การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรส เพื่อใช้ผลิตวัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหาร*

Screening of 5′-Phosphodiesterase Producing Bacteria for Food Flavor Enhancer Production

ดร. อนันต์ บุญปาน**
อรวรรณ พึ่งคำ***
ดร.วีระสิทธิ์ สรรพมงคลไชย****

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ 5′ -ฟอสโฟไดเอสเทอเรสจากน้ำปลาดิบ ทำการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียพร้อมทั้งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้สำหรับผลิตวัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหารต่อไป การคัดเลือกแบคทีเรีย 20 ไอโซเลทที่แยกมาจากน้ำปลาดิบ เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรสบนอาหารแข็ง DNase test agar-methyl green และในอาหารเหลว Sehgal and Gibbons Complex (SGC) ที่เติมเกลือโซเดียม คลอไรด์ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ พบว่า แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุด คือ แบคทีเรียไอโซเลท AN 150 การจัดจำแนกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA กับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท AN 150 คือ Bacillus altitudinis และเป็นแบคทีเรียชอบเกลือ แบคทีเรียชอบเกลือ Bacillus altitudinis AN 150 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว SGC ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1.0 โมลาร์ การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียในอาหารเหลว SGC ในถังหมักขนาด 5.0 ลิตร พบว่า แบคทีเรียดังกล่าวมีการผลิตเอนไซม์ควบคู่ไปกับการเจริญและผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเท่ากับ 382.50 หน่วย/มล. เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้ว่าในการเตรียมเอนไซม์จากแบคทีเรียเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ระดับอุตสาหกรรม ควรเตรียมเอนไซม์ให้อยู่ในรูปผงแห้งซึ่งจะทำให้เอนไซม์มีความคงตัวเป็นเวลานานและนำไปใช้ในในกระบวนการผลิตวัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหารได้ง่าย

---

*ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2557
**อาจารย์ประจำคณะการจัดการธุรกิจอาหาร สถาบันการจัดการปัญญาภิวัฒน์
***อาจารย์ประจำคณะเทคโนโลยีคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
****รองศาสตราจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Abstract

The objective of this research was screening of 5′-phosphodiesterase (5′-PDE) producing bacteria from raw fish sauce. Identification of selected bacteria and optimization of the conditions for maximum enzyme production for further application in food flavor enhancer production were examined. Twenty pure bacterial cultures isolated from raw fish sauce were selected for 5′-PDE producing ability on DNase test agar-methyl green medium and Sehgal and Gibbons Complex (SGC) liquid mediumn containing 0-3.0 M NaCl. The results showed that isolate AN 150 could produce the highest 5′ - PDE activity. The selected isolate was further identified on the basis of morphological, biochemical and compared 16S rDNA to other bacteria. It was concluded that isolate AN 150 belonged to Bacillus altitudinis and classified as halophilic bacteria. A halophilic B. altitudinis AN 150 could produce the highest 5′- PDE activity at pH of 6.0 and temperature of 37°C in SGC liquid medium containing 1.0 M NaCl. Growth and production of 5′- PDE from B. altitudinis AN 150 in 5.0 L fermenter using SGC 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 382.50 unit/ml was observed at 36 hour culture. Researchers have suggested in applying the research results that bacterial enzyme preparation for industrial application should be prepared in dried powder form to possess certain desirable characteristics including long-term stability and easy handling during application in food flavor enhancer production.

ความสำคัญของปัญหา

สารประกอบ 5′-นิวคลีโอไทด์ (5′-nucleotides) เป็นวัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหาร (flavor enhancer) ที่จะทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารรสชาติดีขึ้นเรียกรสชาตินี้ว่า "อูมามิ" (umami taste) ซึ่งถูกจัดให้เป็นรสชาติที่ 5 ที่มีเอกลักษณ์แตกต่างจากรสชาติพื้นฐาน 4 รส คือ รสหวาน รสเค็ม รสเปรี้ยว และรสขม (Bachmanov, 2010) สารประกอบนิวคลีโอไทด์ ดังกล่าวคือ กัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต (guanosine 5′-monophosphate, 5′-GMP) และ อิโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต (inosine 5′-monophosphate, 5′-IMP) (Ying et al., 2004) สารประกอบ 5′-นิวคลีโอไทด์ใช้ปรุงแต่งรสชาติของอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เช่น ซุปสำเร็จรูป บะหมี่กึ่งสำเร็จรูป น้ำปลา ผลิตภัณฑ์เนื้อและอาหารเหลวต่างๆ เป็นต้น การใช้สารประกอบ 5′-นิวคลีโอไทด์ในการปรุงแต่งรสอาหารไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียงกับผู้บริโภคเหมือนการใช้ผงชูรส (monosodium glutamate; MSG) ซึ่งการบริโภคผงชูรสในปริมาณที่มากเกินไป อาจทำให้ผู้บริโภคบางรายเกิดความผิดปกติ เช่น มีอาการชาและร้อนวูบวาบที่ปาก ลิ้น ต้นคอ ใบหน้า โหนกแก้ม หน้าอก มีผื่นแดงตามตัว แน่นหน้าอก หายใจไม่สะดวก และอาจส่งผลต่อสมองในส่วนที่ควบคุมการเจริญเติบโตและระบบประสาทตา (แก้ว กังสดาลอำไพ, 2531, Husarova and Ostatnikova, 2013) ดังนั้นจึงได้มีการใช้วัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหารประเภท 5′-นิวคลีโอไทด์ เช่น 5′-GMP และ 5′-IMP ที่ทำให้เกิดรสชาติอูมามิในอาหารเช่นเดียวกับผงชูรส แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค (Ledesma-Amaro et al., 2013)

