใช้ในการศึกษานั้นสามารถหลั่งโปรตีนออกมานอกเซลล์ได้ ยกเว้นแบคทีเรียกรดแล็กติก *T. halophilus* MRC10-1-3 ซึ่งไม่สามารถผลิตโปรตีนที่หลั่งออกมานอกเซลล์ได้

(Extracellular enzyme) ในขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* สามารถผลิตโปรตีนที่หลั่งออกมาออกเซลล์ สอดคล้องกับโปรตีนในกลุ่มซบทีลิสซันที่หลั่งออกมาออกเซลล์จาก *Virgibacillus* sp. 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Virgibacillus* sp. SK37 และ SK33 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ถูกกระตุ้นกิจกรรมด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ (Sinsuwan et al., 2007; 2008a; 2010a; 2010b; Phommao et al., 2011) นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับโปรตีนที่หลั่งออกมาออกเซลล์จากแบคทีเรีย ได้แก่ *Halobacillus thailandensis* sp. nov. ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากน้ำปลา (Chaiyanan et al., 1999) โปรตีนที่ผลิตจาก *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* หรือ *B. lentus* (Ballinger and Wells, 1998) *Brevibacterium linens* ATCC 9174 (Ratray et al., 1997) ผลการศึกษานี้ยังพบว่าทั้งแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus* sp., *Brevibacterium* sp., *Corynebacterium* sp. และ *T. halophilus* สามารถหลั่งโปรตีนออกมาออกเซลล์ ยกเว้น *T. halophilus*. MRC10-1-3 (รูปที่ 4.3) อาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรีย



รูปที่ 4.2 เส้นผ่านศูนย์กลางของส่วนใสที่เกิดจากการย่อยสลายไฟบรินในอาหารวุ้นด้วยเอนไซม์สกัดจากแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. ที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลา



รูปที่ 4.3 กิจกรรมการย่อยสลายเอโซเคซีน โดยเอ็นไซม์สกัดจากแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากกระบวนการหมักน้ำตาล

แล็กติก *T. halophilus* MRC10-1-3 ผลิตเฉพาะโปรติเอสที่ตรึงอยู่ภายในเซลล์เท่านั้นหรือไม่มีการสร้างโปรติเอสเลยและผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตโปรติเอสและเอนไซม์ย่อยไฟบรินได้สูง ดังนั้นจึงได้คัดเลือกแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 มาศึกษาคุณลักษณะคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินและโปรตีน ซึ่งในการศึกษานี้เป็นรายงานแรกที่ศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจาก *Virgibacillus* sp. ที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลา

4.2 คุณลักษณะของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7

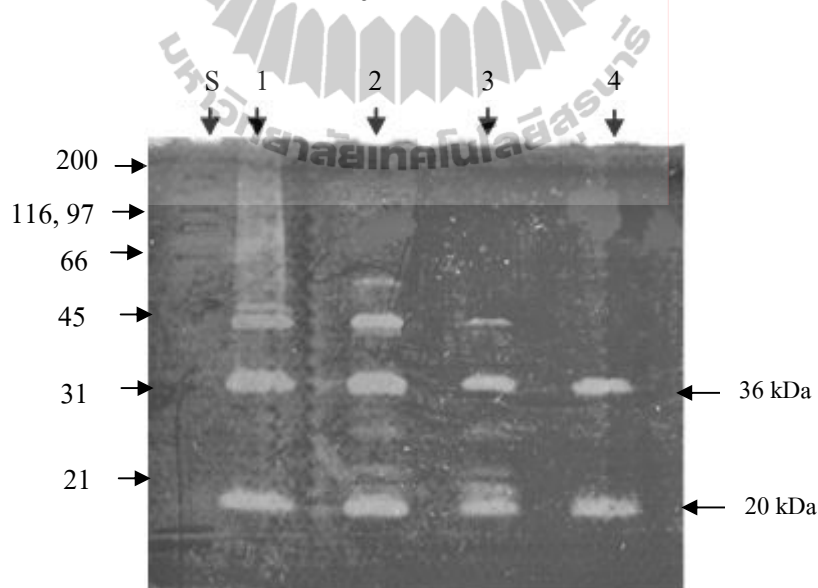
4.2.1 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน

เพื่อให้เกิดองค์ความรู้เกี่ยวกับเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน จึงทำบริสุทธิ์เอนไซม์และศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 เมื่อนำเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินมาทำบริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 25.6 เท่า แต่มีปริมาณผลผลิต (Yield) เพียง 1.2% (ตารางที่ 1) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ในแต่ละขั้นตอนมีการกำจัดเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินออกจึงส่งผลให้ผลผลิตที่ได้ลดลงอย่างมาก ซึ่งในแต่ละขั้นตอนจะตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์และตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ด้วยเทคนิค Fibrin zymogram เป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อนำเอนไซม์ผ่านคอลัมน์ phenyl-Sepharose พบว่า ปริมาณผลผลิตที่ได้ลดลงเหลือเพียง 2.4% เนื่องจากว่า *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 หลั่งเอนไซม์ออกมามากมาย

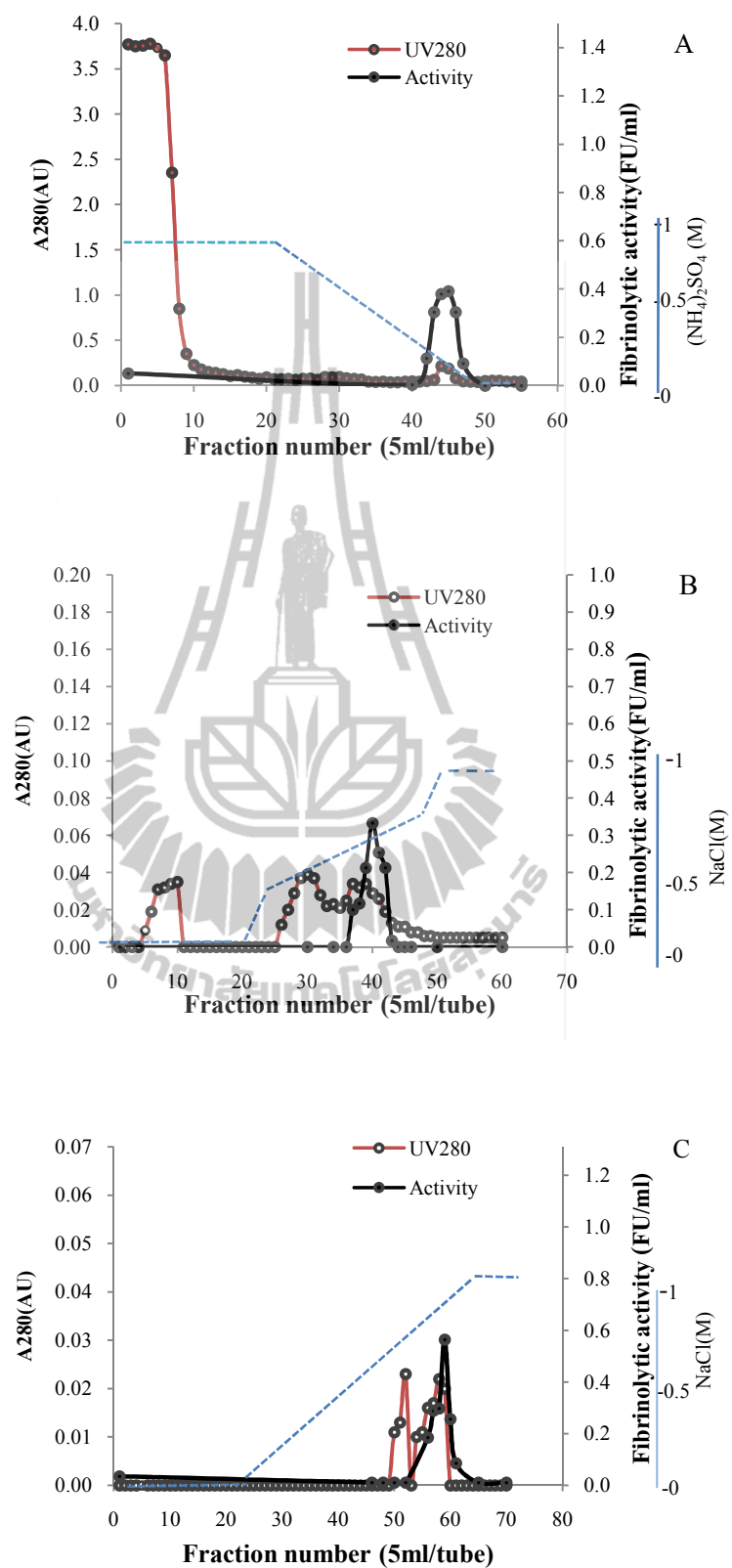
ตารางที่ 4.1 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินที่ผลิตจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7

| Step of purification | Volume (ml) | Total protein (mg) | Total unit activity (U) | Specific activity (U/mg protein) | Fold | Yield (%) |
|--|-------------|--------------------|-------------------------|----------------------------------|------|-----------|
| Crude proteinase | 500 | 69.77 | 260.4 | 3.7 | 1.0 | 100.0 |
| Crude in 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ | 500 | 27.83 | 122.9 | 4.4 | 1.2 | 47.2 |
| Phenyl-Sepharose | 20 | 0.79 | 6.3 | 8.0 | 2.1 | 2.4 |
| DEAE- Sephacel | 40 | 0.20 | 11.2 | 54.7 | 14.7 | 4.3 |
| Source Q | 15 | 0.03 | 3.3 | 95.5 | 25.6 | 1.2 |

หลายชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวยีสต์สกัด (รูปที่ 4.4 แถวที่ 1) เมื่อสังเกตแถบของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินที่ผ่านคอลัมน์ phenyl-Sepharose (รูปที่ 4.4 แถวที่ 2) จะเห็นได้ว่าคอลัมน์ไฮโดรโฟบิกสามารถกำจัดเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินที่มีขนาดโมเลกุลสูงกว่า 60 กิโลดาลตัน ออกไปได้ อย่างมากส่งผลให้ผลผลิตที่ได้ลดลง แต่ค่าความบริสุทธิ์ (Fold) เพิ่มขึ้นเพียง 2.1 เท่า เนื่องจากกำจัดโปรตีนปนเปื้อนได้เพียงเล็กน้อย ปริมาณโปรตีนที่วัดได้เป็นปริมาณโปรตีนซึ่งผลิตจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 เท่านั้น เนื่องจากอาหารเหลวยีสต์สกัดที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมีองค์ประกอบสำคัญเพียงเพปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโน ซึ่งไม่สามารถตรวจวัดปริมาณโปรตีนได้ จะเห็นได้ว่าเมื่อผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ไฮโดรโฟบิก โปรตีนเอสถูกชะออกมาในช่วงท้ายของการแยก (รูปที่ 4.5A) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์มีความไม่บริสุทธิ์สูง อย่างไรก็ตาม เมื่อเอนไซม์ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ไฮโดรโฟบิก พบว่าค่าความบริสุทธิ์ที่ได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย จึงทำบริสุทธิ์เอนไซม์ต่อด้วยเทคนิคการแยกด้วยตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (Anion exchanger) โดยนำเอนไซม์ผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel ซึ่งเอนไซม์ถูกแยกออกมาในช่วงกลางของการแยก (รูปที่ 4.5B) และพบว่าเทคนิคนี้ให้ค่าความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นจาก 2.1 เท่า เป็น 14.7 เท่า (ตารางที่ 4.1) เมื่อเปรียบเทียบแถบกิจกรรมการย่อยไฟบรินจากตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ phenyl-Sepharose (รูปที่ 4.4 แถวที่ 2) กับตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel (รูปที่ 4.4 แถวที่ 3) พบว่าการแยกโปรตีนด้วยคอลัมน์



รูปที่ 4.4 รูปแบบของเอนไซม์ วิเคราะห์โดย SDS-fibrin zymogram; Crude enzyme (1), เอนไซม์จากการทำบริสุทธิ์โดย phenyl-Sepharose (2), DEAE-Sephacel (3) และ Source Q (4) S คือ โปรตีนมาตรฐาน



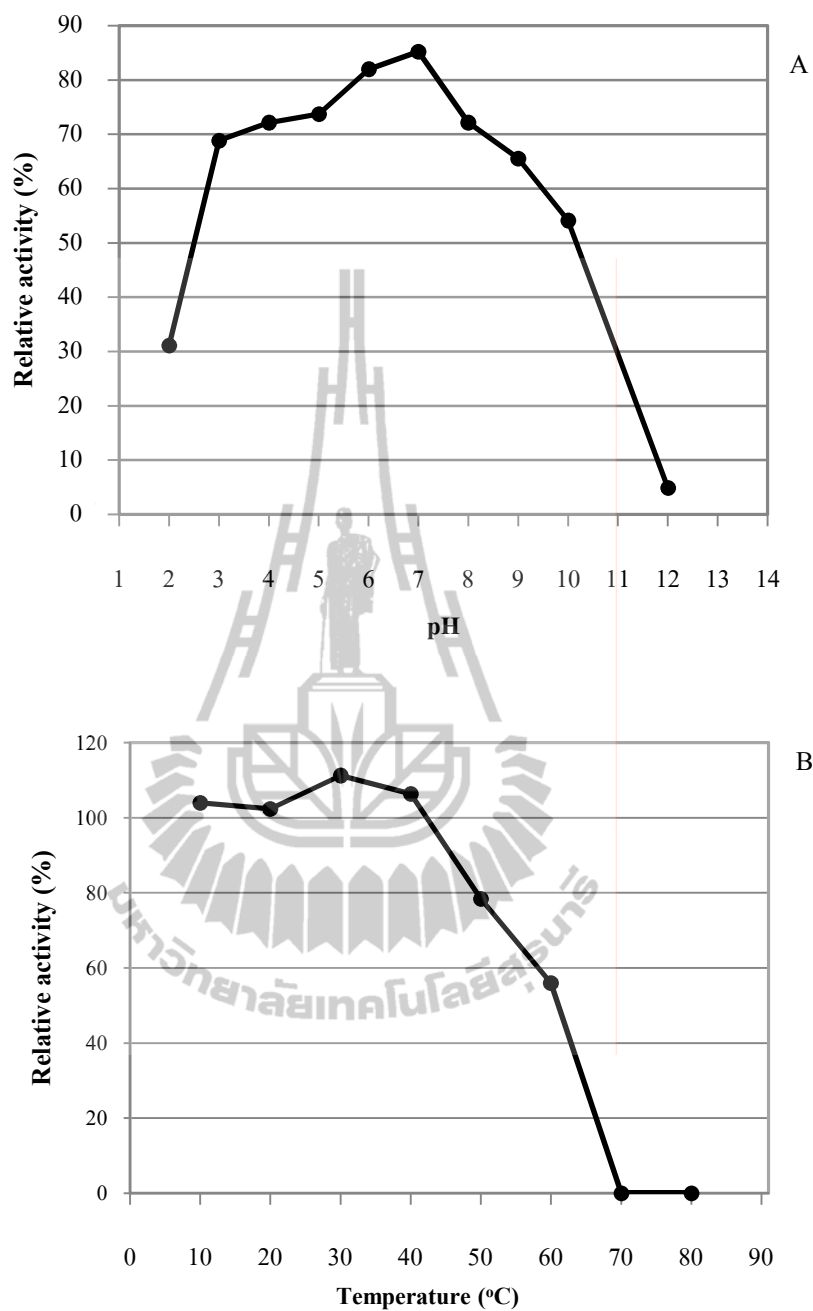
รูปที่ 4.5 การทำบริสุทธิ์ด้วย phenyl-Sepharose (A), DEAE-Sepacel (B) และ Source Q (C)

DEAE-Sephacel สามารถกำจัดเอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณ 41 กิโลดาลตัน ออกไปได้เพียงบางส่วน อย่างไรก็ตามเทคนิคดังกล่าวยังไม่สามารถกำจัดโปรตีนปนเปื้อนได้มากเท่าที่ควร เพื่อเพิ่มค่าความบริสุทธิ์จึงนำเอนไซม์มาทำบริสุทธิ์ต่อด้วยเทคนิคการแลกเปลี่ยนประจุลบอีกครั้งโดยใช้ตัวกลาง Source30Q เนื่องจากเรซิน Source30Q มีแรงยึดระหว่างประจุสูง ดังนั้นเอนไซม์จึงถูกชะออกมาในช่วงท้ายของการแยก (รูปที่ 4.5C) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์มีประจุลบสูงสามารถจับกับเรซินอย่างเหนียวแน่น ด้วยเหตุนี้จึงแยกโปรตีนเอสตัวอื่น ๆ ออกไปได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามโปรตีนที่ถูกแยกออกป็นนั้นเป็นเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน ดังนั้นผลผลิตที่ได้จึงมีค่าต่ำ โปรตีนที่แยกได้ด้วยคอลัมน์ Source30Q มีเพียงสองแถบมีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 20 และ 36 กิโลดาลตัน (รูปที่ 4.4 แถวที่ 4) ทั้งนี้มีรายงานขนาดโมเลกุลของพลาสมินและนัตโตเคนสซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินคือ 84 และ 28 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (Novokhatny et al., 2003; Fujita et al., 1993) และมีรายงานขนาดโมเลกุลเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินที่ผลิตได้จาก *Bacillus* ซึ่งอยู่ในช่วง 27-41 กิโลดาลตัน (Kim et al., 1996; Change et al., 2000; Jeong et al., 2001; Kim et al., 1997; Peng et al., 2003; Wang et al., 2009) ในขณะที่เอนไซม์ที่มีขนาด 20 และ 21 กิโลดาลตัน ได้จาก *Pseudomonas* sp. (Wang et al., 2006) และเอนไซม์ขนาด 35 กิโลดาลตัน ได้จาก *Streptomyces* sp. (Simkhada et al., 2010)

