



การคัดเลือแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ 5'-ฟอสโฟไดเอสเทอร์จากน้ำปลาดิบ
Screening of 5'-Phosphodiesterase Producing Bacteria from Raw Fish Sauce

อนันต์ บุญปาน^{1*}, สิริแข พงษ์สวัสดิ์¹ และ เมทินี มาเวียง²

¹สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี 12110

²สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

อำเภอวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี 34190

*E-mail: anan_b@rmutt.ac.th

บทคัดย่อ

การคัดเลือแบคทีเรีย 20 ไอโซเลทที่แยกมาจากน้ำปลาดิบ เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5'-ฟอสโฟไดเอสเทอร์สบนอาหารแห้งและในอาหารเหลวที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ พบว่า แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดคือ แบคทีเรียไอโซเลท AB 005 การจัดจำแนกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA กับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท AB 005 คือ *Bacillus pumilus* และเป็นแบคทีเรียทนเกลือ แบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่ พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียในอาหารเหลวในถังหมักขนาด 5.0 ลิตร พบว่า แบคทีเรียดังกล่าวมีการผลิตเอนไซม์ควบคู่ไปกับการเจริญและผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเท่ากับ 10.50 หน่วย/มิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง

คำสำคัญ: 5'-ฟอสโฟไดเอสเทอร์, แบคทีเรียทนเกลือ, *Bacillus pumilus*, น้ำปลาดิบ

Received: Jun 04, 2015

Revised: Jun 25, 2015

Accepted: Jun 26, 2015

Abstract

Twenty pure bacterial cultures isolated from raw fish sauce were selected for 5'-phosphodiesterase (5'-PDE) producing ability on agar medium and liquid medium containing 0-3.0 M NaCl. The results showed that isolate AB 005 could produce the highest 5'-PDE activity. The selected isolate was further identified on the basis of morphological, biochemical and compared 16S rDNA gene to other bacteria. It was concluded that isolate AB 005 belonged to *Bacillus pumilus* and classified as halotolerant bacteria. A halotolerant *Bacillus pumilus* AB 005 could produce the highest 5'-PDE activity at pH of 7.0 and 37 °C in liquid medium without NaCl. Growth and production of 5'-PDE from *Bacillus pumilus* AB 005 in 5.0 L fermenter using liquid medium was investigated. A typical pattern of 5'-PDE production showed that enzyme production was coupled to cell multiplication and the maximum 5'-PDE production of 10.50 unit/ml was observed at 36 hr.

Keywords: 5'-phosphodiesterase, Halotolerant bacteria, *Bacillus pumilus*, Raw fish sauce

1. บทนำ

สารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ (5'-nucleotides) เป็นวัตถุปรุงแต่งรสอาหาร (flavour enhancer) ที่จะทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารรสชาติดีขึ้น เรียกรสชาตินี้ว่า “อูมามิ” (umami taste) สารประกอบนิวคลีโอไทด์ ดังกล่าว คือ กัวโนซีน 5'-โมโนฟอสเฟต (guanosine 5'-monophosphate, 5'-GMP) และ อินโนซีน 5'-โมโนฟอสเฟต (inosine 5'-monophosphate, 5'-IMP) [1] สารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ใช้ปรุงแต่งกลิ่นรสของอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ โดยไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียงกับผู้บริโภคเหมือนการใช้ผงชูรส (monosodium glutamate; MSG) ซึ่งการบริโภคผงชูรสในปริมาณที่มากเกินไป อาจทำให้ผู้บริโภคบางรายเกิดความผิดปกติ เช่น มีอาการชาและร้อนวูบวาบที่ปาก ลิ้น คัดคอ ไบหน้า โหนกแก้ม หน้าอก มีผื่นแดงตามตัว แน่นหน้าอก หายใจไม่สะดวก และอาจส่งผลกระทบต่อสมองในส่วนที่ควบคุมการเจริญเติบโตและระบบประสาทตา [2] ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีการใช้สารปรุงแต่งรสชาติในอาหารประเภท 5'-นิวคลีโอไทด์ เช่น 5'-GMP

