Science and Technology

RMUTT Journal

Vol.3 No.2 (2013) : 27-37

www.sci.rmutt.ac.th/stj

Online ISSN 2229-1547

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรสจากแบคทีเรียทนเกลือ *Bacillus sp*. RMUT 001

Study on Production of 5′-Phosphodiesterase from Halotolerant *Bacillus sp*. RMUT 001

วัชรีวรรณ บุญส่งศรี* อนันต์ บุญปาน และ สิริแข พงษ์สวัสดิ์

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

อ.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี 12110

*E-mail: watcharewan_b@hotmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรสจากแบคทีเรียทนเกลือ *Bacillus* sp. RMUT 001 ที่แยกมาจากน้ำปลาดิบในอาหารเหลว Sehgal and Gibbons Complex (SGC) พบว่าแบคทีเรียทนเกลือ *Bacillus* sp. RMUT 001 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่ พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว SGC ที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว SGC ในระดับฟลาสก์ในสภาวะที่เหมาะสม พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรสควบคู่ไปกับการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เกิดขึ้นสูงสุดเมื่อการเจริญอยู่ในระยะคงที่ แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเท่ากับ 0.98 หน่วย/มล. เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 17.79 เท่า และได้ผลผลิตเอนไซม์เท่ากับ 73.67 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ: 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรส แบคทีเรียทนเกลือ Bacillus sp. น้ำปลาดิบ

Received: Dec 17, 2013

Accepted: Dec 28, 2013

Abstract

The optimum conditions for growth and 5′ phosphodiesterase (5'- PDE) production from a halotolerant *Bacillus* sp. RMUT 001 isolated from raw fish sauce in Sehgal and Gibbons Complex (SGC) liquid medium were studied. The results showed that a halotolerant *Bacillus* sp. RMUT 001 could produce the highest 5′- PDE activity at pH of 7.0 and temperature of 37 ^{o}C in SGC liquid medium without NaCl. Cultivation of *Bacillus* sp. RMUT 001 in shaking flasks at optimum conditions found that enzyme secretion was coupled to cell multiplication and maximum activity was obtained at stationary phase. The maximum 5′- PDE production was 0.98 U/ml after 5 days cultivation. Enzyme was partially purified by 50% ethanol precipitation (by volume). The purity of 5′- PDE was increased 17.79 folds and yield of 73.67% was obtained.

Keywords: 5′- phosphodiesterase, Halotolerant bacteria, *Bacillus* sp.,Raw fish sauc

1. บทนำ

เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส (ribonuclease, RNase) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายกรดไรโบนิวคลีอิค (ribonucleic acid, RNA) ให้เป็นสารประกอบ 2′-, 3′-, 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ กัวโนซีนโมโนฟอสเฟต (guanosinemonophosphate, GMP) อะดีโนซีนโมโนฟอสเฟต (adenosine monophosphate, AMP) ไซทิดีนโมโนฟอสเฟต (cytidinemonophosphate, CMP) และยูริดีนโมโนฟอสเฟต (uridinemonophosphate, UMP) เอนไซม์ RNase แบ่งออกเป็นสามกลุ่ม ได้แก่ เอนไซม์ 3′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (3′-phosphodiesterase, 3′-PDE) ซึ่งจะย่อยสลาย RNA โดยตัดบริเวณพันธะ 3′-ฟอสโฟไดเอสเทอร์ (3′-phosphodiester linkage, $C_{3'}$-O-P(O_2H)-O- $C_{5'}$) ได้เป็นสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 3′-โมโนฟอสเฟต (ribonucleotide 3′-monophosphate) ได้แก่ เอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (5′-phosphodiesterase, 5′-PDE) ซึ่งจะย่อยสลาย RNA โดยตัดบริเวณพันธะ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอร์ (5′-phosphodiester linkage, $C_{3'}$-O-P(O_2H)-K-$C_{5'}$) ได้เป็นสารประกอบไรโบ นิวคลีโอไทด์ 5′-โมโนฟอสเฟต (ribonucleotide 5′-monophosphate) และเอนไซม์โพลินิวคลีโอไทด์ฟอสโฟรีเลส (polynucleotide phospholyase) [1, 2, 3] เอนไซม์ 5′-PDE เป็นเอนไซม์ที่ได้รับความสนใจและถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตวัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหารชนิดสารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ เนื่องจากเอนไซม์ดังกล่าวสามารถย่อยสลาย RNA ได้สารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ (5′-GMP, 5′-AMP, 5′-CMP, 5′-UMP) ซึ่งสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP จัดเป็นวัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหารที่ให้รสชาติอูมามิและมีการใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร ส่วนสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์อื่นๆ ได้แก่ 5′-AMP, 5′-CMP และ 5′-UMP จะถูกนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมด้านเภสัชภัณฑ์ [4, 5] ดังนั้นเอนไซม์ 5′-PDE จึงมีความน่าสนใจในการนำไปใช้ผลิตสารเพิ่มรสชาติในอาหาร ปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE จากจุลินทรีย์ยังมีน้อย ดังนั้นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE

จากแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์จึงมีความน่าสนใจ ซึ่งจะสามารถใช้เป็นข้อมูลสำหรับผลิตเอนไซม์ 5′-PDE เพื่อใช้ผลิตสารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์สำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ *Bacillus* sp. RMUT 001 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำปลาดิบเชื้อดังกล่าวได้รับการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีโดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) และจะถูกเก็บอยู่ในอาหารวุ้น Sehgal and Gibbons Complex (SGC) [6]

2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE

2.2.1 การศึกษาความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์5′-PDE

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียอายุประมาณ 1-2 วัน ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อแขวนลอยปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE

2.2.2 ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียอายุประมาณ 1-2 วันลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อแขวนลอยปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ที่มีเกลือ NaCl ที่เหมาะสม ปริมาตร 150 มิลลิลิตร โดยปรับพีเอชเป็น 4, 5, 6, 7, 8 นำไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE

2.2.3 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียอายุประมาณ 1-2 วัน ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อแขวนลอยปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ที่มีเกลือ NaCl และปรับพีเอชที่เหมาะสม ปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30, 37, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน ซึ่งทำการเก็บ

ตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE

2.3 การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ในระดับฟลาสก์

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์อายุประมาณ 1-2 วัน ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อแขวนลอยปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ปริมาตร 150 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าที่มีการใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE

2.4 การทำเอนไซม์ 5′-PDE ให้บริสุทธิ์บางส่วน

ทุกขั้นตอนของกระบวนการทำที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RMUT 001 มาเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ตกตะกอนน้ำใส (supernatant) ที่ได้ด้วยเอทานอล 99.8 เปอร์เซ็นต์ โดยให้มีปริมาณความเข้มข้นสุดท้ายของเอทานอลในน้ำหมักเป็น 50.0 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้นาน 24 ชั่วโมง แยกตะกอนเอนไซม์ออกจากน้ำหมักโดยเหวี่ยงแยกตะกอนออกที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนที่ได้ละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ พีเอช 6.0 จากนั้นนำมาทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) โดยใช้เครื่อง lyophilizer จะได้เอนไซม์อยู่ในรูปผงแห้ง

2.5 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE

การวิเคราะห์กิจกรรมของ 5′-PDE [7] 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 หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติมเอทานอล 99.8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 6.0 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ใน อ่างน้ำแข็งนาน 20 นาที ปั่นเหวี่ยงแยกตะตอนออก นำส่วนใสที่ได้ไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น 50 เท่า นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร หนึ่งหน่วยของกิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 1.0 หน่วย ภายใต้สภาวะที่ใช้วิเคราะห์

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผลการวิจัย

3.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RMUT 001 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ได้ดี โดยทำการทดสอบความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ พีเอช 4-8 และอุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว SCG บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที

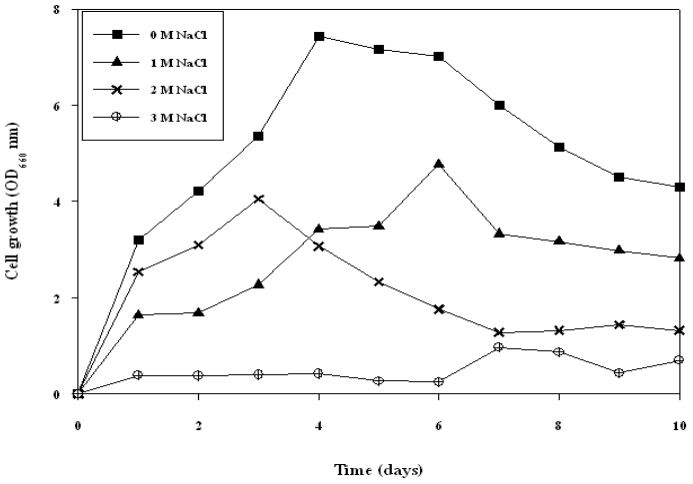
จากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรีย *Bacillus* sp. RMUT 001 สามารถเจริญได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือและที่มีเกลือความเข้มข้น 1.0-3.0 โมลาร์ โดยแบคทีเรียจะเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือ NaCl และการเจริญจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือ NaCl สูงขึ้น ดังผลการทดลองในรูปที่ 1 A จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RMUT 001 เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียทนเกลือ (halotolerant bacteria) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการเกลือ NaCl สำหรับการเจริญ แต่สามารถทนต่อเกลือ NaCl และเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้นตั้งแต่ 2.5 โมลาร์ [8,9] จากผลการทดลองจะสอดคล้องกับการศึกษาของ Ikeda (2000) ซึ่งได้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจากน้ำปลาไทย พบว่าแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ดังกล่าวได้สูงจะสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-4.0 โมลาร์ และเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียทนเกลือ

การศึกษาความเข้มข้นของเกลือ NaCl ต่อการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RMUT 001 พบว่าแบคทีเรียสามารถที่จะผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี NaCl และไม่มีเกลือ NaCl โดยแบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ได้สูงที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือ NaCl ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีเกลือ NaCl แบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ได้ต่ำ ดังผลการทดลองในรูปที่ 1 B จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของเกลือ NaCl มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ดังนั้นในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RMUT 001 จะต้องเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือ NaCl จึงจะสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุด

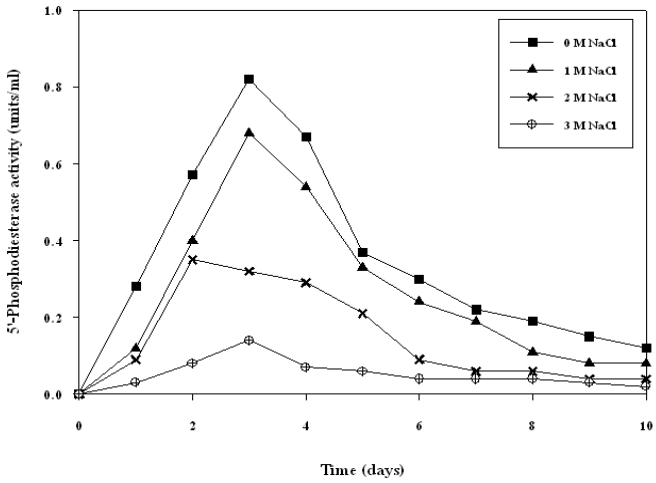
การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RMUT 001 พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus* sp. RMUT 001 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือ NaCl ที่มีพีเอช ระหว่าง 4.0-8.0 โดยจะมีการเจริญดีที่สุดที่พีเอช 7.0 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 2 A สำหรับผลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE จะสอดคล้องกับผลของพีเอชต่อการเจริญ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 2 B กล่าวคือแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RMUT 001 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในช่วงพีเอชระหว่าง 4.0-8.0 โดยจะมีการผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่พีเอช 7.0 และที่ระดับพีเอชสูงหรือต่ำกว่า 7.0 จะผลิตเอนไซม์ได้น้อย เนื่องจากเป็นระดับ พีเอชที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RMUT 001 แบคทีเรียจึงผลิตเอนไซม์ได้น้อยกว่าที่ระดับพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญ

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RMUT 001 พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus* sp. RMUT 001 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือ NaCl

พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิในช่วง 37-50 องศาเซลเซียส โดยจะมีการเจริญดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และการเจริญจะลดลงที่อุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่า 37 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3 A สำหรับผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์คือ 37 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3 B จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ที่อุณหภูมิต่ำหรือสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส การผลิตเอนไซม์จะได้น้อย เนื่องจากแบคทีเรียจะมีการเจริญต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นที่อุณหภูมิสูงเกินไป (40-50 องศาเซลเซียส) เอนไซม์ที่ผลิตได้อาจเกิดการเสียสภาพ ส่งผลให้เอนไซม์ที่ผลิตได้มีปริมาณต่ำ