4.2.2 คุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7

4.2.2.1 พีเอชและอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์

เอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินมีเสถียรภาพในช่วงพีเอชค่อนข้างกว้างคือ 4-10 (รูปที่ 4.6A) เอนไซม์สูญเสียเสถียรภาพที่สภาวะความเป็นกรดและด่างรุนแรง (รูปที่ 4.6A) อย่างไรก็ตามเอนไซม์ยังคงแสดงเสถียรภาพที่สภาวะเป็นกรดสูงที่พีเอช 2 โดยคงมีกิจกรรมเหลืออยู่ประมาณ 31% และเอนไซม์บริสุทธิ์สูญเสียกิจกรรมอย่างสมบูรณ์ที่พีเอช 12 การสูญเสียเสถียรภาพของเอนไซม์เนื่องจากพีเอชกรดและด่างส่งผลให้เอนไซม์เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ เอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 มีเสถียรภาพที่พีเอชกว้างกว่าเอนไซม์นัตโตเคนสและเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินที่ผลิตจาก *Streptomyces* sp. CS684 ซึ่งเอนไซม์มีความเสถียรในช่วงพีเอช 6-9 (Wang et al., 2009; Simkhada et al., 2010) นอกจากนี้เอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. KA38 และ *Pseudomonas* sp. TK015 แสดงเสถียรภาพที่พีเอชในช่วงค่อนข้างกว้างคือ พีเอช 4-11 (Kim et al., 1997; Wang et al., 2009) อุณหภูมิมีผลต่อการสูญเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นพันธะที่เสถียร โครงสร้างโปรตีนจะถูกทำลาย ส่งผลให้เอนไซม์เกิดการสูญเสียกิจกรรมขึ้น การศึกษาอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน พบว่าเอนไซม์มี



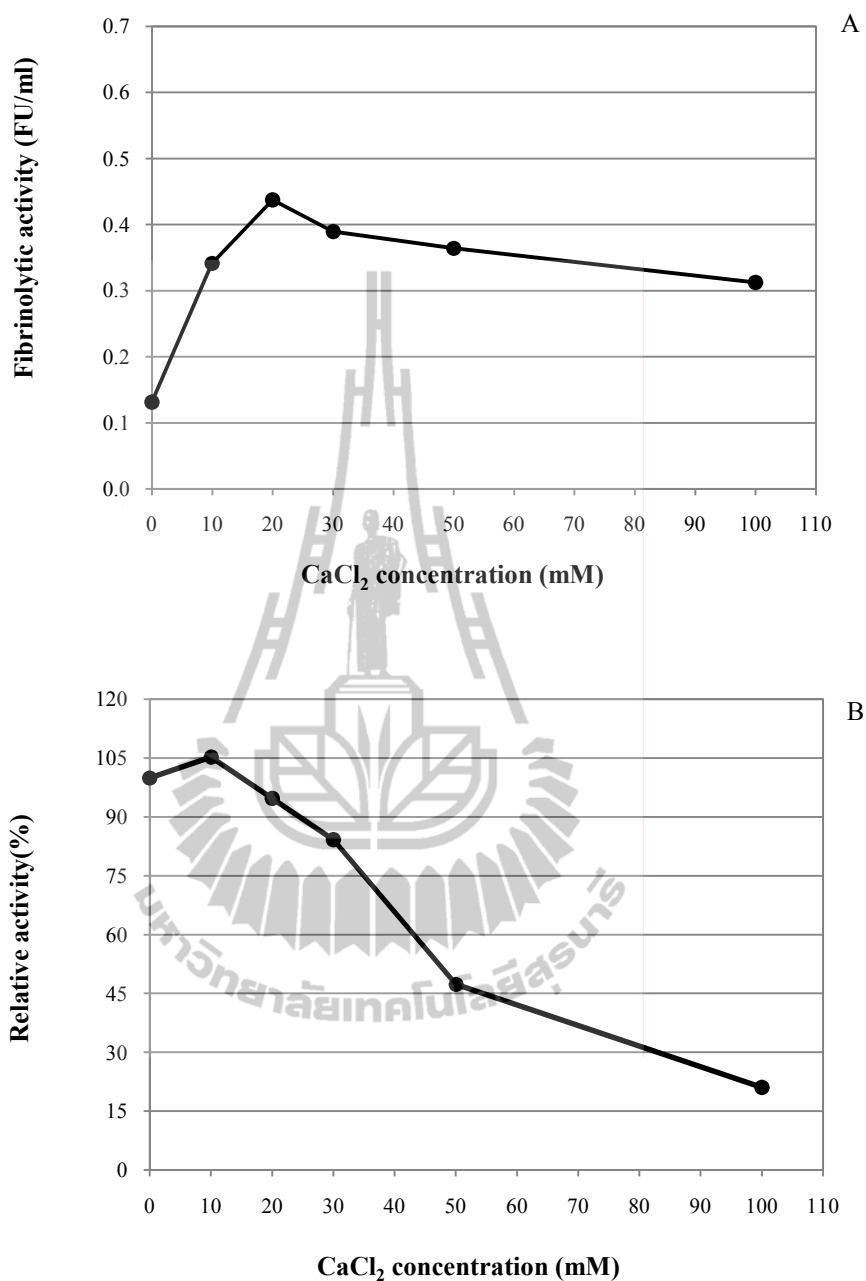
รูปที่ 4.6 ผลของพีเอช (A) และอุณหภูมิ (B) ต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ผลของพีเอชศึกษาโดยบ่มเอนไซม์ที่ค่าพีเอชต่าง ๆ (พีเอช 2-12) ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ผลของอุณหภูมิจากศึกษาโดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (10-80 องศาเซลเซียส) ที่พีเอช 7.4 เป็นเวลา 60 นาที วิเคราะห์กิจกรรมของตัวอย่างทั้งหมดที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

เสถียรภาพสูงในช่วง 10-40 องศาเซลเซียส และยังคงแสดงกิจกรรมได้สูงที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส โดยมีค่ากิจกรรมที่เหลืออยู่ถึง 78 และ 56% ตามลำดับ (รูปที่ 4.6B) เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นกว่า 60 องศาเซลเซียส มีผลทำให้เอนไซม์สูญเสียเสถียรภาพ โดยสูญเสียเสถียรภาพอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* เช่น *B. amyloliquefaciens* AN6, *B. subtilis* KCK-7 และ *B. subtilis* A26 (Agrebi et al., 2010; Agrebi et al., 2009; Paik et al., 2004) จะเห็นได้ว่าเอนไซม์จากเชื้อ *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 มีเสถียรภาพที่อุณหภูมิสูงกว่าเอนไซม์น้ำตาลโคเคนสซึ่งมีเสถียรภาพที่ 30-50 องศาเซลเซียส (Wang et al., 2009) และผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์บริสุทธิ์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 สามารถทนความร้อนในระดับหนึ่ง การรักษาเสถียรภาพของเอนไซม์จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องควบคุมอุณหภูมิไม่ให้สูงเกิน 60 องศาเซลเซียส

4.2.2.2 ผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์

กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ถูกกระตุ้นด้วยแคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ซึ่งเป็นระดับที่เอนไซม์แสดงกิจกรรมได้สูงสุด โดยมีค่ากิจกรรมเพิ่มขึ้นเป็น 3 เท่า เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีแคลเซียมคลอไรด์ (รูปที่ 4.7A) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์มีความจำเป็นต้องใช้แคลเซียมคลอไรด์สำหรับการกระตุ้นกิจกรรมเนื่องจากแคลเซียมไอออนอาจส่งเสริมให้โครงสร้างของเอนไซม์มีความยืดหยุ่น (Flexible) ซึ่งส่งผลให้เอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงรูป (Conformation) ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาได้ เอนไซม์ที่หั่นออกนอกเซลล์จาก *Virgibacillus* sp. SK37 และ *Virgibacillus* sp. SK33 ต้องการแคลเซียมคลอไรด์เพื่อเร่งกิจกรรมเช่นเดียวกับเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 โดยเอนไซม์แสดงกิจกรรมได้สูงสุดที่แคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 100 และ 50 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (Sinsuwan et al., 2007, 2008a, 2010b)

เมื่อศึกษาผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์มีความเสถียรที่ระดับความเข้มข้น 0 ถึง 30 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.7B) และเอนไซม์บริสุทธิ์สูญเสียเสถียรภาพอย่างสมบูรณ์ที่ระดับแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ซึ่งสอดคล้องกับเอนไซม์หั่นออกนอกเซลล์จาก *Virgibacillus* sp. SK37 และ *Virgibacillus* sp. SK33 เอนไซม์ดังกล่าวมีเสถียรภาพที่แคลเซียมคลอไรด์มีความเข้มข้นต่ำกว่า 20 มิลลิโมลาร์ (Phrommao et al., 2011; Sinsuwan et al., 2007) เอนไซม์เกิดการสูญเสียเสถียรภาพ เนื่องจากแคลเซียมคลอไรด์เป็นสารประกอบเกลือที่มีผลลดเสถียรภาพของเอนไซม์ โดยมีผลทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างน้ำที่ล้อมรอบโปรตีน มีผลทำให้การจับตัวระหว่างน้ำที่ล้อมรอบโปรตีนลดลงส่งผลให้เอนไซม์



รูปที่ 4.7 ผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรม (A) และเสถียรภาพ (B) ของเอนไซม์บริสุทธิ์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอช 7.4 ที่ 37 องศาเซลเซียส ศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์โดยบ่มเอนไซม์ก่อนที่ระดับแคลเซียมคลอไรด์ต่าง ๆ (0-100 มิลลิโมลาร์) พีเอช 7.4 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส และตรวจวัดกิจกรรมที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยมีแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์

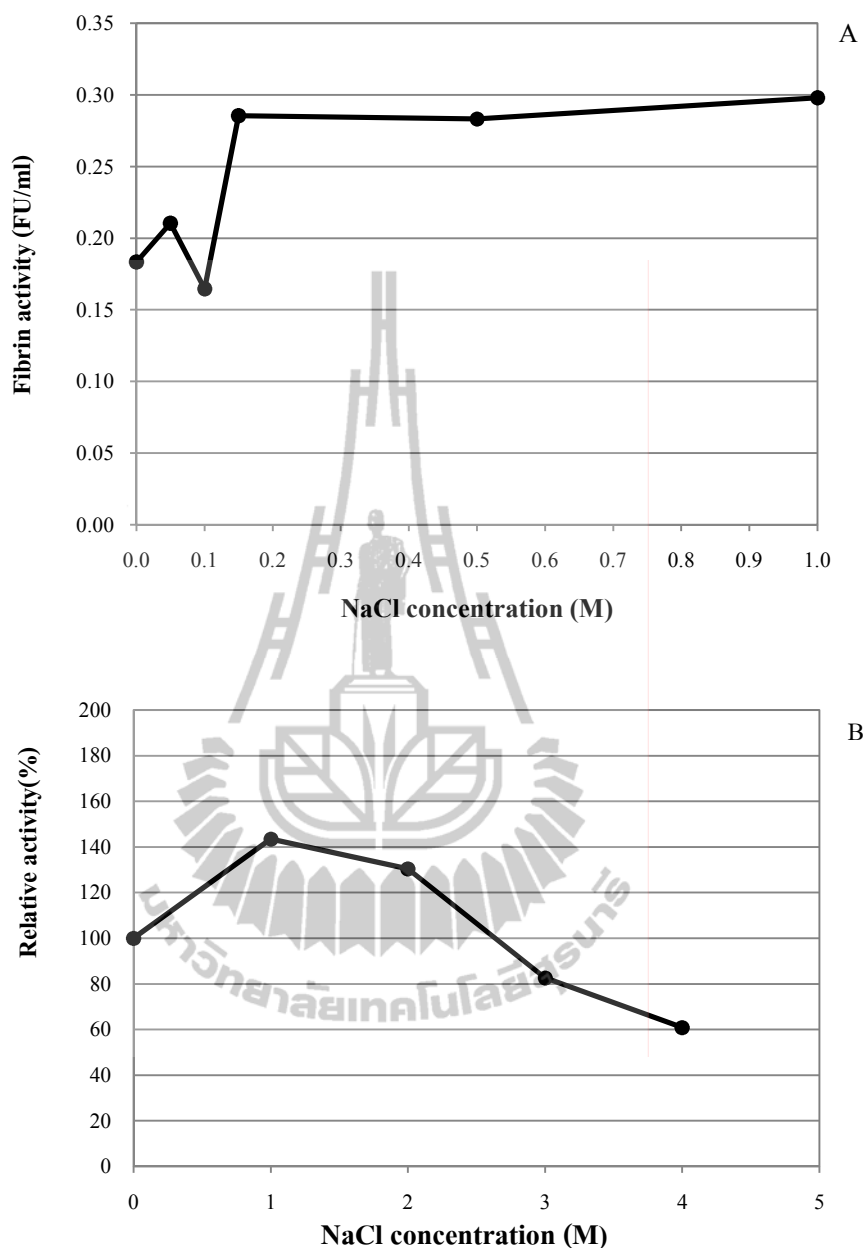
ของน้ำเพิ่มขึ้น และอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกภายในโมเลกุลลดลง โปรตีนจึงมีแนวโน้มที่จะเปิดตัวออกเกิดการสูญเสียโครงสร้างธรรมชาติในที่สุด (Boye, Ma, and Harwalker, 1997)

4.2.2.3 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์

จากการศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์บริสุทธิ์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์บริสุทธิ์ถูกเร่งด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นมากกว่า 0.15 โมลาร์ และยังคงแสดงกิจกรรมสูงเช่นนี้ไปจนถึงระดับความเข้มข้น 1 โมลาร์ (รูปที่ 4.8A) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ถูกกระตุ้นด้วยโซเดียมคลอไรด์ โดยโซเดียมคลอไรด์อาจส่งเสริมการเข้าจับเอนไซม์ของสารตั้งต้น (Page and Cera, 2006) การศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมที่ระดับความเข้มข้น 0-1 โมลาร์ เนื่องจากปฏิกิริยาการสลายไฟบรินเกิดขึ้นในร่างกายโดยมีความเข้มข้นไอออนโซเดียมโดยประมาณ 0.15 โมลาร์ ดังนั้นจึงมุ่งเน้นศึกษาที่ระดับของโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นไม่เกิน 1 โมลาร์

เมื่อศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อเสถียรภาพของเอนไซม์บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์มีเสถียรภาพสูงที่เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-2 โมลาร์ (รูปที่ 4.8B) เอนไซม์คงเหลือกิจกรรมถึง 80% และ 60% ที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 3 และ 4 โมลาร์ ตามลำดับ ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์มีความเสถียรสูงในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK37 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีเสถียรภาพในช่วงความเข้มข้นเกลือที่กว้างตั้งแต่ 0 ถึง 30% (Phrommao et al., 2011) ยิ่งไปกว่านั้น Sinsuwan et al. (2010) ได้รายงานเกี่ยวกับเอนไซม์บริสุทธิ์จาก *Virgibacillus* sp. SK33 ซึ่งแสดงกิจกรรมเพิ่มสูงขึ้นถึง 2.5 เท่า ในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นสูงตั้งแต่ 10% จนถึง 25% เป็นที่น่าสังเกตว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ผลิตจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 มีกิจกรรมเพิ่มขึ้นเมื่อบ่มเอนไซม์ที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 โมลาร์ การบ่มเอนไซม์ด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง อาจมีผลเหนี่ยวนำทำให้โครงรูปของเอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลงเอื้ออำนวยให้บริเวณเร่งและบริเวณจับและหมู่ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาอยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสม เอนไซม์มีเสถียรภาพลดลงเมื่อระดับของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงมากกว่า 2 โมลาร์ สาเหตุที่เสถียรภาพของเอนไซม์ลดลง อาจเนื่องมาจากปรากฏการณ์ salting out ส่งผลให้เอนไซม์เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ

มีรายงานเกี่ยวกับบทบาทของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน เช่น Kim and Choi (2001) รายงานว่าเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินบริสุทธิ์ซึ่งผลิตจาก *B. amyloliquefaciens* DJ4 สามารถเร่งกิจกรรมในสภาวะที่มีเกลือและถูกกระตุ้นด้วยเกลือ



รูปที่ 4.8 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรม (A) และเสถียรภาพ (B) ของเอนไซม์บริสุทธิ์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ศึกษาผลต่อกิจกรรมที่พีเอช 7.4 ที่ 37 องศาเซลเซียส และศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์โดยบ่มเอนไซม์ที่ระดับโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ (0-4 โมลาร์) ที่พีเอช 7.4 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส และตรวจวัดกิจกรรม ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยมีแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์

โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5% โดยส่วนใหญ่โปรตีนที่ผลิตจากแบคทีเรียกลุ่มชอบเกลือสูงและชอบเกลือปานกลางจำเป็นต้องมีเกลือโซเดียมคลอไรด์เพื่อเร่งกิจกรรม โดยเอนไซม์ชอบเกลือไม่สามารถแสดงกิจกรรมได้ในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่ำหรือไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ เนื่องจากเอนไซม์จะเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ (Kim and Kim 2005; Uchida et al., 2004) แต่จากผลการศึกษานี้ พบว่าเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินยังคงแสดงกิจกรรมได้ทั้งในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์และไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียทนเกลือมีคุณสมบัติในการทนเกลือหรือมีเสถียรภาพในสภาวะที่มีเกลือสูง เนื่องจากว่าเอนไซม์ทนเกลือเหล่านี้มีกรดอะมิโนที่เป็นกรดอยู่บริเวณพื้นผิวของเอนไซม์ ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้ทำหน้าที่ในการเกิดอันตรกิริยาทางประจุไฟฟ้ากับเกลือและน้ำมีแนวโน้มที่จะเสถียร โครงสร้างเอนไซม์ (Roa and Argos, 1981; Flannery, 1996) เช่น โปรตีนจาก *Halobacterium halobium* ประกอบด้วยกรดอะมิโนแอสพาติก (Aspartic) กลูตามิก (Glutamic) และเอไมด์ประมาณ 23% ต่อโมเลกุล (Stepanov et al., 1992)

4.2.2.4 ผลของสารตั้งต้นจำเพาะต่อกิจกรรมของเอนไซม์

เอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินสามารถย่อยสลายสารตั้งต้น Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA ซึ่งเป็นสารตั้งต้นสังเคราะห์สำหรับซับติลิสิน (Subtilisin) และไคโมทริปซิน (Chymotrypsin) ได้สูงสุด แต่ไม่ย่อยสลายสารตั้งต้นสำหรับทริปซิน (Trypsin) พลาสมิน (Plasmin) คาลิครีอิน (Kalikrein) ทรอมบิโน (Thrombin) และยูโรไคเนส (Urokinase) (ตารางที่ 4.2) จะเห็นว่ากรดอะมิโนที่เอนไซม์สามารถย่อยสลาย (P₁) มีโครงสร้างเป็นอะโรมาติก (Aromatic) ได้แก่ ฟีนิลอะลานีน ซึ่งเป็นลักษณะ

ตารางที่ 4.2 ความสามารถในการย่อยสารตั้งต้นจำเพาะของเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7

| Synthetic substrates | Specificity | Relative activity (%) |
|-------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA | Subtilisin and chymotrypsin | 100.0 |
| Benz-Val-Gly-Arg-pNA | Urokinase | 2.9 |
| Tos-Gly-Pro-Arg-pNA | Thrombin | 5.7 |
| Benz-Pro-Phe-Arg-pNA | Kalikrein | 2.7 |
| D-Val-Leu-Lys-pNA | Plasmin | 3.9 |
| Benz-L-Arg-pNA | Trypsin | 3.1 |

เช่นเดียวกับเอนไซม์โปรติเอสในกลุ่มซับทิลิซิน (Subtilisin) (Graycar, Ballinger, and Wells, 2004) คุณสมบัตินี้คล้ายกับเอนไซม์นัตโตะไคเนส ซึ่งสามารถย่อยสลาย Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA ได้ดี ในขณะที่พลาสมินมีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนไลซีน โดยมีสารตั้งต้นจำเพาะคือ D-Val-Leu-Lys-pNA นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจากแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายซับทิลิซิน (Fujita et al., 1993; Chang et al., 2000; Peng et al., 2003)

4.2.2.5 ผลของสารยับยั้งและไอออนต่อกิจกรรมของเอนไซม์

เมื่อศึกษาผลของสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์บริสุทธิ์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 พบว่า PMSF ซึ่งเป็นสารยับยั้งโปรติเอสกลุ่มซีรีน (Serine protease) เช่น ไคโมทริปซิน ทริปซิน และธอมบิน และยับยั้งโปรติเอสในกลุ่มซิสทีน (Cysteine) เช่น ปาเปน (Mikola and Mikola, 1986) สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงสุด เอนไซม์มีหมู่ซีรีนอยู่ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยา ซึ่งจะไวต่อการทำปฏิกิริยากับ PMSF โดยหมู่ไฮดรอกซิลของซีรีนที่อยู่บริเวณเร่งปฏิกิริยาทำปฏิกิริยากับ PMSF เกิดเป็น Phenylmethanesulfonic ester ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ จากการศึกษาพบว่า PMSF สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงสุด โดยมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เหลือเพียง 24% ในขณะที่สารยับยั้งโปรติเอสกลุ่มซิสทีน (Cysteine) เมทาลโล (Metallo) และเอซิด (acid) ไม่พบการยับยั้งหรือมีการยับยั้งเพียงเล็กน้อย (ตารางที่ 4.3) เช่นเดียวกับ Leupeptin, SBTI และ TLCK ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน และ TPCK ที่มีความจำเพาะต่อไคโมทริปซิน ก็ไม่มีผลต่อกิจกรรม ผลดังกล่าวบ่งชี้ว่าเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 จัดเป็นซีรีนโปรติเอสที่ไม่ใช่ทริปซินและไคโมทริปซินแต่เป็นกลุ่มซับทิลิซิน จากผลการศึกษานี้สอดคล้องกับเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินที่ผลิตได้จากแหล่งอื่น ๆ ได้แก่ *Pseudomonas* sp., *B. natto*, *B. subtilis* KCK-7, *Bacillus* sp. nov. SK006, *Bacillus* sp. DJ-4, *B. amyloliquefaciens* DC-4, *Bacillus* sp. CK11-4, *B. subtilis* DC33, *Fusarium* sp. BLB, *Streptomyces* sp. CS684, *Streptomyces megasporus* SD5 (Chitte and Dey, 2000; Fujita et al., 1993; Hua et al., 2008; Kim et al., 1996; Kim and Choi, 2000; Paik et al., 2004; Peng et al., 2003; Simkhada et al., 2010; Ueda et al., 2007; Wang et al., 2009; Wang et al., 2006) ในขณะที่เอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจาก *Bacillus* sp. KA38 จัดเป็นเมทาลโลโปรติเอส (Metalloprotease) ซึ่งถูกยับยั้งด้วย EDTA และ Zn^{2+} (Kim et al., 1996)

นอกจากนี้ กิจกรรมของเอนไซม์สามารถถูกกระตุ้นได้เล็กน้อยด้วย Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , และ Li^+ ส่วน Zn^{2+} มีผลลดกิจกรรมของเอนไซม์เล็กน้อย (ตารางที่ 4.4) ผลดังกล่าวบ่งชี้ว่าแคลเซียมคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์มีผลเร่งกิจกรรมของเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ทนต่อไอออนของโลหะ

ได้หลากหลายชนิดที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไอออนของโลหะทรานซิชัน (Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} และ Mn^{2+}) เนื่องจากว่าไอออนโลหะทำให้เกิดโครงสร้างที่เหมาะสมที่จะเกิดปฏิกิริยาได้ มีรายงานเกี่ยวกับผลของไอออนบวกและไอออนของโลหะทรานซิชันต่อการเร่งกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มซัพทิลิซินจากเชื้อ *Streptomyces albogriseolus* และ *Salinivibrio costicola* ว่าถูกยับยั้งกิจกรรมด้วย Zn^{2+} (Suzuki et al., 1997; Lama et al., 2005) ซึ่งมีทั้งสอดคล้องและแตกต่างกันออกไปจากการศึกษานี้ เนื่องจากเอนไซม์ย่อย

ตารางที่ 4.3 ผลของสารยับยั้งและสารเคมีต่อกิจกรรมของเอนไซม์บริสุทธิ์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7

| Substance | Targeted enzyme | Final concentration | Relative activity (%) |
|-------------------------------|--|---------------------|-----------------------|
| Leupeptin | Trypsin-like and some cysteine proteases | 100 μM | 97 |
| Trypsin inhibitor I (soybean) | Trypsin-like protease | 0.02 mg/mL | 98 |
| TLCK | Trypsin-like protease | 100 μM | 95 |
| TPCK | Chymotrypsin-like protease | 100 μM | 99 |
| PMSF | Serine protease | 1 mM | 24 |
| EDTA | Metallo protease | 10 mM | 94 |
| Bestatin | Aminopeptidase | 10 μM | 104 |
| Pepstatin | Acid protease | 10 μM | 100 |
| E-64 | Cysteine protease | 10 μM | 95 |
| 2-Mercaptoethanol | - | 10 mM | 100 |

สลายไฟบรินนั้นผลิตมาจากแหล่งที่แตกต่างกัน เอนไซม์ย่อยไฟบรินจาก *Bacillus* เช่น *B. subtilis* JY1 ถูกยับยั้งด้วยไอออน Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} และ Hg^{2+} ในขณะที่ *Paenibacillus polymyxa* EJS-3 ถูกกระตุ้นกิจกรรมโดย Zn^{2+} , Mg^{2+} และ Fe^{2+} ถูกยับยั้งด้วย Ca^{2+} และ Cu^{2+} (Lu et al., 2010) สำหรับเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจาก *B. subtilis* BK17 พบว่าไอออนของ Zn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} และ Fe^{2+} ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน (Jeong et al., 2001) ในขณะที่เอนไซม์ย่อยสลาย

ไฟบรินจาก *B. subtilis* DC33 ถูกยับยั้งด้วย Zn^{2+} และ Fe^{3+} (Wang et al., 2006) และรายงานของ Wang et al. (2009) พบว่าเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจาก *Pseudomonas* sp. TKU015 ถูกกระตุ้นกิจกรรมได้ด้วย Mg^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} และ Ca^{2+} แต่จะถูกยับยั้งเล็กน้อยด้วย Cu^{2+} และ Zn^{2+}

ตารางที่ 4.4 ผลของไอออนและไอออนโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp.

SK1-3-7

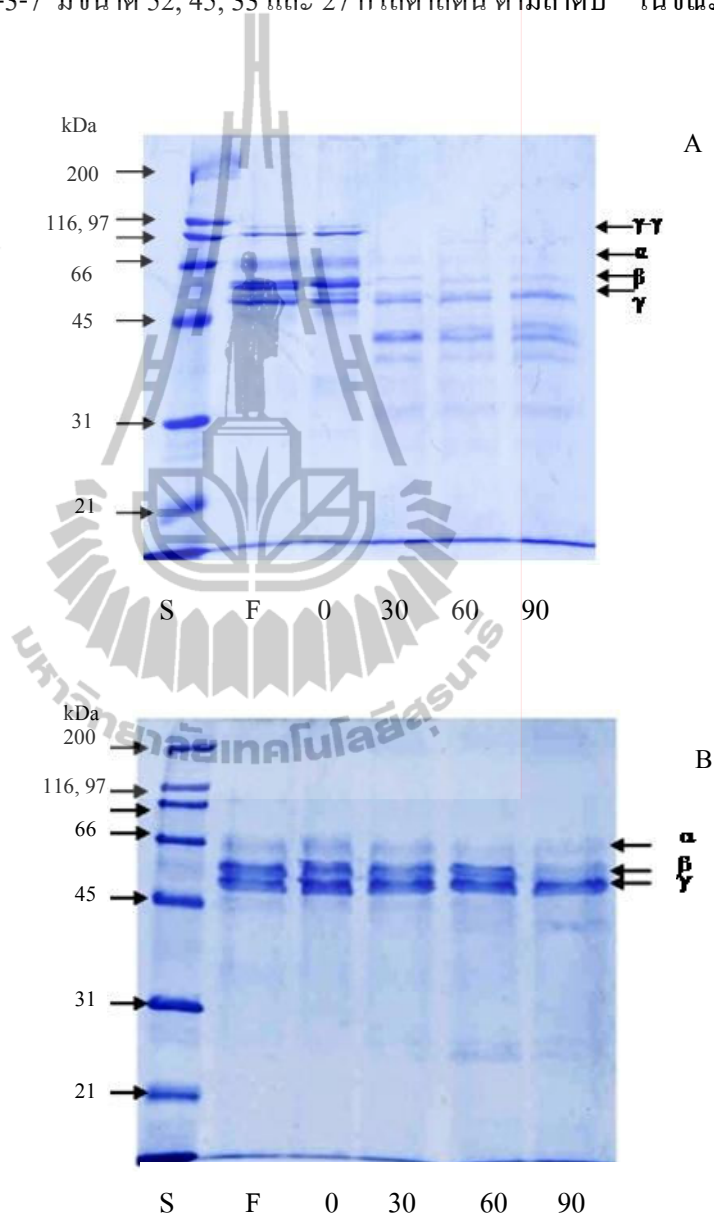
| Substance | Final concentration (mM) | Relative activity (%) |
|------------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Mono- and di- valent cations | | |
| Li^+ | 20 | 112 |
| Na^+ | 20 | 108 |
| K^+ | 20 | 114 |
| Mg^{2+} | 20 | 116 |
| Ca^{2+} | 20 | 110 |
| Metal ions | | |
| Cu^{2+} | 1 | 108 |
| Co^{2+} | 1 | 109 |
| Fe^{2+} | 1 | 106 |
| Mn^{2+} | 1 | 104 |
| Zn^{2+} | 1 | 93 |

4.2.3 การเปรียบเทียบกิจกรรมและรูปแบบการย่อยสลายไฟบรินระหว่างเอนไซม์จาก

Virgibacillus sp. SK1-3-7 และพลาสมิน

ไฟบรินโนเจนซึ่งเป็นสารตั้งต้นของไฟบรินประกอบด้วยพอลิเปปไทด์ 3 สาย ที่แตกต่างกัน ได้แก่ α , β และ γ ซึ่งมีพันธะไดซัลไฟด์เชื่อมต่อกันระหว่างสามสาย โดยมีขนาดโมเลกุล 64, 56 และ 47 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการแสดงกิจกรรมของเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ปฏิกริยาต้องมีแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้เกิดการ

เชื่อมต่อกันของสาย γ เกิดเป็นสาย γ - γ มีน้ำหนักโมเลกุล 105 กิโลดาลตัน (รูปที่ 4.9A) เมื่อศึกษา รูปแบบการย่อยสลายไฟบรินของเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ใน SDS-PAGE พบว่า เอนไซม์สามารถย่อย α และ γ - γ อย่างรวดเร็วภายในครึ่งชั่วโมง ตามด้วยการย่อยสาย β และย่อย สาย γ เป็นลำดับสุดท้าย (รูปที่ 4.9A) ผลิตผลที่เกิดจากการย่อยไฟบรินด้วยเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 มีขนาด 52, 45, 33 และ 27 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ในขณะที่เอนไซม์



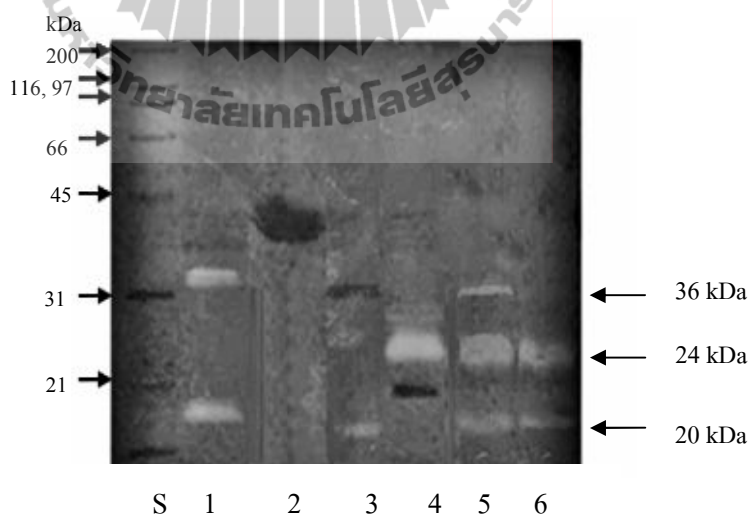
รูปที่ 4.9 รูปแบบของการย่อยไฟบรินของเอนไซม์บริสุทธิ์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 (A) และพลาสมิน (B) ซึ่งวิเคราะห์โดย SDS-PAGE (12.5%T) F คือไฟบริน ตัวเลขแสดง เวลาการย่อยในหน่วยนาที S คือ โปรตีนมาตรฐาน

พลาสมินสามารถย่อยไฟบรินที่สาย α อันดับแรก และตามด้วยการย่อยสาย β ด้วยอัตราการย่อยที่ช้าและสุดท้ายย่อย γ (รูปที่ 4.9B) โดยมีผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยไฟบรินมีขนาด 50, 33 และ 26 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ซึ่งในระบบการศึกษารูปแบบการย่อยไฟบรินด้วยพลาสมินนั้นไม่มีแคลเซียมคลอไรด์ในปฏิกิริยาจึงไม่เกิดสาย γ - γ เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการย่อยไฟบรินของเอนไซม์บริสุทธิ์เทียบกับพลาสมิน พบว่าเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ย่อยสลายไฟบรินได้เร็วกว่าพลาสมินแต่มีความจำเพาะเจาะจงต่อพันธะที่ต่างกัน (รูปที่ 4.9) ผลการศึกษาที่สอดคล้องกับรายงานของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจาก *Paenibacillus polymyxa* EJS-3 ซึ่งย่อยสาย α และ β ลำดับแรกตามด้วยการย่อย γ ในอัตราการย่อยที่ช้า (Lu et al., 2010) ในขณะที่เอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจาก *B. subtilis* DC33 ซึ่งสามารถย่อยสาย β ได้เร็วกว่า α และ γ (Wang et al., 2006) นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจาก *Streptomyces* sp. CS684 สามารถย่อยเฉพาะสาย β เท่านั้น (Simkhada et al., 2010)

4.2.4 ผลของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารต่อกิจกรรมของเอนไซม์