ในปัจจุบันการผลิต 5′-นิวคลีโอไทด์สามารถจะทำได้หลายวิธีได้แก่ การสกัดจากเนื้อสัตว์โดยตรง การหมักเพื่อผลิตนิวคลีโอไซด์จากนั้นใช้กระบวนการฟอสโฟรีเรชั่นเพื่อเปลี่ยนนิวคลีโอไทด์ได้เป็น 5′-นิวคลีโอไทด์ การสังเคราะห์

ด้วยกระบวนการทางเคมี และการย่อยสลายกรดนิวคลีอิกให้กลายเป็นสารประกอบ 5′ –นิวคลีโอไทด์ด้วยเอนไซม์ (Kuninaka et al., 1961, Olmedo et al., 1994) กระบวนการผลิตสารประกอบนิวคลีโอไทด์ด้วยกระบวนการทางเอนไซม์สามารถใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่มีแหล่งจากจุลินทรีย์และพืช เช่น ดีออกซิไรโบนิวคลีเอส (deoxyribonuclease, DNase) และไรโบนิวคลีเอส (ribonuclease, RNase) ซึ่งจะย่อยสลายกรดนิวคลีอิกได้เป็นสารประกอบนิวคลีโอไทด์กัวโนซีนโมโนฟอสเฟต (guanosinemonophosphate, GMP) อะดีโนซีนโมโนฟอสเฟต (adenosine monophosphate, AMP) ไซทิดีนโมโนฟอสเฟต (cytidinemonophosphate, CMP) ยูริดีนโมโนฟอสเฟต (uridinemonophosphate, UMP) และไทมีนโมโนฟอสเฟต (thyminemonophosphate, TMP) ทั้งชนิด 2′, 3′ และ 5′ (Gundampati and Debnath, 2009, Guo-Qing et al., 2006) ส่วนเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายกรดนิวคลีอิกให้ได้เฉพาะสารประกอบนิวคลีโอไทด์ชนิด 5′-นิวคลีโอไทด์ คือ เอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (5′-phosphodiesterase, 5′-PDE) ซึ่งจะย่อยสลายกรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid, RNA) โดยตัดบริเวณพันธะ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอร์ (5′-phosphodiester linkage, C_3-O-P(O_2 H) -K - C_5) ได้เป็นสารประกอบ ไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-โมโนฟอสเฟต (ribonucleotide 5′-monophosphate) เนื่องจากสารประกอบ นิวคลีโอไทด์ชนิด 5′- คือ 5′-GMP และ 5′-IMP เท่านั้นที่จะทำให้เกิดรสชาติอูมามิในผลิตภัณฑ์อาหาร ดังนั้นเอนไซม์ 5′-PDE จึงมีความน่าสนใจในการนำไปใช้ผลิตสารเพิ่มรสชาติในอาหาร (Deoda and Singhal, 2003, Hechang et al., 2008, Shi et al., 2007) ปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับการใช้เอนไซม์ 5′-PDE จากจุลินทรีย์ยังมีน้อย ดังนั้นการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE จากแหล่งต่างๆ จึงมีความน่าสนใจ โดยเฉพาะการคัดเลือกแบคทีเรียจากน้ำปลาดิบ เนื่องจากแบคทีเรียที่มีบทบาทในน้ำปลาจะผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในการย่อยสลายกรดนิวคลีอิกที่มีอยู่ในตัวปลาให้ได้เป็นสารประกอบ นิวคลีโอไทด์ โดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จะสามารถนำไปผลิตเอนไซม์สำหรับใช้ผลิตสารประกอบ 5′-นิวคลีโอไทด์ต่อไป ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับผู้บริโภคในการเลือกใช้เป็นวัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหารนอกเหนือจากการใช้ผงชูรส และข้อมูลที่ได้จากการวิจัยน่าจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนากระบวนการผลิต 5′-นิวคลีโอไทด์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อคัดเลือกและจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำปลาดิบซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ตลอดจนศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรีย

วิธีดำเนินการวิจัย

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ 20 ไอโซเลท ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำปลาดิบ โดยอนันต์ บุญปาน และคณะ (2558) เชื้อดังกล่าวจะถูกเก็บอยู่ในอาหารวุ้น Sehgal and Gibbons Complex (SGC) (Sehgal and Gibbons, 1960) ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ 5′-PDE บนอาหารแข็ง