และ 5'-IMP ที่ทำให้เกิดรสชาติอูมามิในอาหาร เช่นเดียวกับผงชูรส แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค [3]

ในปัจจุบันการผลิต 5'-นิวคลีโอไทด์สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การสกัดจากเนื้อสัตว์โดยตรง การหมักเพื่อผลิตนิวคลีโอไซด์ จากนั้นใช้กระบวนการฟอสโฟรีเรชั่นเพื่อเปลี่ยนนิวคลีโอไซด์ได้เป็น 5'-นิวคลีโอไทด์ การสังเคราะห์ด้วยกระบวนการทางเคมี และการย่อยสลายกรดนิวคลีอิกให้กลายเป็นสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ด้วยเอนไซม์ [3] กระบวนการผลิตสารประกอบนิวคลีโอไทด์ด้วยกระบวนการทางเอนไซม์สามารถใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่มีแหล่งจากจุลินทรีย์และพืช เช่น ไดออกซีไรโบนิวคลีเอส (deoxyribonuclease, DNase) และ ไรโบนิวคลีเอส (ribonuclease, RNase) ซึ่งจะย่อยสลายกรดนิวคลีอิกได้เป็นสารประกอบนิวคลีโอไทด์ทั้งชนิด 2', 3' และ 5' ส่วนเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายกรดนิวคลีอิกให้ได้เฉพาะสารประกอบนิวคลีโอไทด์ชนิดสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ คือ เอนไซม์

5'-ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (5'-phosphodiesterase, 5'-PDE) เนื่องจากสารประกอบ นิวคลีโอไทด์ชนิด 5'-เท่านั้นที่จะทำให้เกิดรสชาติอูมามิในผลิตภัณฑ์อาหาร ดังนั้นเอนไซม์ 5'-PDE จึงมีความน่าสนใจในการนำไปใช้ผลิตสารเพิ่มรสชาติในอาหาร [3, 4, 5] ปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับการใช้เอนไซม์ 5'-PDE จากจุลินทรีย์ยังมีน้อย ดังนั้นการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5'-PDE จากแหล่งต่างๆ จึงมีความน่าสนใจ โดยเฉพาะการคัดเลือกแบคทีเรียจากน้ำปลาดิบ เนื่องจากแบคทีเรียที่มีบทบาทในน้ำปลาจะผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในการย่อยสลายกรดนิวคลีอิกที่มีอยู่ในตัวปลาให้ได้เป็นสารประกอบนิวคลีโอไทด์ โดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จะสามารถนำไปผลิตเอนไซม์สำหรับใช้ผลิตสารประกอบ 5'-นิวคลีโอไทด์ต่อไป ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับผู้บริโภคในการเลือกใช้ เป็นสารปรุงแต่งรสชาติในอาหารนอกเหนือจากการใช้ผงชูรส และข้อมูลที่ได้จากการวิจัยน่าจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนากระบวนการผลิต 5'-นิวคลีโอไทด์ ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ 20 ไอโซเลท ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำปลาดิบ เชื้อดังกล่าวจะถูกเก็บอยู่ในอาหารวุ้น Sehgal and Gibbons Complex (SGC) [6] ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์

2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์

นิวคลีโอสมอาหารแข็ง

นำแบคทีเรียบริสุทธิ์ 20 ไอโซเลท มาจุดลงบนอาหารแข็ง DNase test agar-methyl green ที่เติมเกลือ NaCl ให้มีความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน สังเกตการเกิดพื้นที่ส่วนใส (clear zone) จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณการเกิดพื้นที่ส่วนใส (clear zone) และของโคโลนี คัดเลือกไอโซเลทที่ให้อัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณการเกิดพื้นที่ส่วนใส และของโคโลนีสูงไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป [7]

2.3 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์

5'-PDE ในอาหารเหลว

ถ่ายแบคทีเรียบริสุทธิ์ 20 ไอโซเลท ลงในอาหารเหลว SGC ที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อแขวนลอยปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน นำหมักที่ได้นำมาเหวี่ยงแยกเซลล์ออกและนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5'-PDE