รูปที่ 4.10 แสดงถึงกิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินของเอนไซม์แต่ละชนิด โดยแถวที่ 1 แสดงถึงกิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินของเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 แถวที่ 2 แสดงถึงกิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินของเอนไซม์เพปซิน ซึ่งพบว่าไม่สามารถย่อยสลายไฟบรินได้ แถวที่ 3 แสดงถึงกิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินของเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 หลังผ่านการบ่มด้วยเอนไซม์เพปซิน แถวที่ 4 แสดงถึงกิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินของเอนไซม์ทริปซิน แถวที่ 5 แสดงถึงกิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินของเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ที่ผ่านการย่อยด้วยทริปซิน แถวที่ 6 แสดงถึงกิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินของเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เพปซินและทริปซิน ตามลำดับ จากผลการศึกษาพบว่าเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 แสดงแถบกิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินที่มีขนาดโมเลกุล 20 และ 36 กิโลดาลตัน (รูปที่ 4.10 แถวที่ 1) เมื่อเอนไซม์ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เพปซิน พบว่าเอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมเหลืออยู่ ซึ่งจะสังเกตพบแถบกิจกรรมเกิดขึ้นที่ตำแหน่งน้ำหนักโมเลกุล 20 กิโลดาลตัน (รูปที่ 4.10 แถวที่ 3) ซึ่งสอดคล้องกับผลของการวัดค่ากิจกรรมการย่อยสารตั้งต้นจำเพาะของเอนไซม์ทริปซิน คือ Benz-L-Arg-pNA และโคโมทริปซิน คือ Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA พบว่าเอนไซม์ทริปซินสามารถย่อยสารตั้งต้นได้ทั้งคู่ ส่วนเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 มีความจำเพาะต่อ Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA เพียงอย่างเดียว ในขณะที่เอนไซม์เพปซินไม่สามารถย่อยสารตั้งต้นทั้งสองได้ จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแถบตำแหน่ง 20 กิโลดาลตัน เป็นกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 แต่เพียงอย่างเดียว โดยมีค่ากิจกรรม

หลังบ่มที่เหลืออยู่ 3.87 ± 0.00 Unit/ml จาก 4.22 ± 0.09 Unit/ml (ตารางที่ 4.5) ซึ่งให้เห็นว่าเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 สามารถทนต่อการย่อยของเอนไซม์เพปซินได้ การที่เอนไซม์มีกิจกรรมลดลงเนื่องจากว่าสภาวะที่ทดสอบมีค่าความเป็นกรดสูงมาก โดยมีค่าพีเอชประมาณ 2 ซึ่งอาจทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพธรรมชาติบางส่วน เมื่อศึกษาผลของเอนไซม์ทริปซินต่อกิจกรรมของเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 พบว่าเอนไซม์สามารถทนต่อการย่อยด้วยทริปซินสังเกตได้จากแถบกิจกรรมที่เหลืออยู่ที่ตำแหน่ง 20 และ 36 กิโลดาลตัน (รูปที่ 4.10 แถวที่ 5) ส่วนแถบกิจกรรมตรงตำแหน่ง 24 กิโลดาลตัน ที่เกิดขึ้นนั้นแสดงถึงกิจกรรมของทริปซิน (รูปที่ 4.10 แถวที่ 4) ซึ่งสอดคล้องกับค่ากิจกรรมที่เหลืออยู่หลังผ่านการบ่มด้วยทริปซิน โดยพบว่ากิจกรรมของทริปซินที่เหลืออยู่ลดลงจาก 6.57 ± 0.74 Unit/ml เป็น 4.98 ± 0.71 Unit/ml แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 อาจย่อยเอนไซม์ทริปซินได้บางส่วนทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินลดลง ในขณะที่ค่ากิจกรรมที่เหลืออยู่เมื่อทดสอบด้วยสารตั้งต้นจำเพาะ Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 และทริปซินสามารถย่อยสารตั้งต้น Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA ได้ทั้งคู่ (ตารางที่ 4.5) อย่างไรก็ตาม ผลของแถบกิจกรรมในไฟบรินไซโมแกรมและค่ากิจกรรมการย่อยของ



รูปที่ 4.10 กิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินของเอนไซม์แต่ละชนิดวิเคราะห์โดย SDS-PAGE (12.5% T) แถวที่ 1 แสดงเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 แถวที่ 2 แสดงเอนไซม์เพปซิน แถวที่ 3 แสดงเอนไซม์หลังจากผ่านการย่อยด้วยเพปซิน แถวที่ 4 แสดงทริปซิน แถวที่ 5 แสดงเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ผ่านการย่อยด้วยทริปซิน แถวที่ 6 แสดงเอนไซม์ที่ผ่านการย่อยด้วยเพปซินและตามด้วยทริปซิน

ตารางที่ 4.5 การย่อยสลายสารตั้งต้นจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินและโคโมทริปซินของเอนไซม์ จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 เอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์เพปซิน

| Enzymes | Activity (Unit/ml) | |
|--|--------------------|-------------------------|
| | Benz-L-Arg-pNA | Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA |
| <i>Virgibacillus</i> sp. 1-3-7 enzyme | ND | 4.22±0.09 |
| Pepsin | ND | ND |
| Trypsin | 6.57±0.74 | 4.19±0.25 |
| Pepsin + <i>Virgibacillus</i> sp. 1-3-7 enzyme | ND | 3.87±0.00 |
| Trypsin + <i>Virgibacillus</i> sp. 1-3-7 enzyme | 4.98±0.71 | 4.79±0.41 |
| Pepsin + Trypsin + <i>Virgibacillus</i> sp. 1-3-7 enzyme | 6.94±0.84 | 3.99±0.20 |

หมายเหตุ ND หมายถึง Not detected

สารตั้งต้นสังเคราะห์ พบว่าเอนไซม์ยังคงแสดงกิจกรรมได้ดี เนื่องจากสภาพจำลองของลำไส้เล็กที่พีเอช 8 เป็นสถานะที่เอนไซม์ สามารถแสดงกิจกรรมได้สูงสุดคล้องกับผลของพีเอชต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ (รูปที่ 4.6A) จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน ยิ่งไปกว่านั้น เอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ยังทนต่อการย่อยด้วยเพปซินและทริปซิน ตามลำดับ สังเกตได้จากแถบกิจกรรมที่เหลืออยู่ตำแหน่ง 20 กิโลดาลตัน (รูปที่ 4.10 แถวที่ 6) ส่วนแถบกิจกรรมตำแหน่ง 24 กิโลดาลตัน ที่เกิดขึ้นนั้นคือกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน (รูปที่ 4.10 แถวที่ 4) โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ที่เหลืออยู่คือ 3.87 ± 0.00 Unit/ml ใกล้เคียงกับค่ากิจกรรมหลังผ่านการย่อยด้วยเพปซินคือ 3.99 ± 0.20 Unit/ml (ตารางที่ 4.5) จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ทนต่อการย่อยของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารจำลอง Wong and Mine (2004) ซึ่งพบว่าเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินที่สกัดได้จากกะปิสามารถทนต่อการย่อยของเพปซินและทริปซิน เอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 มีศักยภาพที่จะใช้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ

4.3 การศึกษาคุณลักษณะของโปรติเอส โดยใช้สารตั้งต้นโปรตีนเอโซเคซีน

4.3.1 การทำบริสุทธิ์ และขนาดโมเลกุลของโปรติเอส

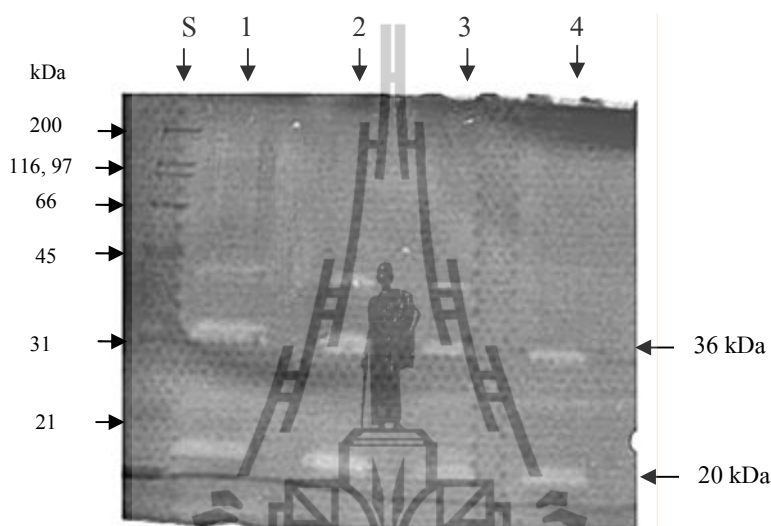
เอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 นอกจากย่อยสลายไฟบรินแล้วยังสามารถย่อยสลายเอโซเคซีนได้สูง รูปแบบของการแยกหรือการทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์เหมือนกับเอนไซม์ย่อยไฟบริน (รูปที่ 4.5) โดยมีค่าความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 14.1 เท่า และผลผลิตที่ได้ต่ำคือเหลือประมาณ 1% (ตารางที่ 4.6) โปรติเอสที่แยกได้มีขนาด 20 และ 36 กิโลดาลตัน (รูปที่ 4.11) ซึ่งคิดว่าเอนไซม์ย่อยเอโซเคซีนหรือโปรติเอสจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 เป็นเอนไซม์ชนิดเดียวกับเอนไซม์ที่ย่อยไฟบริน นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าโปรติเอสจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 มีขนาดที่สอดคล้องกับ *Virgibacillus* sp. SK33 ซึ่งมีขนาด 19 และ 32 กิโลดาลตัน (Sinsuwan et al., 2007, 2010b) และ *Virgibacillus* sp. SK37 มีขนาด 19, 34 และ 44 กิโลดาลตัน (Phrommao et al., 2011) ยิ่งไปกว่านี้มี

ตารางที่ 4.6 ตารางขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ของโปรติเอสที่ผลิตจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7

| Step of purification | Volume(ml) | Total protein (mg) | Total activity (U) | Specific activity (U/mg protein) | Fold | Yield (%) |
|--|------------|--------------------|--------------------|----------------------------------|------|-----------|
| Crude proteinase | 500 | 69.77 | 23.7 | 0.3 | 1.0 | 100 |
| Crude in 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ | 500 | 27.83 | 18.0 | 0.6 | 2.2 | 76 |
| Phenyl-Sepharose | 20 | 0.79 | 0.9 | 1.1 | 3.7 | 4 |
| DEAE-Sephacel | 40 | 0.20 | 0.6 | 2.8 | 9.4 | 2 |
| Source Q | 15 | 0.03 | 0.1 | 4.2 | 14.1 | 1 |

รายงานขนาดโมเลกุลของโปรติเอสซึ่งพบได้ในแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เช่น *B. subtilis* PE-11 (Adinarayana et al., 2003) ขนาด 15 กิโลดาลตัน จากเชื้อ *Micrococcus* sp. INIA 528 ขนาด 19.4 กิโลดาลตัน (Fernández, Mohedano, Polanco, Medina and Nuñez, 1996) จากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ขนาด 18 กิโลดาลตัน (Karadzic, Masui and Fujiwara, 2004) จากเชื้อ *B. laterosporus* ขนาด 15 กิโลดาลตัน (Usharani and Muthuraj, 2010) จากเชื้อ Haloalkaliphilic bacterium sp. AH6 ขนาด 40 กิโลดาลตัน (Dodia et al., 2008) จากเชื้อ *Virgibacillus marismortui* ขนาด 17, 19, 24, 29

และ 35 กิโลดาลตัน (Chamroensaksri et al., 2008) จากเชื้อ *Halobacillus karajensis* ขนาด 36 กิโลดาลตัน (Karbalaei-Heidari et al., 2009) จากเชื้อ *B. licheniformis* ขนาด 31 กิโลดาลตัน (Toyokawa et al., 2010)



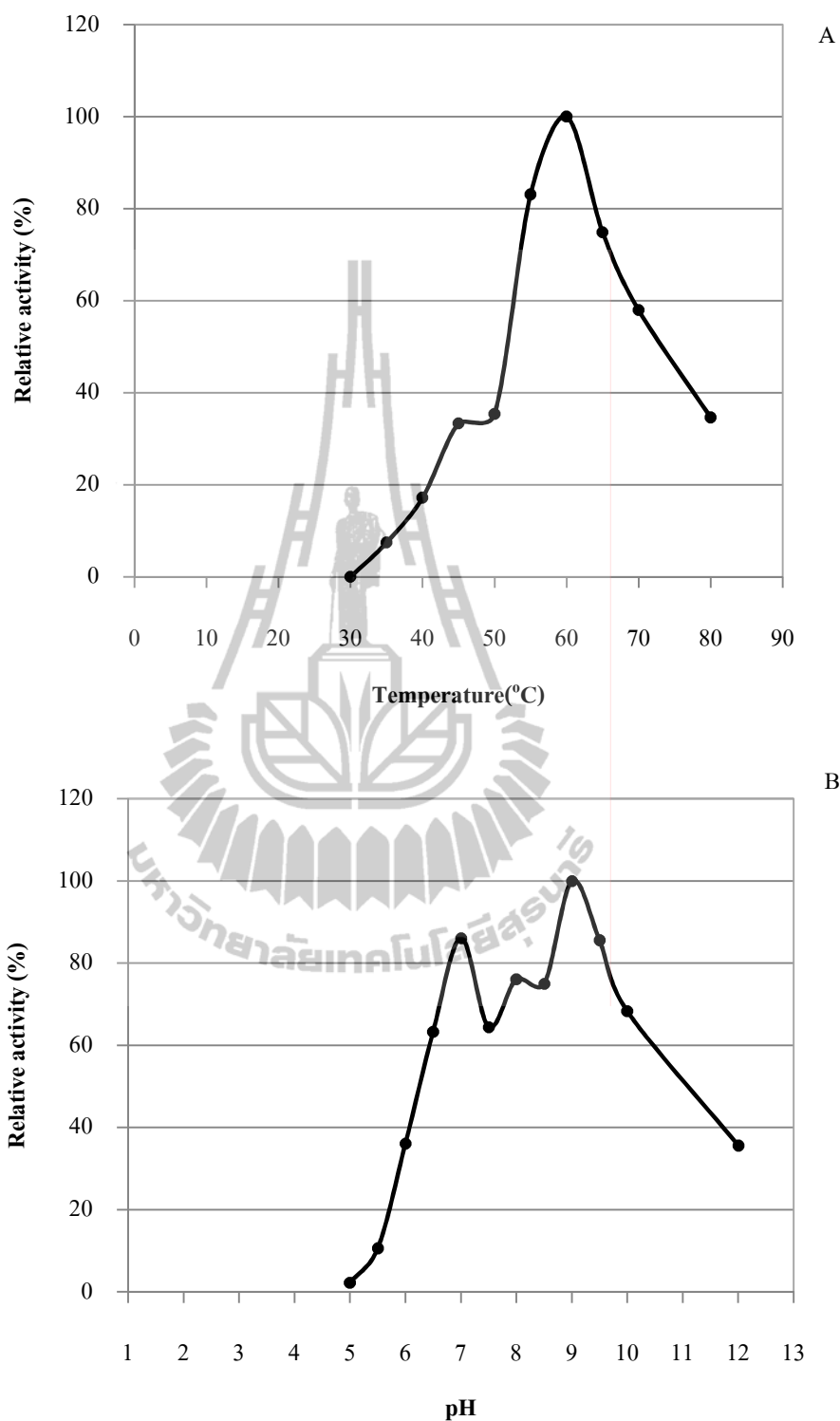
รูปที่ 4.11 รูปแบบของเอนไซม์ วิเคราะห์โดย Activity staining; Crude enzyme (1), เอนไซม์จากการทำบริสุทธิ์โดย phenyl-Sepharose (2), DEAE-Sepharose (3) และ Source Q (4) S คือ โปรตีนมาตรฐาน

4.3.2 อุณหภูมิและพีเอชต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของโปรติเอส

การศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 มีได้ศึกษาผลของอุณหภูมิและพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายไฟบรินเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และพีเอช 7.4 ซึ่งเป็นอุณหภูมิและพีเอชในร่างกายของคนปกติ ดังนั้นในการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจึงมุ่งเน้นศึกษาเฉพาะเสถียรภาพของเอนไซม์เท่านั้น ในขณะที่การศึกษาคูสมบัติทางชีวเคมีของโปรติเอสจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ที่ย่อยสลายเอโซเคซินได้ทำการศึกษาผลของอุณหภูมิและพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ เนื่องจากอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งกิจกรรมของเอนไซม์เป็นคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของโปรติเอส การเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้สารตั้งต้นมีพลังงานมากพอที่จะทำให้สารนั้นกลายเป็นสารที่ถูกกระตุ้นอยู่ในสภาพพร้อมเปลี่ยนแปลง สารที่ถูกกระตุ้นที่เกิดขึ้นนั้นมีความไม่เสถียรซึ่งจะเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาอย่างรวดเร็ว ดังนั้นการเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่ม แต่การเพิ่มของอุณหภูมิเพื่อให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเอนไซม์เพิ่ม