นำแบคทีเรียบริสุทธิ์ 20 ไอโซเลท มาจุดลงบนอาหารแข็ง DNase test agar-methyl green ที่เติมเกลือ NaCl ให้มีความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน สังเกตการณ์เกิดพื้นที่ส่วนใส (clear zone) จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการเกิดพื้นที่ส่วนใส (clear zone) และของโคโลนี คัดเลือกไอโซเลทที่ให้อัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการเกิดพื้นที่ส่วนใสและของโคโลนีสูงไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป (Ikeda, 2000)

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ในอาหารเหลว

ถ่ายแบคทีเรียบริสุทธิ์ ลงในอาหารเหลว SGC ที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (ยี่ห้อ New Brunwick รุ่น Innova 40R) ที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็น

เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อแขวนลอยปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0–3.0 โมลาร์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน น้ำหมักที่ได้นำมาเหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (ยี่ห้อ Hitachi รุ่น CR 22 GIII) ที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5′–PDE

การจำแนกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ 5′–PDE

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาจำแนกหาชนิดของแบคทีเรีย โดยศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยศึกษารูปร่าง การติดสีแกรม การเจริญที่อุณหภูมิ พีเอช และความเข้มข้นเกลือระดับต่างๆ ลักษณะทางชีวเคมีโดยใช้เครื่องจำแนกชนิดจุลินทรีย์อัตโนมัติ VITEX 2 Compact และศึกษายีนของ 16S rDNA โดยการทำ DNA sequencing ของผลผลิต PCR ที่ได้จากการสกัด DNA ของแบคทีเรีย จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้จากการทำ DNA sequencing มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสอื่นๆ ในฐานข้อมูล (GenBank database) ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)

การศึกษาความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ 5′–PDE

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้อายุประมาณ 24 ชั่วโมง ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อแขวนลอยปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 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 เพื่อวิเคราะห์การเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (ยี่ห้อ Biochrom รุ่น Libra S12) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5′–PDE

การศึกษาพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ 5′–PDE

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้อายุประมาณ 24 ชั่วโมง ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ปริมาตร 150 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อแขวนลอยปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ที่ปรับพีเอชเป็น 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30, 35, 37, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5′–PDE

การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′–PDE ในถังหมักขนาด 5.0 ลิตร

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้อายุประมาณ 24 ชั่วโมง ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ปริมาตร 150 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อต่อลงในถังหมักขนาด 5.0 ลิตร (ยี่ห้อ Major Science รุ่น MS-F1) ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ปริมาตร 3,000 มิลลิลิตร ที่มีการใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm (ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรน้ำหมัก/นาที) ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์การเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5′–PDE

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5′–PDE

การวิเคราะห์กิจกรรมของ 5′–PDE (ดัดแปลงจาก

Fujimoto et al., 1974) โดยใช้สารละลายเอนไซม์ 1.0 มิลลิลิตร สำหรับทำปฏิกิริยากับสารละลายกรดไรโบนิวคลีอิก 1.0 มิลลิลิตร (กรดไรโบนิวคลีอิก 0.1 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4 . 7H_2O$ 0.16 โมลาร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 0.04 โมลาร์ พีเอช 7.0) บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติมสารละลายสำหรับตกตะกอนกรดนิวคลีอิก (ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดท 0.25 เปอร์เซ็นต์ในกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อ่างน้ำแข็งนาน 20 นาที ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง นำส่วนใสที่ได้ไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น 50 เท่า นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร หนึ่งหน่วยของกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 1.0 หน่วย ภายใต้สภาวะที่ใช้วิเคราะห์

