การผลิตสารเพิ่มรสชาติในอาหารกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต ด้วยกระบวนการทางเอนไซม์

PRODUCTION OF FLAVOUR ENHANCING GUANOSINE 5′-MONOPHOSPHATE IN FOOD BY ENZYMATIC PROCESS

วัชรีวรรณ บุญส่งศรี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

การผลิตสารเพิ่มรสชาติในอาหารกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต ด้วยกระบวนการทางเอนไซม์

วัชรีวรรณ บุญส่งศรี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตสารเพิ่มรสชาติในอาหารกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต ด้วยกระบวนการทางเอนไซม์ Production of Flavour Enhancing Guanosine 5′-Monophosphate in Food by Enzymatic Process
ชื่อ-นามสกุล	นางสาววัชรีวรรณ บุญส่งศรี
สาขาวิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์อนันต์ บุญปาน, ปร.ด.
ปีการศึกษา	2556

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(อาจารย์คลนภา แก้วภา, ปร.ด.)

.....กรรมการ
(อาจารย์อนันต์ บุญปาน, ปร.ด.)

.....กรรมการ
(อาจารย์จันทิมา ทีฆะ, Ph.D.)

.....กรรมการ
(อาจารย์โศรดา วัลภา, D.Tech.Sc.)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อนุมัติวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สิริแข พงษ์สวัสดิ์, วท.ด.)
วันที่ 9 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2557

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตสารเพิ่มรสชาติในอาหารกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต ด้วยกระบวนการทางเอนไซม์
ชื่อ-นามสกุล	นางสาววัชรีวรรณ บุญส่งศรี
สาขาวิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์อนันต์ บุญปาน, ปร.ด.
ปีการศึกษา	2556

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตสารเพิ่มรสชาติในอาหารกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟตด้วยเอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรสที่ผลิตจากแบคทีเรียซึ่งแยกมาจากน้ำปลาดิบ โดยทำการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรส ทำการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียพร้อมทั้งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตและการทำงานของเอนไซม์ และประยุกต์ใช้เอนไซม์สำหรับผลิตสารประกอบกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต

การคัดเลือกแบคทีเรีย 14 ไอโซเลทที่แยกมาจากน้ำปลาดิบ เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรสบนอาหารแข็ง DNase test agar-methyl green และในอาหารเหลว Sehgal and Gibbons Complex (SGC) ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ พบว่า แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดคือ แบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 การจัดจำแนกแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA กับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 คือ *Bacillus altitudinis* และเป็นแบคทีเรียทนเกลือ สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว SGC ที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียในอาหารเหลว SGC ในถังหมักขนาด 5.0 ลิตร พบว่า แบคทีเรียดังกล่าวมีการผลิตเอนไซม์ควบคู่ไปกับการเจริญและผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเท่ากับ 1.18 หน่วย/มล. เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 40 ชั่วโมง สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรสคือ ที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความเสถียรในช่วงพีเอชระหว่าง 4.0-9.0 และในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 40-50 องศาเซลเซียส เอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรสนี้มีสมบัติเป็นเอนไซม์ที่ชอบเกลือ โดยสามารถทำงานได้ดีที่สุดในสภาพที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1.0 โมลาร์ การผลิต

สารประกอบกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟตจากกรดไรโบนิวคลีอิกโดยใช้เอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรส พบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับผลิตสารประกอบกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต เท่ากับ 0.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ทำการย่อยเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะสามารถผลิตสารประกอบกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟตได้ผลผลิตเท่ากับ 0.82 กรัมต่อกรัมกรดไรโบนิวคลีอิก

การผลิตสารเพิ่มรสชาติในอาหารกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟตสามารถใช้กระบวนการทางเอนไซม์ในการย่อยสลายกรดไรโบนิวคลีอิก สารเพิ่มรสชาติที่ผลิตได้จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับผู้บริโภคในการเลือกใช้เป็นสารปรุงแต่งรสชาติในอาหาร นอกจากนั้นข้อมูลที่ได้จากการวิจัยจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนากระบวนการผลิตสารประกอบกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

คำสำคัญ : กัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรส แบคทีเรียทนเกลือ *Bacillus altitudinis* เอนไซม์ชอบเกลือ

Thesis Title	Production of Flavour Enhancing Guanosine 5′-monophosphate in Food by Enzymatic Process
Name-Surname	Miss Watcharewan Boonsongsri
Program	Applied Biology
Thesis Advisor	Mr. Anan Boonpan, Ph.D.
Academic Year	2013

ABSTRACT

This research was aimed to study the production of flavour enhancing guanosine 5′-monophosphate (5′-GMP) in food by 5′-phosphodiesterase (5′-PDE) which was produced by bacteria isolated from raw fish sauce. Isolation and screening of 5′-PDE producing bacteria, identification of selected bacteria, optimization of the conditions for maximum enzyme production and enzyme activity, and application of enzyme in 5′-GMP production were examined.

Fourteen pure bacterial cultures isolated from raw fish sauce were screened for 5′-PDE producing ability on DNase test agar-methyl green medium and Sehgal and Gibbons Complex (SGC) liquid medium containing 0–3.0 M NaCl. The results showed that isolate RMUT 001 could produce the highest 5′-PDE activity. The selected isolate was further identified on the morphological and biochemical basis, and compared its 16S rDNA gene to other bacterias. It was found that isolate RMUT 001 belonged to *Bacillus altitudinis* and was classified as halotolerant bacteria. The halotolerant *Bacillus altitudinis* RMUT 001 could produce the highest 5′- PDE activity at pH 7.0 and 37 °C in SGC liquid medium without NaCl. Growth and production of 5′-PDE from *Bacillus altitudinis* RMUT 001 in 5.0 L fermenter using SGC liquid medium was also investigated. A typical pattern of 5′-PDE production showed that enzyme production was coupled to cell multiplication and the maximum 5′-PDE production of 1.18 unit/ml during the 40-hour culture. The optimum pH and temperature for the activity of 5′-PDE were 6.0 and 40 °C, respectively. The enzyme was stable in the pH range between 4.0-9.0 and at temperature between 40-50 °C. This 5′-PDE had marked halophilic enzyme property, showing maximal activity in the

presence of 1.0 M NaCl. Application of 5′-PDE in 5′-GMP production from ribonucleic acid (RNA) showed that the optimum 5′-PDE concentration for hydrolysis of RNA was 0.3% by weight. The 3-hour hydrolysis reaction gave the highest 5′-GMP yield of 0.82 g/g RNA.

In the production of food flavour enhancing 5′-GMP, enzymatic process for hydrolysis of RNA could be used. Flavour enhancing 5′-GMP is an alternative product for customer as a flavoring agent in foods. In addition, information from this research will be useful for industrial development of 5′-GMP production.

Keywords : guanosine 5′- monophosphate, 5′- phosphodiesterase, halotolerant bacteria, *Bacillus altitudinis*, halophilic enzyme

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.อนันต์ บุญปาน กรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำต่างๆ ตลอดระยะเวลาที่ทำวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณ ดร.ดลนภา แก้วภา ประธานกรรมการ ดร.จันทิมา ฑีฆะ กรรมการ และ ดร.โศรดา วัลภา ผู้ทรงคุณวุฒิทางวิชาการ ที่กรุณาให้คำแนะนำเพิ่มเติม และตรวจสอบ แก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่กรุณาให้คำแนะนำ และคอยเป็นกำลังใจในการทำงานในครั้งนี้ด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณ ดร.อัญชลี ทองกำเหนิด สำหรับการช่วยเหลือในด้านการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ขอขอบคุณ คุณพีระพงษ์ พงษ์ทองหล่อ และเพื่อนๆ นักศึกษาปริญญาโท สาขาชีววิทยาประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี สำหรับกำลังใจ และการช่วยเหลืองานในทุกๆ ด้านเป็นอย่างดีมาตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่เป็นกำลังใจ คอยห่วงใย และให้การสนับสนุนในทุกๆ เรื่อง ตลอดการศึกษา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมาจากการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

วัชรีวรรณ บุญส่งศรี

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย……..(3)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ……(5)
กิตติกรรมประกาศ……..(7)
สารบัญ……(8)
สารบัญตาราง……....(10)
สารบัญรูป……(12)
บทที่ 1 บทนำ……..14
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา……..14
1.2 วัตถุประสงค์……...15
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……16
2.1 วัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหาร……16
2.2 โมโนโซเดียมกลูตาเมตหรือผงชูรส……16
2.3 กรดนิวคลีอิกและสารประกอบนิวคลีโอไทด์……..21
2.4 กระบวนการผลิตสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์……34
2.5 เอนไซม์ที่มีบทบาทในการทำให้เกิดสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์……37
2.6 บทบาทของจุลินทรีย์ในการผลิตนิวคลีโอไทด์……40
2.7 การจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ตามความต้องการของเกลือ……43
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……49
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย……53
3.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำปลาดิบ……..55
3.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (5′-phosphodiesterase, 5′-PDE) บนอาหารแข็ง……..55
3.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ในอาหารเหลว……..56
3.4 การจำแนกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE……...56
3.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE……57
3.6 การศึกษาการเจริญและผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ในถังหมัก……58
3.7 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ 5′-PDE……59

3.8 การศึกษาการผลิตสารประกอบกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต ……...……60
3.9 วิธีวิเคราะห์……..61
3.10 สถานที่และระยะเวลาในการทำวิจัย……..62
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล……..63
4.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำปลาดิบ……..……..63
4.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE บนอาหารแข็ง……..64
4.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ในอาหารเหลว……..…66
4.4 การจำแนกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE……..…..67
4.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE……..…....74
4.6 การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ในถังหมัก……79
4.7 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ 5′-PDE……80
4.8 การศึกษาการผลิตสารประกอบกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต……..……85
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ……88
5.1 สรุปผลการวิจัย……88
5.2 ข้อเสนอแนะ……...89
บรรณานุกรม……...90
ภาคผนวก……97
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ……..……98
ภาคผนวก ข สารเคมีและวิธีการที่ใช้ในการทดสอบเชื้อ……..……..……...100
ภาคผนวก ค การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์……..……....102
ภาคผนวก ง วิธีวิเคราะห์……..……104
ภาคผนวก จ ผลการทดลอง……..……112
ภาคผนวก ฉ การวิเคราะห์ทางสถิติ……..……126
ประวัติผู้เขียน……128

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 มาตรฐานของสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP……..29

ตารางที่ 2 มาตรฐานของสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-IMP……...30

ตารางที่ 3 การเกิดปฏิกิริยาเสริมรสชาติร่วมกัน(specific synergistic action) ที่อัตราส่วนต่างๆ ระหว่าง MSG และ 5′-GMP หรือ 5′-IMP……..……..31

ตารางที่ 4 ค่าwater activity (a_w) ต่ำที่สุดที่เชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถเจริญเติบโตได้…….....47

ตารางที่ 5 จำนวนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำปลาดิบที่มีอายุการหมัก 6 เดือน……...64

ตารางที่ 6 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE บนอาหาร DNase test agar-methyl green ที่เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์……..……65

ตารางที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001…….……..68

ตารางที่ 8 ลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001…….……..69

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (% similarity) ของลำดับเบส 16S rDNA ระหว่างแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001กับแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp……73

ตารางที่ 10 ปริมาณสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลาย RNA ด้วยเอนไซม์ 5′-PDE ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ……87

ตารางที่ 11 การเตรียมสารละลายมาตรฐานโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ…….……...……108

ตารางที่ 12 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรียที่แยกจากน้ำปลาบนอาหารแข็งที่เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์…….. 113

ตารางที่ 13 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ของแบคทีเรียในอาหารเหลว SGC ที่เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ …..…...……...……..114

ตารางที่ 14 ผลของความเข้มข้นเกลือ NaCl ต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001……..…….115

ตารางที่ 15 ผลของความเข้มข้นเกลือ NaCl ต่อการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ของแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001……...……116

ตารางที่ 16 ผลของพีเอชต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001…….……117

ตารางที่ 17 ผลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ของแบคทีเรีย
Bacillus altitudinis RMUT 001……..……118
ตารางที่ 18 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001……119
ตารางที่ 19 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ของแบคทีเรีย
Bacillus altitudinis RMUT 001……..……120
ตารางที่ 20 การเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ของแบคทีเรีย
Bacillus altitudinis RMUT 001 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร……..……..121
ตารางที่ 21 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย
Bacillus altitudinis RMUT 001……..……122
ตารางที่ 22 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE จาก
แบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001……..……122
ตารางที่ 23 ความเสถียรของเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย
Bacillus altitudinis RMUT 001 ที่พีเอชต่างๆ……..……123
ตารางที่ 24 ความเสถียรของเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย
Bacillus altitudinis RMUT 001 ที่อุณหภูมิต่างๆ……..……123
ตารางที่ 25 ผลของความเข้มข้นเกลือ NaCl ต่อกิจกรรมของเอนไซม์
5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001……..……124
ตารางที่ 26 ปริมาณสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ที่ได้จากการย่อยสลาย
RNA ด้วยเอนไซม์ 5′-PDE ความเข้มข้นต่างๆ……...……125
ตารางที่ 27 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างปริมาณสารประกอบนิวคลีโอไทด์
5′-GMP ที่ได้จากการย่อยสลาย RNA ด้วยเอนไซม์ 5′-PDE
โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test
ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%.....127

สารบัญรูป

รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของกรดกลูตามิก……..17

รูปที่ 2 กระบวนการผลิตโมโนโซเดียมกลูตาเมตจากแป้งมันสำปะหลัง……...20

รูปที่ 3 โครงสร้างของไนโตรเจนเบส……22

รูปที่ 4 โครงสร้างของนิวคลีโอไซด์และนิวคลีโอไทด์……23

รูปที่ 5 โครงสร้างของกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิกและกรดไรโบนิวคลีอิก……..……..24

รูปที่ 6 โครงสร้างของสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP……..28

รูปที่ 7 โครงสร้างของสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-IMP……..28

รูปที่ 8 การเสริมรสชาติร่วมกันของสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ผสม
ระหว่าง 5′-GMP กับ 5′-IMP ต่อรสชาติของ MSG……..32

รูปที่ 9 กระบวนการผลิตสารประกอบ5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์จากRNA
ด้วยกระบวนการทางเอนไซม์……35

รูปที่ 10 ปฏิกิริยาการย่อยสลายกรดไรโบนิวคลีอิกด้วยเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส……39

รูปที่ 11 การตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ด้วยเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรส……...40

รูปที่ 12 วิถีการสร้าง AMP และ GMP……42

รูปที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของตัวถูกละลาย (solute) ชนิดต่างๆ
กับค่า water activity (a_w) ในสารละลายแต่ละชนิด……...46

รูปที่ 14 แสดงกลไกการถ่ายโอนพลังงาน (energy transduction) เปรียบเทียบระหว่าง
เชื้อแบคทีเรียชอบเกลือกับเชื้อแบคทีเรียทนเกลือ……..48

รูปที่ 15 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ของแบคทีเรียไอโซเลท
RMUT 001 บนอาหาร DNase test agar-methyl green……...66

รูปที่ 16 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ในอาหาร
เหลว SGC ที่เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-3 .0 โมลาร์……67

รูปที่ 17 ลำดับเบส 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001……...72

รูปที่ 18 Phylogenetic tree ของแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 ที่ได้จากการเปรียบเทียบ
ลำดับเบสของยีน 16S rDNA……..……73

รูปที่ 19 ผลของความเข้มข้นของเกลือ NaCl ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE
ของแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001……..……76

รูปที่ 20 ผลของพีเอชต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ของแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001……77
รูปที่ 21 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ของแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001……78
รูปที่ 22 การเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ของแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001 ในถังหมักขนาด 5.0 ลิตร……80
รูปที่ 23 ผลของพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001……83
รูปที่ 24 ความเสถียรของเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001 ที่พีเอชและอุณหภูมิต่างๆ……..……..84
รูปที่ 25 ผลของความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001……85
รูปที่ 26 ปริมาณสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลาย RNA ด้วยเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001……..87
รูปที่ 27 กราฟมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)……108
รูปที่ 28 โครมาโทแกรมของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP มาตรฐานและสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ที่ได้จากการย่อยสลาย RNA ด้วยเอนไซม์ 5′-PDE ……..……111
รูปที่ 29 กราฟมาตรฐานสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP……111