นั้นมีขีดจำกัด ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์เป็น โปรตีนที่มีโครงสร้างสามมิติที่สลับซับซ้อนและการที่เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ เอนไซม์ต้องมีโครงสร้างสามมิติที่เหมาะสมต่อการทำงาน โดยมีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนต่าง ๆ โดยเฉพาะบริเวณเร่งปฏิกิริยาอย่างพอเหมาะที่จะให้สารตั้งต้นเข้าจับแล้วเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ขึ้นได้ โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเร่งปฏิกิริยานี้จะคงรูปอยู่ได้ต้องอาศัยพันธะอนโควาเลนต์ต่าง ๆ จำนวนมาก ซึ่งพันธะเหล่านี้ง่ายแก่การถูกทำลาย ดังนั้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นไปอีกจนทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ จะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาลดลง ซึ่งการศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งกิจกรรมของโปรตีนเอสจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 คือ 60 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.12A) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งกิจกรรมของเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 มีค่าใกล้เคียงกับสภาวะที่เหมาะสมต่อการเร่งกิจกรรมของโปรตีนเอสบริสุทธิ์จาก *Virgibacillus* sp. SK33 คือ 55 องศาเซลเซียส (Phrommao et al., 2011) และโปรตีนเอสบริสุทธิ์จาก *Virgibacillus* sp. SK37 คือ 55-60 องศาเซลเซียส (Sinsuwan et al., 2010) นอกจากนี้ Chamroensaksri et al. (2008) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์จาก *Virgibacillus marismortui* คือ 50 องศาเซลเซียส Usharani and Muthuraj (2010) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์จาก *B. laterosporus* คือ 40 องศาเซลเซียส และ *B. licheniformis* RSP-09-37 คือ 50 องศาเซลเซียส (Sareen and Mishra, 2008) ในขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งกิจกรรมของโปรตีนเอสจาก *B. licheniformis* RKK-04 คือ 50 องศาเซลเซียส (Toyokawa et al., 2010)

พีเอชมีผลต่อการเร่งกิจกรรมของเอนไซม์ โดยพีเอชจะมีผลต่อการแตกตัวของกรดอะมิโนไอโซข้างของเอนไซม์ การเกิดประจุของกรดอะมิโนภายในโครงสร้างของโปรตีนมีผลต่ออันตรกิริยาทางประจุไฟฟ้า (Electrostatic interactions) ส่งเสริมให้เอนไซม์เกิดการเร่งปฏิกิริยาดีขึ้นซึ่งสภาวะนี้เรียกว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ในขณะที่เมื่อพีเอชเพิ่มสูงหรือต่ำมีผลทำลายอันตรกิริยาทางประจุไฟฟ้า หรือสะพานเกลือ (Salt bridge) ดังนั้นโครงสร้างเอนไซม์ที่เสถียรด้วยอันตรกิริยาทางประจุไฟฟ้ามีแนวโน้มที่จะเปิดตัวออก ส่งผลให้เอนไซม์เกิดการสูญเสียกิจกรรมเกิดขึ้น การศึกษานี้พบว่าโปรตีนเอสจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 สามารถเร่งกิจกรรมได้ดีที่พีเอช 9.0 (รูปที่ 4.12B) ซึ่งใกล้เคียงกับเอนไซม์จากแหล่งอื่นที่มีสารตั้งต้นที่แตกต่างกัน จากรายงานของ Sinsuwan et al. (2007) พบว่าเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK37 ย่อยเอโซเคซินได้ดีที่สุดที่พีเอช 6.0 และ 8.0 นอกจากนี้ Phrommao et al. (2011) รายงานว่าโปรตีนเอสบริสุทธิ์จาก *Virgibacillus* sp. SK37 สามารถย่อยสารตั้งต้นสังเคราะห์ Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC ได้ดีที่สุดในที่พีเอช 8.0 และ Sinsuwan et al. (2010) พบว่าเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK33 สามารถย่อยสารตั้งต้น Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC ได้สูงสุดที่พีเอช 7.5 และมีรายงานโปรตีนเอสจากแบคทีเรียหลาย

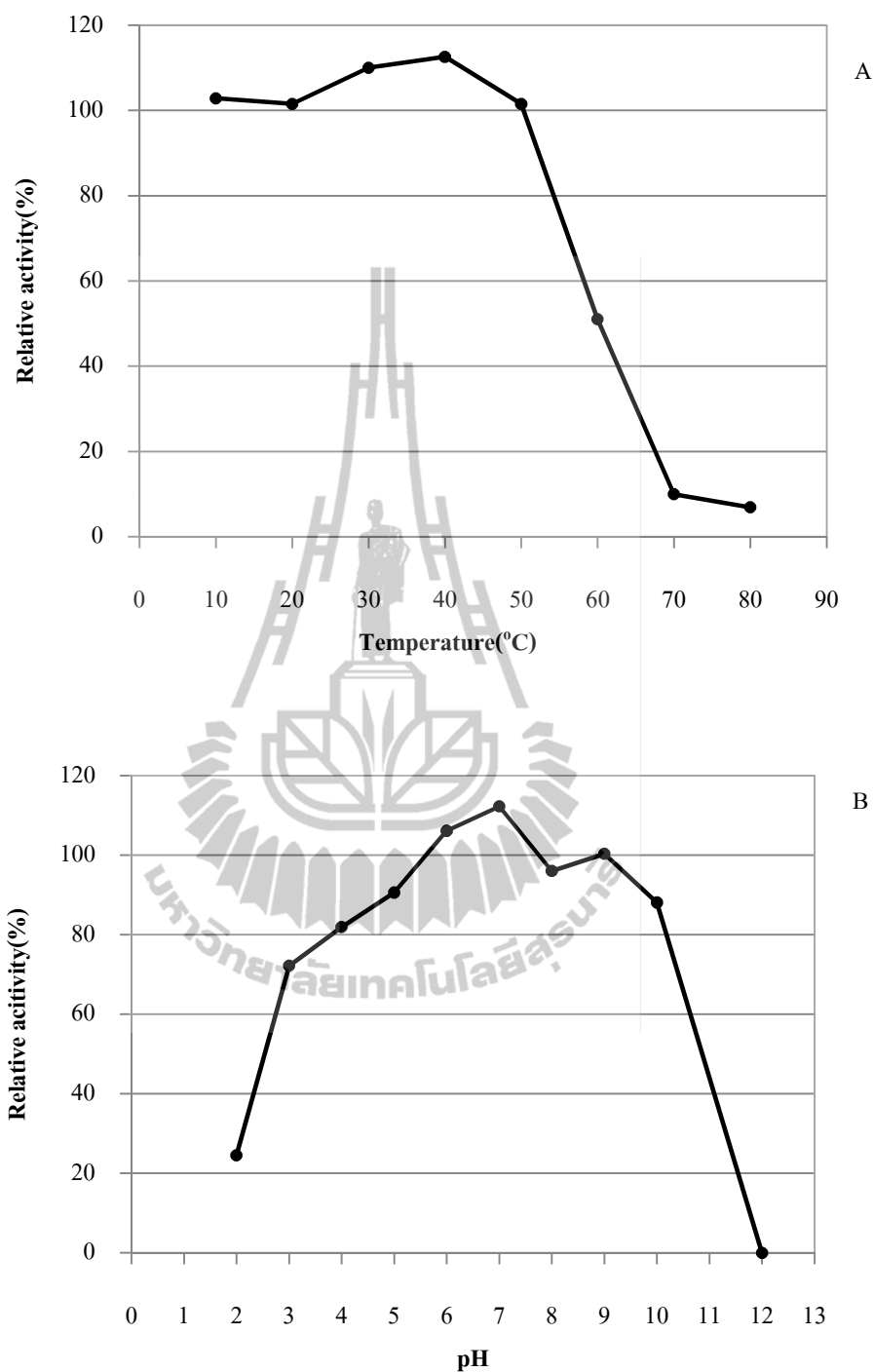


รูปที่ 4.12 ผลของอุณหภูมิ (A) และพีเอช (B) ต่อกิจกรรมการย่อยสารตั้งต้นเอโซเคซีนของโปรตีนจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7

สายพันธุ์ เช่น โปรติเอสจาก Haloalkaliphilic bacterium sp. AH6 และ *Bacillus* sp. SAL1 ย่อยเคซีนได้ดีที่สุดที่พีเอช 9-11 และ 9.0 ตามลำดับ (Dodia et al., 2008; Almas, Hameed, Shelly and Mohan, 2009) โปรติเอสจาก *Halobacillus karjensis* ย่อยเอโซเคซีนได้ดีที่สุดที่พีเอช 9 (Karbalaie-Heidari et al., 2009) โปรติเอสจาก *B. licheniformis* RKK-04 สามารถย่อยสารตั้งต้น Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA ได้ดีที่พีเอช 10.0 (Toyokawa et al., 2010) และโปรติเอสจาก *B. licheniformis* RSP-09-37 ย่อยเคซีนได้ดีที่สุดที่พีเอช 10.0 (Sareen and Mishra 2008)

เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 พบว่าเอนไซม์มีเสถียรภาพและแสดงกิจกรรมได้สูงที่ 10-50 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.13A) นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งกิจกรรมได้ดี โดยมีค่ากิจกรรมเหลืออยู่ถึง 50% (รูปที่ 4.13A) เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายสารตั้งต้นไฟบรินหลังจากบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า โปรติเอสมีค่ากิจกรรมเหลืออยู่ 56% (รูปที่ 4.6B) แสดงให้เห็นว่าผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ในการย่อยสารตั้งต้นทั้งสองมีค่าใกล้เคียงกัน และมีเสถียรภาพใกล้เคียงกับเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK37 ซึ่งมีเสถียรภาพที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส (Phrommao et al., 2011) โปรติเอสบริสุทธิ์จาก *Virgibacillus* sp. SK33 ซึ่งมีเสถียรภาพที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส (Sinsuwan et al., 2010) เอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 เกิดการสูญเสียเสถียรภาพอย่างสมบูรณ์ที่ 70-80 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับโปรติเอสบริสุทธิ์จาก *Bacillus* sp. SAL1 (Almas et al., 2009) *B. licheniformis* RKK-04 (Toyokawa et al. 2010) *Filobacillus* sp. RF2-5 (Hiraga et al., 2005) *Halobacillus* sp. SR5-3 (Namwong et al., 2006) โปรติเอสจาก *B. licheniformis* RSP-09-37 (Sareen and Mishara, 2008) และโปรติเอสจาก *Halobacillus karjensis* (Karbalaie-Hajighasemi et al., 2009) มีเสถียรภาพที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส และโปรติเอสบริสุทธิ์จากแบคทีเรีย Haloalkaliphilic bacterium sp. มีเสถียรภาพในช่วงอุณหภูมิกว้างคือ 25-80 องศาเซลเซียส (Dodia et al., 2008)

เมื่อศึกษาผลของพีเอชต่อเสถียรภาพของโปรติเอสจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 พบว่าเอนไซม์มีเสถียรภาพที่ค่อนข้างกว้างในช่วงพีเอช 4-10 (รูปที่ 4.13B) นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์สูญเสียกิจกรรมที่สภาวะความเป็นกรดที่พีเอช 2 และด่างที่พีเอช 12 อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมเหลืออยู่ถึง 21% ในสภาวะที่เป็นกรดรุนแรง (พีเอช 2) และมีกิจกรรมเหลืออยู่ถึง 73% ที่พีเอช 3 และสูญเสียกิจกรรมอย่างสมบูรณ์ที่พีเอช 12 (รูปที่ 4.13B) ซึ่งเอนไซม์แสดงเสถียรภาพคล้ายกับการย่อยสลายไฟบรินจากรายงานข้างต้น แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. 1-3-7 สามารถย่อยสลายสารตั้งต้นไฟบรินหรือเอโซเคซีนในช่วงพีเอชที่กว้างเช่นเดียวกัน อีกทั้ง

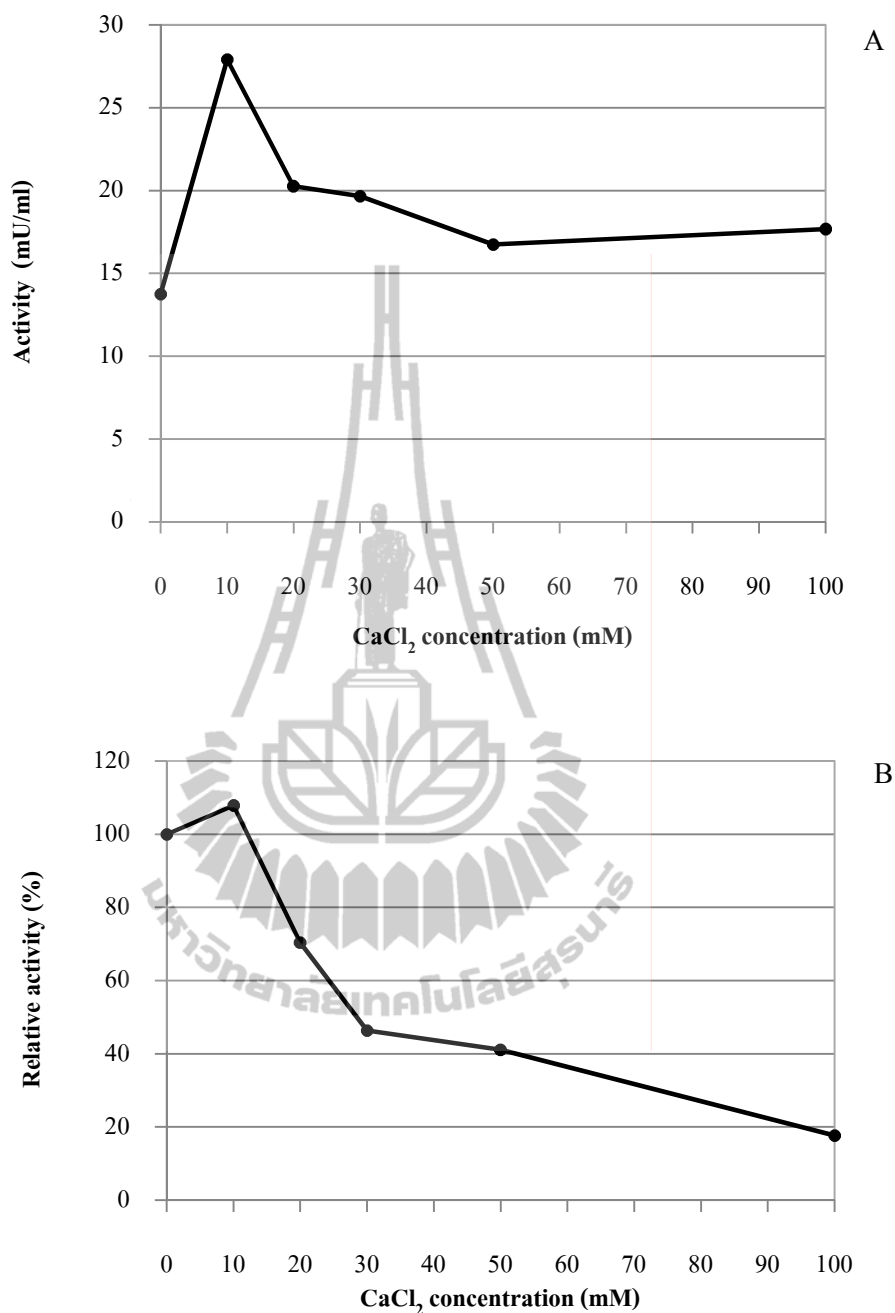


รูปที่ 4.13 ผลของอุณหภูมิ (A) และพีเอช (B) ต่อเสถียรภาพของโปรตีนจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 เมื่อวิเคราะห์ด้วยสารตั้งต้นเอโซเคซิน ผลของอุณหภูมิศึกษาโดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (10-80 องศาเซลเซียส) พีเอช 7 เป็นเวลา 60 นาที ผลของพีเอชศึกษาโดยบ่มเอนไซม์ที่ค่าพีเอชต่าง ๆ (พีเอช 2-12) ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

เอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 มีเสถียรภาพในช่วงพีเอชที่ใกล้เคียงกับโปรติเอสจาก *Virgibacillus* sp. SK37 โดยมีเสถียรภาพในช่วงพีเอชที่ค่อนข้างกว้างคือ 5-10 (Phrommao et al., 2011) และโปรติเอสจาก *B. licheniformis* RSP-09-37 มีเสถียรภาพในช่วงพีเอชที่ค่อนข้างกว้างคือ 4-12 (Sareen and Mishra., 2008) โปรติเอสบางกลุ่มมีเสถียรภาพในสภาวะที่เป็นด่าง (Alkaline protease) เช่น โปรติเอสจาก Haloalkaliphilic bacterium sp. AH6 มีเสถียรภาพที่พีเอช 8-13 (Dodia et al., 2008) โปรติเอสจาก *B. strain* SAL1 มีเสถียรภาพที่พีเอช 7-10 (Almas et al., 2009) โปรติเอสจาก *B. licheniformis* RKK-04 มีเสถียรภาพที่พีเอช 8-10 (Toyokawa et al., 2010)