2.4 การจำแนกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์

5'-PDE

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาจำแนกหาชนิดของแบคทีเรีย โดยศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยศึกษารูปร่าง การติดสีแกรม การเจริญที่อุณหภูมิ พิเอช และความเข้มข้นเกลือระดับต่างๆ ลักษณะทางชีวเคมี โดยใช้เครื่องจำแนกชนิดจุลินทรีย์อัตโนมัติ VITEX 2 Compact และศึกษาฮีนของ 16S rDNA โดยการ

ทำ DNA sequencing จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้จากการทำ DNA sequencing มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสอื่นๆ ในฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)

2.5 การศึกษาความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ 5'-PDE

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้อายุประมาณ 24 ชั่วโมง ลงในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อแขวนลอยปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในฟลาस्कขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์การเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนคลิ่นแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5'-PDE

2.6 การศึกษาพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ 5'-PDE

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้อายุประมาณ 24 ชั่วโมง ลงในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อแขวนลอยปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในฟลาस्कขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ที่ปรับพีเอชเป็น 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ

ที่ 30, 37, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5'-PDE

2.7 การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5'-PDE ในถังหมักขนาด 5.0 ลิตร (รุ่น MS-F1, บริษัท major science ประเทศสหรัฐอเมริกา)

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้อายุประมาณ 24 ชั่วโมง ลงในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ปริมาตร 150 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อต่อลงในถังหมักขนาด 5.0 ลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ปริมาตร 3,000 มิลลิลิตร ที่มีการใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ตามข้อ 2.5-2.6 อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm (ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรน้ำหมัก/นาที) ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์การเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนคลิ่นแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5'-PDE

2.8 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5'-PDE

การวิเคราะห์กิจกรรมของ 5'-PDE ดัดแปลงจากวิธีการของ Fujimoto *et al.* [8] โดยใช้สารละลายเอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร สำหรับทำปฏิกิริยากับสารละลายกรดไโรโบนิวคลีอิก 1.0 มิลลิลิตร (กรดไโรโบนิวคลีอิก 0.1 เปอร์เซ็นต์ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.16 โมลาร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 0.04 โมลาร์ พีเอช 7.0) บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติมเอทานอล 99.8 เปอร์เซ็นต์

ปริมาตร 6.0 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำแข็งนาน 20 นาที ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออก นำส่วนใสที่ได้ไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น 50 เท่า นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร หนึ่งหน่วยของกิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 1.0 หน่วย ภายใต้สภาวะที่ใช้วิเคราะห์

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ นิวคลีเอสบนอาหารแข็ง

จากการนำแบคทีเรียบริสุทธิ์ทั้ง 20 ไอโซเลท ที่แยกมาจากน้ำปลาดิบมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์นิวคลีเอสบนอาหาร DNase test agar-methyl green ที่เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 1 จากผลการทดลองพบว่า หลังจากบ่มเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 10 วัน มีแบคทีเรีย 15 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตเอนไซม์ นิวคลีเอสได้ โดยสังเกตได้จากพื้นที่ส่วนใสที่เกิดขึ้นบนอาหาร DNase test agar-methyl green แบคทีเรียไอโซเลท AB 005 จะให้อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการเกิดพื้นที่ส่วนใสและของโคโลนีสูงที่สุดบนอาหารที่ไม่เติมเกลือ NaCl แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียไอโซเลท AB 005 สามารถผลิตเอนไซม์นิวคลีเอสได้สูงที่สุด แบคทีเรียดังกล่าวจะผลิตเอนไซม์และขับออกมานอกเซลล์ เพื่อย่อยสลายกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid, DNA) ซึ่งเป็นสับเตรต และเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับเมทิลกรีน (methyl green) ทำให้สีเขียวหายไป แล้วเห็นเป็นบริเวณใสขึ้นมา [7]

