คุณลักษณะของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นปานกลางและแบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นสูงที่แยกจากน้ำปลา

Characterization of Purified Protease from Moderately and Extremely of Halophilic Bacteria Isolated from Fish Sauce

วีระสิทธิ์ กัลยากฤต[1] กานต์ธิดา วดีศิริศักดิ์[1] และ มังกร โรจน์ประภากร[1]

Werasit Kanlayakrit[1] Kanthida Wadeesirisak[1] and Mangkorn Rodprapakorn[1]

บทคัดย่อ

ศึกษาแบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นปานกลาง *Virgibacillus halodenitrificans* PB302 และแบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นสูง *Halobacterium salinarum* PB407 ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกจากน้ำปลาของโรงงานน้ำปลาในภาคตะวันออกของประเทศไทย เมื่อนำแบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นปานกลาง *Virgibacillus halodenitrificans* PB302 มาศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์บริสุทธิ์ พบว่า เอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 10.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (°C) มีความเสถียรในช่วงพีเอชระหว่าง 4.0-12.0 และมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-60 °C มีสมบัติเป็นเอนไซม์โปรติเอสชอบเกลือ สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ (0-18.0 เปอร์เซ็นต์) กิจกรรมของเอนไซม์ถูกกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นโดย EDTA และ 1,10 phenanthroline ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์ถูกยับยั้งโดย $FeCl_2$, $MgCl_2$ และ EDTA และ 1,10 phenanthroline ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ส่วน $CaCl_2$ ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ในขณะที่เอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ที่ผลิตจากแบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นสูง *Halobacterium salinarum* PB407 สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 8.0 อุณหภูมิ 60 °C มีความเสถียรในช่วงพีเอช ระหว่าง 5.0-8.0 และมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-60 °C มีสมบัติเป็นเอนไซม์โปรติเอสชอบเกลือ สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 2.0-4.0 โมลาร์ (12.0-24.0 เปอร์เซ็นต์) กิจกรรมของเอนไซม์ถูกกระตุ้นให้เพิ่มขึ้นโดย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ และ $MgCl_2$ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์ถูกยับยั้งโดย $FeCl_2$ และ EDTA

ABSTRACT

High protease activity producing moderately halophilic bacteria *Virgibacillus halodenitrificans* PB302 and extremely halophilic bacteria *Halobacterium salinarum* PB407 isolated from fish sauce factories in the eastern part of Thailand were studied. The purified enzyme produced by moderately halophilic bacteria *Virgibacillus halodenitrificans* PB302 exhibited optimal activity at pH 10.0 and 60 °C. Stability was highest in the range of pH 4.0 to 12.0 and temperature 30 to 60 °C. This protease had marked halophilic properties, showing maximum activities in the presence of 0 to 3.0 M NaCl (0-18.0%, w/v). The activity was promoted by 1 mM EDTA and 1,10 phenanthroline and it was inhibited by $FeCl_2$, $MgCl_2$ and 10 mM EDTA and 1,10 phenanthroline. The purified protease produced by extremely halophilic bacteria *Halobacterium salinarum* PB407 exhibited optimal activity at pH 8.0 and 60 °C. Stability of enzyme was observed during pH 5.0-8.0 and 30-60 °C. It had marked halophilic enzyme properties, showing maximum activities in the presence of 2.0 to 4.0 M NaCl (12.0-24.0 %, w/v). The activity was stimulated more by 1 to 10 mM $CaCl_2$ and 10 mM $MgCl_2$, and it was inhibited by $FeCl_2$, EDTA and 1,10 phenanthroline

Key Words: Halophilic protease, Fish sauce, Halophilic bacteria, Purified protease

e-mail address: fagiwrk@ku.ac.th

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900

Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkok 10900

คำนำ

ปัจจุบันมีความสนใจเกี่ยวกับเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการหมักน้ำปลา เพื่อช่วยลดระยะเวลาในการกระบวนหมักให้สั้นลง ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียชอบเกลือ ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสชอบเกลือได้ จากการศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสชอบเกลือจากน้ำปลาไทย Bovornreungroj (2005) พบว่า แบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นสูง *Halobacterium salinarum* PB407 และแบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นปานกลาง *Virgibacillus halodenitrificans* PB302 (กานต์ธิดา, 2555) มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสชอบเกลือ จึงมีการศึกษาคุณลักษณะและการแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยการศึกษาเพิ่มเติมในการวิจัยครั้งนี้ เพื่อให้ทราบคุณลักษณะของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นปานกลางและแบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นสูงที่แยกจากน้ำปลา เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนากระบวนการหมักน้ำปลาให้ได้น้ำปลาที่มีกลิ่นและรสชาติดีขึ้นต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมเอนไซม์โปรติเอสและทำให้บริสุทธิ์

ทำการเตรียมเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Virgibacillus halodenitrificans* PB302 และ *Halobacterium salinarum* PB407 ซึ่งแยกได้จากน้ำปลาไทยโดยห้องปฏิบัติการเอนไซม์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (Kanlayakrit and Bovornreungroj, 2002) โดยเลี้ยงในอาหารเหลว M73 (Norberg and Hofsten, 1969) ทำการเก็บเกี่ยวเอนไซม์และทำให้เข้มข้นโดยวิธีอัลตร้าฟิลเตรชั่นและทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อแบคทีเรีย *Virgibacillus halodenitrificans* PB302 ใช้เจลฟิลเตรชั่น (Sephacryl S-200) และแอนไอออนโครมาโทรกราฟี (DEAE Toyopearl 650M) ส่วนเอนไซม์โปรติเอสของ *Halobacterium salinarum* PB407 ใช้โครมาโทรกราฟีแบบจำเพาะ (bacitracin-sepharose 4B)

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ดัดแปลงจากวิธีของ Sarath *et al.* (1990)

สารละลายเอนไซม์ 75 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลาย azocasein ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 30 นาที หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 15 นาที เพื่อให้เกิดการตกตะกอนอย่างสมบูรณ์ นำไปเหวี่ยงแยกตะกอนออกที่ 8,000xg เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใส 600 ไมโครลิตร ไปเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 700 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร

1 หน่วยของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (unit/ml) เท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 0.1 ภายใต้สภาวะที่ใช้วิเคราะห์

3. การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์โปรติเอส

3.1 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ช่วงพีเอชระหว่าง 4.0-12.0 จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

3.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมจากผลการวิจัยในข้อ 3.1 จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ทดลองในช่วงอุณหภูมิ 30-80 °C โดยเปลี่ยนอุณหภูมิเป็น 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 °C ตามลำดับ

3.3 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ โดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยบัฟเฟอร์ช่วงพีเอชระหว่าง 4.0-12.0 นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายเอนไซม์มาปรับพีเอชให้ได้ 7.0 จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ (residual activity)

3.4 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 °C ตามลำดับ โดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม นำไปบ่มในช่วงอุณหภูมิ 30-80 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 4 °C ทันที จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่

3.5 การศึกษาผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชเหมาะสม จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โดยการแปรผันความเข้มข้นเกลือ NaCl ในสับสเตรตให้มีความเข้มข้นช่วง 0-4.0 โมลาร์ ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม

การศึกษาผลของเกลือ NaCl ต่อการทำงานของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส โดยการกำจัดเกลือออกจากสารละลายเอนไซม์ด้วยการทำไดแอลิซิสในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสมโดยใช้ถุงเซลโลเฟน (cellophane) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่เหลือ จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่ผ่านการทำไดแอลิซิสมาบ่มกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีเกลือ NaCl เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

3.6 การศึกษาผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส โดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสม และนำเอนไซม์บ่มกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีอิออนโลหะ ได้แก่ แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) เฟอรัสคลอไรด์ ($FeCl_2$) และแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ 10 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเอนไซม์มาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่เหลือ

3.7 การศึกษาผลของสารคีเลต (chelate) ต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส โดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสม นำเอนไซม์บ่มกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีสารคีเลต ได้แก่ ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA) และ 1,10-phenathroline ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ 10 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเอนไซม์มาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่เหลือ

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Virgibacillus halodenitrificans* PB302 พบว่า เอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์สามารถทำงานได้ในช่วงพีเอช 8.0-12.0 และสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 10.0 เอนไซม์สามารถทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิ 60-70 °C และดีที่สุดที่อุณหภูมิ 60 °C มีความเสถียรในช่วงพีเอชระหว่าง 4.0-12.0 และในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-60 °C ขณะที่เอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Halobacterium salinarum* PB407 สามารถทำงานได้ในช่วงพีเอช 7.0-10.0 และ

สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 8.0 เอนไซม์สามารถทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิ 50-70 °C และสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 60 °C มีความเสถียรในช่วงพีเอชระหว่าง 5.0-8.0 และในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-60 °C (Figure 1A, 1B และFigure 2A และ 2B)