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ 5′-PDE บนอาหารแข็ง

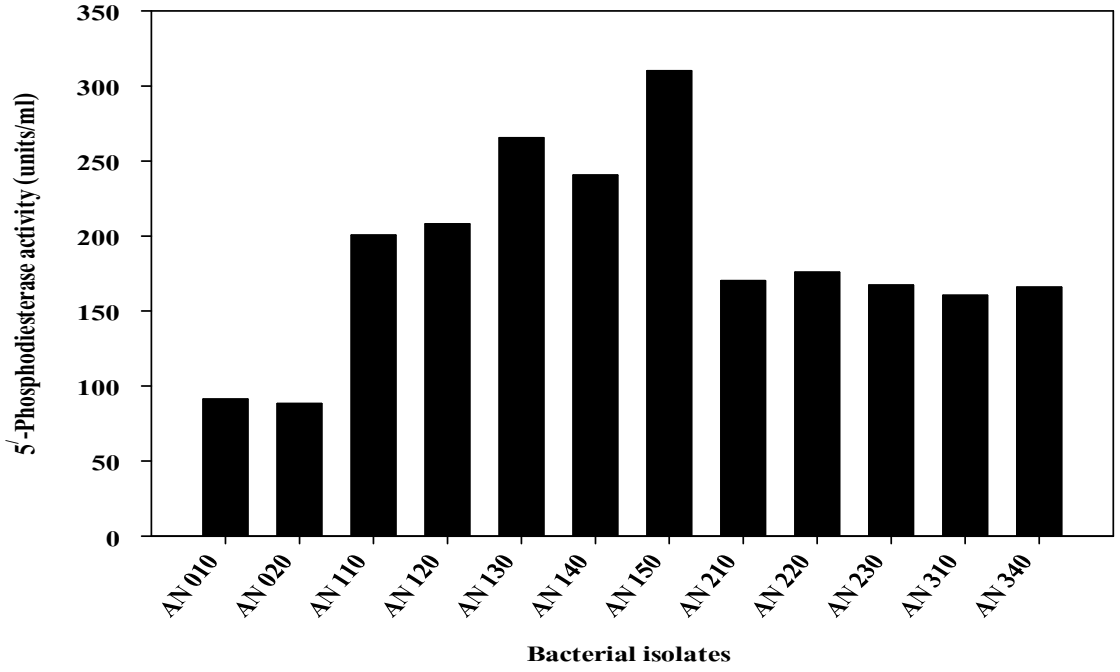
จากการนำแบคทีเรียบริสุทธิ์ทั้ง 20 ไอโซเลท ที่แยกมาจากน้ำปลาดิบมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE บนอาหาร DNase test agar-methyl green ที่เติมเกลือ NaCl ให้มีความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 1 จากผลการทดลองพบว่า หลังจากบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน มีแบคทีเรีย 12 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ได้ โดยสังเกตได้จากพื้นที่ส่วนใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นบนอาหาร DNase test agar-methyl green โดยแบคทีเรียไอโซเลท AN 150 จะให้อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการเกิดพื้นที่ส่วนใสและของโคโลนีสูงที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียไอโซเลท AN 150 สามารถผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ได้สูงที่สุด แบคทีเรียดังกล่าวจะผลิตเอนไซม์และขับออกมานอกเซลล์ เพื่อย่อยสลายกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid, DNA) ซึ่งเป็นสับสเตรทและเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับเมทิลกรีน (methyl green) ทำให้สีเขียวหายไป แล้วเห็นเป็นบริเวณใสขึ้นมา (Ikeda, 2000) ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลท AN 150 สำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ในอาหารเหลว

เมื่อนำแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ 5′-PDE บนอาหารแข็งทั้ง 12 ไอโซเลท มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 1 จากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลทสามารถผลิตเอนไซม์ได้ โดยแบคทีเรียไอโซเลท AN 150 สามารถผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ได้สูงที่สุด (310.10 หน่วยต่อมิลลิลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียไอโซเลทอื่น ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE บนอาหารแข็ง ดังนั้นแบคทีเรียไอโซเลท AN 150 จึงถูกคัดเลือกไว้สำหรับใช้ในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ต่อไป

ตารางที่ 1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ 5′-PDE บนอาหารแข็งที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์

แบคทีเรียไอโซเลท	อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลาง (มม.) และเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (มม.)			
	0 M NaCl	**1 M NaCl**	**2 M NaCl**	**3 M NaCl**
AN 010	1.10	-	-	-
AN 020	1.00	-	-	-
AN 030	-	-	-	-
AN 040	-	-	-	-
AN 050	-	-	-	-
AN 060	-	-	-	-
AN 110	-	2.00	-	-
AN 120	-	2.20	-	-
AN 130	-	2.50	-	-
AN 140	-	2.40	-	-
AN 150	-	2.95	-	-
AN 210	-	-	1.50	-
AN 220	-	-	1.65	-
AN 230	-	-	1.45	-
AN 240	-	-	-	-
AN 250	-	-	-	-
AN 310	-	-	-	1.25
AN 320	-	-	-	-
AN 330	-	-	-	-
AN 340	-	-	-	1.35



รูปที่ 1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ในอาหารเหลวที่เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์

การจำแนกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ 5′-PDE

จากการนำแบคทีเรียไอโซเลท AN 150 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม 5′ -PDE ได้สูง มาจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมี พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท AN 150 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก โคโลนีมีสีครีม เซลล์มีลักษณะรูปร่างท่อน สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส พีเอชระหว่าง 4-8 ในสภาวะที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ (ตารางที่ 2) การศึกษาลักษณะทางชีวเคมีโดยใช้เครื่องจำแนกชนิดจุลินทรีย์อัตโนมัติ VITEX 2 Compact แสดงผลในตารางที่ 3 จากลักษณะต่างๆ ทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลท AN 150 พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท AN 150 จะมีลักษณะที่คล้ายกับแบคทีเรีย Bacillus altitudinis ซึ่งผลการจำแนกแบคทีเรียไอโซเลท AN 150 จะสอดคล้องกับการศึกษาของ Suntinanalert (1978) ซึ่งได้แยกแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำปลาไทยพบแบคทีเรียในกลุ่มชอบเกลือและทนเกลือจีนัส Bacillus sp. ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์และมีบทบาทในกระบวนการหมักน้ำปลา

การตรวจสอบทางพันธุศาสตร์โมเลกุลของแบคทีเรียไอโซเลท AN 150 โดยการหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA ด้วยเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (automatic DNA sequencer) และเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างลำดับเบสของแบคทีเรียไอโซเลท AN 150 กับลำดับเบสของแบคทีเรียที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GeneBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท AN 150 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย Bacillus altitudinis (98.50 % similarity) B. pumilus (95.10% similarity) B. aerophilus (93.40 % similarity) และ B. stratosphericus (93.20 % similarity) (รูปที่ 2) เมื่อนำลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมี มาพิจารณาร่วมกับผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท AN 150 มีลักษณะต่างๆ คล้ายกับแบคทีเรีย B. altitudinis มากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าแบคทีเรียไอโซเลท AN 150 คือแบคทีเรีย B. altitudinis

ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของแบคทีเรียไอโซเลท AN 150

Characteristics	AN 150
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, 1, 2, 3 M NaCl	+

หมายเหตุ : + = Positive reaction

\- = Negative reaction

ตารางที่ 3 ลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลท AN 150

Characteristics	Reaction
Gram reaction	+ve
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	+
lnulin	+
D-glucose	-
D-ribose	+
Putrescine assimilation	-
Growth in 6.5% NaCl	-
Kanamycin resistance	+
Oleandomycin resistance	-
Esculin hydrolyse	-
Tetrazolium red	-
Polymixin_B resistance	(-)
	-

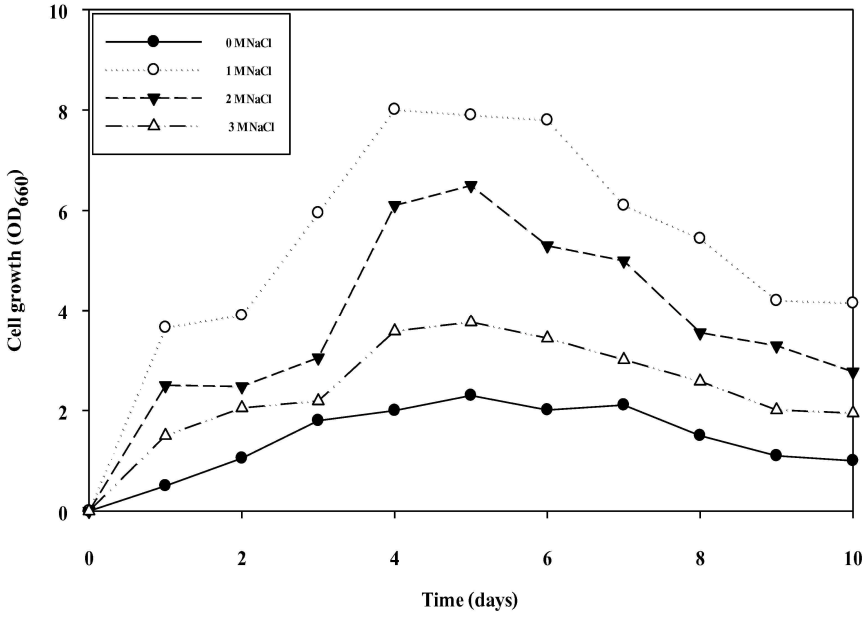
หมายเหตุ:			ID Message Confidence Level	% Probaility
	+ve	= Gram positive bacteria		
	+	= Positive reaction	Excellent	96 to 99
	-	= Negative reaction	Very Good	93 to 95
	(+)	= Weak-positive reaction	Good	89 to 92
	(-)	= Weak-negative reaction	Acceptable	85 to 88

รูปที่ 2 Phylogenetic tree ของแบคทีเรียไอโซเลท AN 150 ที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน16S rDNA

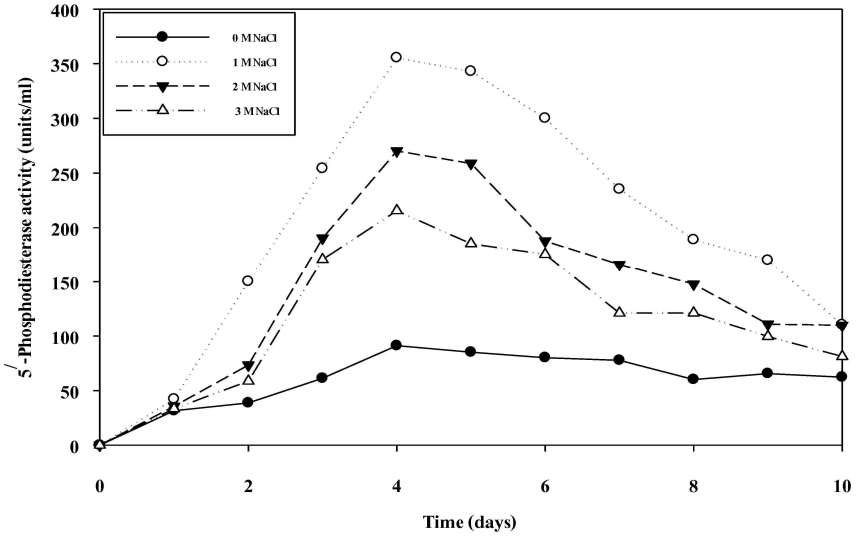
การศึกษาความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ 5′-PDE

การศึกษาความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย B.altitudinis AN 150 พบว่า แบคทีเรียสามารถเจริญได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือและที่มีเกลือความเข้มข้น 1.0–3.0 โมลาร์ โดยแบคทีเรียจะเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า B. altitudinis AN 150 เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียชอบเกลือ (halophilic bacteria) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ต้องการเกลือ NaCl ความเข้มข้นตั้งแต่ 1.0 – 4.0 โมลาร์ สำหรับการเจริญ (OK et al., 1982)

การศึกษาความเข้มข้นของเกลือ NaCl ต่อการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย B. altitudinis AN 150 พบว่าแบคทีเรียสามารถที่จะผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี NaCl และไม่มีเกลือ NaCl โดยแบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ได้สูงที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือ NaCl แบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ได้ต่ำ ดังผลการทดลองในรูปที่ 4 แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของเกลือ NaCl มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE โดยแบคทีเรียจะเจริญและผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ได้ดีที่สุดในสภาวะที่มีเกลือ NaCl ดังนั้นในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย B. altitudinis AN 150 จะต้องเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ จึงจะสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุด



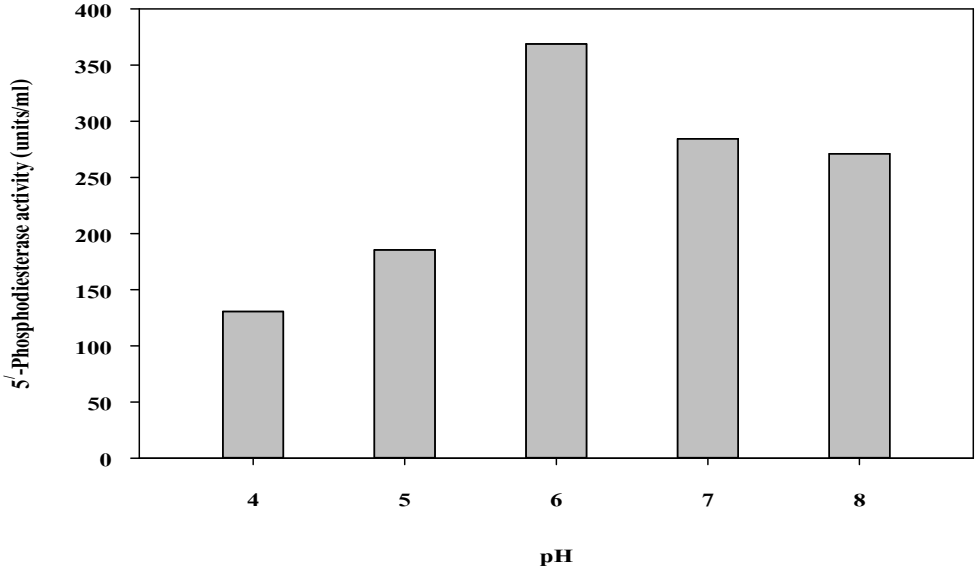
รูปที่ 3 ผลของความเข้มข้นของเกลือ NaCl ต่อการเจริญของ Bacillus altitudinis AN 150



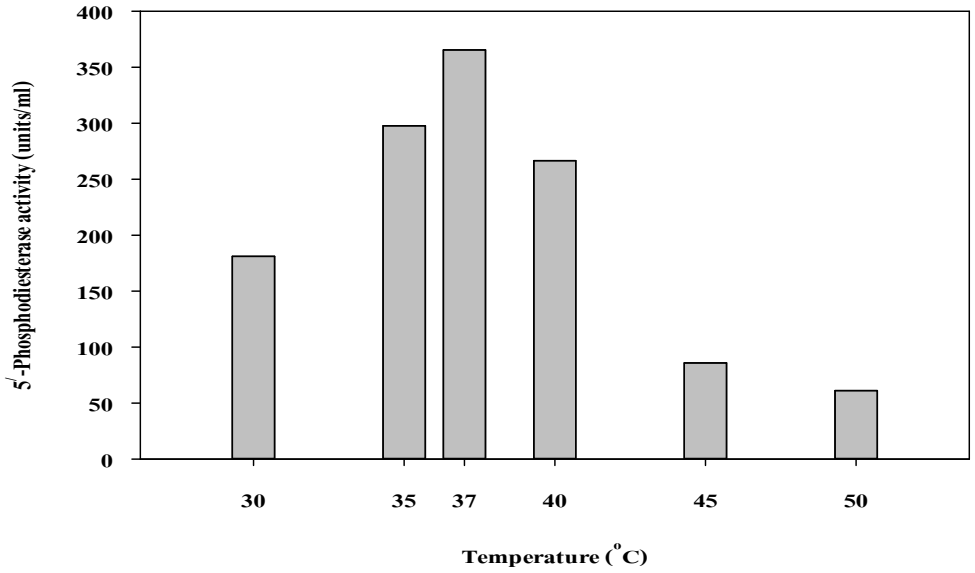
รูปที่ 4 ผลของความเข้มข้นของเกลือ NaCl ต่อการผลิตเอนไซม์ 5´-PDE ของ Bacillus altitudinis AN 150

การศึกษาพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ 5´-PDE

จากการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ 5´-PDE ของแบคทีเรีย B. altitudinis AN 150 พบว่าแบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ 5´-PDE ได้ในช่วงพีเอช 4.0-8.0 โดยจะมีการผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่พีเอช 6.0 (รูปที่ 5) สำหรับที่ระดับพีเอชสูงหรือต่ำกว่า 6.0 จะผลิตเอนไซม์ได้น้อย เนื่องจากเป็นระดับพีเอชที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย B. altitudinis AN 150 แบคทีเรียจึงผลิตเอนไซม์ได้น้อยกว่าที่ระดับพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญ การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการการผลิตเอนไซม์ 5´-PDE พบว่าแบคทีเรีย B. altitudinis AN 150 ผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (รูปที่ 6) ที่อุณหภูมิต่ำหรือสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส แบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ได้น้อย เนื่องจากแบคทีเรียจะมีการเจริญน้อยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นที่อุณหภูมิสูงเกินไป (45-50 องศาเซลเซียส) เอนไซม์ที่ผลิตขึ้นมาอาจเกิดการเสียสภาพ ส่งผลให้เอนไซม์ที่ผลิตได้มีปริมาณต่ำ (พัชรา วีระกะลัส, 2543)



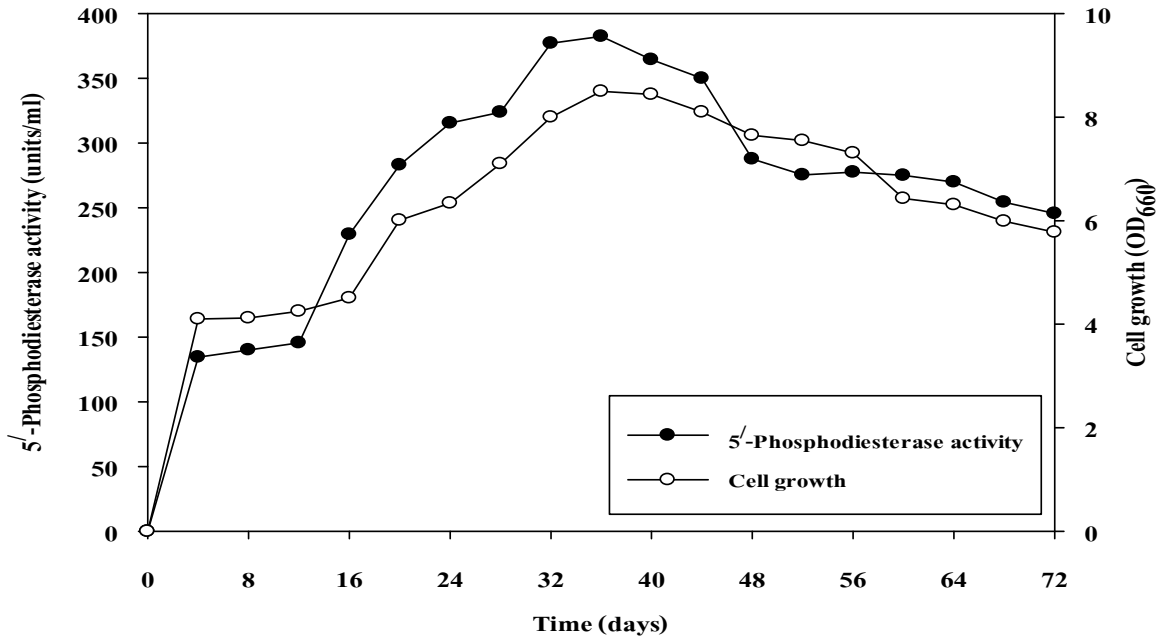
รูปที่ 5 ผลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ 5´-PDE ของ Bacillus altitudinis AN 150



รูปที่ 6 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ของ Bacillus altitudinis AN 150

การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ในถังหมักขนาด 5.0 ลิตร

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย B. altitudinis AN 150 ในถังหมักขนาด 5.0 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm (ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรน้ำหนัก/นาที) ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียมีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นการเจริญจะค่อยๆเพิ่มขึ้นและสูงสุดเมื่อการเพาะเลี้ยงเข้าสู่ชั่วโมงที่ 36 ชั่วโมง จากนั้นจะค่อยๆ ลดต่ำลงจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อทำการเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นและสูงสุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเข้าสู่ชั่วโมงที่ 36 จากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์จะค่อยๆลดต่ำลงจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE เมื่อทำการเพาะเลี้ยงนาน 36 ชั่วโมง เท่ากับ 382.50 หน่วยต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 7) ซึ่งจะสูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE ที่ผลิตจากข้าวบาร์เลย์งอก (germinated barley rootlets) และเชื้อรา Penicillium citrinum ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ได้ 300 และ 353 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Deoda and Singhal, 2003, Shi et al., 2007) จากการทดลองจะเห็นว่า แบคทีเรีย B. altitudinis AN 150 มีรูปแบบการเจริญควบคู่ไปกับการผลิตเอนไซม์ (growth link associate product formation) โดยในขณะที่มีการเจริญจะมีการผลิตเอนไซม์ออกมาด้วย และจะมีการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเมื่อการเจริญอยู่ในระยะคงที่ (stationary phase) (Crueger and Crueger, 1990)