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ (5′-ribonucleotides) เป็นวัตถุปรุงแต่งรสอาหาร (flavour enhancer) ที่จะทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารรสชาติดีขึ้นเรียกรสชาตินี้ว่า “อูมามิ” (umami taste) สารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวคือ กัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต (guanosine 5′-monophosphate, 5′-GMP) และ อิโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต (inosine 5′-monophosphate, 5′-IMP) [1] สารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ใช้ปรุงแต่งกลิ่นรสของอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เช่น ซุปสำเร็จรูป บะหมี่กึ่งสำเร็จรูป น้ำปลา ผลิตภัณฑ์เนื้อ และอาหารเหลวต่างๆ เป็นต้น การใช้สารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ในการปรุงแต่งรสอาหารไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียงกับผู้บริโภคเหมือนการใช้ผงชูรส (monosodium glutamate; MSG) ซึ่งการบริโภคผงชูรสในปริมาณที่มากเกินไป อาจทำให้ผู้บริโภคบางรายเกิดความผิดปกติ เช่น มีอาการชาและร้อนวูบวาบที่ปาก ลิ้น ต้นคอ ใบหน้า โหนกแก้ม หน้าอก มีผื่นแดงตามตัว แน่นหน้าอก หายใจไม่สะดวก และอาจส่งผลต่อสมองในส่วนที่ควบคุมการเจริญเติบโตและระบบประสาทตา [2] ดังนั้นในปัจจุบันจึงได้มีการใช้สารปรุงแต่งรสชาติในอาหารประเภท 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ เช่น 5′-GMP และ 5′-IMP ที่ทำให้เกิดรสชาติอูมามิในอาหารเช่นเดียวกับผงชูรส แต่ไม่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค [3]

ในปัจจุบันการผลิต 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์สามารถจะทำได้หลายวิธีได้แก่ การสกัดจากเนื้อสัตว์โดยตรง การหมักเพื่อผลิตนิวคลีโอไซด์จากนั้นใช้กระบวนการฟอสโฟรีเรชั่นเพื่อเปลี่ยนนิวคลีโอไซด์ให้เป็น 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ การสังเคราะห์ด้วยกระบวนการทางเคมี และการย่อยสลายกรดไรโบนิวคลีอิกให้กลายเป็นสารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ด้วยเอนไซม์ [3] กระบวนการผลิตสารประกอบนิวคลีโอไทด์ด้วยกระบวนการทางเอนไซม์สามารถใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่มีแหล่งจากจุลินทรีย์และพืช เช่น ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส (deoxyribonuclease, DNase) และไรโบนิวคลีเอส (ribonuclease, RNase) ซึ่งจะย่อยสลายกรดนิวคลีอิกและกรดไรโบนิวคลีอิกได้เป็นสารประกอบนิวคลีโอไทด์และไรโบนิวคลีโอไทด์ทั้งชนิด 2′-, 3′- และ 5′- ส่วนเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายกรดไรโบนิวคลีอิกให้ได้เฉพาะสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ชนิด 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ คือ เอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (5′-phosphodiesterase, 5′-PDE) เนื่องจากสารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์เท่านั้นที่จะทำให้เกิดรสชาติอูมามิในผลิตภัณฑ์อาหาร

ดังนั้นเอนไซม์ 5′-PDE จึงมีความน่าสนใจในการนำไปใช้ผลิตสารเพิ่มรสชาติในอาหาร [3, 4, 5] ปัจจุบันข้อมูลเกี่ยวกับการใช้เอนไซม์ 5′-PDE จากจุลินทรีย์ยังมีน้อย ดังนั้นการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE จากแหล่งต่างๆ จึงมีความน่าสนใจ โดยเฉพาะการคัดเลือกแบคทีเรียจากน้ำปลาดิบ เนื่องจากแบคทีเรียที่มีบทบาทในน้ำปลาจะผลิตเอนไซม์ เพื่อใช้ในการย่อยสลายกรดนิวคลีอิกและกรดไรโบนิวคลีอิกที่มีอยู่ในตัวปลาให้ได้เป็นสารประกอบ นิวคลีโอไทด์และไรโบนิวคลีโอไทด์ โดยแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จะสามารถนำไปผลิตเอนไซม์ 5′-PDE สำหรับใช้ผลิตสารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ต่อไป ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับผู้บริโภคในการเลือกใช้เป็นสารปรุงแต่งรสชาติในอาหารนอกเหนือจากการใช้ผงชูรส และข้อมูลที่ได้จากการวิจัยน่าจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนากระบวนการผลิต 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ในระดับอุตสาหกรรมของประเทศต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อคัดเลือกและจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำปลาดิบซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรส

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรสของแบคทีเรียและศึกษาสมบัติของเอนไซม์ดังกล่าว

1.2.3 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้เอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรสสำหรับการผลิตสารเพิ่มรสชาติในอาหารกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต

บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

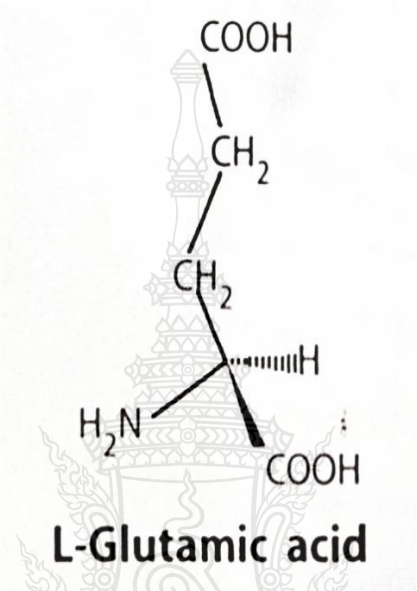
2.1 วัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหาร

วัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหารคือ สารที่ถูกเติมลงในอาหารโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อช่วยปรุงแต่งรสชาติในอาหาร ทำให้อาหารมีรสชาติดีขึ้น โดยสารเพิ่มรสชาติในอาหารจะใช้เพียงปริมาณเล็กน้อยก็สามารถปรุงแต่งและสร้างรสชาติในอาหารให้มากขึ้นในขณะรับประทานและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค วัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหารที่มีการใช้ทั่วไปได้แก่ โมโนโซเดียมกลูตาเมต (monosodium glutamate, MSG) หรือผงชูรส สารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ ประเภทกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต (guanosine 5′-monophosphate, 5′-GMP) และอิโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต (inosine 5′- monophosphate, 5′-IMP) [6]

2.2 โมโนโซเดียมกลูตาเมตหรือผงชูรส

โมโนโซเดียมกลูตาเมตหรือผงชูรสเป็นวัตถุเจือปนในอาหาร (food additive) ที่มีการใช้เพื่อเพิ่มรสชาติในอาหารกันอย่างแพร่หลาย โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นวัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหารที่ทำให้เกิดรสชาติเฉพาะตัวในอาหาร โดยเฉพาะอาหารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบซึ่งเรียกรสชาตินี้ว่ารสอูมามิ (umami) ซึ่งเป็นรสที่คล้ายรสของเนื้อและได้ถูกจัดให้เป็นรสชาติที่ 5 ที่มีเอกลักษณ์แตกต่างจากรสชาติพื้นฐาน 4 รส คือ รสหวาน รสเค็ม รสเปรี้ยว และรสขม โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นสารประกอบประเภทกลูตาเมต (glutamate) ซึ่งเป็นเกลือของกรดกลูตามิก (glutamic acid) กลูตาเมตหรือกรดกลูตามิกถูกจัดเป็นกรดอะมิโนไม่จำเป็น (non-essential amino acid) กลูตาเมตในธรรมชาติพบได้ 2 ลักษณะคือ กลูตาเมตที่รวมอยู่กับกรดอะมิโนอื่นๆ ในรูปของโปรตีน (bound glutamate) และกลูตาเมตอิสระ (free glutamate) ซึ่งไม่ได้เกาะอยู่กับสารใดๆ กลูตาเมตที่อยู่ในรูปของโปรตีนจะไม่มีกลิ่นรสและไม่มีคุณสมบัติทำให้เกิดรสชาติในอาหาร แต่เมื่อโมโนโซเดียมกลูตาเมตละลายน้ำจะแตกตัวได้กลูตาเมตอิสระและโซเดียมกลูตาเมตอิสระนี้เท่านั้นที่มีผลต่อการเพิ่มรสชาติในอาหาร [7]

โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นสารประกอบที่มีโซเดียม 1 อะตอมรวมกับกรดอะมิโน 1 โมเลกุล คือ กลูตาเมต หรือกรดกลูตามิก มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 188 เป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งที่มีหมู่อะมิโน (NH_2) 1 ตำแหน่ง และหมู่คาร์บอกซีลิก (COOH) 2 ตำแหน่ง [8] โครงสร้างทางเคมีของกรดกลูตามิกแสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของกรดกลูตามิก
ที่มา : Vickery and Schmidt (1931)

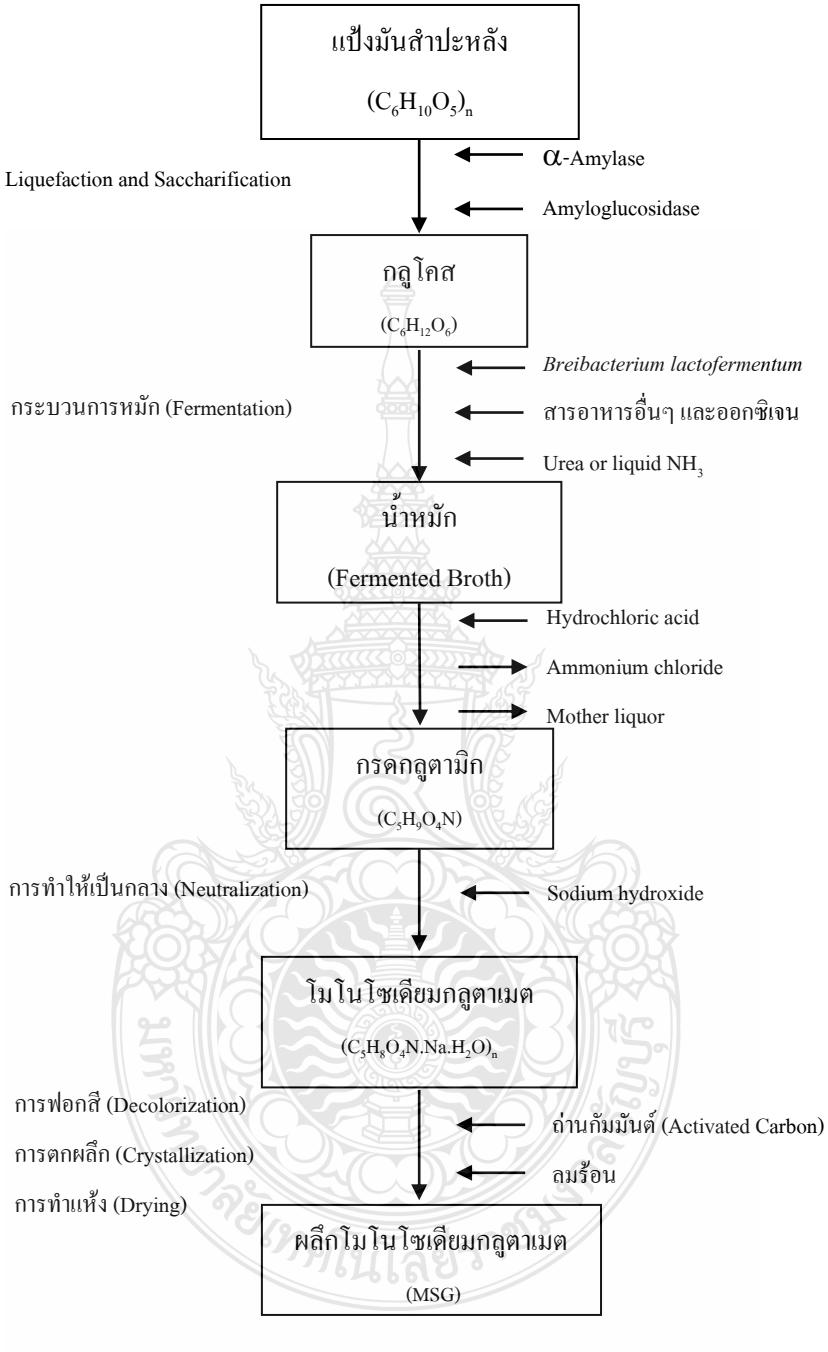
การผลิตกรดกลูตามิกสามารถใช้กระบวนการทางชีวภาพโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิต เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดกลูตามิกได้นั้นมีอยู่ทั่วไปในธรรมชาติ ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ และต้องใช้ไบโอติน (biotin) เพื่อการเจริญเติบโต สำหรับการผลิตกรดกลูตามิกในระดับอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ใช้แบคทีเรียที่แยกได้จากดินจีนัส *Brevibacterium* sp. และ *Corynebacterium* sp. [9] การใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตกรดกลูตามิกนั้น มีหลักการทั่วไปเช่นเดียวกับการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตสารชีวภาพอื่นๆ คือนำจุลินทรีย์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตสารชีวภาพ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน เกลือแร่และวิตามินต่างๆ แหล่งคาร์บอนที่ถูกใช้เป็นองค์ประกอบในสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตกรดกลูตามิกในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่ แป้ง กากน้ำตาล น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลทราย แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ เกลือแอมโมเนียม

ยูเรีย เกลือไนเตรต น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) กากถั่วเหลือง (soybean meal) แร่ธาตุ ได้แก่ แมกนีเซียมและโพแทสเซียม และวิตามิน ได้แก่ ไบโอติน [10]

การใช้จุลินทรีย์ในการผลิตกรดกลูตามิกในระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องควบคุมสูตรอาหารและปัจจัยต่างๆ ให้เหมาะสม เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดกลูตามิกได้ปริมาณมาก ขณะเดียวกันก็ต้องควบคุมปัจจัยสำคัญที่ทำให้จุลินทรีย์สามารถขับกรดกลูตามิกออกนอกเซลล์ด้วย เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดปรากฏการณ์การย้อนกลับไปยับยั้ง(feedback inhibition) [10] การผลิตกรดกลูตามิกของเชื้อจุลินทรีย์ ไบโอตินเป็นวิตามินที่สำคัญในการสร้างกรดโอเลอิก (oleic acid) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ การที่เชื้อจุลินทรีย์มีเยื่อหุ้มเซลล์ที่แข็งแรงจะส่งผลให้กรดกลูตามิกที่สร้างขึ้นมาถูกขับออกนอกเซลล์ได้ยากและเกิดการสะสมอยู่ภายในเซลล์ นอกจากนั้นจะเกิดการย้อนกลับไปยับยั้งการสร้างกรดกลูตามิกเพื่อไม่ให้กรดกลูตามิกภายในเซลล์มีปริมาณสูงเกินไป เชื้อแบคทีเรียจีนัส *Brevibacterium* sp. และ *Corynebacterium* sp. เป็นแบคทีเรียที่ต้องการไบโอตินในการเจริญเติบโต ซึ่งในสภาวะที่มีไบโอตินมากเพียงพอ แบคทีเรียเหล่านี้จะไม่ขับกรดกลูตามิกออกนอกเซลล์ [11] ดังนั้นจึงต้องใช้ปริมาณไบโอตินที่เหมาะสมในการผลิตกรดกลูตามิก ซึ่งพบว่าปริมาณไบโอตินที่เหมาะสมคือ 0.5 ไมโครกรัม/กรัมของน้ำหนักเซลล์แห้ง การลดปริมาณไบโอตินในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้จุลินทรีย์สร้างกรดโอเลอิกซึ่งเป็นองค์ประกอบของฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ในเยื่อหุ้มเซลล์ได้น้อยลง เยื่อหุ้มเซลล์จึงหลวมและมีช่องว่างสำหรับให้กรดกลูตามิกถูกขับออกมานอกเซลล์ได้มากขึ้น [10]

ในการผลิตกรดกลูตามิกระดับอุตสาหกรรมนั้น แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อมักเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์หรือกรด และกากน้ำตาลซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีราคาค่อนข้างถูก ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ เกลือแอมโมเนียม ยูเรีย และก๊าซแอมโมเนีย เป็นต้น ปัจจุบันกระบวนการผลิตโมโนโซเดียมกลูตาเมตมีการพัฒนาไปอย่างมาก มีการหาแหล่งวัตถุดิบธรรมชาติ เช่น แป้งมันสำปะหลังมาเป็นวัตถุดิบในการผลิต โดยนำไปผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อผลิตเป็นน้ำตาลสำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย กระบวนการผลิตโมโนโซเดียมกลูตาเมตโดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบแสดงดังรูปที่ 2 แป้งมันสำปะหลังจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะมัยเลส (α-amylase) และอะมัยโลกลูโคซิเดส (amyloglucosidase) ให้เป็นน้ำตาลกลูโคสเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารประเภทคาร์บอนร่วมกับแหล่งไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียม และสารอาหารประเภทอื่นๆ ให้กับแบคทีเรียใช้ในการผลิตกรดกลูตามิก รวมทั้งมีการจำกัดปริมาณออกซิเจนที่ใช้ในกระบวนการหมักให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย และการผลิตกรดกลูตามิก เมื่อได้กรดกลูตามิกแล้วจะทำให้