3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ 5'-PDE ในอาหารเหลว

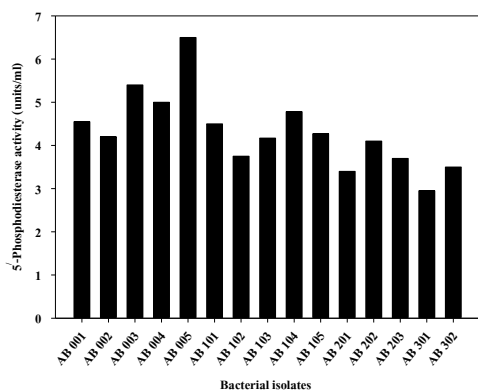
เมื่อนำแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ 5'-PDE บนอาหารแข็งทั้ง 15 ไอโซเลท มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 1 จากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลทสามารถผลิตเอนไซม์ได้ โดยแบคทีเรียไอโซเลท AB 005 สามารถผลิตเอนไซม์ 5'-PDE ได้สูงที่สุด (6.50 หน่วยต่อมิลลิลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียไอโซเลทอื่น ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5'-PDE บนอาหารแข็ง ดังนั้นแบคทีเรียไอโซเลท AB 005 จึงถูกคัดเลือกไว้สำหรับใช้ในการผลิตเอนไซม์ต่อไป

3.3 การจำแนกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ 5'-PDE

นำแบคทีเรียไอโซเลท AB 005 มาจำแนกชนิดของแบคทีเรีย โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าแบคทีเรียไอโซเลท AB 005 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก โคโลนีมีสีครีม เซลล์มีลักษณะรูปร่างท่อน สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส พีเอชระหว่าง 4-8 ในสภาวะที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ (ตารางที่ 2) การศึกษาลักษณะทางชีวเคมีด้วยเครื่องจำแนกชนิดจุลินทรีย์อัตโนมัติ VITEK 2 Compact แสดงผลดังตารางที่ 3

ตารางที่ 1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์นิวคลีเอสบนอาหารแข็ง

Isolate no.	อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใส (มม.) และเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (มม.)			
	0 M	1 M	2 M	3 M
	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
AB 001	2.10	-	-	-
AB 002	1.50	-	-	-
AB 003	2.85	-	-	-
AB 004	2.50	-	-	-
AB 005	3.70	-	-	-
AB 006	-	-	-	-
AB 101	-	2.00	-	-
AB 102	-	1.25	-	-
AB 103	-	1.50	-	-
AB 104	-	2.45	-	-
AB 105	-	1.90	-	-
AB 201	-	-	1.05	-
AB 202	-	-	1.45	-
AB 203	-	-	1.20	-
AB 204	-	-	-	-
AB 205	-	-	-	-
AB 301	1.00	-	-	-
AB 302	1.10	-	-	-
AB 303	-	-	-	-
AB 304	-	-	-	-



รูปที่ 1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5'-PDE ในอาหารเหลว SGC จากลักษณะต่างๆ ของแบคทีเรียไอโซเลท AB 005

พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท AB 005 จะมีลักษณะที่คล้ายกับแบคทีเรีย *Bacillus pumilus*

การตรวจสอบทางพันธุศาสตร์โมเลกุลของแบคทีเรียไอโซเลท AB 005 โดยการหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA ด้วยเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (automatic DNA sequencer) และเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างลำดับเบสของแบคทีเรียไอโซเลท AB 005 กับลำดับเบสของแบคทีเรียที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GeneBank พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท AB 005 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Bacillus pumilus*, *B. aerophilus*, *B. altitudinis* และ *B. stratosphericus* ที่ระดับ 99.99% (รูปที่ 2) เมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางชีวเคมี และลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลท AB 005 ประกอบกัน พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท AB 005 คือแบคทีเรีย *Bacillus pumilus*

ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของแบคทีเรียไอโซเลท AB 005

Characteristics	AB 005
Gram stain	positive
Pigment	cream
Shape	rod
Cultural characteristics :	
Growth at :	
30, 37, 40, 45, 50 °C	+
Growth at pH :	+
4, 5, 6, 7, 8	
Growth in :	+
0 M NaCl	+
1 M NaCl	+
2 M NaCl	+
3 M NaCl	