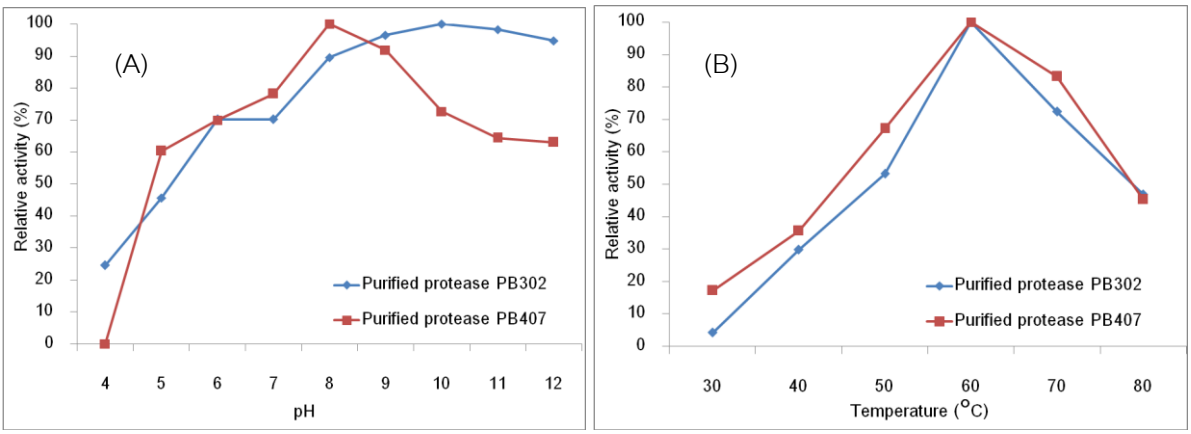

Figure 1 Effect of pH (A) and temperature (B) on activity of purified protease from *Virgibacillus halodenitrificans* PB302 and *Halobacterium salinarum* PB407.

เอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ของ *Virgibacillus halodenitrificans* PB302 สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือ 0-3.0 โมลาร์ แต่กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีเกลือสูง (Kushner, 1978) ส่วนเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ของ *Halobacterium salinarum* PB407 สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือ 2.0-4.0 โมลาร์ (Figure 3)

เมื่อนำเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ของ *Virgibacillus halodenitrificans* PB302 ที่ผ่านการทำไดแอลิซิสในสารละลายบัฟเฟอร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์สัมพัทธ์เหลือเท่ากับ 61.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์โปรติเอสเริ่มต้น และเมื่อนำเอนไซม์ที่ผ่านการทำไดแอลิซิสมาบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีเกลือเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงโดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เท่ากับ 38.0 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เมื่อนำเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ของ *Halobacterium salinarum* PB407 ที่ผ่านการทำไดแอลิซิสในสารละลายบัฟเฟอร์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ และเมื่อนำเอนไซม์ที่ผ่านการทำไดแอลิซิสมาบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีเกลือเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์พบว่า ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เช่นกัน แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ทั้งสองเป็นเอนไซม์ที่ต้องการเกลือ เพื่อให้การทำงานมีประสิทธิภาพสูงขึ้นหรือมีสมบัติเป็นเอนไซม์ชอบเกลือ และเมื่อเอนไซม์อยู่ในสภาวะที่ไม่มีเกลือ ทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เสียสภาพไปอย่างถาวรและไม่สามารถกลับมามีกิจกรรมได้อีก

เอนไซม์ชอบเกลือทุกชนิดที่ได้จากแบคทีเรียชอบเกลือเมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีเกลือ NaCl หรือ KCl ที่ความเข้มข้นสูง จะสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์อย่างรวดเร็ว และสามารถกลับมามีกิจกรรมของเอนไซม์ใหม่ได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีเกลือ ยกเว้นกลุ่มเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ไม่สามารถกลับมามีกิจกรรมของเอนไซม์ได้อีกครั้งเมื่อทำไดแอลิซิสในสารละลายที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl ต่ำกว่า 4 โมลาร์ (Bovornreungroj, 2005)

