

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาคุณสมบัติเอนไซม์ฮาโลฟิลิกโปรตีนเอสที่ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นของแบคทีเรียชอบเกลือที่คัดแยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลา
หน่วยกิต	12
ผู้เขียน	นายปรีดา ผดุงเกียรติวงษ์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.วิมลศิริ พรทวีวัฒน์
หลักสูตร	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2544

บทคัดย่อ

การศึกษาการเจริญเติบโตและการสร้างเอนไซม์โปรตีนเอสของแบคทีเรียชอบเกลือที่แยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลา คัดแยกได้สายพันธุ์ IOR-25 ที่มีการสร้างเอนไซม์โปรตีนเอสได้สูง สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างเอนไซม์โปรตีนเอสของแบคทีเรียชอบเกลือสายพันธุ์ IOR-25 คือที่ pH 6.0 และมีความเข้มข้นของเกลือ 25 เปอร์เซ็นต์ ระดับความเข้มข้นของเกลือมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ การเจริญเติบโตและการสร้างเอนไซม์โปรตีนเอสที่ความเข้มข้นเกลือ 25 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเซลล์มีรูปร่างเป็นแท่ง เซลล์จะเปลี่ยนรูปร่างไปเป็นทรงกลมเมื่อมีความเข้มข้นของเกลือลดลงเหลือ 10 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ และการสร้างเอนไซม์โปรตีนเอสที่ความเข้มข้นของเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์หรือต่ำกว่า เซลล์ของแบคทีเรียชอบเกลือไม่สามารถทนอยู่ได้เมื่อไม่มีเกลือในอาหาร

เอนไซม์ฮาโลฟิลิกโปรตีนเอสของแบคทีเรียชอบเกลือสายพันธุ์ IOR-25 ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ bacitracin-Sepharose 4B affinity chromatography เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 20 เท่าเมื่อเทียบกับเอนไซม์เริ่มต้น และมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่ pH 6.0 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของเกลือ 25 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์จัดอยู่ในกลุ่มเซรีนโปรตีนเอสเนื่องจากสูญเสียสภาพการทำงานอย่างสมบูรณ์ด้วย Phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) หลังจากนั้นเอนไซม์บริสุทธิ์ผ่านอเล็กโตรโพรซีตบน SDS-polyacrylamide gel พบแถบโปรตีน 2 แถบมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 101 กิโลดาลตัน และ 47 กิโลดาลตัน

Thesis Title	Purification and Characterization of Halophilic Protease by Halophilic Bacteria Isolated from Fermenting Fish Sauce
Thesis Credits	12
Candidate	Mr. Preeda Padongkeittiwong
Supervisors	Dr. Wimolsiri Pornraveewat
Degree of Study	Master of Science
Department	Microbiology
Academic Year	2001

Abstract

Growth and protease production of *Halobacterium* strains isolated from fermenting fish sauce were studied. The isolate IOR-25 gave the highest protease activity. The optimum pH and salt concentration for growth and enzyme production of this isolate were pH 6.0 and 25% salt (w/v), respectively. Salt concentration affected cell morphology, growth, and enzyme production. At 25% (w/v) salt concentration, cells were rod-shaped. Cells became coccoid shape when the salt concentration was decreased to 10% (w/v). No cell multiplication as well as protease production was observed at 10% (w/v) salt concentration or lower. The bacterial cells could not withstand the condition of absence of salt in the medium.

Purification of extracellular halophilic proteases of *Halobacterium* isolate IOR-25, using bacitracin-Sepharose 4B affinity chromatography, could increase the protease activity up to 20-fold of the crude enzyme. The optimum conditions for enzyme activity of the purified protease were pH 6.0, 55 °C, and 25% (w/v) salt concentration, respectively. The enzymes were classified to be serine proteases for complete inactivation by Phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF). After electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels, the purified enzymes gave two protein bands at M_r 101 kDa and 47 kDa.