หมายเหตุ : + = Positive reaction

- = Negative reaction

ตารางที่ 3 ลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียโอโซเลท

AB 005

Characteristics	Reaction
β -xylosidase	+
L-lysine arylamidase	-
Leucine arylamidase	-
Phenylalanine arylamidase	+
L-proline arylamidase	-
β -galactosidase	+
L-pyrrolidonyl arylamidase	-
α -galactosidase	+
Alanine arylamidase	-
Tyrosine arylamidase	+
β -N-acetyl-glucosaminidase	-
Ala-Phe-Pro arylamidase	+
Cyclodextrine	-
D-galactose	-
Glycogene	-
Myo-inositol	-
Methyl- α -D-glucopyranoside	-
acidification	-
Ellman	+
Methyl-D-xyloside	-
α -mannosidase	+
Maltotriose	-
Glycine arylamidase	(-)
D-mannitol	+
D-manonse	+
D-melezitose	-
N-acetyl-D-glucosamine	-
Palatinose	-
L-rhamnose	-
β -glucosidase	+
β -mannosidase	-
Phosphoryl choline	-
Pyruvate	+
α -glucosidase	-
D-tagatose	+
D-trehalose	+
Inulin	-
D-glucose	+
D-ribose	-
Putrescine assimilation	-
Kanamycin resistance	-
Oleandomycin resistance	-
Esculin hydrolyse	+
Tetrazolium red	(-)
Polymixin_B resistance	-

หมายเหตุ: +ve = Gram positive bacteria ID Message Confidence Level %
Probability

+	= Positive reaction	Excellent	96 to 99
-	= Negative reaction	Very Good	93 to 95
(+)	= Weak-positive reaction	Good	89 to 92
(-)	= Weak-negative reaction	Acceptable	85 to 88

AB 005

AY876289 *Bacillus pumilus* ATCC 7061AJ831842 *Bacillus altitudinis*AJ831841 *Bacillus stratosphericus*A1811844 *Bacillus cereus* 78K

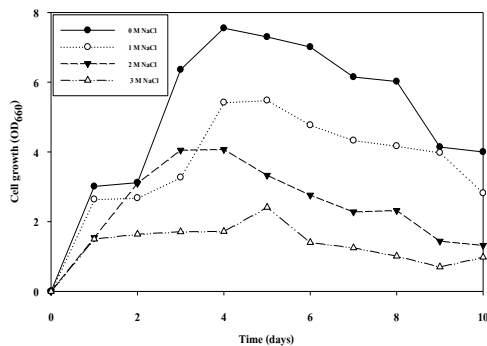
รูปที่ 2 Phylogenetic tree ของแบคทีเรียโอโซเลท AB 005 ที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA

3.4 การศึกษาความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ 5'-PDE

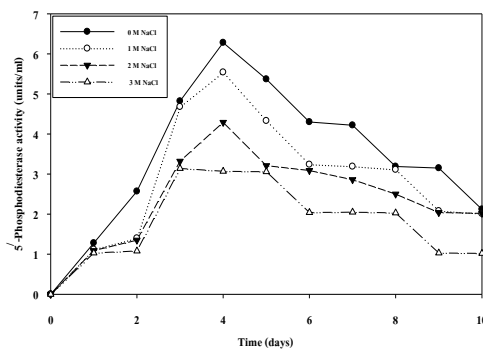
การศึกษาความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AB 005 พบว่า แบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือและที่มีเกลือความเข้มข้น 1.0-3.0 โมลาร์ โดยแบคทีเรียจะเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือ และการเจริญจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้น ผลการทดลองในรูปที่ 3 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียดังกล่าวเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียทนเกลือ (halotolerant bacteria) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการเกลือ NaCl สำหรับการเจริญ แต่สามารถทนต่อเกลือ NaCl และเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้นตั้งแต่ 2.5 โมลาร์ [9, 10]

การศึกษาความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ฟอสโฟไลโดเอสเทอเรสจากแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AB 005 พบว่า แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ 5'-PDE ได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือและไม่มีเกลือ NaCl โดยแบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ 5'-PDE ได้สูงที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือ NaCl ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีเกลือ NaCl แบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ได้ต่ำ ดังผลการทดลองในรูปที่ 4 จากการทดลองแสดงให้เห็น