4.3.3 ผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของโปรติเอส

ที่ระดับความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ 10 มิลลิโมลาร์ มีผลเร่งกิจกรรมของเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 สูงสุด (รูปที่ 4.14A) โดยสามารถกระตุ้นให้เอนไซม์เร่งกิจกรรมเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่มีแคลเซียมคลอไรด์ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ต้องการแคลเซียมคลอไรด์เพื่อกระตุ้นกิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินและเอโซเคซีน เนื่องจากว่าแคลเซียมคลอไรด์สามารถเกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโนโซ่ข้างที่อยู่ข้างเคียงบริเวณเร่งปฏิกิริยา ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือประจุของเอนไซม์ มีผลให้การเข้าจับกับสารตั้งต้นเกิดได้ดีขึ้นและมีเสถียรภาพมากขึ้นส่งเสริมให้ปฏิกิริยาเกิดได้ดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบความต้องการใช้แคลเซียมคลอไรด์เพื่อเร่งกิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินของเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 กับการย่อยสลายเอโซเคซีน พบว่าที่ระดับแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์สามารถเร่งกิจกรรมการย่อยไฟบรินเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ในขณะที่กิจกรรมการย่อยเอโซเคซีนลดลงเหลือ 70% แสดงให้เห็นว่าปฏิกิริยาการย่อยสลายสารตั้งต้นไฟบรินของเอนไซม์ต้องการแคลเซียมคลอไรด์เพื่อกระตุ้นกิจกรรมที่ระดับความเข้มข้นสูงกว่าการย่อยสลายสารตั้งต้นเอโซเคซีน เนื่องจากอุณหภูมิการตรวจวิเคราะห์กิจกรรมแตกต่างกัน ซึ่งการย่อยสลายเอโซเคซีนตรวจวิเคราะห์ที่ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์เร่งกิจกรรมได้ดีที่สุดและสืบเนื่องจากการเพิ่มอุณหภูมิทำให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ดังนั้นเอนไซม์จึงมีความต้องการใช้แคลเซียมเพื่อเร่งกิจกรรมในระดับที่ต่ำกว่าการย่อยสลายไฟบริน ซึ่งตรวจวิเคราะห์ที่ 37 องศาเซลเซียส เอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 มีความต้องการแคลเซียมคลอไรด์เพื่อเร่งกิจกรรมเช่นเดียวกับเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK33 และ SK37 (Sinsuwan et al., 2007, 2010a, 2010b; Phrommao et al., 2011) นอกจากนี้พบโปรติเอสบริสุทธิ์จาก Haloalkaliphilic bacterium sp. AH6 สามารถเร่งกิจกรรมได้สูงที่ระดับความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่ 5 มิลลิโมลาร์ (Dodia et al., 2008) ยิ่งไปกว่านั้น เมื่อพิจารณาผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ พบว่า



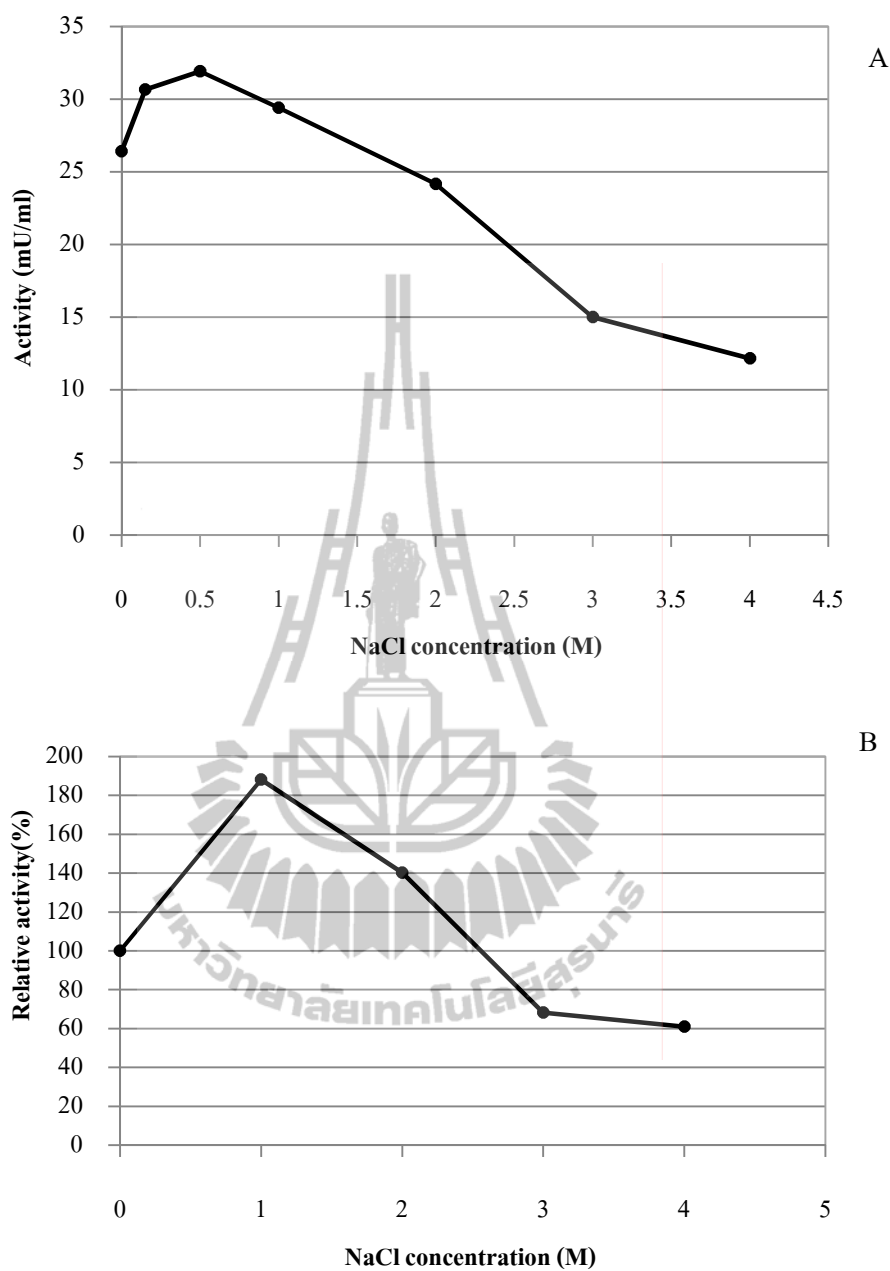
รูปที่ 4.14 ผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรม (A) และต่อเสถียรภาพ (B) ของโปรตีนจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 วิเคราะห์ด้วยสารตั้งต้นเอโซเคซีนที่พีเอช 9 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ศึกษาเสถียรภาพโดยบ่มที่ระดับแคลเซียมคลอไรด์ต่าง ๆ (0-100 มิลลิโมลาร์) ที่พีเอช 9 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส และตรวจวัดกิจกรรมที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยมีแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์

เอนไซม์มีเสถียรภาพที่ระดับแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0 ถึง 10 มิลลิโมลาร์ และที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์มีค่ากิจกรรมเหลืออยู่ 70% ในขณะที่ระดับแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 30 และ 50 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์มีกิจกรรมเหลืออยู่เพียง 46% และ 41% ตามลำดับ การสูญเสียเกิดอย่างสมบูรณ์ที่ 100 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4.14B)

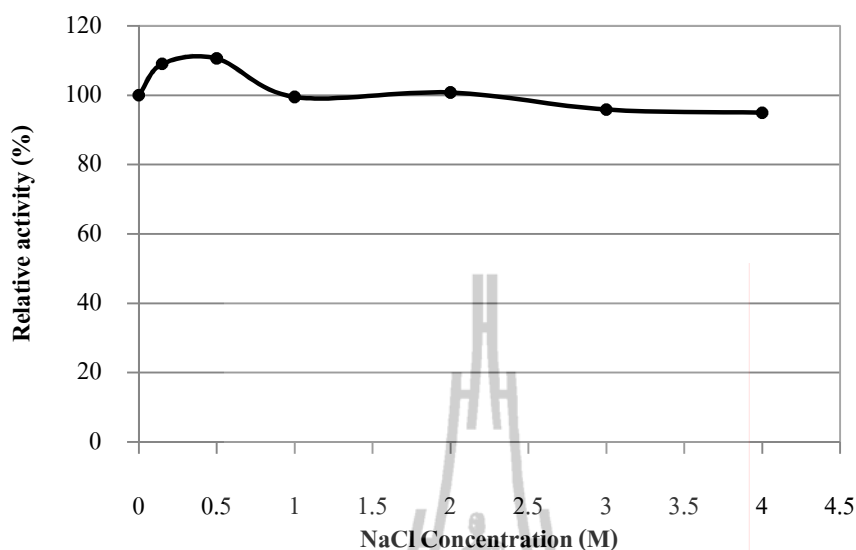
4.3.4 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของโปรติเอส

ระดับของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการเร่งกิจกรรมของโปรติเอสคือที่ 0.5 โมลาร์ (รูปที่ 4.14A) ซึ่งสอดคล้องกับกิจกรรมการย่อยสลายไฟบริน ซึ่งให้เห็นว่าเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ต้องการโซเดียมคลอไรด์เพื่อเร่งกิจกรรมการย่อยสลายไฟบรินและเอโซเคซิน นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 มีกิจกรรมลดลงเมื่อโซเดียมคลอไรด์มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น และกิจกรรมของเอนไซม์ค่อย ๆ ลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงกว่า 2 โมลาร์ ในขณะที่เมื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์บริสุทธิ์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 โดยใช้สารตั้งต้นสังเคราะห์ Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA แทนเอโซเคซิน พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ยังคงเร่งกิจกรรมได้ดีที่ระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงกว่า 2 โมลาร์ จนถึง 4 โมลาร์ (รูปที่ 4.16) ซึ่งบ่งชี้ว่าเอโซเคซินเกิด Salting out ในสภาวะที่มีเกลือสูงซึ่ง เป็นแนวโน้มเดียวกับที่พบเมื่อใช้สารตั้งต้นไฟบรินใน 4.2.2.3 จากผลการศึกษานี้ชี้ชัดว่าเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 สามารถแสดงกิจกรรมได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีโซเดียมคลอไรด์ โปรติเอสจาก *Filobacillus* sp. RF2-5 (Hiraga et al., 2005) และ *Halobacillus* sp. SR5-3 (Namwong et al., 2006) พบว่ากิจกรรมของโปรติเอสเพิ่มสูงขึ้น 2.5 เท่า ที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 20-35% ซึ่งแตกต่างไปจากรายงานเกี่ยวกับโปรติเอสจาก *B. licheniformis* RKK-04 ซึ่งพบว่ากิจกรรมของโปรติเอสลดลงเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น (Toyokawa et al., 2010)

เมื่อศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อเสถียรภาพ พบว่าเอนไซม์มีเสถียรภาพในเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0-2 โมลาร์ (รูปที่ 4.15B) เป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมเพิ่มขึ้นถึง 1.8 เท่า ที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ (รูปที่ 4.15B) พบว่าเสถียรภาพของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอาจเนื่องจากโครงสร้างของเอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลง อันเนื่องมาจากการเกิดอันตรกิริยาของโซเดียมคลอไรด์กับโซ่ข้างของกรดอะมิโนมีผลส่งเสริมให้บริเวณเร่งและบริเวณจับรวมถึงหมู่ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยาอยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสม ยิ่งไปกว่านั้นเอนไซม์มีกิจกรรมเพิ่มขึ้น 1.4 เท่า ที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2 โมลาร์ (รูปที่ 4.15B) เมื่อพิจารณาที่ระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 3 และ 4 โมลาร์ จะเห็นได้ว่าเอนไซม์เหลือกิจกรรมเพียง 83% และ 61% ตามลำดับ (รูป 4.15B)



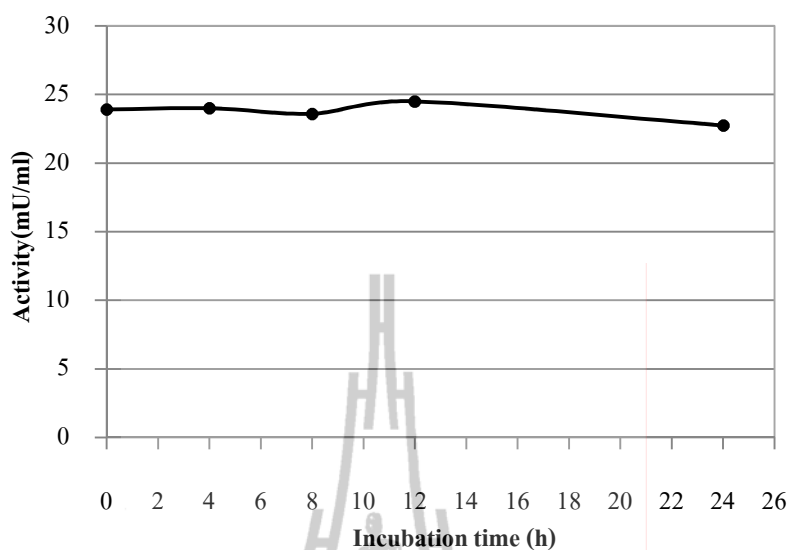
รูปที่ 4.15 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรม (A) และต่อเสถียรภาพ (B) ของโปรติเอสจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยสารตั้งต้นเอโซเคซินที่พีเอช 9 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์โดยปมเอนไซม์ที่ระดับโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ (0-4 โมลาร์) ที่พีเอช 9 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ 37 องศาเซลเซียส และตรวจวัดกิจกรรมที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยมีแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์



รูปที่ 4.16 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของโปรติเอสโดยใช้สารตั้งต้นสังเคราะห์ Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA

ซึ่งเป็นแนวโน้มเดียวกับที่ย่อยสลายไฟบริน นอกจากนี้โปรติเอสมีเสถียรภาพในช่วงความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ค่อนข้างกว้าง ดังนั้นจึงสามารถจัดโปรติเอสจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 เป็นชนิดที่ทนเกลือ (Halotolerant protease) โดยทั่วไปโปรติเอสผลิตจากแบคทีเรียชอบเกลือจะมีลักษณะเด่น คือมีเสถียรภาพในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูง เช่น *B. licheniformis* RKK-04 ซึ่งโปรติเอสที่ผลิตได้มีเสถียรภาพในช่วงโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10-30% (Toyokawa et al., 2010) โปรติเอสจาก *Haloalkaliphilic bacterium* sp. AH6 มีเสถียรภาพในช่วงโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-4 โมลาร์ (Dodia et al., 2008) โปรติเอสจาก *Halobacillus karajensis* มีเสถียรภาพในช่วงโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-3 โมลาร์ (Karbalaei-Heidari et al., 2009) โปรติเอสจาก *Halobacillus* sp. SR5-3 มีเสถียรภาพในช่วงโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-25% (Namwong et al., 2006) และโปรติเอสจาก *B. subtilis* FP-133 มีเสถียรภาพในช่วงโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-20% (Setyorini, Kim, Takenaka, Murakami and Aoki, 2006)

เมื่อนำเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ไปบ่มในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ และแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK 1-3-7 มีเสถียรภาพสูงซึ่งเอนไซม์ไม่มีการสูญเสียกิจกรรม (รูปที่ 4.17) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์มีเสถียรภาพสูงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.17 ผลของระยะเวลาในการบ่มต่อกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายเอโซเคซีนที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ และแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ที่ 37 องศาเซลเซียส

4.3.5 ผลของสารตั้งต้นจำเพาะต่อกิจกรรมของโปรติเอส

การศึกษาความจำเพาะต่อสารตั้งต้นสังเคราะห์ (Synthetic substrate) ของโปรติเอสจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 โดยทำการศึกษากิจกรรมที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และพีเอช 9 พบว่าเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 สามารถย่อยสลายสารตั้งต้น Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA และไม่ย่อยสลายสารตั้งต้นสำหรับทริปซิน (Trypsin) พลาสมิน (Plasmin) ทรอมบิน (Thrombin) และยูโรไคเนส (Urokinase) (ตารางที่ 4.7) จึงกล่าวได้ว่าโปรติเอสบริสุทธิ์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับซัพทิลิซินซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาความจำเพาะต่อสารตั้งต้นสังเคราะห์ของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินใน 4.2.2.4 และโปรติเอสจากแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. lentus*, *B. alcolophilus* N85S และ *B. alcolophilus* PB92 (Ballinger and Wells, 1998) ซึ่งเป็นโปรติเอสที่ผลิตได้จากเชื้อที่กล่าวมาสามารถย่อยสลาย Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC ได้ดี นอกจากนี้ยังมี *B. licheniformis* BA17 (Ozturk et al., 2009) สามารถย่อยสลาย Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA ได้ดีด้วยเช่นกัน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะต่อโปรติเอสจากแบคทีเรียในกลุ่มซัพทิลิซิน

ตารางที่ 4.7 สารตั้งต้นจำเพาะของเอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ตรวจวิเคราะห์ที่ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 9 เป็นเวลา 30 นาที

| Synthetic substrates | Specificity | Relative activity (%) |
|-------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA | Subtilisin and Chymotrypsin | 100 |
| Tos-Gly-Pro-Arg-pNA | Thrombin | 6 |
| D-Val-Leu-Lys-pNA | Plasmin | 3 |
| Benz-L-Arg-pNA | Trypsin | 2 |

4.3.6 ผลของสารยับยั้งและสารเคมีต่อกิจกรรมของโปรติเอส

เมื่อศึกษาผลของสารยับยั้งและสารเคมีต่อกิจกรรมของโปรติเอสที่ 60 องศาเซลเซียส และพีเอช 9 พบว่าสารยับยั้งโปรติเอสในกลุ่มเมทาลโลและเอซิด รวมถึงสารยับยั้งที่จำเพาะต่อทริปซิน (Leupeptin, SBTI และ TLCK) และไคโมทริปซิน (TPCK) ไม่มีผลยับยั้งโปรติเอสจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ในขณะที่ PMSF ซึ่งเป็นสารยับยั้งโปรติเอสกลุ่มซีรีนสามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยกิจกรรมของเอนไซม์เหลือเพียง 11% เทียบกับตัวอย่างควบคุม (ตารางที่ 4.8) ผลดังกล่าวบ่งชี้ว่าเอนไซม์จัดเป็นซีรีนโปรติเอสที่ไม่ใช่ทริปซินและไคโมทริปซิน สอดคล้องกับผลของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน ซึ่งถูกยับยั้งด้วย PMSF อย่างสมบูรณ์ และสอดคล้องกับโปรติเอสจาก *B. laterosporus* (Usharrani and Muthuraj, 2010) *B. licheniformis* RSP-09-37 (Sareen and Mishra, 2008) Haloalkaliphilic bacterium sp. (Dodia et al., 2008) และ *B. licheniformis* RKK04 (Toyokawa et al., 2010) ซึ่งถูกยับยั้งด้วย PMSF ในขณะที่ 2-mercaptoethanol (β -ME) ซึ่งเป็นสารรีดิวซ์ (Reducing agent) ที่มีผลทำลายพันธะไดซัลไฟด์ซึ่งมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เล็กน้อย แสดงว่าพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide bond) ไม่ใช่พันธะหลักสำหรับการเสถียรโครงสร้างของเอนไซม์