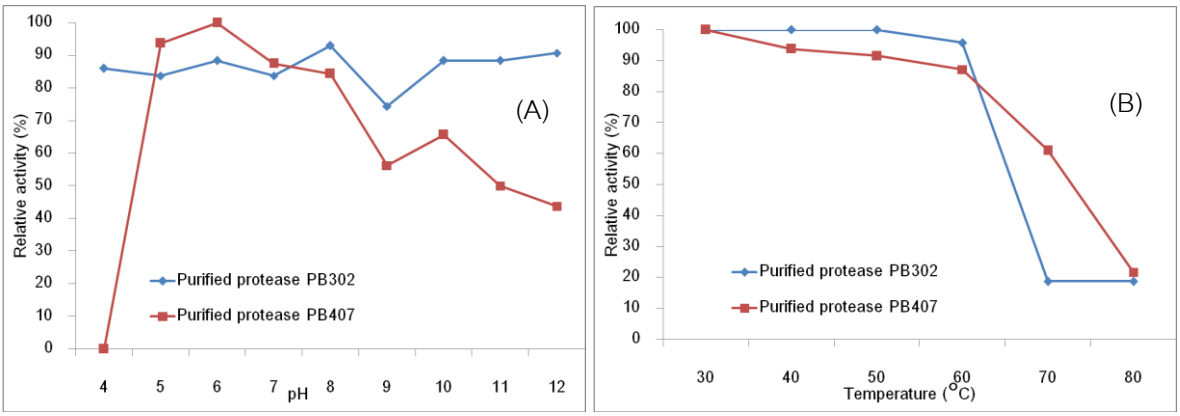

Figure 2 pH (A) and temperature (B) stability of purified protease from *Virgibacillus halodenitrificans* PB302 and *Halobacterium salinarum* PB407.

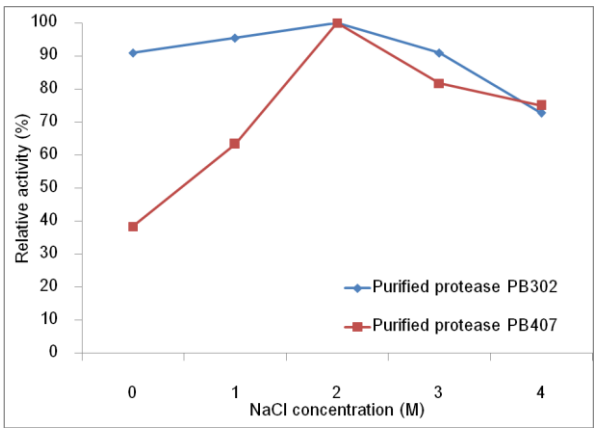

Figure 3 Effect of NaCl concentration on activity of purified protease from *Virgibacillus halodenitrificans* PB302 and *Halobacterium salinarum* PB407.

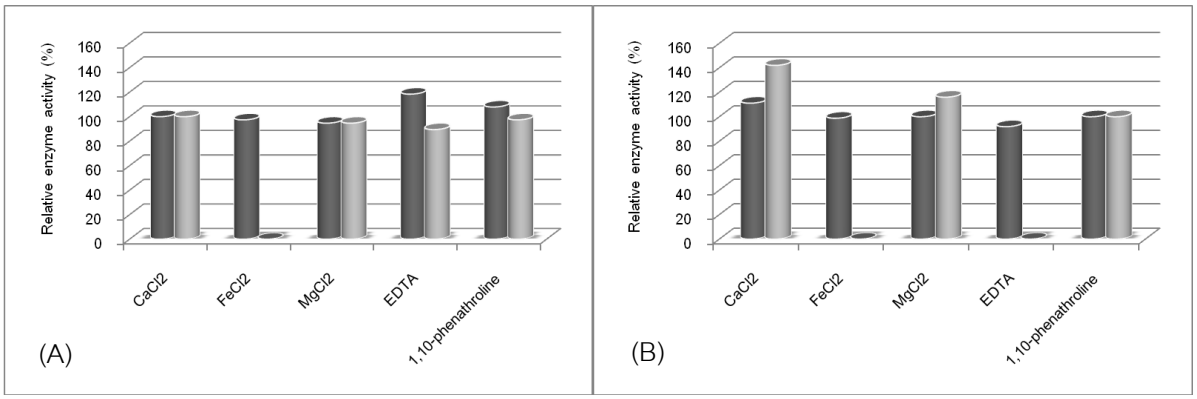

Figure 4 Effect of inorganic ions and chelating agent on activity of purified protease from *Virgibacillus halodenitrificans* PB302 (A) and *Halobacterium salinarum* PB407 (B).

Remark: ■ = 1 mM concentration, ■ = 10 mM concentration.

จากการศึกษาผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จากแบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นปานกลาง *Virgibacillus halodenitrificans* PB302 (Figure 4A) พบว่า $CaCl_2$ ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โปรติเอสเมื่อเปรียบเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่ได้ใส่อิออนโลหะลงไป ส่วน $FeCl_2$ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์และ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ จะยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ที่เหลืออยู่เท่ากับ 97.4 และ 94.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่ $FeCl_2$ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ จะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ ผลของสารคีเลตต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่า เอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ถูกยับยั้งด้วย EDTA และ 1,10 phenanthroline ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เท่ากับ 89.5 และ 97.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ขณะที่ EDTA และ 1,10 phenanthroline ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ให้เพิ่มขึ้นเท่ากับ 118.4 และ 107.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ผลของอิออนโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จากแบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นสูง *Halobacterium salinarum* PB407 (Figure 4B) พบว่า $CaCl_2$ ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ และ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ สามารถส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสทำให้มีกิจกรรมสัมพัทธ์สูงกว่า 100 เปอร์เซ็นต์ โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 111.1, 142.0 และ 116.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม ส่วน $FeCl_2$ ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จะยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์เพียงเล็กน้อย โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 98.8 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 10 มิลลิโมลาร์ จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ ขณะที่ $MgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ส่วนผลของสารยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสของ *Halobacterium salinarum* PB407 พบว่า EDTA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เพียงเล็กน้อยโดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เท่ากับ 91.9 และ EDTA ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส อย่างสมบูรณ์ ส่วน 1,10 phenanthroline ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส จากคุณลักษณะบางประการข้างต้น อาจกล่าวได้ว่าเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จากแบคทีเรียชอบเกลือ *Virgibacillus halodenitrificans* PB302 และ *Halobacterium salinarum* PB407 ควรจะจัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ metallo protease

จากรายงานของ Yossan *et al*. (2006) พบว่า $MnCl_2$, $CaCl_2$ และ $MgCl_2$ จะส่งผลทำให้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่บริสุทธิ์จาก *Bacillus megaterium* ที่แยกได้จากกระบวนการผลิตน้ำปลามีกิจกรรมสูงขึ้นเมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่ไม่ได้เติมอิออนโลหะ โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 151, 130 และ 121 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นว่าอิออนโลหะช่วยป้องกันเอนไซม์ไม่ให้เอนไซม์เสียสภาพ จากการศึกษาของ Gupta *et al.* (2005) พบว่า $CaCl_2$ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ทำให้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสชอบเกลือจาก *Bacillus* sp. มีกิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 140 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาของ Karbalaei-Heidari *et al.* (2007) พบว่า $CaCl_2$ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ทำให้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสชอบเกลือจาก *Salinivibrio* sp. AF-2004 มีกิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 112 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Mahnaz and Karbalaei-Heidari (2012) พบว่า $MgCl_2$ $CaCl_2$ และ $FeCl_2$ ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ สามารถส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จากแบคทีเรียชอบเกลือปานกลาง *Salinivibrio* sp. MS-7 โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 117, 131 และ 121 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ 1,10 phenathroline ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์

เท่ากับ 118 เปอร์เซ็นต์ ส่วน EDTA ความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ จะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ 26 และ 4.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Hiraga *et al*. (2005) พบว่า EDTA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จะยับยั้งอย่างสมบูรณ์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซรีนโปรติเอสจากแบคทีเรียชอบเกลือ *Filobacillus* sp. RF2-5 นอกจากนี้จากการศึกษาของ Namwong *et al*. (2006) พบว่า เอนไซม์เซรีนโปรติเอสชอบเกลือที่ผลิตจาก *Halobacillus* sp. SR5-3 ที่แยกจากน้ำปลาไทยจะถูกยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อย่างสมบูรณ์โดย EDTA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จากการศึกษาของ Vidyasagar *et al*. (2009) พบว่า EDTA ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ และ 1,10 phenathroline ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จะยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสชอบเกลือความเข้มข้นสูงจากแบคทีเรียชอบเกลือ *Chromohalobacter* sp. TVSP101โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์เท่ากับ 64, 62 และ 84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สรุป

เอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จากแบคทีเรียชอบเกลือปานกลาง *Virgibacillus halodenitrificans* PB302 สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 10.0 อุณหภูมิ 60 °C มีความเสถียรในช่วงพีเอชระหว่าง 4.0-12.0 ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิ 30-60 °C นาน 30 นาที สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มีเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ (0-18.0 เปอร์เซ็นต์ NaCl) อิออนโลหะพวก $FeCl_2$ และ $MgCl_2$ และสารคีเลตพวก EDTA และ 1,10 phenanthroline ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ มีผลยับยั้งทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง ส่วน EDTA และ 1,10 phenanthroline ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ส่งเสริมให้กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น

เอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์จากแบคทีเรียชอบเกลือสูง *Halobacterium salinarum* PB407 สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 8.0 อุณหภูมิ 60 °C มีความเสถียรในช่วงพีเอชระหว่าง 5.0-8.0 ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิ 30-60 °C เป็นเวลา 30 นาที สามารถทำงานได้ดีสุดในสภาวะที่มีเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ (12.0 เปอร์เซ็นต์ NaCl) กิจกรรมของเอนไซม์ถูกกระตุ้นด้วย $CaCl_2$ และ $MgCl_2$ และสูญเสียกิจกรรมเมื่ออยู่ในสภาวะที่มี EDTA

จากการเปรียบเทียบคุณลักษณะบางประการข้างต้นพบว่า เอนไซม์โปรติเอสที่บริสุทธิ์ที่ได้จากแบคทีเรีย 2 ชนิด มีคุณสมบัติบางประการที่แตกต่างกัน เช่น สามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่กว้าง นอกจากนี้ยังสามารถทำงานที่พีเอชและอุณหภูมิสูงได้ จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำเอนไซม์เหล่านี้ไปใช้ร่วมกับการหมักน้ำปลาซึ่งมีสภาวะการหมักที่มีเกลือ NaCl ประมาณ 10.0-30.0 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 5.0-7.0 และอุณหภูมิประมาณ 30-40 องศาเซลเซียส

เอกสารอ้างอิง

กานต์ธิดา วดีศิริศักดิ์. 2555. **การผลิตและการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์โปรติเอสชอบเกลือจากแบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นปานกลางและแบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นสูง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Bovornreungroj, P. 2005. **Selection of extremely halophilic bacteria producing halophilic proteolytic enzyme for fish sauce production**. Ph. D Thesis, Kasetsart University.

Gupta, A., I. Roy, R.K. Patel, S.P. Singh, S.K. Khare and M.N. Gupta. 2005. One-step purification and characterization of an alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus* sp. **J. Chromatogr. A.** 1075: 103-108.

Hiraga, K., Y. Nishikata, S. Namwong, S. Tanasupawat, T. Takada and K. Oda. 2005. Purification and characterization of serine protease from halophilic bacterium, *Filobacillus* sp. RF2-5. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 69: 38-44.

Kanlayakrit, W. and P. Bovornreungroj. 2002. Isolation of extremely halophilic bacteria producing salt-loving protease for fish sauce fermentation. pp. 366-373. *In* **Proceeding of 40th Kasetsart University Annual Conference**. Kasetsart University, Bangkok.

Karbalaei-Heidari, H.R., A. Ziaee, J. Schaller and M. A. Amoozegar. 2007. Purification and characterization of an extracellular haloalkaline protease produced by the moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004. **Enzyme Microb. Tech.** 40: 266-272.

Kushner, D.J. 1978. Life in high salt and solute concentrations: Halophilic bacteria, pp.317-368. *In* D.J. Kushner (ed.). **Microbial Life in Extremely Environment**. Academic Press, London.

Mahnaz S. and H. R. Karbalaei-Heidari. 2012. A novel low molecular weight extracellular protease from a moderately halophilic bacterium *Salinivibrio* sp. Strain MS-7: Production and biochemical properties. **Mol. Biol. Res. Commun.** 1: 45-56.

Namwong, S. 2006. A halophilic serine protease from *Halobacillus* sp. SR5-3 isolated from fish sauce: Purification and characterization. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 70 (6): 1395-1401.

Norberg, P. and B.V. Hofsten. 1969. Proteolytic enzymes from extremely halophilic bacteria. **J. Gen. Microbiol.** 55: 251-256.

Sarath, G., R.S. delta Motte and F.W Wagner. 1990. Protease assay methods pp. 25-55. *In* R.J. Beynon and J.S. Bond, (eds.) **Proteolytic Enzymes: A Practical Approach**. IRL Press, Oxford, UK.

Vidyasagar, M., S. Prakash, V. Mahajan, Y. S. Shouche and K. Sreeremulu. 2009. Purification and characterization of an extreme halothermophilic protease from a halophilic bacterium *Chromohalobacter* sp. TVSP101. **Braz. J. Microbiol.** 40: 12-19.

Yossan, S., A. Reungsang and M. Yasuda. 2006. Purification and characterization of alkaline protease from *Bacillus megaterium* isolated from Thai fish sauce fermentation process. **Sci. Asia** 32: 377-383.