รูปที่ 7 การเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ของ Bacillus altitudinis AN 150 ในถังหมักขนาด 5.0 ลิตร

สรุปผลการวิจัย

การจัดจำแนกแบคทีเรียไอโซเลท AN 150 ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ได้สูง ด้วยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และเปรียบเทียบลำดับเบสของ 16S rDNA กับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น พบว่าเป็นแบคทีเรีย Bacillus altitudinis ที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียชอบเกลือ แบคทีเรียดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว SGC ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียในถังหมักขนาด 5.0 ลิตร พบว่า แบคทีเรียดังกล่าวมีการผลิตเอนไซม์ควบคู่ไปกับการเจริญและผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเท่ากับ 382.50 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง

บรรณานุกรม

แก้ว กังสดาลอำไพ. (2531). "ผงชูรสอีกครั้ง". *นิตยสารหมอชาวบ้าน.* 32(378) : 44-47.

พัชรา วีระกะลัส. (2543). *เอนไซม์.* พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อนันต์ บุญปาน สิริเขษ พงษ์สวัสดิ์ และจันทิมา ทีฆะ. (2558). การผลิตสารเพิ่มรสชาติในอาหารด้วยกระบวนการทางเอนไซม์. รายงานการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

Bachmanov, A. (2010). "Umami : fifth taste? Flavor enhancer?". *Perfumer & Flavorist.* (35) : 52-57.

Crueger, W. and Crueger, A. (1990). *Biotechnology.* 2 edition. Sunderland : Sinauer Associates Inc.

Deoda, A.J. and Singhal, R.S. (2003). "5′-Phosphodiesterases (5′-PDE) from germinated barley for hydrolysis of RNA to produce flavor nucleotides". *Bioresource Technology.* (88) : 245-250.

Fujimoto, M., Kuninaka, A. and Yoshino, H. (1974). *"Purification of a nuclease from Penicillium citrinum"*. Agricultural and Biological Chemistry Journal. (38) : 777-783.

Gundampati, R.K. and Debnath, M. (2009). "Extracellular ribonuclease from Aspergillus niger : process optimization for production". *International Journal of Engineering and Technology*. 1(4) : 317-320.

Guo-Qing, Y., Shi, L.E., Yu, Y., Zhen-Xing, T. and Jian-Shu, C. (2006). "Production, purification and characterization of nuclease p1 from *Penicillium citrinum*". *Process Biochemistry*. (41) : 1276-1281.

Hechang, Z., Guangqi, C., Wen, C., Hailong, L., Yi, G., Yongdoo, P. and Fanguo, M. (2008). "Extraction and DNA digestion of 5′-Phosphodiesterases from malt root". Tsinghua Science and Technology. 13(4) : 480-484.

Husarova, V. and Ostatnikova, D. (2013). "Monosodium glutamate toxic effects and their implications for human intake: A review". *JMED Research*. (1) : 1-12.

Ikeda, T. (2000). *Characterization of extracellular halophilic ribonuclease from halotolerant Pseudomonas* sp. M.S. Thesis, Kasetsart University, Bangkok.

Kuninaka, A., Kibi, M., Yoshino, H. and Sahaguchi, K. (1961). "Studies on 5′-Phosphodi esterases in microorganisms : Past 2. Properties and application of Penicllium citrinum 5′-Phosphodiesterases". *Agricultural and Biological Chemistry Journal*. (25) : 693-701.

Ledesma-Amaro, R., Jimenez, A., Santos, M.A. and Revuelta, J.L. (2013). "Biotechnological production of feed nucleotides by microbial strain improvement". *Process Biochemistry*. (48) : 1263-1270.

Ok, T., Matsukura,T., Ooshiro, Z., Hayashi, S. and Itakura, T. (1982). "Protease formation by two moderately halophilic Bacillus strains from fish sauce". J. Jap. Soc. Food Sci. Technol. 29 (10): 618-622.

Olmedo, F., Iturbe, F., Hernandez, J.G. and Munguia, A.L. (1994). "Continuous production of 5′-ribonucleotides from yeast RNA by hydrolysis with immobilized 5′-Phosphodiesterases and 5′-adenylate deaminase". *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. (10) : 36-40.

Sehgal, S. N. and Gibbons, N. E. (1960). "Effect of metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum*". *Canada Journal of Microbiology*. (6) : 165-169.

Shi, L.E., Ying, G.O., Zhang, X.Y., Tang, Z.X., Chen, J.S., Xiong, W.Y. and Liu, H.Z. (2007). "Medium optimization for 5′-phosphodiesterase production from Penicillium citrinum using response surface methodology". *Food Technology and Biotechnology*. 45(2) : 126-133.

Suntinanalert, P. (1978). *Role of microorganisms in the fermentation of Nam Pla in Thailand : Relationship of the bacteria isolated from Nam Pla produced from different geographical localities in Thailand*. M.S. Thesis, Mahidol University, Bangkok.

Ying, G.Q., Shi, L.E. Tang, Z.X. and Shan, J.F. (2004). "The applications of mononucleotides and producing methods". *Food Research and Development*. (25) : 120–123.