เป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ทำให้ได้โมโนโซเดียมกลูตาเมต ทำการฟอกสีสารละลายโมโนโซเดียมกลูตาเมตด้วยถ่านกัมมันต์ (activated carbon) และทำให้สารละลายเข้มข้นขึ้นจนสามารถตกผลึกเป็นโมโนโซเดียมกลูตาเมตบริสุทธิ์ได้ จากนั้นอบผลึกโมโนโซเดียมกลูตาเมตให้แห้งด้วยลมร้อนและบรรจุเป็นขนาดต่างๆ ตามความต้องการของลูกค้าเพื่อจำหน่ายต่อไป [10]



รูปที่ 2 กระบวนการผลิตโมโนโซเดียมกลูตาเมตจากแป้งมันสำปะหลัง
ที่มา : สุวิมล (2550)

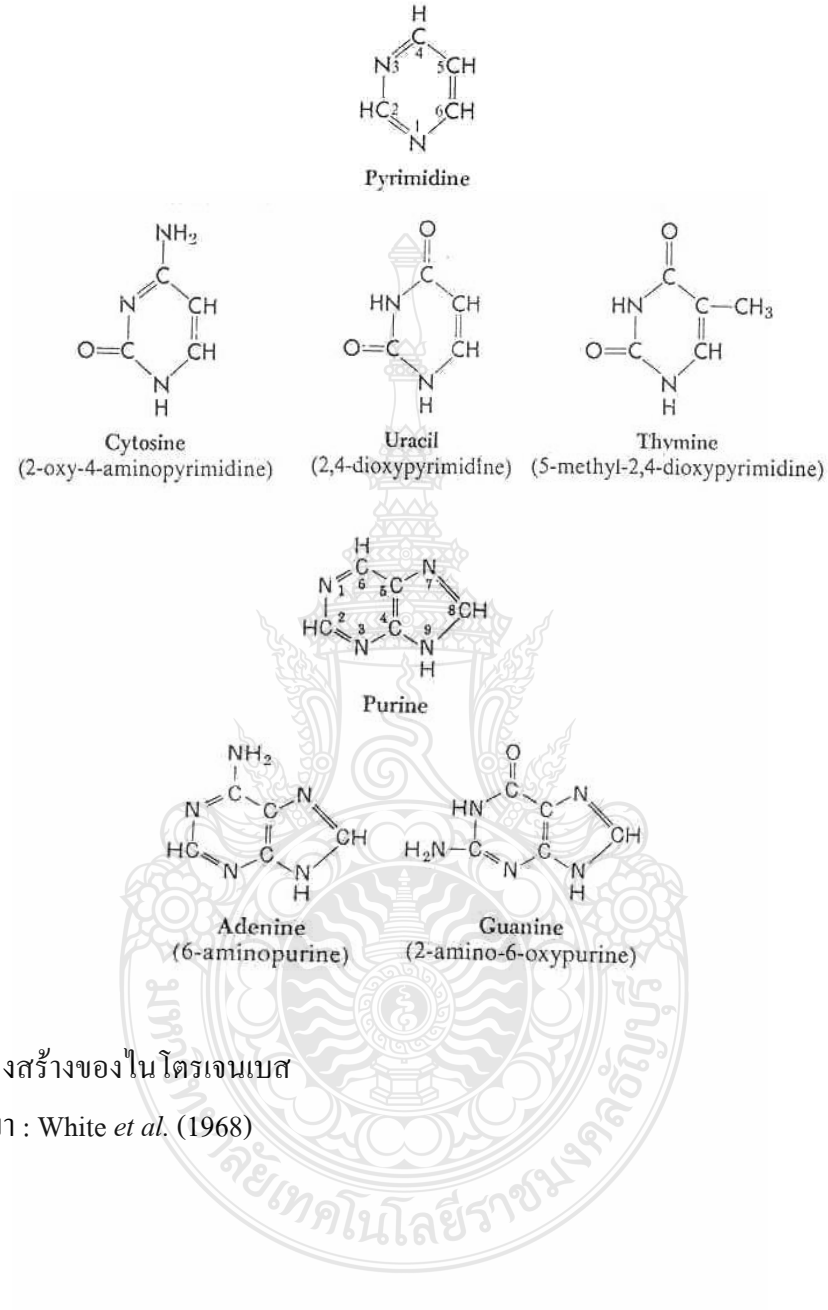
2.3 กรดนิวคลีอิกและสารประกอบนิวคลีโอไทด์

กรดนิวคลีอิกมี 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid, DNA) และกรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid, RNA) ซึ่งกรดนิวคลีอิกทั้งสองชนิดนี้จะมีส่วนประกอบ 3 ส่วนด้วยกันคือ ส่วนที่เป็นไนโตรเจนเบส (nitrogenous base) ได้แก่ เฮเทอโรไซคลิคเอมีน (heterocyclic amine) พวกเพียวรีน (purine) และไพริมิดีน (pyrimidine) ดังรูปที่ 3 ส่วนที่เป็นน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 ตัว ได้แก่ น้ำตาลไรโบส (ribose) และ 2-ดีออกซีไรโบส (2-deoxyribose) และส่วนที่เป็นกรดฟอสฟอริก ถ้าย่อยสลายกรดนิวคลีอิก อย่างสมบูรณ์แล้วจะได้ส่วนประกอบทั้งสามส่วนแยกออกจากกันเป็นอิสระทั้งหมด [12]

สารประกอบนิวคลีโอไซด์ (nucleoside) ประกอบด้วยเบสเพียวรีนหรือไพริมิดีนรวมตัวกับโมเลกุลของน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 ตัว โดยอาจเป็นน้ำตาลไรโบส หรือ 2-ดีออกซีไรโบส ไม่มีหมู่ฟอสเฟต ส่วนสารประกอบนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) จะประกอบด้วย 3 ส่วนคือ น้ำตาลไรโบส หรือ 2-ดีออกซีไรโบส ไนโตรเจนเบส และกรดฟอสฟอริกดังรูปที่ 4 [12]

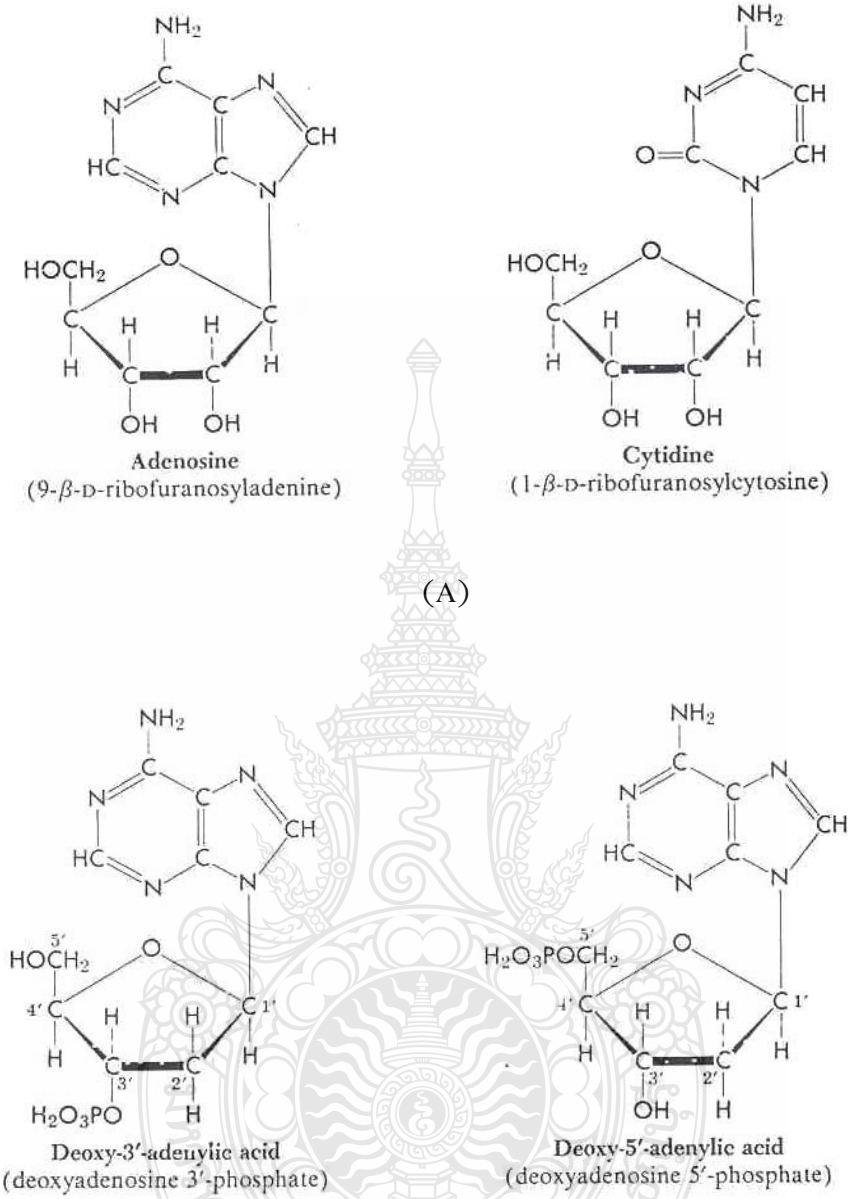
กรดนิวคลีอิคคือโพลิเมอร์ของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกเกิดโดยการที่สารประกอบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟตมาต่อกันเป็นโพลิเมอร์ โดยมีการปล่อยหมู่ไพโรฟอสเฟตออกไป กระบวนการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิกนี้ต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ด้วย ในขณะที่สารประกอบนิวคลีโอไซด์ไตรฟอสเฟตมาต่อกันเพื่อให้เกิดเป็นกรดนิวคลีอิกขึ้นนั้นจะมีการสร้างพันธะระหว่าง 3′-ไฮดรอกซิลกับ 5′-ฟอสเฟตของอีกโมเลกุลหนึ่งที่อยู่ถัดไป การต่อกันเช่นนี้ทำให้โครงนอกของโมเลกุลกรดนิวคลีอิกเป็นน้ำตาล-ฟอสเฟต โดยที่ทั้งสองส่วนนี้เชื่อมกันอยู่โดยใช้พันธะ 3′, 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอร์ (3′, 5′-phosphodiester bond) [12] โครงสร้างของสายโพลีไรโบนิวคลีโอไทด์ที่พบในกรดนิวคลีอิกพวก RNA และสายของโพลีดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ที่พบในกรดนิวคลีอิกพวก DNA แสดงได้ดังรูปที่ 5 [13]

DNA เป็นกรดนิวคลีอิกที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ส่วนมากพบในนิวเคลียสของเซลล์ สำหรับส่วนน้อยจะพบในคลอโรพลาสต์และไมโตคอนเดรีย DNA จะพบในสิ่งมีชีวิตเกือบทุกชนิด DNA เป็นกรดนิวคลีอิกที่มีสายโพลีนิวคลีโอไทด์สองสายพันกันอยู่โดยที่สายทั้งสองจะยึดเหนี่ยวกันอยู่ได้โดยใช้พันธะไฮโดรเจนซึ่งเกิดระหว่างคู่เบสที่จำเพาะเจาะจงคือ อะดีนีน (adenine) จะทำพันธะกับไทมีน (thymine) โดยใช้พันธะไฮโดรเจน 2 พันธะ และกัวนีน (guanine) จะทำพันธะกับไซโตซีน (cytosine) โดยใช้พันธะไฮโดรเจน 3 พันธะ



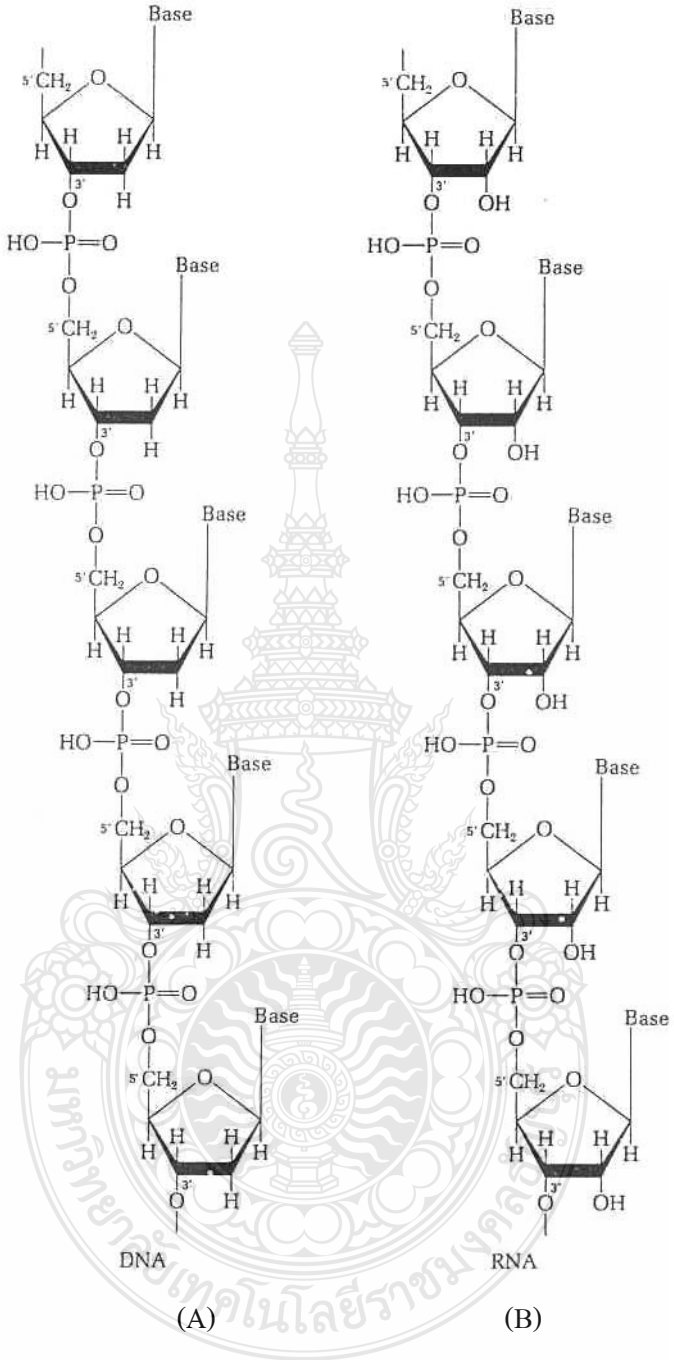
รูปที่ 3 โครงสร้างของไนโตรเจนเบส

ที่มา : White *et al.* (1968)



รูปที่ 4 โครงสร้างของนิวคลีโอไซด์ (A) และนิวคลีโอไทด์ (B)

ที่มา : White *et al.* (1968)



รูปที่ 5 โครงสร้างของกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (A) และกรดไรโบนิวคลีอิก (B)

ที่มา : Lehninger (1970)

RNA เป็นกรดนิวคลีอิกสายเดี่ยว (single strand) ประกอบด้วยสายยาวของไรโบนิวคลีโอไทด์ที่ไม่มีการแตกกิ่งก้าน มีความยาวสั้นกว่าโมเลกุลของ DNA มาก แต่มีปริมาณในเซลล์มากกว่า RNA ทำหน้าที่ถ่ายทอดข้อความทางพันธุกรรมจาก DNA นำมาสร้างโปรตีนและเอนไซม์ต่างๆ ดังนั้นจึงพบ RNA ส่วนใหญ่ในไซโตพลาสซึมโดยเฉพาะที่ไรโบโซมซึ่งเป็นที่สร้างโปรตีน นอกจากนี้ยังพบ RNA ในนิวคลีโอลัสในนิวเคลียสซึ่งเป็นที่สร้าง RNA เกือบทั้งหมด RNA ที่พบในธรรมชาติมี 3 ชนิดใหญ่ ๆ คือ

1) messenger RNA (mRNA) เป็นตัวทำหน้าที่ถ่ายทอดข้อมูลทางพันธุกรรมจากยีนหรือ DNA ออกมายังไซโตพลาสซึมเพื่อแปลข้อมูลเหล่านี้เป็นโปรตีน

2) transfer RNA (tRNA) เป็นตัวขนส่งกรดอะมิโนตามรหัสบน tRNA นั้นซึ่งสัมพันธ์กับรหัสบน mRNA เพื่อนำไปใช้ในการสร้างโปรตีนต่อไป

3) ribosomal RNA (rRNA) เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของไรโบโซมซึ่งมีหน้าที่ในการสร้างโปรตีนโดยการทำงานร่วมกับ mRNA และ tRNA รหัสบางส่วนบน rRNA จะมีความสัมพันธ์กับ mRNA และ tRNA

2.3.1 คุณสมบัติทั่วไปของ DNA [14]