ตารางที่ 4.8 ผลของสารยับยั้งและสารเคมีต่อกิจกรรมของโปรติเอสจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7

| Substance | Targeted enzyme | Final concentration | Relative activity (%) |
|-------------------------------|---|---------------------|-----------------------|
| Leupeptin | Trypsin-like and some cysteine protease | 100 μ M | 95 |
| Trypsin inhibitor I (soybean) | Trypsin-like protease | 0.02 mg/ml | 89 |
| TLCK | Trypsin-like protease | 100 μ M | 88 |
| TPCK | Chymotrypsin-like protease | 100 μ M | 84 |
| PMSF | Serine protease | 1 mM | 11 |
| EDTA | Metallo protease | 10 mM | 82 |
| Bestatin | Metallo aminopeptidase | 10 μ M | 93 |
| Pepstatin | Acid protease | 10 μ M | 92 |
| E-64 | Cysteine protease | 10 μ M | 87 |
| 2-mercaptoethanol | - | 10 mM | 89 |

เมื่อศึกษาผลของไอออนและไอออนโลหะต่อกิจกรรมของโปรติเอส พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ ถูกกระตุ้นได้เล็กน้อยด้วยไอออน Li^+ , Na^+ และ Ca^{2+} และไอออนโลหะ Fe^{3+} , Mn^{2+} และ Zn^{2+} แต่ถูกยับยั้งเล็กน้อยด้วย K^+ และ Mg^{2+} (รูปที่ 4.9) อีกทั้งถูกยับยั้งด้วยโลหะ Cu^{2+} ซึ่งแตกต่างจากผลที่ใช้ไฟบรินเป็นสารตั้งต้น *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 เอนไซม์ถูกยับยั้งด้วยโลหะ Zn^{2+} แต่เพียงอย่างเดียว อาจเป็นเพราะว่าสารตั้งต้นที่ใช้ต่างชนิดกัน Sinsuwan et al. (2010) พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์จาก *Virgibacillus* sp. SK33 ถูกยับยั้งเล็กน้อยด้วยไอออน K^+ และกระตุ้นกิจกรรมได้ด้วยไอออน Li^+ , Na^+ และ Ca^{2+} และไอออนโลหะ Fe^{3+} , Mn^{2+} และ Zn^{2+} แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วย Cu^{2+} Phrommao et al. (2011) พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ถูกยับยั้งด้วย Cu^{2+} , Zn^{2+} และ Fe^{3+} แต่กระตุ้นกิจกรรมได้เล็กน้อยด้วยไอออน Mn^{2+} ยังมีรายงานเอนไซม์บริสุทธิ์จาก *B. laterosporus* ถูกยับยั้งด้วย Cu^{2+} , K^+ และ Zn^{2+} (Usharrani and Muthuraj, 2010) โปรติเอสจาก *B. licheniformis* RSP-09-37 ถูกกระตุ้นกิจกรรมได้ด้วย Ca^{2+} ในขณะที่กิจกรรมถูกยับยั้งด้วย Mn^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} และ

Cu^{2+} (Sareen and Mishra, 2008) และโปรตีนจาก *B. licheniformis* RKK 04 ถูกยับยั้งด้วย Cu^{2+} , Ag^+ และ Zn^{2+} แต่ถูกกระตุ้นด้วย Mn^{2+} และ Ca^{2+} ไม่มีผลต่อการเร่งกิจกรรมของโปรตีน (Toyokawa et al., 2010) ในขณะที่รายงานโปรตีนจาก Haloalkaliphilic bacterium นั้นถูกยับยั้งกิจกรรมด้วย Ca^{2+} และ Mg^{2+} (Dodia et al., 2008) จะเห็นได้ว่าผลของไอออนและไอออนโลหะต่อกิจกรรมของโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรียต่างสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน

ตารางที่ 4.9 ผลของไอออนและไอออนโลหะต่อกิจกรรมของโปรตีนจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7

| Substance | Final concentration (mM) | Relative activity (%) |
|------------------------------|--------------------------|-----------------------|
| Mono- and di- valent cations | | |
| Li^+ | 10 | 108 |
| Na^+ | 10 | 116 |
| K^+ | 10 | 97 |
| Mg^{2+} | 10 | 98 |
| Ca^{2+} | 10 | 111 |
| Metal ions | | |
| Cu^{2+} | 1 | 90 |
| Co^{2+} | 1 | 104 |
| Fe^{3+} | 1 | 110 |
| Mn^{2+} | 1 | 108 |
| Zn^{2+} | 1 | 108 |

บทที่ 5

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 บทสรุป

Virgibacillus sp. SK1-3-7 เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่แสดงศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน (Fibrinolytic enzyme) และเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน (Proteolytic enzyme) ได้สูงสุดจากแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบทั้งหมด 25 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้ในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาที่ผลิตโปรติเอสที่หลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (Extracellular protease) เอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินและย่อยสลายโปรตีนที่ผลิตได้จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 มีขนาด 20 และ 36 กิโลดาลตัน เอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินแสดงกิจกรรมในสถานะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูง (4 โมลาร์) สามารถแสดงกิจกรรมได้ในสถานะที่มีและไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ นอกจากนี้เอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินยังแสดงเสถียรภาพในช่วงพีเอชที่กว้าง คือ 4-10 เอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินถูกกระตุ้นการเร่งกิจกรรมด้วยเกลือแคลเซียมคลอไรด์และโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินที่มีคุณสมบัติทนเกลือมาก่อน เอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินถูกกระตุ้นการเร่งกิจกรรมด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ เอนไซม์แสดงคุณลักษณะโปรติเอสกลุ่มซีรีน (Serine protease) ที่ถูกยับยั้งด้วย PMSF ทำหน้าที่คล้ายซบพิลิสิน เนื่องจากสามารถย่อยสลายสารตั้งต้นสังเคราะห์ Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA ได้ดี เอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ย่อยสลายไฟบรินได้สูงกว่าเอนไซม์พลาสมินซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายไฟบรินที่เกิดขึ้นในร่างกาย ดังนั้นเอนไซม์ย่อยสลายไฟบรินจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์สุขภาพซึ่งสามารถลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดและหัวใจ

เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 มีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งกิจกรรมที่ 60 องศาเซลเซียส และพีเอช 9 ตามลำดับ และเอนไซม์ยังคงแสดงกิจกรรมได้สูงในช่วงพีเอชค่อนข้างกว้างเช่นเดียวกับเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน คือ 4-10 นอกจากนี้โปรติเอสที่ผลิตได้แสดงคุณสมบัติทนเกลือ และถูกกระตุ้นกิจกรรมด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์สูง 4 โมลาร์ ดังนั้นแบคทีเรีย *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 มีศักยภาพที่จะพัฒนาไปเป็นกล้าเชื้อเพื่อใช้ในกระบวนการหมักน้ำปลาได้ ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับเอนไซม์ทางการค้าที่มีกิจกรรมลดลงในสถานะที่มีเกลือสูง ยิ่งไปกว่านี้โปรติเอสแสดงกิจกรรมได้ทั้งในสถานะที่มีและไม่มีเกลือโซเดียม

คลอไรด์สูง ดังนั้นจะเห็นได้ว่าโปรตีนจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 มีศักยภาพในการประยุกต์ใช้ในสภาวะที่มีเกลือสูงและไม่มีเกลือได้ทั้งสองสภาวะ

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรมีการศึกษาการนำไปใช้ประโยชน์ได้จริงของเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน จาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 ในอาหาร เพื่อให้ทราบถึงศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายไฟบริน ในอาหารที่มีองค์ประกอบของโปรตีนเป็นหลัก

5.2.2 ควรมีการศึกษาการย่อยสลายไฟบรินจาก *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 โดยทดสอบในสัตว์ทดลองหรือมนุษย์ และศึกษาความเป็นพิษของเอนไซม์ในเซลล์ปกติของร่างกาย



รายการอ้างอิง

- กำพล เลาหพันธุ์แสง. (2542). **ศัลยศาสตร์หลอดเลือด**. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์เรือนแก้ว
- An, H., Seymour, T. A., Wu, J., and Morrissey, M. T. (1994). Assay systems and characterization of Pacific whiting (*Merluccius productus*) protease. **Journal of Food Science**. 59(2): 277-281.
- Almas, S., Hameed, A., Shelly, D., and Mohan, P. (2009). Purification and characterization of a novel protease from *Bacillus* strain SAL1. **African Journal of Biotechnology**. 8 (15): 3603-3609.
- Adinarayana, K., Ellaiah, P., and Prasad, D. S. (2003). Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-11. **American Association of Pharmaceutical Scientists**. 4(4): 1-4
- Akolkar, A. V., Durai, D., and Desai, A. J. (2010). Halobacterium sp. SP1(1) as a starter culture for accelerating fish sauce fermentation. **Journal of Applied Microbiology**. 109(1): 44-53.
- Agrebi, R., et al. (2009). Fibrinolytic enzymes from a newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis* A26: characterization and statistical media optimization. **Canadian Journal of Microbiology**. 55(9):1049-1061.
- Agrebi, R., et al. (2010). Fibrinolytic serine protease isolation from *Bacillus amyloliquefaciens* An6 Grown on *Mirabilis jalapa* tuber powders. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 162(1): 75-88.
- Arulmani, M., et al. (2007). Purification and partial characterization of serine protease from thermostable alkalophilic *Bacillus laterosporus*-AK1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 23(4): 475-481.
- Astrup, T., and Mullertz, S. (1952). The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 40(2): 346-351.

- Ballinger, M., and Wells, J.A. (1998). Subtilisin. In A. Barrett, N.D. Rawlings and J.F. Woessner (eds). **Handbook of proteolytic enzymes** (pp 289-294). San Diego: Academic Press.
- Beddows, C. G., Ardeshir, A. G., and Daud, W. J. (1979). Biochemical changes occurring during the manufacture of Budu. **Journal of Science of Food and Agriculture**. 30(11): 1097-1103.
- Blann, A. D., Landray, M. J., and Lip, G. Y. (2002). An overview of antithrombotic therapy. **British Medical Journal**. 325(7367): 762-765.
- Bode, C., Runge, M., and Smalling, R. W. (1996). The future of thrombolysis in the treatment of acute myocardial infarction. **European Heart Journal** . 17(Supplement E): 55-60.
- Bokarewa, M. I., Jin, T., and Tarkowski, A. (2006). *Staphylococcus aureus*: Staphylokinase. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. 38(4): 504–509.
- Boye, J. I., Ma, C. Y., and Harwalker, V. R. (1997). Thermal denaturation and coagulation of proteins. In S. Damodaran, and A., Paraf (Eds.). **Proteins and Their Applications** (pp. 25-66). New York: Marcel Dekker.
- Castellino, F. J. (1995). Plasminogen. In K. A. High and H. R. Roberts (eds). **Molecular basis of Thrombosis and Hemostasis** (pp 495-451). New York: Marcel Dekker.
- Castellino, F. J., and Powell, J. R. (1981). Human plasminogen. **Methods in Enzymology**. 80 (Pt. C): 365-378.
- Carrasco, I. J., Marquez, M. C., and Ventosa, A. (2009). *Virgibacillus salinus* sp. nov., a moderately halophilic bacterium from sediment of a saline lake. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 59: 3068–3073.
- Chitte, R. R., and Dey, S. (2000). Potent fibrinolytic enzyme from a thermophilic *Streptomyces megasporus* strain SD5. **Letters in Applied Microbiology**. 31(6): 405–410.
- Choi, H-Y., and Sa, Y-S. (2001). Fibrinolytic and antithrombotic protease from *Spirodela polyrhiza*. **Bioscience Biotechnology and Biochemical**. 65(4): 781-786.
- Chaiyanan, S., et al. (1999). Polyphasic taxonomy of a novel *Halobacillus*, *Halobacillus thailandensis* sp. nov. isolated from fish sauce. **Systematic and Applied Microbiology**. 22(3): 360-365.
- Chang, C-T., Fan, M-H., Kuo, F-C., and Sung, H-Y. (2000). Potent fibrinolytic enzyme from a mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NK1. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 48(8): 3210-3216.

- Chamroensaksri, N., Akaracharanya, A., Visessanguan, W., and Tanasupawat, S. (2008). Characterization of halophilic bacterium NB2-1 from pla-ra and its protease production. **Journal of Food Biochemistry**. 32(4): 536-555.
- Chen, Y-G., et al. (2009). *Virgibacillus litoralis* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from saline soil. **Antonie van Leeuwenhoek**. 96: 323-329.
- Colen, D. (1980). On the regulation and control of fibrinolysis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. 43: 77-89.
- Collen, D., and Lijnen, H. R. (1991). Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. **Blood**. 78: 3114-3124.
- Deng, A., Wu, J., Zhang, Y., Zhang, G., and Wen, T. (2010). Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. B001. **Bioresource Technology**. 101(18): 7100-7106.
- Dodia, M. S., et al. (2008). Purification and stability characteristics of an alkaline serine protease from a newly isolated Haloalkaliphilic bacterium sp. AH-6. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 35(2): 121-131.
- Fernández, J., Mohedano, A. F., Polanco, M. J., Medina, M., and Nuñez, M. (1996). Purification and characterization of an extracellular cysteine proteinase produced by *Micrococcus* sp. INIA 528. **Journal of Applied Microbiology**. 81(1): 27-34.
- Fujita, M., Nomura, K., Hong, K., Ito, Y., Asada, A., and Nishimuro, S. (1993). Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (Nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. 197(3): 1340-1347.
- Fujita, M., Hong, K., Ito, Y., Misawa, S., Takeuchi, N., Kariya, K., and Nishimuro, S. (1995). Transport of nattokinase across the rat intestinal tract. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. 18(9): 1194-1196.
- Fujita, M., Ito, Y., and Nishimuro, H. S. (1995). Characterization of nattokinase-degraded products from Human fibrinogen or cross-linked fibrin. **Fibrinolysis**. 9(3): 157-164.
- Flannery, W. L. (1956). Current status of knowledge of halophilic bacteria. **Bacteriological Reviews**. 20:49-66.

- Graycar, T. P., Ballinger, M. D., and Wells, J. A. (2004). Subtilisin. In A. J. Barrett, N. D. Rawlings and J. F. Woessner (eds.). **Handbook of proteolytic enzymes** (Vol. 2). (2nd ed., pp. 1786-1792). Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Gupta, A., Joseph, B., Mani, A., and Thomas, G. (2008). Biosynthesis and properties of an extracellular thermostable serine alkaline protease from *Virgibacillus pantothenicus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 24: 237–243.
- Godfrey, T., and West, S. (1996). **Industrial enzymology**. (2nd ed.). New York: Macmillan Publishers.
- Haddar, A., Bougatef, A., Agrebi, R., Sellami-Kamoun, A., and Nasri, M. (2009). A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavensis* A21. Purification and characterization. **Process Biochemistry**. 44(1): 29-35.A
- Hartley, B. S. (1960). Proteolytic enzymes. **Annual Review of Biochemistry**. 29: 45-72.
- Heyndrickx, M., et al. (1998). *Virgibacillus*: a new genus to accommodate *Bacillus pantothenicus* (Proom and Knight 1950). Emended description of *Virgibacillus pantothenicus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 48(1): 99-106.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., and Williams, S. T. (1994). Extremely halophilic, aerobic archaeobacteria (Halobacteria). In W. R. Hensyl (ed.). **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology** (9th ed., pp. 739-746). Baltimore, Md: Williams & Wilkins.
- Hiraga, K., et al. (2005). Purification and characterization of serine proteinase from a halophilic bacterium, *Filobacillus* sp. RF2-5. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. 69(1): 38-44.
- Hua, Y., Jiang, B., Mine, Y., and Mu, W. (2008). Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. nov. SK006 isolated from an Asian traditional fermented shrimp paste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56(4): 1451-1457.
- Jeong, Y. K., et al. (2001). Purification and biochemical characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* BK-17. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. 17(1): 89-92.
- Kamekura, M., and Onishi, H. (1974). Protease formation by a moderately halophilic *Bacillus* strain. **Journal of Applied Microbiology**. 27 (4): 809-810.