เห็นว่าความเข้มข้นของเกลือ NaCl มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5'-PDE โดยแบคทีเรียจะเจริญและผลิตเอนไซม์ 5'-PDE ได้ดีที่สุด ในสภาวะที่ไม่มีเกลือ NaCl ดังนั้นในการผลิตเอนไซม์ 5'-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AB 005 จะต้องเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือ NaCl จึงจะสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุด



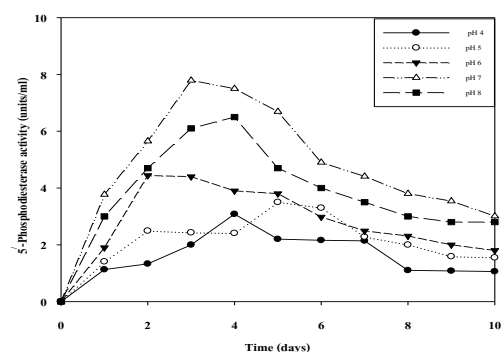
รูปที่ 3 ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AB 005



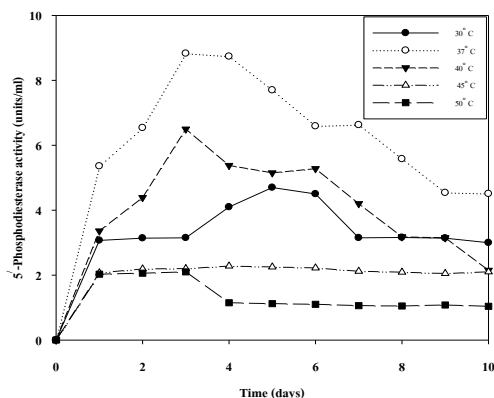
รูปที่ 4 ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการผลิตเอนไซม์ 5'-PDE ของแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AB 005

3.5 การศึกษาพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ 5'-PDE

จากการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ 5'-PDE พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AB 005 จะผลิตเอนไซม์ 5'-PDE ได้ในช่วงพีเอช 4.0-8.0 พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ คือ 7.0 (รูปที่ 5) ที่ระดับพีเอชสูงหรือต่ำกว่า 7.0 จะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์เนื่องจากไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AB 005 โดยแบคทีเรียจะมีการเจริญดีที่สุดที่พีเอช 7.0 จึงสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุด การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ 5'-PDE พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AB 005 ผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (รูปที่ 6) ที่อุณหภูมิต่ำหรือสูงกว่านี้การผลิตเอนไซม์จะได้น้อย เนื่องจากแบคทีเรียจะมีการเจริญต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นที่อุณหภูมิสูงเกินไป (45-50 องศาเซลเซียส) เอนไซม์ที่ผลิตขึ้นมามีโอกาสเกิดการเสียสภาพ ส่งผลให้เอนไซม์ที่ผลิตได้มีปริมาณต่ำ



รูปที่ 5 ผลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ 5'-PDE ของแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AB 005

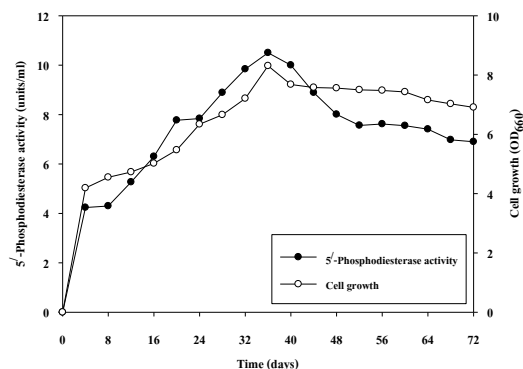


รูปที่ 6 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ 5'-PDE ของแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AB 005

3.6 การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5'-PDE ในถังหมักขนาด 5.0 ลิตร