2.3.1.1 เซลล์แต่ละเซลล์ในสิ่งมีชีวิตหนึ่งจะมีจำนวน DNA คงที่

2.3.1.2 ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีจำนวนคงที่ของ DNA ในเซลล์แตกต่างกัน

2.3.1.3 DNAมีโครงสร้างเป็นเกลียวคู่ (double helix structure) คือสายโพลีนิวคลีโอไทด์ 2 สายจะจับคู่และพันเป็นเกลียว

2.3.1.4 ไนโตรเจนเบสที่ประกอบอยู่ในกรดนิวคลีอิกจะทำให้ DNA มีคุณสมบัติในการดูดแสงอัลตราไวโอเลตที่ 260 นาโนเมตรได้ดี

2.3.1.5 DNA ถูกสลายได้โดยเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (phosphodiesterase) หรือนิวคลีเอส (nuclease) ชนิด DNase โดยทำลายพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ (phosphodiester bond) ทำให้สาย DNA สั้นลงหรือสลายจนเหลือเป็นนิวคลีโอไทด์

2.3.1.6 DNA ถูกสลายได้ด้วยกรด โดยทำลายพันธะไกลโคซิดิค (glycosidic bond) ที่เชื่อมระหว่างน้ำตาลไรโบสและไนโตรเจนเบส และถ้าใช้อุณหภูมิสูงร่วมด้วยจะทำลายพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ด้วย แต่ DNA จะไม่ถูกสลายด้วยด่างเนื่องจากคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ของน้ำตาลไรโบสไม่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH)

2.3.1.7 DNA ถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติ (denature) คือการทำให้ไม่เป็นเกลียวคู่ได้โดยความร้อน สภาวะกรดด่างอย่างแรง สารที่ทำลายพันธะไฮโดรเจน เช่น ยูเรีย กัวนิดีนไฮโดรคลอไรด์ (guanidine-hydrochloride) เป็นต้น

2.3.2 คุณสมบัติทั่วไปของ RNA [14]

2.3.2.1 ในแต่ละเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะมีปริมาณ RNA ไม่คงที่

2.3.2.2 RNA สามารถดูดแสงอัลตราไวโอเลตที่ 260 นาโนเมตรได้ดี

2.3.2.3 RNA จะถูกสลายได้โดยเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (phosphodiesterase) หรือนิวคลีเอส (nuclease) ชนิด RNase

2.3.2.4 RNA ถูกสลายได้ด้วยด่าง

2.3.3 การตรวจสอบกรดนิวคลีอิกจะทำโดยอาศัยคุณสมบัติขององค์ประกอบแต่ละส่วนของกรดนิวคลีอิกในการตรวจสอบ [14] ได้แก่

2.3.3.1 Orcinol test ใช้ตรวจสอบ RNA โดยน้ำตาลไรโบสเมื่อต้มกับกรดเข้มข้นจะถูกเปลี่ยนเป็น furfural ซึ่งทำปฏิกิริยากับ orcinol ให้สีเขียว

2.3.3.2 Diphenylamine test ใช้ตรวจสอบ DNA โดยน้ำตาลดีออกซีไรโบสทำปฏิกิริยากับ diphenylamine จะให้สีน้ำเงิน

2.3.3.3 Molybdate test การทดสอบหมู่ฟอสเฟตซึ่งจะให้ผลบวกทั้ง DNA และ RNA

2.3.3.4 การดูดแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร ของไนโตรเจนเบสบนกรดนิวคลีอิก

สารประกอบนิวคลีโอไทด์มีลักษณะเป็นผลึกหรือผงสีขาวหรือไม่ขาว ไม่มีกลิ่น มีรสชาติเฉพาะตัว ละลายได้ในน้ำ สารประกอบนิวคลีโอไทด์แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดตามน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบคือ ไรโบนิวคลีโอไทด์ (ribonucleotide) และดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (deoxyribonucleotide) [15] นิวคลีโอไทด์เป็นเอสเทอร์ชนิดฟอสเฟต (phosphate ester) ของนิวคลีโอไซด์ กล่าวคือ เป็นสารประกอบที่เกิดจากการที่น้ำตาลจับกับเบสด้วยพันธะไกลโคไซด์ และจับอยู่กับหมู่ฟอสเฟตด้วยพันธะเอสเทอร์ (ester bond) ตำแหน่งในโมเลกุลของน้ำตาลไรโบสและดีออกซีไรโบสสามารถเกิดพันธะเอสเทอร์กับกรดฟอสฟอริกได้หลายตำแหน่ง โดยถ้าเป็นน้ำตาลไรโบสจะเกิดได้ที่ตำแหน่ง 2′, 3′ และ 5′ แต่ถ้าเป็นน้ำตาลดีออกซีไรโบสจะเกิดได้เฉพาะที่ตำแหน่ง 3′ และ 5′ เท่านั้น นิวคลีโอไทด์ที่พบในธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นชนิดที่มีหมู่ฟอสเฟตจับอยู่ที่ตำแหน่ง 5′ [16] นิวคลีโอไทด์ชนิด 5′-นิวคลีโอไทด์ ได้แก่ กัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต (guanosine 5′-monophosphate, 5′-GMP) และอิโนซีน

5′-โมโนฟอสเฟต (inosine 5′-monophosphate, 5′-IMP) เป็นสารประกอบที่จัดเป็นวัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหารที่ช่วยเพิ่มรสชาติในอาหารซึ่งมีบทบาทในอุตสาหกรรมอาหารอย่างมากในปัจจุบัน [17]

2.3.4 สารประกอบนิวคลีโอไทด์มีคุณสมบัติดังนี้ [18]

2.3.4.1 สารประกอบนิวคลีโอไทด์เป็นสารเคมีที่คงตัวไม่สลายตัวง่ายในระหว่างการเก็บรักษาตามปกติและขณะปรุงอาหาร

2.3.4.2 เมื่อนำสารประกอบนิวคลีโอไทด์ละลายน้ำแล้วให้ความร้อนถึง 100 องศาเซลเซียส จะไม่เกิดการสลายตัว

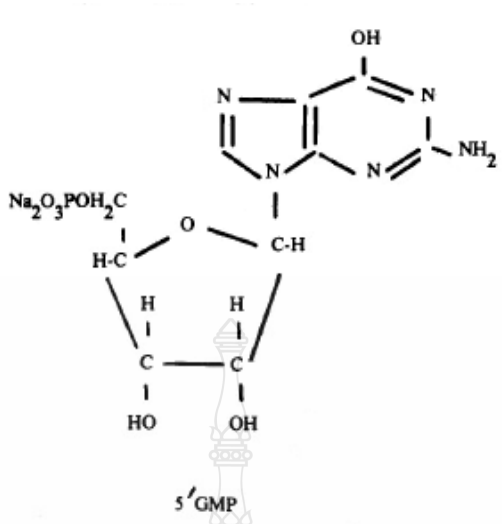
2.3.4.3 ถ้าใช้ความร้อนเกิน 100 องศาเซลเซียส ในเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ สารประกอบนิวคลีโอไทด์จะสลายตัวบ้างเล็กน้อย โดยเฉพาะถ้าพีเอชต่ำกว่า 3 จะสลายตัวมากขึ้น

2.3.4.4 ถ้าสารประกอบนิวคลีโอไทด์ละลายน้ำแล้วให้ความร้อนถึง 120 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จะสลายตัวประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์

2.3.4.5 สารประกอบนิวคลีโอไทด์ถูกทำลายหรือสลายตัวด้วยเอนไซม์ฟอสโฟโมโนเอสเทอเรส (phosphomonoesterase) ซึ่งอาจมีในอาหาร ดังนั้นควรให้ความร้อนประมาณ 75-85 องศาเซลเซียส แก่อาหารเพื่อทำลายเอนไซม์ก่อนเติมสารประกอบนิวคลีโอไทด์

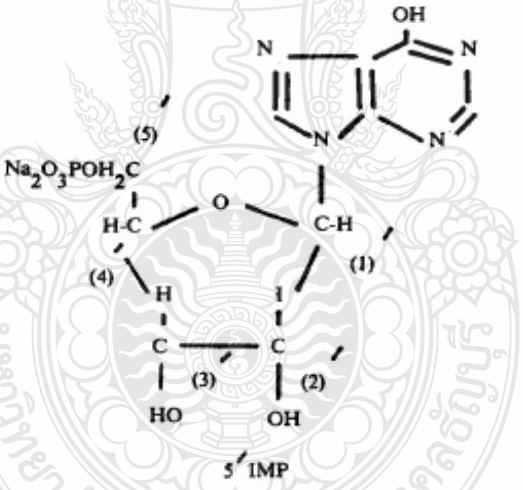
2.3.4.6 สารประกอบนิวคลีโอไทด์ไม่มีกลิ่น มีสีขาว ละลายในน้ำและกรดอะซิติกได้เพียงเล็กน้อยหรือเกือบจะไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvents)

ไรโบนิวคลีโอไทด์ เป็นวัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหาร ที่มีคุณสมบัติเป็นสารให้รสชาติอูมามิในผลิตภัณฑ์อาหาร ได้แก่ 5′-GMP และ 5′-IMP [19] สารประกอบ 5′-GMP เป็นไรโบนิวคลีโอไทด์ที่โครงสร้างประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟต เบสกัวนีน และน้ำตาลไรโบส โดยหมู่ฟอสเฟตจะสร้างพันธะกับคาร์บอนของน้ำตาลไรโบสที่ตำแหน่งที่ 5 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 407.20 สารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-IMP มีโครงสร้างที่คล้ายกับสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP แต่แตกต่างตรงชนิดของเบสที่เป็นองค์ประกอบโดย 5′-IMP จะเป็นเบสอะดีนีนที่ถูกกำจัดหมู่อะมิโน (deamination) และน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 392.19 [20, 21] โครงสร้างของสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP และ 5′-IMP แสดงดังรูปที่ 6 และ 7 ตามลำดับ [22]



รูปที่ 6 โครงสร้างของสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP

ที่มา : Ahluwalia *et al*. (1990)



รูปที่ 7 โครงสร้างของสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-IMP

ที่มา : Ahluwalia *et al*. (1990)

สารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP และ 5′-IMP ได้รับการยอมรับจาก Japanese Food Additives Petitions ให้เป็นวัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหาร และได้กำหนดมาตรฐานของสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ ทั้งสองชนิดนี้ตาม Japanese Official Standardization [23] ดังตารางที่ 1 และ 2

ตารางที่ 1 มาตรฐานของสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP

Guanosine 5′-monophosphate	
Colorless or white crystals that have a specific taste	
Nitrogen (dried) [a*]	16.2-17.2%
Phosphorus (dries) [a*]	7.3-7.9%
Max. U.V. absorption (in 0.01 N HCl)	256±2 mμ
Specific U.V. absorption (in 0.01 N HCl)	270-280 mμ
Ribose (orcinol reaction)	positive
Organic phosphate	positive
Paper chromatography [b*]	U.V. absorbing one spot
Sodium	positive
Solution (0.1 g⟶10ml)	Colorless, little or on turbidity
pH (1 g⟶20 ml)	7.0-8.5
Ammonium	negative
Arsenic	Max. 2 ppm
Heavy metal	Max.20 ppm
Amino acid	negative
Loss on drying [a*]	Max. 8%

a* 120 ^{o}C for 4 hr

b* A mixture of saturated ammonium sulfate, tert-butanol, and 0.025 N ammonia solution (160:3:40) is employed as the solvent.

ที่มา : Kuninaka *et al.* (1964)

ตารางที่ 2 มาตรฐานของสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-IMP

Inosine 5′-monophosphate	
Colorless or white crystals that have a specific taste	
Nitrogen (dried) [a*]	14.0-14.6%
Phosphorus (dries) [a*]	7.6-8.2%
Max. U.V. absorption (in 0.01 N HCl)	250±2 mμ
Ribose (orcinol reaction)	positive
Organic phosphate	positive
Paper chromatography [b*]	U.V. absorbing one spot
Sodium	positive
Solution (0.5 g⟶10ml)	Colorless, little or on turbidity
pH (1 g⟶20 ml)	7.0-8.5
Ammonium	negative
Arsenic	Max. 2 ppm
Heavy metal	Max.20 ppm
Amino acid	negative
Loss on drying [a*]	Max. 26.5%

a* 120 ^{o}C for 4 hr

b* A mixture of saturated ammonium sulfate, tert-butanol, and 0.025 N ammonia solution (160:3:40) is employed as the solvent.

ที่มา : Kuninaka *et al.* (1964)

มีรายงานเกี่ยวกับความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาเสริมรสชาติร่วมกัน (specific synergistic action) ของสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP หรือ 5′-IMP กับโมโนโซเดียมกลูตาเมต (monosodium glutamate, MSG) ปฏิกิริยาเสริมรสชาติร่วมกันของสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP หรือ 5′-IMP กับ MSG จะทำให้ระดับรสชาติอูมามิในผลิตภัณฑ์อาหารสูงขึ้นหรือเด่นชัดขึ้นมากกว่ารสชาติของ 5′-GMP หรือ 5′-IMP หรือ MSG อย่างเดียว [23, 24, 25] นอกจากนั้นอัตราส่วนที่เหมาะสมของ 5′-GMP หรือ 5′-IMP กับ MSG จะทำให้ระดับรสชาติอูมามิในผลิตภัณฑ์อาหารสูง

ที่สุดด้วย (ตารางที่ 3) [3] นอกจากนั้นเมื่อนำสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ผสมระหว่าง 5′-GMP กับ 5′-IMP ในสัดส่วนที่เท่ากันเติมลงในสารประกอบ MSG ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ผสมเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้รสชาติของ MSG เพิ่มขึ้นด้วย (รูปที่ 8) [26]

ตารางที่ 3 การเกิดปฏิกิริยาเสริมรสชาติร่วมกัน (specific synergistic action) ที่อัตราส่วนต่างๆ ระหว่าง MSG และ 5′-GMP หรือ 5′-IMP

Ratio of mixture MSG : 5′-GMP (5′-IMP)	**Relative strength of taste of mixture**
1 : 0	- (1)
1 : 2	13.3 (6.5)
1 : 1	30.0 (7.5)
2 : 1	22.0 (5.5)
10 : 1	19.0 (5.0)
20 : 1	12.4 (3.4)
50 : 1	6.4 (2.5)
100 : 1	5.5 (2.0)

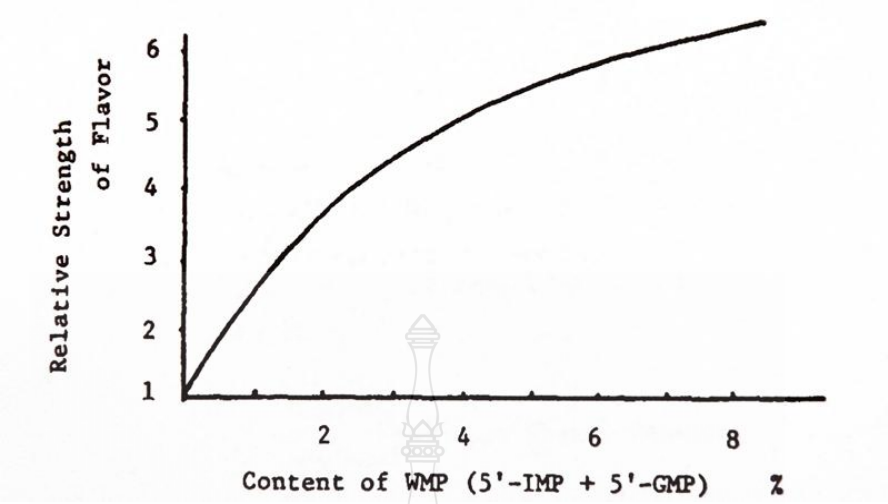
หมายเหตุ MSG = Monosodium glutamate

5′-GMP = Guanosine 5′-monophosphate

5′-IMP = Inosine 5′-monophosphate

ตัวเลขในวงเล็บ = ค่า relative strength of taste of mixture ระหว่าง MSG กับ 5′-IMP

ที่มา : Kuninaka *et al*. (1961)



รูปที่ 8 การเสริมรสชาติร่วมกันของสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ผสมระหว่าง 5′-GMP กับ 5′-IMP ต่อรสชาติของ MSG

หมายเหตุ MSG = Monosodium glutamate

5′-GMP = Guanosine 5′-monophosphate

5′-IMP = Inosine 5′-monophosphate

ที่มา : Noguchi *et al*. (1976)