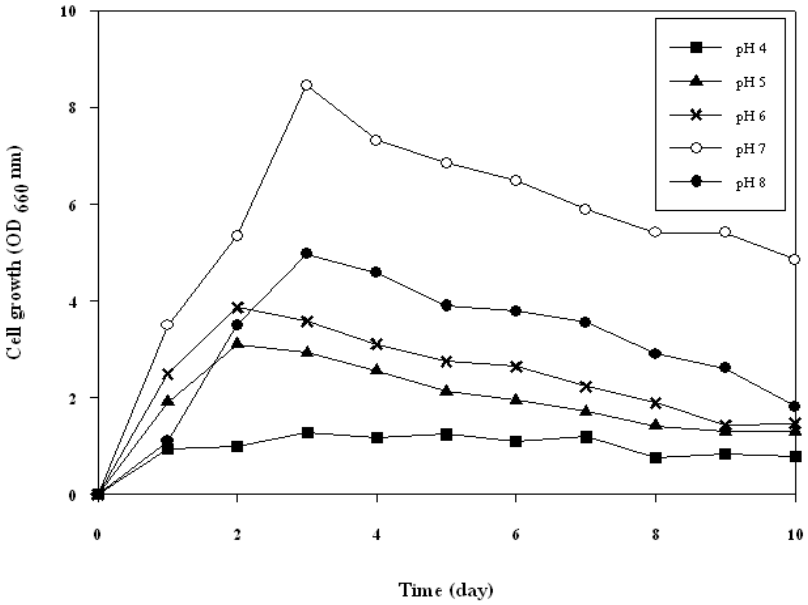


(A)

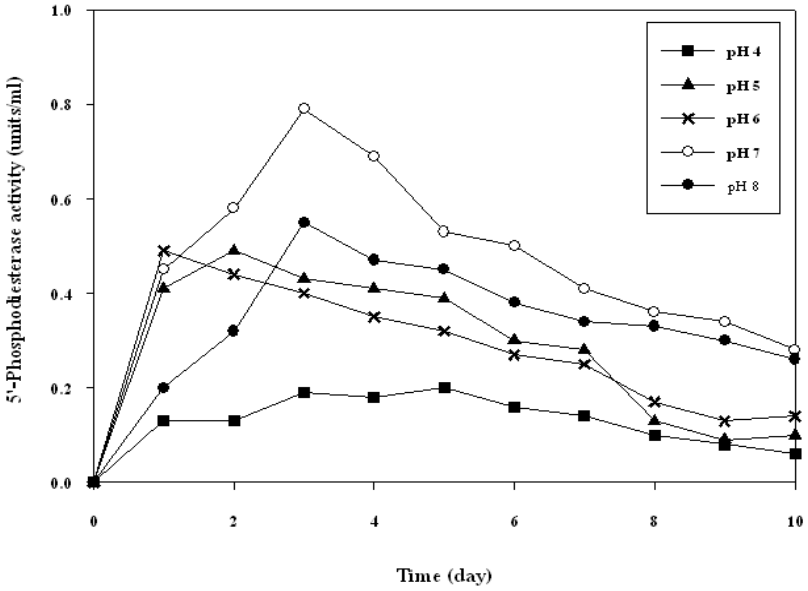


(B)

รูปที่ 1 ผลของความเข้มข้นของเกลือ NaCl ต่อการเจริญ (A) และการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE (B) ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RMUT 001

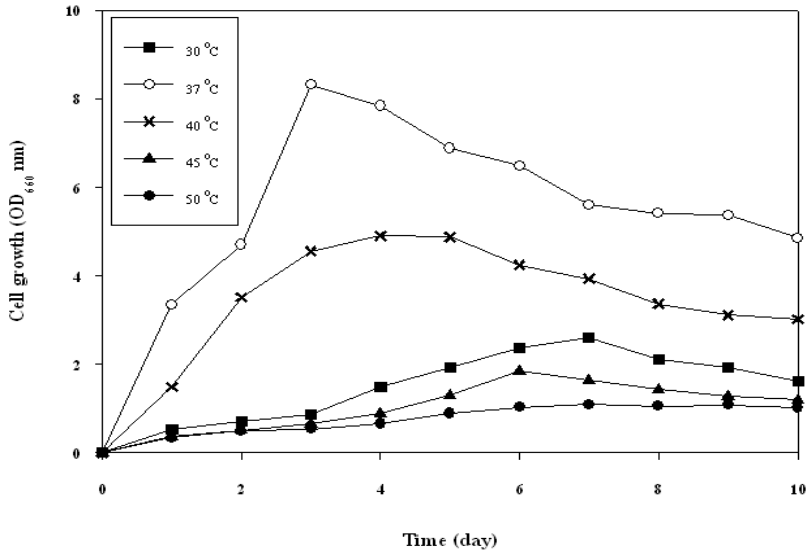


(A)