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ 5'-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AB 005 ในถังหมักขนาด 5.0 ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า แบคทีเรียมีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อทำการเพาะเลี้ยงนาน 18 ชั่วโมง จากนั้นการเจริญจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นและสูงสุดเมื่อการเพาะเลี้ยงเข้าสู่ชั่วโมงที่ 36 ชั่วโมง จากนั้นจะค่อยๆ ลดต่ำลงจนถึงสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง กิจกรรมของเอนไซม์ 5'-PDE จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อทำการเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นและสูงสุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเข้าสู่ชั่วโมงที่ 36 จากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์จะค่อยๆ ลดต่ำลงจนถึงสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง กิจกรรมของเอนไซม์ 5'-PDE เมื่อทำการเพาะเลี้ยงนาน 36 ชั่วโมง เท่ากับ 10.50 หน่วยต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 7) จากการทดลองจะเห็นว่าแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AB 005 มีรูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5'-PDE มีลักษณะการเจริญควบคู่ไปกับการผลิตเอนไซม์ในลักษณะที่เป็น growth link associate product formation โดยในขณะที่มีการเจริญจะมีการผลิตเอนไซม์ออกมาด้วย และจะมี

การผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเมื่อการเจริญอยู่ในระยะคงที่หรืออยู่ในระยะ stationary phase [11]



รูปที่ 7 การเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5'-PDE ของแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* AB 005 ในถังหมักขนาด 5.0 ลิตร

4. สรุปผลการวิจัย

การจัดจำแนกแบคทีเรียไอโซเลท AB 005 ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5'-PDE ได้สูง ด้วยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA กับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น พบว่า เป็นแบคทีเรีย *Bacillus pumilus* ที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียทนเกลือ แบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียในถังหมักขนาด 5.0 ลิตร พบว่า แบคทีเรียดังกล่าวมีการผลิตเอนไซม์ควบคู่ไปกับการเจริญและผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง

4. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณการวิจัยประจำปี 2556 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

5. เอกสารอ้างอิง

- [1] A. Kuninaka, "Nucleotides and related compounds," in *Biotechnology Product of Primary Metabolism*. vol. 6, H.J. Rehm and G. Reed (eds.), M. Roehr (vol. eds.), Weinheim:VCH Verlagsgesellschaft, 1996, pp. 563-606
- [2] แก้ว กังสดาลอำไพ, "ผงชูรสอีกครั้ง," *นิตยสารหมอชาวบ้าน*, 32(378), 44-47, 2531
- [3] A. Kuninaka, M. Kibi, H. Yoshino, and K. Sahaguchi, "Studies on 5' phosphodiesterases in microorganisms. Past 2. Properties and application of *Penicillium citrinum* 5'-phosphodiesterases," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 25, pp. 693-701, 1961.
- [4] H. Onishi, M. Kamekura, H. Yokoi, and T. Kobayashi, "Production of 5'-nucleotide by using halophilic nuclease H preferentially absorbed on flocculated cell of the halophile *Micrococcus varians* subs. *halophilus*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 54, No. 11, pp. 2632-2635, 1988.
- [5] A.J. Deoda, and R.S. Singhal, "5'-Phosphodiesterases (5'-PDE) from germinated barley for hydrolysis of RNA to produce flavor nucleotides," *Bioresour. Technol.*, vol. 88, pp. 245-250, 2003.
- [6] S.N. Sehgal, and N.E. Gibbons, "Effect of some metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum*," *Can. J. Microbiol.*, vol. 6, pp. 165-169, 1960.
- [7] K. Ikeda, "Characterization of extracellular halophilic ribonuclease from halotolerant *Pseudomonas* sp.," M.S. Thesis, Kasetsart University, 2000.
- [8] M. Fujimoto, A. Kuninaka, and H. Yoshino, "Purification of a nuclease from *Penicillium citrinum*," *Agric. Biol. Chem.*, vol. 38, pp. 83-777, 1974.
- [9] D.J. Kushner, "Life in high salt and solute concentrations : Halophilic bacteria," in *Microbial Life in Extreme Environments*. D.J. Kushner, ed., London : Academic Press, 1978, pp. 317-368.
- [10] M.J. Garabito, M.C. Maquez, and A. Ventosa, "Halotolerant *Bacillus* diversity in hypersaline Environments," *Can. J. Microbiol.*, vol. 44, pp 95-102, 1998.
- [11] D. Lee, Y. Kok, K. Kim, B. Kim, H. Choi, D. Kim, M.T. Suhartono, and Y. Pyun, "Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1," *FEMS Microbiol. Lett.* vol. 179, pp. 393-400, 1999.