การที่สารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP 5′-IMP หรือสารผสมของสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ทั้งสองนี้และ MSG มีผลในการเสริมรสชาติต่อกันนั้นจึงเป็นสิ่งที่มีประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ผสมเป็นสารปรุงแต่งรสชาติในอาหารชนิดใหม่ ซึ่งสารผสมของ MSG กับสารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ถูกใช้เป็นวัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหารที่มีประสิทธิภาพสำหรับอาหารทุกชนิด โดยในประเทศญี่ปุ่นมีการใช้สารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP 5′-IMP และสารผสมของสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ทั้งสองนี้สำหรับปรุงแต่งรสชาติของผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิตจากโรงงานอุตสาหกรรม ในขณะที่การปรุงแต่งรสชาติในอาหารตามบ้านเรือนทั่วไปจะใช้ MSG ร่วมกับสารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์เป็นส่วนใหญ่ [20, 27]

การนำสารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์มาใช้ในการปรุงแต่งรสชาติในอาหาร นิยมใช้สารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP และ 5′-IMP โดยเฉพาะ 5′-IMP เป็นสารชนิดหนึ่งที่อยู่ในกลุ่มของสารที่ให้กลิ่นรสของเนื้อสัตว์ การทดสอบกลุ่มผู้บริโภคเพื่อหาค่าความเข้มข้นของ

สารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ที่ปรุงแต่งรสชาติในอาหารให้เป็นที่ยอมรับ ปรากฏว่าการใช้ 5′-IMP และ 5′-GMP จะได้กลิ่นรสที่จัดมาก แม้จะเติมลงในอาหารเพียงปริมาณเล็กน้อย ปริมาณที่น้อยที่สุดของ5′-IMPและ 5′-GMP ซึ่งละลายน้ำแล้วให้กลิ่นรสเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมีค่าประมาณ 0.012 และ 0.0035 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (คิดจากปริมาณที่ไม่มีน้ำผลึก) แต่ถ้าละลายรวมอยู่กับ 1.0 เปอร์เซ็นต์ โมโนโซเดียมกลูตาเมตปริมาณต่ำสุดที่ยอมรับจะลดลงประมาณ 1/120 และ 5′-GMP สามารถปรุงแต่งรสอาหารได้มากกว่า 5′-IMP ถึง 2.1-5.5 เท่า ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารปรุงแต่งรสชาติแต่ละตัวและส่วนประกอบอื่นๆ ในอาหาร [18]

การใช้สารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ปรุงแต่งรสชาติในอาหารยังได้มีการทำเป็นสารผสมระหว่าง 5′-IMP และ 5′-GMP ร่วมกับโมโนโซเดียมกลูตาเมต ในอัตราส่วนโมโนโซเดียมกลูตาเมตและสารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์เท่ากับ 95:5 หรือ 96:4 ใช้เติมลงในผลิตภัณฑ์ซีอิ๊วหรือน้ำปลา และปรุงแต่งรสชาติในอาหารที่ปรุงประจำวันเช่นเดียวกับผงชูรส การผสมกันระหว่างสารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ร่วมกับโมโนโซเดียมกลูตาเมตจะทำให้รสชาติของอาหารดีกว่าการใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตแต่เพียงอย่างเดียว โดยเฉพาะเมื่อใช้กับอาหารประเภทเนื้อสัตว์และซุป ซึ่งจะเป็นการช่วยควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ในด้านกลิ่นรสของอาหารให้มีประสิทธิภาพ กล่าวคือให้รสชาติดีและสม่ำเสมอกันทุกครั้งที่ผลิต [28]

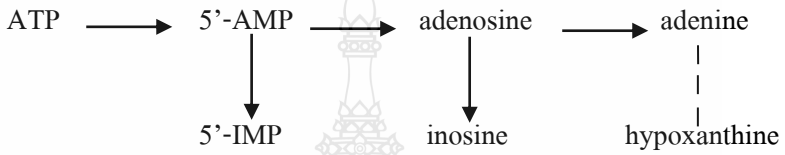
ในประเทศญี่ปุ่นมีการใช้สารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์เป็นวัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหารระดับอุตสาหกรรมเป็นจำนวนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยเฉพาะในรูปของสารประกอบไดโซเดียม 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์สามารถใช้ปรุงแต่งรสอาหารได้หลายชนิด เช่น ซุป อาหารกระป๋อง ไส้กรอก สตู อาหารพวกผัก ก๋วยเตี๋ยว ข้าว ผลิตภัณฑ์ที่ใช้สำหรับปรุงแต่งรสอาหารต่างๆ เช่น น้ำส้มสายชู ซีอิ๊ว และผลิตภัณฑ์เนื้อ เป็นต้น สารประกอบไดโซเดียม 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ซึ่งบริษัททาเคดาให้ชื่อทางการค้าว่า ไรโบไทด์ โดยเป็นส่วนผสมของสารประกอบไดโซเดียม 5′-IMP และ 5′-GMP อย่างละเท่าๆ กันนั้น ใช้เติมในอาหารโดยปกติใช้ประมาณ 0.001-0.1 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นกับชนิดของอาหาร โดยในอาหารกระป๋องประเภทผักใช้ปริมาณต่างๆ กันดังนี้ หน่อไม้ 0.005 เปอร์เซ็นต์ ถั่ว 0.04 เปอร์เซ็นต์ ข้าวโพด 0.01 เปอร์เซ็นต์ เห็ด 0.001 เปอร์เซ็นต์ แครอท 0.025 เปอร์เซ็นต์ และมันฝรั่ง 0.005 เปอร์เซ็นต์ [29]

2.4 กระบวนการผลิตสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์

กระบวนการผลิตสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ โดยเฉพาะ 5′-GMP และ 5′-IMP เพื่อใช้เป็นวัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหารมีหลายวิธี กระบวนการผลิตที่ใช้โดยทั่วไปได้แก่

2.4.1 การสกัดจากเนื้อสัตว์

ในเนื้อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ปลา และสัตว์ทะเลมีสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-IMP ซึ่งอาจเปลี่ยนแปลงมาจาก ATP (adenosine triphosphate) ตามขบวนการทางชีวเคมีดังนี้



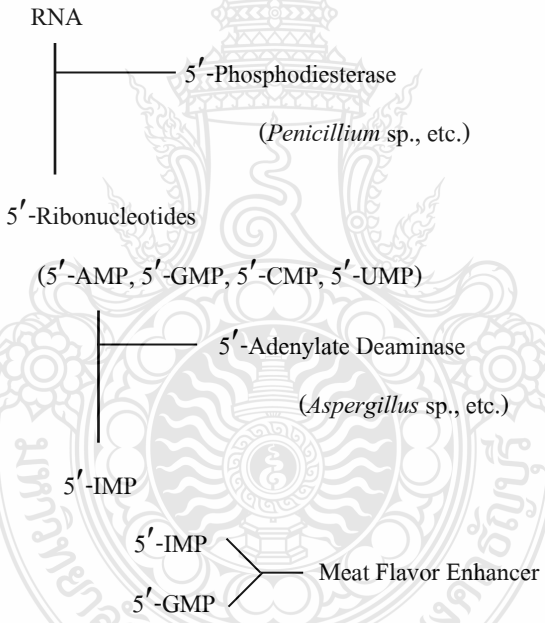
ในประเทศญี่ปุ่นได้ปรับปรุงวิธีการเตรียมสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-IMP จากเนื้อสัตว์ทะเล โดยเฉพาะจากเนื้อปลา โดยการแยกสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-IMP จากเนื้อปลาโดยวิธี electrolytic dialysis ปกติสัตว์ทะเลสดจะมีสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-IMP อยู่จำนวนมากกว่า 5′-AMP (adenosine 5′-monophosphate) และการกำจัดหมู่อะมิโน (amino group) ของ 5′-AMP ที่มีอยู่ในเนื้อปลา โดยใช้เอนไซม์ adenyl- deaminase ก็สามารถทำให้ได้สารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-IMP [3]

การสกัดสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-IMP จากสัตว์ทะเลยังไม่ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ เพราะการใช้ปลาเป็นวัตถุดิบนั้น ราคาค่อนข้างแพง และการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีทำให้คุณภาพของปลาไม่สม่ำเสมอ นอกจากนี้ยังเป็นวิธีการสกัดที่ได้เฉพาะสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-IMP หรือ 5′-AMP เท่านั้น เพราะในปลาทั่วไปมีสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP น้อย การจะสกัด 5′-GMP จากเนื้อปลาจึงไม่คุ้มค่า [20]

2.4.2 การย่อยสลายกรดไรโบนิวคลีอิค (ribonucleic acid, RNA) ด้วยเอนไซม์

เอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย RNA ไปเป็นสารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ ได้แก่ เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส (ribonuclease, RNase) เช่น 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (5′-phosphodiesterase, 5′-PDE) โดยเอนไซม์ 5′-PDE จะย่อยสลาย RNA ได้สารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ชนิด 5′-ซึ่งสารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ชนิด 5′-GMP และ 5′-IMP จัดเป็นวัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหารที่มีคุณสมบัติของรสชาติอูมามิ [26]

การใช้เอนไซม์ 5′-PDE จากจุลินทรีย์และพืชย่อยสลาย RNA จะทำให้ได้สารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ชนิด 5′-AMP, 5′-GMP, 5′-CMP (cytidine 5′--monophosphate) และ 5′-UMP (uridine 5′- monophosphate) และสามารถเตรียม 5′-IMP จาก 5′-AMP ได้ [3] ในประเทศญี่ปุ่นการผลิตสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP และ 5′-IMP ในขั้นตอนแรกจะย่อยสลาย RNA ที่สกัดจากเซลล์ยีสต์ด้วยเอนไซม์ 5′-PDE ที่ผลิตจากเชื้อรา *Penicillium* sp. หรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นทำให้ได้สารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ชนิด 5′-AMP, 5′-GMP, 5′-CMP และ 5′-UMP จากนั้นจะใช้เอนไซม์ 5′-AMP deaminase ที่ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus* sp. หรือจุลินทรีย์ชนิดอื่น สำหรับเปลี่ยน 5′-AMP ให้เป็น 5′-IMP ผลผลิต 5′-GMP และ 5′-IMP ที่ได้จะถูกแยกด้วยกระบวนการแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange) และจะใช้เป็นวัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหารซึ่งมีกลิ่นคล้ายเนื้อ [26] กระบวนการผลิตสารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์จาก RNA ด้วยกระบวนการทางเอนไซม์แสดงดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 กระบวนการผลิตสารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์จาก RNA ด้วยกระบวนการทางเอนไซม์
ที่มา: Noguchi *et al*. (1976)

2.4.3 การย่อยสลาย RNA ระหว่างการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ของยีสต์

การย่อยสลาย RNA ในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ที่สภาวะที่เหมาะสม เอนไซม์ที่อยู่ในตัวเซลล์ยีสต์จะย่อยสลายกรดนิวคลีอิกในตัวเซลล์ได้เป็นสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP และ 5′-IMP ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhao and Fleet [30] โดยนำสารละลายเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* มาบ่มที่อุณหภูมิและพีเอชต่างๆ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายตัวเองเพื่อผลิตสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ พบว่า สารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ที่เกิดขึ้นจะมีทั้งชนิด 2′-, 3′- และ 5′- ไรโบนิวคลีโอไทด์ โดยการย่อยสลาย RNA จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 การย่อยสลายตัวเองของเซลล์ยีสต์ที่อุณหภูมิต่ำกว่าคือ 30 และ40 องศาเซลเซียสพีเอช 5.0 และ6.0 จะทำให้ได้สารประกอบ 3′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ ในขณะที่การย่อยสลายตัวเองของเซลล์ยีสต์ที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 จะทำให้ได้สารประกอบ 2′-และ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ สำหรับสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์ที่ทำให้เกิดสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-AMP และ 5′-GMP คืออุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 4.0 ตามลำดับ

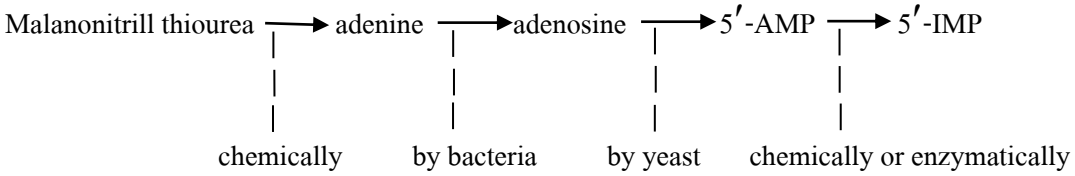
2.4.4 การใช้กระบวนการหมักเพื่อผลิตสารประกอบนิวคลีโอไซด์ (nucleosides) โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ จากนั้นใช้กระบวนการฟอสโฟรีเลชั่น (phosphorylation) สำหรับเปลี่ยนสารประกอบนิวคลีโอไซด์ไปเป็นสารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ [1]

2.4.5 การใช้กระบวนการหมักเพื่อผลิตสารประกอบ5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ [1]

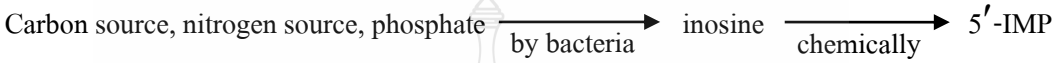
2.4.6 การใช้กระบวนการทางเคมีในการสังเคราะห์สารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ (synthesized chemically) โดยในประเทศญี่ปุ่นได้เตรียมสารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธีทางเคมีจนได้ผลดีและนำไปใช้ประโยชน์ได้เช่น สามารถเตรียมสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-AMP ได้จากกระบวนการ phosphorylated inosine [1]

2.4.7 การใช้วิธีการต่างๆ ประกอบกัน เป็นการผลิตโดยอาศัยวิธีการต่างๆประกอบเข้าด้วยกันอย่างมีประสิทธิภาพและนำไปใช้ได้ผลดี [17] ซึ่งได้มีการปรับปรุงและพัฒนาการวิธีการในประเทศญี่ปุ่นโดยแบ่งเป็น 2 วิธี ตามวิธีการที่แสดงไว้ดังนี้

วิธีที่ 1



วิธีที่ 2



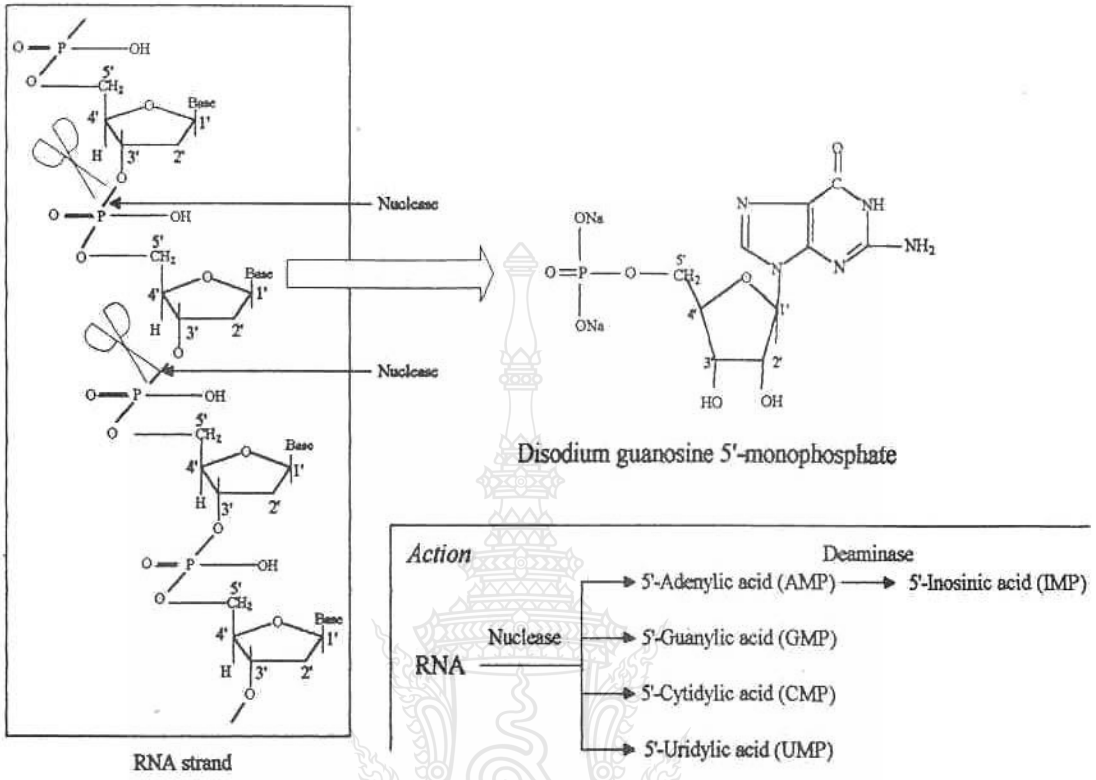
2.5 เอนไซม์ที่มีบทบาทในการทำให้เกิดสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์