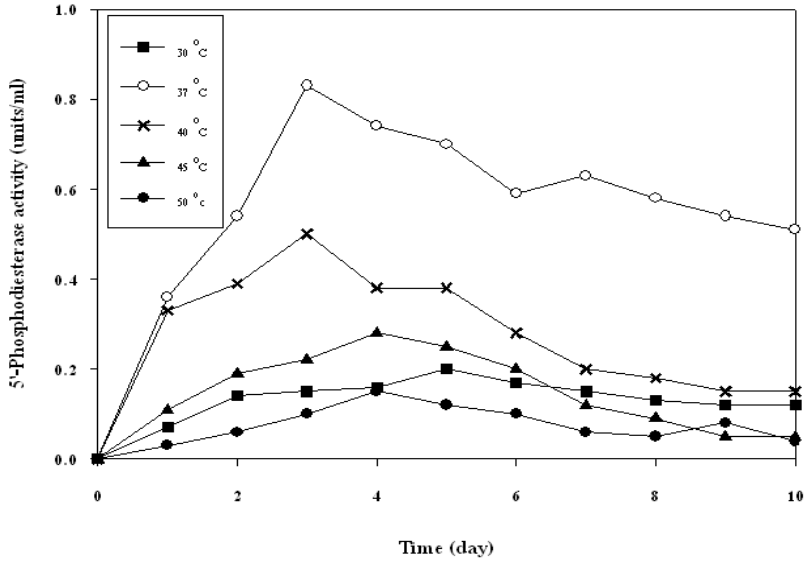


(B)

รูปที่ 2 ผลของพีเอชต่อการเจริญ (A) และการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE (B) ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RMUT 001



(A)



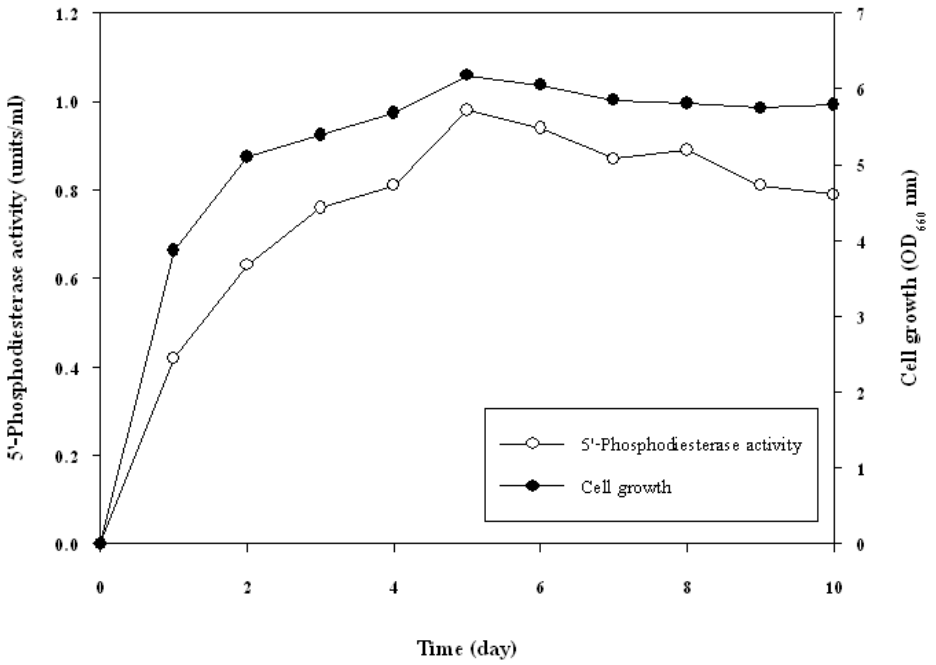
(B)

รูปที่ 3 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ (A) และการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE (B) ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RMUT 001

3.2 การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ในระดับฟลาสก์

การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RMUT 001 โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว SCG พีเอช 7.0 ในสภาวะที่ไม่มีเกลือ NaCl บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที จากการทดลองพบว่า แบคทีเรีย *Bacillus* sp. RMUT 001 มีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อทำการเพาะเลี้ยงนาน 2 วัน จากนั้นการเจริญจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นและสูงสุดเมื่อการเพาะเลี้ยงเข้าสู่วันที่ 5 จากนั้นจะคงที่จนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย

Bacillus sp. RMUT 001 จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อทำการเพาะเลี้ยงนาน 3 วัน จากนั้นจะค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้นและสูงสุดเมื่อการเพาะเลี้ยงเข้าสู่ชั่วโมงวันที่ 5 โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE สูงสุดเท่ากับ 0.98 หน่วยต่อมิลลิลิตรจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์จะค่อยๆลดต่ำลงจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4 จากการทดลองพบว่า แบคทีเรีย *Bacillus* sp. RMUT 001 มีรูปแบบการเจริญควบคู่ไปกับการผลิตในลักษณะที่เป็น growth link associate product formation โดยในขณะที่มีการเจริญจะมีการผลิตเอนไซม์ออกมาด้วย และจะมีการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเมื่อการเจริญอยู่ในระยะคงที่หรืออยู่ในระยะ stationary phase [11]



รูปที่ 4 การเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RMUT 001 ในการเพาะเลี้ยงระดับฟลาสก์

3.3 การทำเอนไซม์ 5′-PDE ให้บริสุทธิ์บางส่วน

นำสารละลายเอนไซม์ 5′-PDE ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียทนเกลือ *Bacillus* sp. RMUT 001 มาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 1 จากผลการทดลองพบว่า เอนไซม์ 5′-PDE มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 17.79 เท่าของเอนไซม์เริ่มต้น และมีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมดคงเหลือ 73.67 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองจะพบว่า เอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นน้อย และมีการสูญเสีย 26.33 เปอร์เซ็นต์ ของเอนไซม์เริ่มต้น แสดงว่าขั้นตอนการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเอทานอลยังไม่เหมาะสม ดังนั้นจึงอาจมีการเปลี่ยนตัวตกตะกอนให้เหมาะสมและเพิ่มขั้นตอนในการทำให้เอนไซม์ให้บริสุทธิ์ ซึ่งอาจทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากขึ้น และลดการสูญเสียเอนไซม์ ทำให้ได้ผลผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่สูงขึ้น

ตารางที่ 1 การทำเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรียทนเกลือ *Bacillus* sp. RMUT 001 ให้บริสุทธิ์บางส่วน

Purification step	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Activity (units/ml)	Specific activity (units/mg protein)	Purification (folds)	Yield (%)
Culture filtrate	1,000	0.58	0.98	1.69	1	100
50% Ethanol precipitate	200	0.12	3.61	30.08	17.79	73.67

4. สรุปผลการวิจัย

แบคทีเรียทนเกลือ *Bacillus* sp. RMUT 001 สามารถผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ได้ดีที่สุดที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว SGC ที่ไม่มีเกลือ NaCl แบคทีเรียสามารถผลิต5′-PDE ควบคู่ไปกับการเจริญเติบโต แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเท่ากับ 0.98 หน่วย/มิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเอทานอลความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 17.79 เท่า และได้ผลผลิตเอนไซม์เท่ากับ 73.67 เปอร์เซ็นต์

5. เอกสารอ้างอิง

[1] A. Kuninaka, M. Kibi, H. Yoshino, and K. Sahaguchi, “Studies on 5′-phosphodiesterases in microorganisms. Past 2. Properties and application of *Penicllium citrinum* 5′-phosphodiesterases,” *Agric. Biol. Chem*, vol. 25, pp. 693-701, 1961.

[2] F. Egami, and K. Nakamura, *Microbial Ribonucleases*,Heidelberg : Springer-Verlag, 1969.

[3] E.V. Kumar, M. Srijana, K. Chaitanya, Y.H.K. Reddy, and G. Reddy, “Biodegradation of poultry by a novel bacterial isolate *Bacillus altitudinis* GVC11,” *Indian Journal of Biotechnology*, vol. 10, pp. 502-507, 2010.

[4] 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.

[5] Y.G. Qing, L.E. Shi, Y. Yu, T.Z. Xing, and C.J. Shu, “Production, purification and chareacterization of nuclease p1 from *Penicillium citrinum*,” Process Biochemistry, vol. 41, pp. 1276-1281, 2006.

[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] M. Fujimoto, A. Kuninaka, and H. Yoshino, "Purification of a nuclease from *Penicillium citrinum*," *Agric Biol Chem*, vol. 38, pp. 83-777, 1974.

[8] 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.

[9] M.J. Garabito, M.C. Maquez, and A. Ventosa, "Halotolerant *Bacillus* diversity in Hypersaline Environments," *Can. J. Microbiol,* v.ol 44, pp 95-102, 1998.

[10] K. Ikeda, "Characterization of extracellular halophilic ribonuclease from halotolerant *Pseudomonas* sp.," M.S. Thesis Kasetsart University, 2000.

[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.