- Kamekura, M., and Seno, Y. (1990). A halophilic extracellular protease from a halophilic archaeobacterium strain 172 P1. **Biochemistry and Cell Biology**. 68(1): 352-359.
- Karadzic, I., Masui, A., and Fujiwara, N. (2004). Purification and characterization of a protease from *Pseudomonas aeruginosa* grown in cutting oil. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 4(3): 145–152.
- Karbalaeei-Heidari, H. R., Ziaee, A-A., and Amoozegar, M. A. (2007a). Purification and biochemical characterization of a protease secreted by the *Salinivibrio* sp. strain AF-2004 and its behavior in organic solvents. **Extremophiles**. 11(2): 237-243.
- Karbalaeei-Heidari, H. R., Ziaee, A-A., and Amoozegar, M. A. (2007b). Purification and characterization of an extracellular haloalkaline protease produced by the moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. **Enzyme and Microbial Technology**. 40(2): 266-272.
- Karbalaeei-Heidari, H. R., Amoozegar, M. A., Hajjighasemi, M., Ziaee, A-A., and Ventosa, A. (2009). Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium *Halobacillus karajensis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 36(1): 21-27.
- Kim, W. J., and Kim, S. M. (2005). Purification and characterization of *Bacillus subtilis* JM-3 protease from anchovy sauce. **Journal of Food Biochemistry**. 29(5):591–610.
- Kim, E-Y., Kim, D-G., Kim, Y-R., Choi, S-Y., and Kong, I-S. (2009). Isolation and identification of halotolerant *Bacillus* sp. SJ-10 and characterization of its extracellular protease. **Journal of Microbiology**. 45(2): 193-199.
- Kim, H-K., et al. (1997). Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KA38 originated from fermented fish. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 84(4): 307-312.
- Kim, W., et al. (1996). Purification and characterization of fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK11-4 screened from Chungkook-Jang. **Applied and Environmental Microbiology**. 62(7): 2482-2488.
- Kim, S-H., and Choi, N-S. (2000). Purification and characterization of Subtilisin DJ-4 secreted by *Bacillus* sp. strain DJ-4 screened from Doen-Jang. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. 64(8): 1722-1725.

- Kim, S-H., and Choi, N-S. (2001). The effect of sodium chloride on the serine-type fibrinolytic enzymes and the thermostability of extracellular protease from *Bacillus amyloliquefaciens* DJ-4. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**. 34(2): 134-138.
- Kushner, D. J. (1993). Growth and nutrition of halophilic bacteria. In R.H. Vreeland and L.I. Hochstein (eds.). **The biology of halophilic bacteria** (pp. 87-89). Boca Raton: CRC Press.
- Larsen, H. (1962). Halophilism. In I. C. Gunsalus and R. Y. Stanier (eds). **The Bacteria** (vol. 4, pp. 297-336). London: Academic Press.
- Lama, L., Romano, I., Calandrelli, V., Nicolaus, B., and Gambacorta, A. (2005). Purification and characterization of a protease produced by an aerobic haloalkaliphilic species belonging to the *Salinivibrio* genus. **Research in Microbiology**. 156(4). 478-484.
- Lack, C. H. (1948). Staphylokinase: an activator of plasma protease. **Nature**. 161(4093): 559-560.
- Lijnen, H. R., et al. (1994). Mechanisms of plasminogen activation. **Journal of Internal Medicine**. 236(4): 415-424.
- Lijnen, H. R., Van Hoef, B., De Cock, F., and Collen, D. (1989). The mechanism of plasminogen activation and fibrin dissolution by single chain urokinase-plasminogen activator in plasma milieu in vitro. **Blood** . 73(7): 1864:1872.
- Lopetcharat, K., Choi, Y. J., Park, J. W., and Daeschel, M. A. (2001). Fish sauce products and manufacturing; a review. **Food Reviews International**. 17(1): 65-68.
- Lu, F., et al. (2010). Purification and characterization of a novel anticoagulant and fibrinolytic enzyme produced by endophytic bacterium *Paenibacillus polymyxa* EJS-3. **Thrombosis Research**. 126(5): e349-e355.
- Mala, M., and Srividya, S. (2010). Partial purification and properties of a laundry detergent compatible alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* species Y. **Indian Journal of Microbiology**. 50 (3): 309-317.
- Matthews, B. W. (1996). Studies on protein stability with T4 lysozyme. **Advances in Protein Chemistry**. 46: 249-278.
- Maurer, K-H. (2004). Detergent proteases. **Current Opinion in Biotechnology**. 15(4): 330-334.

- Mikola, L., and Mikola, J. (1986). Plant proteolytic enzymes. In M. J. Dalling (ed.) (Vol. 1) **Occurrence and properties of different types of peptidases in higher plants** (pp 97–117). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Morihara, K. (1974). Comparative specificity of microbial proteinases. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**. 41: 179-243.
- Nawong, S. (2006). Isolation, selection and identification of protease-producing bacteria from fish sauce fermentation to be used as starter cultures. M.S. thesis, Food Technology Suranaree University of Technology, Thailand.
- Namwong, S., et al. (2006). A halophilic serine proteinase from *Halobacillus* sp. SR5-3 isolated from fish sauce: purification and characterization. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. 70(6):1395-401.
- Nejad, Z. J., Yaghmaei, S., and Hosseini, R. H. (2010). Production of extracellular protease and determination of optimize condition by *Bacillus licheniformis* BBRC 100053. **Chemical Engineering Transactions**. 21: 1447-1452.
- Nuguchi, H., et al. (2004). *Bacillus vietnamensis* sp. nov., a moderately halotolerant, aerobic, endospore-forming bacterium isolated from Vietnamese fish sauce. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 54(6): 2117-2120.
- Novokhatny, V., Taylor, K., and Zimmerman, T. P. (2003). Thrombolytic potency of acid-stabilized plasmin: superiority over tissue-type plasminogen activator in an in vitro model of catheter-assisted thrombolysis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. 1(5): 1034–1041.
- Norberg, P., and Hofsten, B. V. (1969). Proteolytic enzymes from extremely halophilic bacteria. **Journal of General Microbiology**. 55(2): 251-256.
- Oren, A. (2003). Halophilic microorganisms and their environments. **International Microbiology**. 6(2): 151–152.
- Osturk, S., et al. (2009). Alkaline serine protease from halotolerant *Bacillus licheniformis* BA17. **Annals of Microbiology**. 59 (1): 83-90.
- Page, M. J., and Cera, E. D. (2006). Role of Na⁺ and K⁺ in enzyme function. **Physiological Reviews**. 86: 1049 –1092.

- Paik, H-D., et al. (2004). Purification and characterization of the fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus subtilis* KCK-7 from Chungkookjang. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. 14(4): 829-835.
- Pais, E., Alexy, T., Holsworth, R. E., and Meiselman, H. J. (2006). Effects of nattokinase a pro-fibrinolytic enzyme, on red blood cell aggregation and whole blood viscosity. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**. 35(1-2): 139-142.
- Peng, Q-Z., et al. (2009). *Virgibacillus zhanjiangensis* sp. nov., a marine bacterium isolated from sea water. **Antonie van Leeuwenhoek**. 96(4): 645-652.
- Peng, Y., Huang, Q., Zhange, R-H., and Zhang, Y-Z. (2003). Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. 134(1): 45-52.
- Pertesen, L. C., Lund, L. R., Nielsen, L. S., Dano, K., and Skriver, L. (1988). One-chain urokinase-type plasminogen activator from human sarcoma cells is a proenzyme with little or no intrinsic activity. **Journal of Biological Chemistry**. 263(23):11189-11195.
- Penica, D., et al. (1983). Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. **Nature**. 301(5897): 214-221.
- Phrommao, E., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2011). Identification of novel halotolerant bacillopeptidase F-like proteinases from a moderately halophilic bacterium, *Virgibacillus* sp. SK37. **Journal of Applied Microbiology**. 110(1): 191-201.
- Rattray, F. P., Fox, P. F., and Healy, A. (1997). Specificity of an extracellular proteinase from *Brevibacterium linens* ATCC 9174 on bovine beta-casein. **Applied and Environmental Microbiology**. 63(6): 2468-2471.
- Rawlings, N. D., and Barrett, A. J. (1993). Evolutionary families of peptidases. **Biochemistry Journal**. 290 (Pt 1): 205-218.
- Raksakulthai, N., and Haard, N. F. (1992). Correlation between the concentration of peptides and amino acids and the flavor of fish sauce. **Asean Food Journal**. 7(3): 86-90.
- Rao, J. K. M., and Argos, P. (1981). Structural stability of halophilic proteins. **Biochemistry**. 20(23):6536-43.

- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatege, M. S., and Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 62(3): 597-635.
- Rijken, D. C., Wijngaards, G., Zaal-de Jong, M., and Welbergen, J. (1979). Purification and partial characterization of plasminogen activator from human uterine tissue. **Journal of Biochemistry and Biophysics**. 580(1): 140-153.
- Robbins, K. C., Summaria, L., Hsieh, B., and Shah, R. J. (1967). The peptide chains of human plasmin. Mechanism of activation of human plasminogen to plasmin. **Journal of Biological Chemistry**. 242(10): 2333-2342.
- Sareen R, and Mishra, P. (2008). Purification and characterization of organic solvent stable protease from *Bacillus licheniformis* RSP-09-37. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 79(3): 399-405.
- Sanchez-Porro, C., Mellado, E., Bertoldo, C., Antranikian, G., and Ventosa, A.(2003). Screening and characterization of the protease CP1 produced by the moderately halophilic bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain CP76. **Extremophiles**. 7(3): 221-228.
- Sasithi, P., Kasemasarn, B. O., Liston, J., and Dollar, A. M. (1996). Microbiology and chemistry of fermented fish. **Journal of Food Science**. 31(1): 105-110.
- Setyorini, E., Kim, Y. J., Takenaka, S., Murakami, S., and Aoki, K. (2006). Purification and characterization of a halotolerant intracellular protease from *Bacillus subtilis* strain FP-133. **Journal of Basic Microbiology**. 46(4): 294-304.
- Simkhada, J. R., Mander, P., Cho, S. S., and Yoo, J. C. (2010). A novel fibrinolytic protease from *Streptomyces* sp. CS684. **Process Biochemistry**. 45(1): 88-93.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2010a). A NaCl-stable serine proteinase from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from Thai fish sauce. **Food Chemistry**. 119(2): 573–579.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2010b). Purification and characterization of a salt-activated and organic solvent-stable heterotrimer proteinase from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from Thai fish sauce. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58(1): 248–256.

- Sinsuwan, S., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2008a). Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. **Process Biochemistry**. 43: 185–192.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2008b). Characterization of Ca²⁺ activated cell bound proteinase from *Virgibacillus* sp. SK37 isolated from fish sauce fermentation. **LWT - Food Science and Technology**. 41(10):2166-2174.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2007). NaCl-Activated Extracellular Proteinase from *Virgibacillus* sp. SK37 Isolated from Fish Sauce Fermentation. **Journal of Food Science**. 72(5): C264-269.
- Shah, K. P., Zahger, D., and Ganz, W. (1995). Streptokinase in acute myocardial infarction. In S. G. Francis and J. S. Alpert (eds). **Coronary care** (pp 409-410). New York: Little Brown.
- Steinkraus, K. H. (1989). **Industrialization of indigenous fermented foods**. New York : M. Dekker.
- Stepanov, V. M., et al. (1992). A serine proteinase of an archaeobacterium, *Halobacterium mediterranei*: a homologue of eubacterial subtilisins. **Biochemical Journal**. 285 (Pt 1): 281-286.
- Sung, J. H., et al. (2010). Purification, molecular cloning, and biochemical characterization of subtilisin JB1 from a newly isolated *Bacillus subtilis* JB1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 162(3): 900-911.
- Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H., and Muraki, H. (1987). A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 43(10): 1110-1111.
- Sumi, H., Hamada, H., Nakanishi, K., and Hiratani, H. (1990). Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase. **Acta Haematologica**. 84(3): 139-143.
- Suzuki, M., et al. (1997). A novel member of the subtilisin-like protease family from *Streptomyces albogrisolus*. **Journal of Bacteriology**. 179(1): 430–438.
- Suzuki, Y., et al. (2003). Dietary supplementation of fermented soybean, natto, suppresses intimal thickening and modulates the lysis of mural thrombi after endothelial injury in rat femoral artery. **Life Sciences**. 73(10): 1289-1298.

- Tanskul, S., et al. (2009). An alkaline serine-proteinase from a bacterium isolated from bat feces: Purification and characterization. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. 73(11): 2393-2398.
- Thelwell, C. (2010). Fibrinolysis standard: A review of the current status. **Journal of Biological Standardization**. 38(4): 437-448.
- Toyokawa, Y., et al. (2010). Purification and characterization of a halotolerant serine proteinase from thermotolerant *Bacillus licheniformis* RKK-04 isolated from Thai fish sauce. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 86(6): 1867-1875.
- Turpie, A. G., Chin, B. S., and Lip, G. Y. (2002). Venous thromboembolism: treatment strategies. **British Medical Journal**. 325(7370): 947-950.
- Uchida, H., et al. (2004). Purification and properties of a protease produced by *Bacillus subtilis* CN2 isolated from a Vietnamese fish sauce. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 20(6): 579-582.
- Udomsil, N., Rodtong, S., Tanasupawat, S., and Yongsawatdigul, J. (2010). Proteinase-producing halophilic lactic acid bacteria isolated from fish sauce fermentation and their ability to produce volatile compounds. **International Journal of Food Microbiology**. 141(3): 186-194.
- Usharani, B., and Muthuraj, M. (2010). Production and characterization of protease enzyme from *Bacillus laterosporus*. **African Journal of Microbiology Research**. 4 (11): 1057-1063.
- Ventosa, A., and Nieto, J. J. (1995). Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. **World Journal Microbiology Biotechnology**. 11(1): 85-94.
- Ventosa, A., Nieto, J. J., and Oren, A. (1998). Biology of moderately aerobic bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 62(2): 504-544.
- Vidyasagar, M., Prakash, S., Mahajan, V., Shouche, Y. S., and Sreeramulu, K. (2009). Purification and characterization of an extreme halothermophilic protease from a halophilic bacterium *Chromohalobacter* sp. TVSP101. **Brazilian Journal of Microbiology**. 40(1): 12-19.
- Walsh, P. N., and Ahmad, S. S. (2002). Proteases in blood clotting. **Essays in Biochemistry**. 38: 95-111.

- Wang, C., et al. (2009). Purification and characterization of nattokinase from *Bacillus subtilis* natto B-12. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 57(20): 9722-9729.
- Wang, C. T., et al. (2006). Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme of *Bacillus subtilis* DC33, isolated from Chinese traditional Douchi. **Journal of Industrial Microbiological and Biotechnology**. 33(9): 750-758.
- Wang, C-Y., Chang, C-C., Ng, C. C., Chen, T-W., and Shyn, Y-T. (2008). *Virgibacillus chiguensis* sp. nov., a novel halophilic bacterium isolated from Chigu, a previously commercial saltern located in southern Taiwan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 58(Pt 2): 341-345.
- Wang, S-L., Chen, H-J., Liang, T-W., and Lin, D-L. (2009). A novel nattokinase produced by *Pseudomonas* sp. TKU015 using shrimp shells as substrate. **Process Biochemistry**. 44(1): 70-76.
- Wei, Q., Wolf-Hall, C., and Chang, K. C. (2001). Natto characteristics as affected by steaming time, *Bacillus* strain, and fermentation time. **Journal of Food Science**. 66(1): 167-173.
- Werf, F. V. D. and Janssens, S. (1996). Acute coronary syndromes: Virchow's triad revisited. **The Lancet**. 348:s2.
- Wiman, B. (1977). Primary structure of the β -chain of human plasmin. **European Journal of Biochemistry**. 76(1): 129-137.
- Wolberg, A. S. (2007). Thrombin generation and fibrin clot structure. **Blood Reviews**. 21(3): 131-142.
- Wong, A. H. K., and Mine, Y. (2004). Novel fibrinolytic enzyme in fermented shrimp paste, a traditional asian fermented seasoning. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 52(1): 980-986.
- Yongsawatdigul, J., Rodtong, S., and Raksakulthai, N. (2007). Acceleration of Thai fish sauce fermentation using proteinases and bacterial starter cultures. **Journal of Food Science**. 72(9): M382-M390.
- Yossan, S., Reungsang, A., and Yasuda, M. (2006). Purification and characterization of alkaline protease from *Bacillus megaterium* isolated from Thai fish sauce fermentation process. **Science Asia**. 32(4): 377-383.

ประวัติผู้เขียน

นางสาวอังคณา มนตรีวงษ์ เกิดเมื่อวันที่ 28 พฤศจิกายน พ.ศ. 2528 ที่อำเภอขุนหาญ จังหวัดศรีสะเกษ จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้นและตอนปลายจากโรงเรียนกันทรอม-วิทยาคม และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ในปีการศึกษา 2550 ในระหว่างการศึกษาระดับปริญญาตรีได้ปฏิบัติงาน โครงการสหกิจศึกษาในแผนกประกันคุณภาพ (Quality Assurance; QA) ณ บริษัท เปอริเอ่ วิเทล (ประเทศไทย) จำกัด จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (เมษายน-สิงหาคม 2550) ภายหลังสำเร็จการศึกษาได้เข้าทำงานกับหน่วยวิจัยโปรตีนอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในตำแหน่งผู้ช่วยวิจัย (ธันวาคม 2550-เมษายน 2551) จึงทำให้เกิดแรงจูงใจที่จะศึกษาต่อในระดับปริญญาโททางด้านโปรตีนอาหาร หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีการศึกษา 2551

ผลงานทางวิชาการ

Characterization of fibrinolytic enzymes from a moderately halophilic bacterium isolated from fish sauce fermentation. อังคณา มนตรีวงษ์ สุรศักดิ์ รอดทอง และ จิรวัดน์ ขงสวัสดิ์กุล. นำเสนอโปสเตอร์ (Poster presentation) ในงานการประชุมนานาชาติ เรื่อง Biotechnology for Healthy Living (The 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology) ครั้งที่ 22 ในวันที่ 20-22 ตุลาคม 2553 ณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตตรัง จังหวัดตรัง