เอนไซม์เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นตัวเร่งทางชีวภาพ (biological catalyst) ที่เร่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นได้ให้เกิดเร็วขึ้น เอนไซม์ทำปฏิกิริยาโดยจับกับสับสเตรตเป็นสารเชิงซ้อนของเอนไซม์และสับสเตรต (enzyme-substrate complex) และเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ (product) การทำงานของเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับสเตรตค่อนข้างสูง เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง กล่าวคือเร่งปฏิกิริยาภายใต้ความดันปกติและอุณหภูมิปานกลาง คุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์เหล่านี้เป็นข้อได้เปรียบในการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม [31]

เอนไซม์นิวคลีเอส (nuclease) เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายกรดนิวคลีอิกให้เป็นสารประกอบนิวคลีโอไทด์ (2′-, 3′-, 5′-nucleotides) เอนไซม์นี้จะทำลายพันธะระหว่างน้ำตาลกับฟอสเฟต โดยถ้าเป็นการตัดพันธะที่เชื่อมระหว่าง 3′ ของน้ำตาลกับฟอสเฟตจะเรียกว่าการตัดชนิด p-type และถ้าเป็นการตัดระหว่างพันธะที่เชื่อมระหว่าง 5′ ของน้ำตาลกับฟอสเฟตจะเรียกว่าการตัดชนิด d-type เอนไซม์นิวคลีเอสเมื่อแบ่งตามลักษณะการทำงานจะแบ่งได้ 2 ประเภทคือ เอ็กโซนิวคลีเอส (exonuclease) จะทำลายพันธะจากปลายของกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid; DNA) หรือกรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid; RNA) เข้ามาทีละพันธะ และเอ็นโดนิวคลีเอส (endonuclease) ซึ่งจะทำลายพันธะที่อยู่ภายในสาย DNA หรือ RNA [32]

เอนไซม์นิวคลีเอสมี 2 ชนิดที่สำคัญคือ ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส (deoxyrobonuclease, DNase) และไรโบนิวคลีเอส (ribonuclease, RNase) โดยเอนไซม์ DNase จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย DNA ให้เป็นสารประกอบ 2′-, 3′-, 5′- นิวคลีโอไทด์หลายชนิดเช่น กัวโนซีนโมโนฟอสเฟต (guanosinemonophosphate, GMP) อะดีโนซีนโมโนฟอสเฟต (adenosine monophosphate, AMP) ไซทิดีนโมโนฟอสเฟต (cytidinemonophosphate, CMP) และไทมีนโมโนฟอสเฟต (thyminemonophosphate, TMP) ส่วนเอนไซม์ RNase จะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย RNA ให้เป็น

สารประกอบ 2′-, 3′-, 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ GMP, AMP, CMP และยูริดีนโมโนฟอสเฟต (uridinemonophosphate, UMP) เอนไซม์ RNase ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย RNA แบ่งออกเป็นสามกลุ่ม ได้แก่ เอนไซม์ 3′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (3′-phosphodiesterase, 3′-PDE) ซึ่งจะย่อยสลาย RNA โดยตัดบริเวณพันธะ 3′-ฟอสโฟไดเอสเทอร์ (3′-phosphodiester linkage, C3′-O-P(O2H)-O-C5′) ได้เป็นสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 3′-โมโนฟอสเฟต (ribonucleotide 3′-monophosphate) ได้แก่ เอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (5′-phosphodiesterase, 5′-PDE) ซึ่งจะย่อยสลาย RNA โดยตัดบริเวณพันธะ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอร์ (5′-phosphodiester linkage, C3′-O-P(O2H)-K-C5′) ได้เป็นสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-โมโนฟอสเฟต (ribonucleotide 5′-monophosphate) และเอนไซม์โพลีนิวคลีโอไทด์ ฟอสโฟรีเลส (polynucleotide phospholyase) [3, 33, 34] 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, 35] ปฏิกิริยาการย่อยสลาย RNA โดยเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจะตัดพันธะที่เชื่อมระหว่าง 3′ ของน้ำตาลกับฟอสเฟตได้สารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP, 5′-AMP, 5′-CMP และ 5′-UMP [36] แสดงดังรูปที่ 10 ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่าสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์โดยเฉพาะ 5′-GMP และอิโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต (inosine 5′-monophosphate, 5′-IMP) ที่ได้จากการเปลี่ยน 5′-AMP ด้วยปฏิกิริยาการกำจัดหมู่อะมิโน (deamination) จะมีรสชาติเฉพาะตัวและจัดเป็นสารเสริมรสชาติ (flavor enhancers, flavor potentiators) ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ โดยจะช่วยทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีรสชาติดีขึ้นเรียกรสชาตินี้ว่าอูมามิ (umami taste) [1, 37]



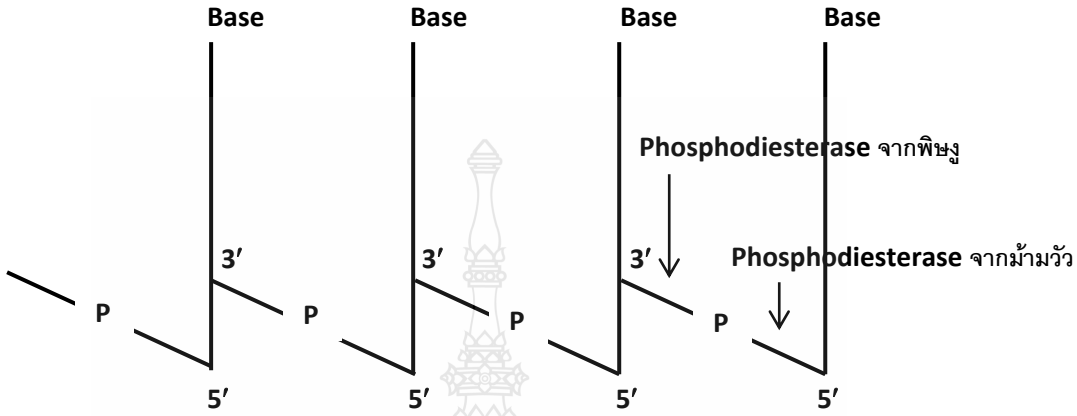
รูปที่ 10 ปฏิกิริยาการย่อยสลายกรดไรโบนิวคลีอิกด้วยเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส

หมายเหตุ Base = Adenine, Guanine, Uracil, Cytosine

ที่มา : Black (1993)

เอนไซม์ 5′-PDE เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มเอนไซม์ RNase มีความสามารถในการย่อยสลาย RNA โดยจะตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ระหว่าง 3′-OH และหมู่ฟอสเฟต ผลที่ได้คือสารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์ (5′-GMP, 5′-AMP, 5′-CMP, 5′-UMP) ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและเภสัชภัณฑ์ [38] การตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ด้วยเอนไซม์ 5′-PDE แสดงดังรูปที่ 11 เอนไซม์ 5′-PDE สามารถผลิตได้จากแหล่งต่างๆ ได้แก่ จุลินทรีย์ พืช และสัตว์ โดยแหล่งของเอนไซม์จากจุลินทรีย์ เช่น *Pennicillium citrinum*, *Streptomyces aureus*, *Micrococcus varians* subsp. *halophilus*, *Halobacterium* sp. และ *Aspergillus niger* เป็นต้น แหล่งจาก

พืช เช่น Catharanthus roseus ถั่วเขียว (mung bean) เมล็ดและรากของข้าวบาเลย์ เป็นต้น แหล่งจากสัตว์ เช่น พิษของงู เนื้อเยื่อจากไต ม้าม และลำไส้ของวัว เป็นต้น [4, 33, 35, 39]



รูปที่ 11 การตัดพันธะฟอสโฟไดเอสเทอร์ด้วยเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรส
ที่มา : Wu and Kwan (2009)

2.6 บทบาทของจุลินทรีย์ในการผลิตนิวคลีโอไทด์

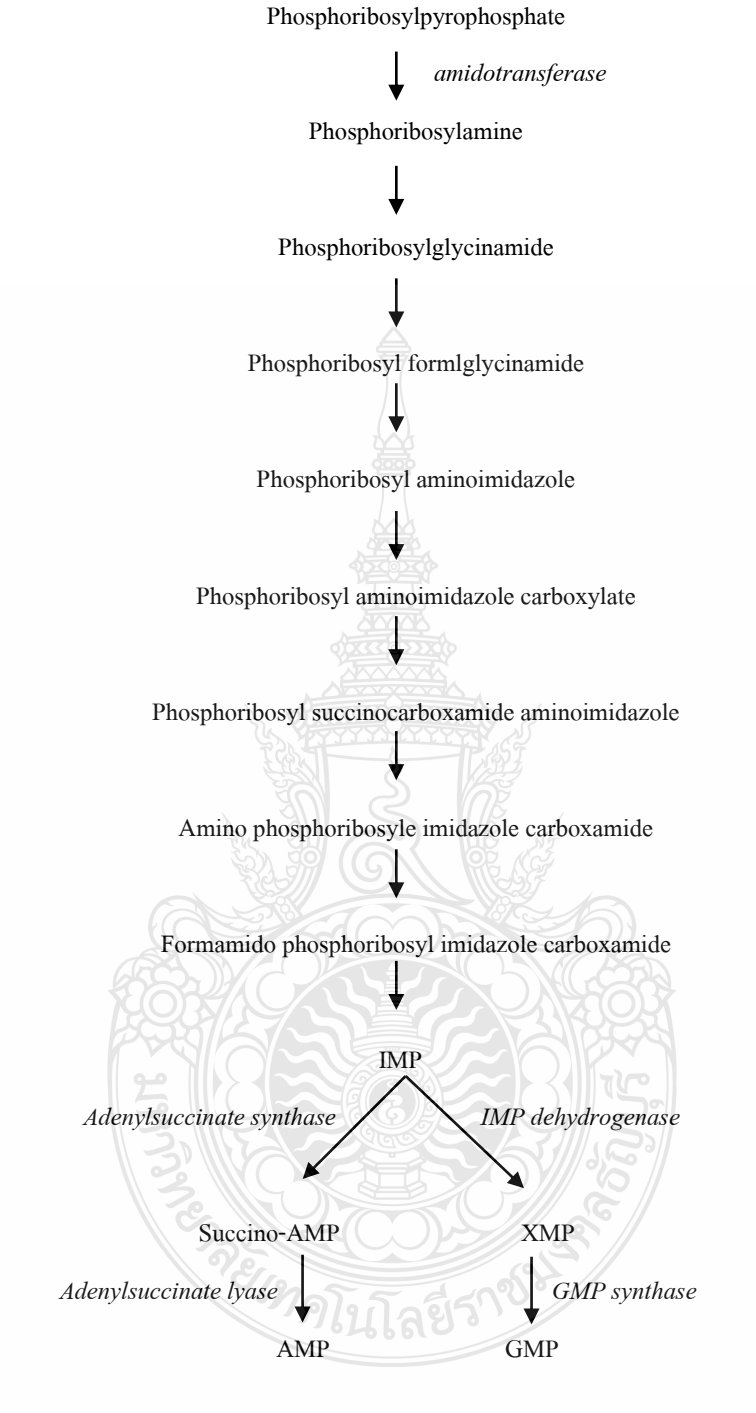
จุลินทรีย์สายพันธุ์ปกติจะมีระบบควบคุมการสร้างสารประกอบนิวคลีโอไทด์โดยวิธี feedback regulation คือ เมื่อมีสารประกอบนิวคลีโอไทด์เพียงพอกับความต้องการแล้ว สารประกอบนิวคลีโอไทด์นั้นจะย้อนกลับไปยับยั้งการสร้าง และ/หรือ การทำงานเอนไซม์ในวิถีการสร้างสารประกอบนิวคลีโอไทด์นั้นๆ เอง [40] ซึ่งหากเป็นสายพันธุ์ผู้ผลิตสารประกอบนิวคลีโอไทด์ในอุตสาหกรรมแล้ว ระบบการควบคุมนี้จะต้องถูกกำจัดออกไปเพื่อให้เชื้อสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตให้สูงขึ้นได้

วิถีการสร้างสารประกอบนิวคลีโอไทด์ในจุลินทรีย์เริ่มต้นจากสารตั้งต้นคือ 5′-phoshoribosyl-pyrophosphate (PRPP) ซึ่ง pyrophosphate จะถูกแทนที่ด้วย NH_2 group ที่ได้รับมาจากกลูตาเมต ขั้นตอนนี้เกิดขึ้นโดยเอนไซม์ PRPP amidotransferase เอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งได้จาก AMP และ GMP ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายของวิถีนี้โดยที่ AMP และ GMP จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์นี้ได้ต่างกัน พบว่าเอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งจาก AMP ได้ง่ายกว่า GMP โดยที่ AMP ในปริมาณ 0.2 mM ก็จะสามารถยับยั้งการทำงานของ PRPP amidotransferase ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าหากต้องการยับยั้งการทำงานโดย GMP ในการทำงานลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ จะต้องใช้ GMP ถึง 2 mM

การควบคุมลักษณะเช่นนี้เรียกว่า Asymmetric control วิถีการสร้างจะดำเนินไปเรื่อยจนกระทั่งได้สารประกอบนิวคลีโอไทด์ตัวแรกคือ IMP ในกรณีที่มี AMP มากเกินต้องการ AMP จะสามารถเปลี่ยนเป็น IMP ได้อีก โดยเอนไซม์ AMP deaminase และเช่นเดียวกัน (รูปที่ 12) หากมี GMP เกินจำเป็น GMP จะถูกเปลี่ยนกลับเป็น IMP ได้โดยเอนไซม์ GMP reductase [40]

สายพันธุ์ที่ใช้เป็นสายพันธุ์ผู้ผลิตนั้น มักเป็นสายพันธุ์ที่ผ่านการปรับปรุงด้านพันธุกรรมแล้ว สายพันธุ์ประเภทหนึ่งที่ใช้กันทั่วไปคือ สายพันธุ์ที่เป็น auxotrophic mutant ซึ่งไม่สามารถสร้างผลผลิตสุดท้าย (end product) ที่จะย้อนกลับมามีผลยับยั้ง แล้วจึงค่อยเติมสารอาหารจำเป็นซึ่งสร้างไม่ได้นั้นให้แก่เชื้อในปริมาณที่มีพอให้เชื้อใช้เจริญเติบโตเท่านั้น ไม่ให้มีเหลือค้างในอาหารจนทำให้เกิดการยับยั้งนั้นๆ ได้ ตัวอย่างเช่น หากต้องการผลิต AMP สายพันธุ์ที่ใช้จะมีคุณสมบัติผิดปกติที่เอนไซม์ IMP dehydrogenase ซึ่งอาจจะผิดปกติที่การสร้างหรือการทำงานของเอนไซม์นี้ ทำให้วิถีการสร้างจะมุ่งมาที่การสร้าง AMP ทางเดียว ขณะเดียวกันสายพันธุ์นี้ก็ควรจะผิดปกติที่เอนไซม์ AMP deaminase ด้วย เพื่อไม่ให้ AMP ถูกเปลี่ยนกลับไปเป็น IMP อีก [40] และเช่นเดียวกัน หากต้องการผลิต GMP ก็จะใช้สายพันธุ์ที่ผิดปกติที่เอนไซม์ adenylsuccinate synthase และ GMP reductase ก็จะเกิดการสะสมของ GMP ตามที่ต้องการ

คุณสมบัติการผ่าเหล่าที่มีประโยชน์อีกข้อหนึ่งคือ purine analogues resistant ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้าง purine ได้สูงมากจนกระทั่ง analogues ที่มีในอาหารไม่สามารถทำอันตรายแก่เชื้อได้ การที่สายพันธุ์ดังกล่าวนี้สามารถสร้าง purine ได้สูงก็เนื่องมาจากการเกิดผิดปกติที่ระบบควบคุมการสร้างเอนไซม์ในวิถีการสร้างสารประกอบนิวคลีโอไทด์ทำให้เชื้อสร้างเอนไซม์ออกมาตลอดเวลา เป็นแบบ constitutitve enzymes ทำให้เชื้อสร้างสารประกอบนิวคลีโอไทด์ได้มาก



รูปที่ 12 วิถีการสร้าง AMP และ GMP

ที่มา : เสาวนีย์ (2547)

2.7 การจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ตามความต้องการของเกลือ

เชื้อแบคทีเรียชอบเกลือ (halophilic, salt loving bacteria) เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการเกลือสำหรับการเจริญเติบโต ถูกจัดอยู่ในอาณาจักร Archaeobacteria ซึ่งเป็นอาณาจักรหนึ่งของระบบการจัดอาณาจักรสิ่งมีชีวิตออกเป็น 3 อาณาจักร ได้แก่ Archaeobacteria Eucaryotes และ Eubacteria [41] ส่วนเชื้อแบคทีเรียทนเกลือ (halotolerant bacteria) เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ต้องการเกลือสำหรับการเจริญเติบโต แต่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีเกลือ ถูกจัดอยู่ในอาณาจักร Eubacteria [41] การจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ตามความต้องการเกลือสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่

2.7.1 จุลินทรีย์พวกไม่ชอบเกลือ (non-halophilic, halophobic, salt-sensitive, inhalotolerant microorganism)

จุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือต่ำกว่า 0.2 โมลาร์ (1.0 เปอร์เซ็นต์) จุลินทรีย์กลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นพวก eubacteria และจุลินทรีย์ที่มักพบตามแหล่งน้ำจืดทั่วไป [42]

2.7.2 จุลินทรีย์พวกทนเกลือ (halotolerant, haloduric microorganism)

จุลินทรีย์กลุ่มนี้ไม่ต้องการเกลือสำหรับการเจริญเติบโต แต่สามารถทนต่อเกลือได้และอาจเจริญเติบโตได้ในสภาพที่มีความเข้มข้นเกลือตั้งแต่ 2.5 โมลาร์ (15.0 เปอร์เซ็นต์) ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียที่สร้างสปอร์พวก *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Staphylococcus aureus* และเชื้อแบคทีเรียพวกที่ไม่ต้องการอากาศบางชนิดโดยเฉพาะ *Clostridium botulinum* รวมถึงยีสต์และราบางชนิดด้วย [42]

2.7.3 จุลินทรีย์พวกชอบเกลือ (halophilic, salt-loving microorganism)

จุลินทรีย์กลุ่มนี้จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในที่ไม่มีเกลืออาจแบ่งออกได้เป็นกลุ่มย่อยดังนี้

2.7.3.1 จุลินทรีย์พวกชอบเกลือความเข้มข้นต่ำ (slight halophilic microorganism) จุลินทรีย์พวกนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือตั้งแต่ 0.2-0.5โมลาร์ (1.0-3.0 เปอร์เซ็นต์) จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้มักพบในน้ำทะเล เช่น *Vibrio alginolyticus* [42]

2.7.3.2 จุลินทรีย์พวกชอบเกลือความเข้มข้นปานกลาง (moderate halophilic microorganism) จุลินทรีย์พวกนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือตั้งแต่ 0.5-2.5 โมลาร์ (3.0-15.0 เปอร์เซ็นต์) จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ได้แก่สาหร่ายและเชื้อแบคทีเรียบางชนิดในกลุ่ม *Vibrio* sp., *Micrococcus* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Bacillus* sp. [42]

2.7.3.3 จุลินทรีย์ชอบเกลือความเข้มข้นสูง (extream halophilic microorganism) จุลินทรีย์พวกนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในสภาพที่มีความเข้มข้นเกลือตั้งแต่ 2.5-5.2 โมลาร์ (15.0-30.0 เปอร์เซ็นต์) ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียพวก Halobacteria และ Halococci จุลินทรีย์พวกนี้มักจะมีลักษณะเป็นสีแดง (red halophile) [42]

Valera [43] ได้รายงานว่าเชื้อจุลินทรีย์ทนเกลือจะเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) แต่ก็ยังสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเกลือ NaCl สูงกว่าในน้ำทะเล นอกจากนั้นในสภาพแวดล้อมที่มีความเค็มสูง (hypersaline environmental) เชื้อจุลินทรีย์ทนเกลือยังคงมีกิจกรรมต่าง ๆ ภายในเซลล์ สำหรับเชื้อแบคทีเรียทนเกลือที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพที่มีความเข้มข้นเกลือ NaCl สูงกว่า 2.5 โมลาร์ จัดเป็นเชื้อแบคทีเรียทนเกลือความเข้มข้นสูง (extreamly halotolerant bacteria)

Kushner [42] ได้รายงานว่าสาเหตุที่ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตลดลง เนื่องจากปริมาณน้ำอิสระที่เซลล์สามารถนำไปใช้ได้หรือที่เรียกว่าค่า water activity (a_w) ที่อยู่ในระบบมีปริมาณต่ำ โดยถ้าปริมาณน้ำอิสระที่เซลล์สามารถนำไปใช้ได้ภายนอกเซลล์ต่ำกว่าภายในเซลล์ น้ำภายในเซลล์จะไหลออกนอกเซลล์ทำให้สารต่าง ๆ ที่อยู่ภายในเซลล์มีความเข้มข้นสูงมากขึ้นซึ่งจะส่งผลต่อระบบการทำงานภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของตัวถูกละลาย (solute) ชนิดต่าง ๆ กับค่า water activity (a_w) ในสารละลายแต่ละชนิดแสดงดังรูปที่ 13

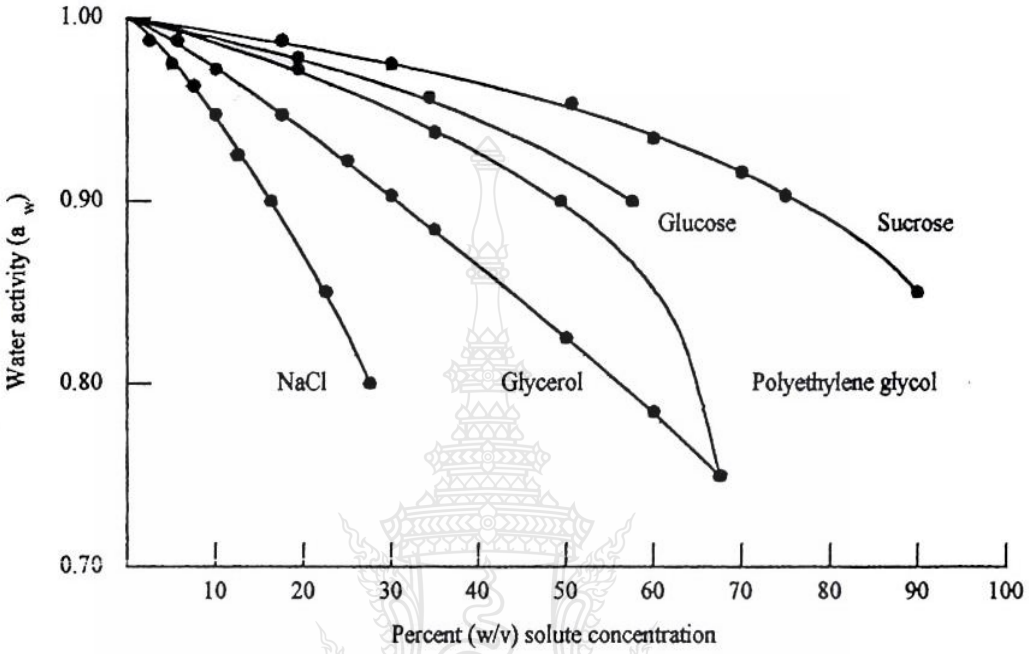
ค่า water activity (a_w) ต่ำที่สุดที่เชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถเจริญเติบโตได้แสดงดังตารางที่ 4 เชื้อจุลินทรีย์ชอบเกลือและทนเกลือซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาพที่มีความเข้มข้นเกลือสูงจะเจริญเติบโตได้ในที่มีค่า a_w ค่อนข้างต่ำคือระหว่าง 0.75-0.86 เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวจะมีไซโตพลาสซึมที่เหมาะสมกับสภาพความเค็มสูง สำหรับพวก eubacteria จะเจริญเติบโตได้ในที่มีค่า a_w ประมาณ 0.90 โดยจะรักษาแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ให้สูงกว่าภายนอกเซลล์ เนื่องจากถ้าแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ต่ำกว่าภายนอกเซลล์ น้ำจะไหลออกนอกเซลล์และขนาดของไซโตพลาสซึมจะลดลงโดยในเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกไซโตพลาสซึมจะมีลักษณะเหี่ยวย่น (plasmolysed) ส่วนเชื้อแบคทีเรียแกรมลบผนังเซลล์จะดึงส่วนของเซลล์เมมเบรนเข้ามาทำให้เซลล์เมมเบรนถูกทำลาย [42] ความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตในสภาพที่มีค่าของแรงดันออสโมติกที่แตกต่างกัน (osmotic tolerant) เกิดจากการที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถปรับแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ให้สูงกว่าภายนอกเซลล์อยู่เสมอ การสะสม K^+ ภายในเซลล์มีบทบาทสำคัญในการรักษาระดับแรงดันออสโมติก นอกจากนั้นเซลล์จุลินทรีย์ยังมีการสะสมสารชนิดอื่นๆ ที่เรียกว่า “osmoregulator” หรือ “compatible solute” ซึ่งทำหน้าที่ปรับสภาพแรงดันออสโมติกภายในเซลล์

สารดังกล่าวได้แก่ กรดอะมิโนบางชนิด เช่น glutamate, glutamine, alanine หรือน้ำตาลบางชนิด เช่น sucrose, trehalose และ glucosylglycerol เป็นต้น [31] เชื้อแบคทีเรียชอบเกลือและทนเกลือส่วนใหญ่จะสะสม compatible solute ที่เป็นสารประกอบอินทรีย์ไว้ภายในเซลล์ เนื่องจากสารดังกล่าวจะช่วยรักษาระดับของแรงดันออสโมติก เกี่ยวข้องในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ และมีผลต่อความคงทนและการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ สาร compatible solute ที่สำคัญในเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือได้แก่ betaine และ ectoin [44]

Kushner and Kamekura [45] ได้รายงานว่าการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือในสภาพแวดล้อมจะทำให้ปริมาณฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ในไซโตพลาสซึมของเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ส่วนเชื้อแบคทีเรียทนเกลือและชอบเกลือความเข้มข้นต่ำจะรักษาความเข้มข้นของ Na^+ ภายในเซลล์อยู่ในระดับต่ำ ได้มีการศึกษาสภาวะของ Na^+ และอิออนอื่นๆ ที่อยู่ภายในเซลล์โดยใช้ nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) พบว่า ความเข้มข้นของ K^+ ภายในเซลล์จะสูงกว่าภายนอกเซลล์ ส่วนความเข้มข้นของ Na^+ ภายในเซลล์จะต่ำกว่าภายนอกเซลล์ ซึ่งทั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ชอบเกลือและทนเกลือจะมีลักษณะดังกล่าวเหมือนกัน ในสิ่งมีชีวิตทั่วๆ ไป Na^+ มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของเซลล์ สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ทนเกลือหรือชอบเกลือความเข้มข้นต่ำต้องการ Na^+ เพื่อช่วยกลไกการขนส่งสารเข้าสู่เซลล์ ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ชอบเกลือความเข้มข้นสูงต้องการ Na^+ เพื่อเป็นสารรักษาสภาพและการทำงานของเอนไซม์ เอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มนี้ต้องการ Na^+ เพื่อให้สามารถทำงานได้ดี นอกจากนี้ Na^+ ยังช่วยทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อกลุ่มนี้ซึ่งไม่ใช่ peptidoglycan แต่เป็นโมเลกุลโปรตีนมีความแข็งแรงโดยเพิ่มแรงยึดเกาะระหว่างหน่วยย่อย (subunit) ของโมเลกุลโปรตีน [31]

รูปที่ 14 แสดงกลไกการถ่ายโอนพลังงาน (energy transduction) เปรียบเทียบระหว่างเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือกับเชื้อแบคทีเรียทนเกลือ การขนส่งโปรตอน (H^+) เข้าสู่เซลล์ขณะที่ Na^+ ผ่านออกนอกเซลล์ (Na^+/H^+ antiporters) จะมีบทบาทสำคัญในกลไกการควบคุมและทำให้เกิดความสมดุลย์ของอิออน (ion homeostasis) ของเซลล์ การขนส่ง Na^+ ผ่านเข้าออกเซลล์โดยอาศัยการผ่านเข้าของโปรตอน (Na^+ coupled secondary transport) จะพบได้บ่อยในระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ชอบสภาวะที่รุนแรง (extremophilic bacteria) และพวก archaea ในสภาวะที่อุณหภูมิสูง ช่วงพีเอชที่เป็นด่าง หรือมีสภาพความเค็มสูง ส่วนการขนส่งโปรตอนที่เกิดจากแรงขับเคลื่อนโปรตอน (H^+ coupled transport) จะพบได้บ่อยในเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ชอบสภาวะที่รุนแรง (non-extremophilic bacteria) และเชื้อแบคทีเรียที่ชอบความเป็นกรด (acidophile) เชื้อแบคทีเรียชอบเกลือจะได้รับ ATP (adenosine triphosphate) ซึ่งเป็นสารที่ให้พลังงานสูงจากระบบการขนส่งโปรตอนแบบ

ไม่ควบคู่ (H^+ noncoupled transport system) ส่วนเชื้อแบคทีเรียทนเกลือจะได้รับ ATP จากระบบการขนส่ง Na^+ และโปรตอนแบบควบคู่ (Na^+/H^+ coupled transport system) [46]

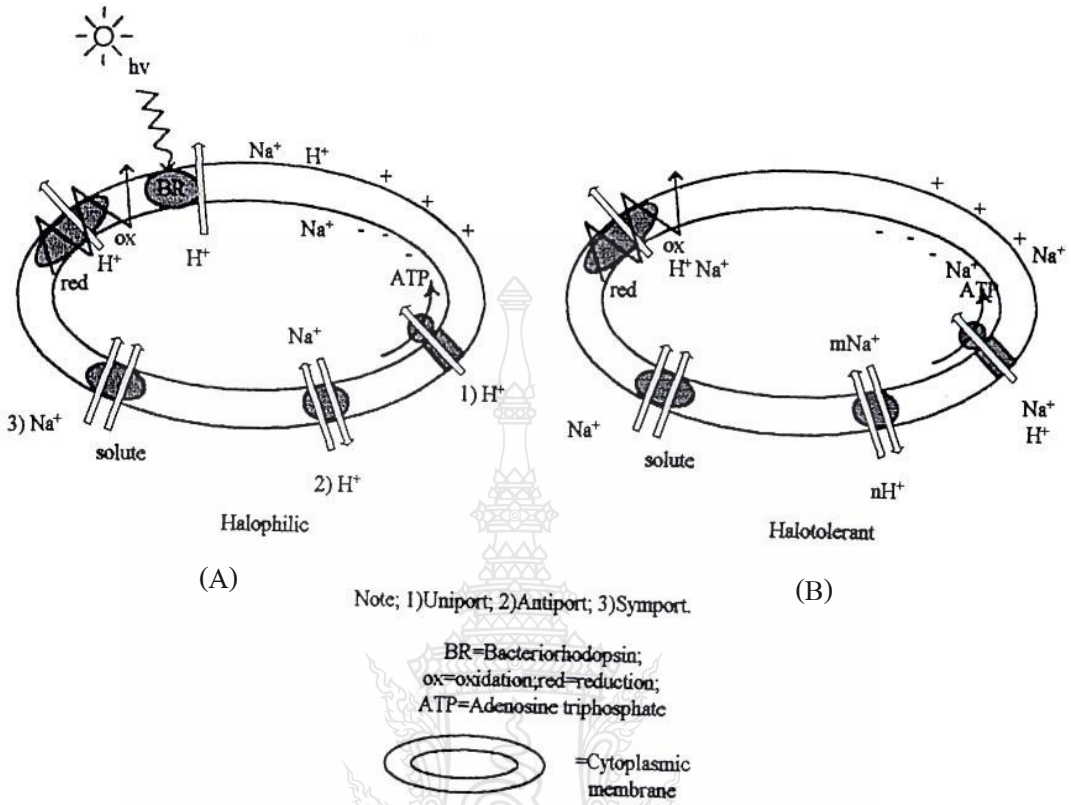


รูปที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของตัวถูกละลาย (solute) ชนิดต่างๆ กับค่า water activity (a_w) ในสารละลายแต่ละชนิด
ที่มา : Kushner (1978)

ตารางที่ 4 ค่า water activity (a_w) ต่ำที่สุดที่เชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถเจริญเติบโตได้

Organisms		**Lower limit**
Fungi	*Rhizopus nigricans*	0.93
	Aspergillus flavus	0.90
	A. niger	0.84
Yeast	*Saccharomyces cerevisiae*	0.94 (in NaCl)
		0.92 (in glucose)
	S. rouxii	0.86 (in NaCl)
		0.857 (in sucrose)
		0.845 (in glucose)
Bacteria	*Bacillus subtilus*	0.949
	Escherichia coli	0.932
	Lactobacillus	0.90
Halotolerant	*Staphylococcus aureus*	0.86-0.88
Moderate halophiles	*Vibrio costicola*	0.86-0.98 (in NaCl)
	Paracoccus halodenitrificans	0.86-0.98 (in NaCl)
Extreme halophiles	Halobacteria and Halococci	0.75-0.88 (in NaCl)

ที่มา : Kushner (1978)



รูปที่ 14 แสดงกลไกการถ่ายโอนพลังงาน (energy transduction) เปรียบเทียบระหว่างเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือ (A) กับเชื้อแบคทีเรียทนเกลือ (B)

ที่มา: Speelmans *et al*. (1995)

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Kuninaka *et al*. [3] พบว่าเชื้อรา *Penicillium citrinum* Thom 1131 สามารถผลิตเอนไซม์ 5′-PDE เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ glucose-peptone ที่ควบคุมพีเอชให้ต่ำกว่า 7.0 เอนไซม์ 5′-PDE สามารถย่อยRNA ของยีสต์ได้สารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5′-โมโนฟอสเฟต (nucleotide 5′-monophosphate) ในปริมาณมาก เอนไซม์นี้ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอชประมาณ 5.0 เอนไซม์ 5′-PDE ที่ผลิตจากเชื้อรา *Penicillium citrinum* ถูกเรียกว่า "nuclease P_1" เอนไซม์นี้จะทำลายพันธะ 3′, 5′-phosphodiester ของโพลีนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยว และพันธะ 3′-phosphomonoester ของโมโนนิวคลีโอไทด์และโอลิโกนิวคลีโอไทด์ เอนไซม์ nuclease P_1 ย่อยกรดนิวคลีอิกสายเดี่ยวได้ แต่ไม่สามารถย่อยกรดนิวคลีอิกเกลียวคู่ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาพที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงกว่า 400 มิลลิโมลาร์ ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์นี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสับสเตรทที่ใช้ เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชระหว่าง 4.0-8.5 ที่อุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส [1]

Kamekura and Onishi [47] พบว่าเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นปานกลาง *Micrococcus varians* ที่แยกจากกากซีอิ๊ว สามารถผลิตเอนไซม์นิวคลีเอสแล้วขับออกมานอกเซลล์เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) หรือเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ความเข้มข้น 1.0-4.0 โมลาร์ เอนไซม์นิวคลีเอสเมื่อถูกทำให้บริสุทธิ์จะมีกิจกรรมของทั้งเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส (RNase) และดีออกซีไรโบนิวคลีเอส (DNase) เอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุดในสภาพที่มีความเข้มข้นเกลือ NaCl 2.9 โมลาร์ หรือเกลือ KCl 2.1 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จึงจัดเป็นเอนไซม์นิวคลีเอสที่ชอบเกลือ (halophilic nuclease) กิจกรรมของเอนไซม์จะสูญเสียไปเมื่อนำไปผ่านการไดอะไลซีสในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเกลือต่ำ และเมื่อนำเอนไซม์ไปเมื่อนำไปผ่านการไดอะไลซีสในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นเกลือ NaCl 3.4 โมลาร์ กิจกรรมของเอนไซม์จะกลับคืนมา 77.0 เปอร์เซ็น ของกิจกรรมเอนไซม์เริ่มต้น

Noguchi *et al*. [26] ได้ทำการตรึงรูปเอนไซม์ 5′-PDE จากเชื้อรา *Penicillium* CM 932 และ 5′-AMP deaminase เชื้อรา *Aspergillus* sp. บน porous ceramics ด้วยพันธะโควาเลนต์และนำไปใช้ผลิตสารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์โมโนฟอสเฟตจาก RNA เมื่อทำการผลิตสารประกอบ 5′-ไรโบนิวคลีโอไทด์โดยใช้คอลัมน์แบบต่อเนื่อง (continuous-column) พบว่า เอนไซม์สามารถย่อยสลาย RNA ได้ถึง 85 เปอร์เซ็นต์ และการเปลี่ยน 5′-AMP ไปเป็น 5′-IMP จะสมบูรณ์เมื่อรักษาสภาวะในการเปลี่ยนสารประกอบเป็นเวลานานกว่า 23 วัน เมื่อใช้สารละลาย RNA ความเข้มข้น 4.0 เปอร์เซ็นต์เป็นสับสเตรต

Kamekura and Onishi [48] ได้เสนอชื่อเอนไซม์นิวคลีเอสที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *Micrococcus varians* var. *halophilus* ว่า “nuclease H” ซึ่งหมายถึงเอนไซม์นิวคลีเอสที่ชอบเกลือ (halophilic nuclease) โดยเอนไซม์จะต้องการเกลือเพื่อทำให้การทำงานมีประสิทธิภาพสูงขึ้น

Kamekura *et al*. [49] ได้ทดลองใช้เอนไซม์นิวคลีเอสที่ชอบเกลือ (halophilic nuclease H) จากเชื้อแบคทีเรีย *Micrococcus varians* subsp. *halophilus* ผลิตสารประกอบนิวคลีโอไทด์จาก RNA ที่สกัดจากยีสต์แห้ง (commercial dry yeast) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์นิวคลีเอสสามารถผลิตสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ได้ผลผลิตเท่ากับ 805 มิลลิกรัมต่อ RNA 5 กรัม

Onishi *et al*. [50] พบว่าเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นปานกลาง *Bacillus* sp. N23-2 ที่แยกจากซากไม้ [51] สามารถผลิตเอนไซม์นิวคลีเอสแล้วขับออกมานอกเซลล์เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 1.0-2.0 โมลาร์ เอนไซม์นิวคลีเอสเมื่อถูกทำให้บริสุทธิ์จะมีกิจกรรมของทั้งเอนไซม์ RNase และ DNase เอนไซม์นี้มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์นิวคลีเอสที่ชอบเกลือ (halophilic nuclease) โดยจะทำงานได้ดีที่สุดในสภาพที่มีความเข้มข้นเกลือ NaCl 1.4-3.2 โมลาร์หรือเกลือ KCl 2.3-3.2 โมลาร์ เอนไซม์สามารถผลิตสารประกอบนิวคลีโอไทด์ (5′-mononucleotide) จาก DNA และ RNA โดยจะทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 8.5 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสกับ DNA และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสกับ RNA

Yokoi *et al*. [52] ได้รายงานเกี่ยวกับการใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC) สำหรับวิเคราะห์สารประกอบนิวคลีโอไทด์และนิวคลีโอไซด์ในสภาพที่มีความเข้มข้นเกลือสูง พบว่าหลังจากเจือจางให้ความเข้มข้นเกลือ NaCl ต่ำกว่า 20 มิลลิโมลาร์ และใช้เวลา 20 นาที จะสามารถแยกและเก็บเกี่ยวสารประกอบนิวคลีโอไทด์และนิวคลีโอไซด์ในสารผสมได้ดี

Onishi *et al*. [5] ได้ออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งใช้คอลัมน์ที่บรรจุเซลล์ที่จับกันเป็นก้อน (flocculated cell) ของเชื้อแบคทีเรียที่ชอบเกลือความเข้มข้นปานกลาง *Micrococcus varians* var. *halophilus* และให้เซลล์ที่จับกันเป็นก้อนดูดซับเอนไซม์นิวคลีเอสที่ชอบเกลือ (halophilic nuclease H) สำหรับผลิตสารประกอบ 5′- นิวคลีโอไทด์ (5′- nucleotide) จาก RNA พบว่าเซลล์ที่จับกันเป็นก้อนจะดูดซับเอนไซม์นิวคลีเอสได้ดีและไม่ดูดซับเอนไซม์นิวคลีโอทิเดส (5′-nucleotidase) นอกจากนี้เมื่อทำการกำจัดเกลือออกจากเซลล์ที่จับกันเป็นก้อนโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มี $MgSO_4.7H_2O$ 2.0 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์นิวคลีโอทิเดสถูกยับยั้งโดยไม่สูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์นิวคลีเอสและถังปฏิกรณ์ชีวภาพนี้จะสามารถผลิตสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ได้

Olmedo *et al*. [21] ได้ศึกษาการผลิตสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-IMP และ 5′-GMP โดยใช้เอนไซม์ย่อยสลาย RNA ด้วยกระบวนการแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์แบบตรึง (packed-bed reactor) 2 ถัง ถังปฏิกรณ์แต่ละถังจะบรรจุเอนไซม์ 5′-PDE และ 5′-AD (5′-adenylate deaminase) ที่ถูกตรึงอยู่ใน acrylic resin พบว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดจะมีความเสถียรหลังจากผ่านกระบวนการแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์แบบตรึงเป็นเวลา 8 ชั่วโมง เอนไซม์ 5′-AD และ 5′-PDE อิสระจะมีครึ่งชีวิต (half lives) เท่ากับ 193 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ 240 นาที ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Hayashi *et al*. [53] รายงานการผลิตสารประกอบ 5′-ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ (5′-deoxyribonucleotides) จากของเหลวที่ได้สกัดจากอวัยวะเพศของปลาแซลมอน (salmon milt) โดยใช้การย่อยสลายด้วยเอนไซม์แบบสองขั้น ตอนเอนไซม์ที่ใช้คือ เอนไซม์แอคติเนส AS (Actinase AS) จากเชื้อรา *Streptomyces griseus* (ของบริษัท Kaken Phamaceutical ประเทศญี่ปุ่น) และเอนไซม์นิวคลีเอสจากเชื้อรา *Penicillium citrinum* (ของบริษัท Amano Phamaceutical ประเทศญี่ปุ่น) พบว่าสามารถผลิตสารประกอบ 5′-ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ได้เท่ากับ 47 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ DNA เริ่มต้นและผลิตสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5′-กรดดีออกซีอะดีไนลิค (5′-deoxyadenylic acid, 5′-dAMP) และ 5′-กรดดีออกซีกัวไนลิค (5′-deoxyguanylic acid, 5′-dGMP) ได้เท่ากับ 17 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Sombutyanuchit *et al*. [54] ได้ทำการเตรียม 5′-GMP-rich yeast extract โดยใช้ยีสต์ที่ได้จากการผลิตเบียร์ (spent brewer's yeast) ที่ผ่านการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) และใช้เอนไซม์ 5′-PDE จากรากของข้าวมอลต์ จากการศึกษาพบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายตัวเองของยีสต์คือ 8 ชั่วโมงและเอนไซม์จะทำงานได้ดีในช่วง 8-14 ชั่วโมง การใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายตัวเองและการทำงานของเอนไซม์นานเกินไปจะทำให้ปริมาณ 5′-GMP ลดลงจาก 0.7-0.9 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 0.2-0.4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 5′-GMP ใน yeast extract จะสูงที่สุดเท่ากับ 0.93 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้เอนไซม์ 5′-PDE เท่ากับ 1.6 หน่วย/มิลลิลิตร

Beluhan *et al*. [55] ศึกษาการทำเอนไซม์ alkaline 5′-PDE จาก barley malt sprouts ให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยการผ่านการให้ความร้อนและตกตะกอนด้วยอะซิโตนเพื่อกำจัดเอนไซม์ phosphomonoesterase (PME) เอนไซม์ 5′-PDE จะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 40 เท่า มีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 30 หน่วย/มิลลิกรัมโปรตีน และได้ผลได้ประมาณ 32 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 8.9 อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส การทำงานของเอนไซม์จะถูกกระตุ้นด้วย Mg^{2+} ความเข้มข้น

10 mM เอนไซม์มีความเสถียรมากกว่า 8 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จะมีความเสถียรถึง 120 นาที และจะไม่สูญเสียกิจกรรมในการทำงานเป็นเวลานานกว่า 90 วัน

Deoda and Singhal [4] ได้ทำการสกัด 5′-PDE จากเมล็ดข้าวบาเลย์งอกที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน และทำให้เอนไซม์ดังกล่าวบริสุทธิ์บางส่วนโดยผ่านกระบวนการอัลตร้าฟิลเตรชั่น ตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที พบว่าเอนไซม์จะมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 17.83 เท่า เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 5.0 และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนสามารถย่อยสลาย RNA ได้เป็นสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP และ 5′-AMP ซึ่งเป็นสารตั้งต้น (precursor) สำหรับผลิต 5′-IMP

Qing *et al*. [35] ทำการผลิตเอนไซม์ nuclease p1 (5′-PDE) ด้วยกระบวนการหมักจากเชื้อรา *Penicillium citrinum* เป็นเวลา 49 ชั่วโมง เอนไซม์ที่ผลิตได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยการให้ความร้อน (thermal deactivation) อัลตร้าฟิลเตรชั่น ตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต โครมาโตกราฟีด้วย phenyl sepharose โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ และแบบเจลฟิลเตรชั่น พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 93 เท่า น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ประมาณ 43-45 กิโลดาลตัน เอนไซม์ต้องการ Zn^{2+} สำหรับการทำงาน สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานเอนไซม์คือที่พีเอช 5.4 อุณหภูมิ 69 องศาเซลเซียส มีความเสถียรในช่วงพีเอชระหว่าง 5.0-6.5 และที่อุณหภูมิสูงถึง 70 องศาเซลเซียส ค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์บริสุทธิ์เท่ากับ 24.28 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 0.36 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร/นาที ตามลำดับ

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

1. ขวดเตรียมสารละลาย ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
2. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
3. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ
4. ตะเกียงแอลกอฮอล์
5. ที่วางหลอดทดลอง
6. แท่งแก้วสามเหลี่ยม
7. บีกเกอร์ ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
8. ไมโครปิเปต ขนาด 100 ไมโครลิตร 1 มิลลิลิตร
9. สไลด์ และกระจกปิดสไลด์
10. หลอดทดลอง
11. อุปกรณ์เขี่ยเชื้อ

เครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์ (microscope)
2. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaking incubator)
3. เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
   (high performance liquid chromatography, HPLC)
4. เครื่องจำแนกชนิดจุลินทรีย์อัตโนมัติ VITEX 2 Compact
5. เครื่องชั่งไฟฟ้า (balance)
6. เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dryer)
7. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (autoclave)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
9. เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixture)

10. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (spectrophotometer)
11. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
12. เครื่องให้ความร้อน (hot plate)
13. ตู้แช่เยือกแข็ง (ultra low temperature freezers)
14. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
15. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow clean bench)
16. ถังหมักขนาด 5 ลิตร (fermentor)
17. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath)

วัตถุดิบ

1. น้ำปลาดิบ

สารเคมี

1. Acetic acid (CH_3COOH)
2. Ammonium oxalate crystal violet
3. Bovine serum albumin (BSA)
4. Copper sulfate ($CuSO_4.5H_2O$)
5. Ethanol 95%
6. Folin-Ciocalteau
7. Glycine ($C_2H_5NO_2$)
8. Guanosine 5′-monophosphate (5′-GMP)
9. Gram's iodine
10. Hydrochloric acid (HCl)
11. Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$)
12. Ribonucleic acid
13. Safanin water solution
14. Sodium acetate ($NaC_2H_3O_2$)
15. Sodium carbonate (Na_2CO_3)
16. Sodium chloride (NaCl)

17. Sodium citrate ($C_6H_5O_7Na_3$)
18. Sodium hydroxide (NaOH)
19. Tris-(hydroxymethly)aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ DNase test agar-methyl green
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Sehgal and Gibbons Complex (SGC)

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำปลาดิบ

นำน้ำปลาดิบอายุการหมัก 6 เดือน มาทำการแยกแบคทีเรียด้วยวิธีการทำให้เชื้อกระจาย (spread plate) โดยทำการเจือจาง (dilution) น้ำปลาดิบ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำกลั่นที่ทำการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 9 มิลลิลิตร แล้วทำการดูดสารละลายที่เจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารแข็ง SGC (Sehgal and Gibbons Complex) [56] ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ให้มีความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ โดยใช้แท่งแก้วที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ยเชื้อให้ทั่วจาน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จะปรากฏโคโลนีเดี่ยวๆ บนผิวหน้าอาหาร นำแบคทีเรียที่แยกได้มาทำการทดลองในขั้นต่อไป

3.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (5′-phosphodiesterase, 5′-PDE) บนอาหารแข็ง

นำแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำปลาดิบมาจุดลงบนอาหารแข็ง DNase test agar-methyl green และเติมเกลือ NaCl ให้มีความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน สังเกตการณ์เกิดพื้นที่ส่วนใส (clear zone) ถ้าเกิดพื้นที่ส่วนใสรอบๆ โคโลนีของแบคทีเรียแสดงว่าแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์และขับออกมาย่อยสลายกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid, DNA) ซึ่งเป็นสับเตรตและเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับเมทิลกรีน (methyl green) ทำให้สีเขียวหายไป [57] วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณการเกิดพื้นที่ส่วนใสและของโคโลนี คัดเลือกไอโซเลทที่อัตราส่วนระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณการเกิดพื้นที่ส่วนใสและของโคโลนีสูงไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ในอาหารเหลว

ถ่ายแบคทีเรียบริสุทธิ์จากข้อ 3.1 ลงในอาหารเหลว SGC ที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 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 บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน น้ำหมักที่ได้นำมาเหวี่ยงแยกเซลล์ออกและนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE [58]

3.4 การจำแนกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 และ 3.3 มาจำแนกหาชนิดของแบคทีเรีย โดยศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางชีวเคมี และการตรวจสอบทางพันธุศาสตร์โมเลกุล โดยการหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA และเปรียบเทียบกับแบคทีเรียอื่น [59, 60]

3.4.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา นำแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหาร SGC ที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้นที่เหมาะสมในจานเพาะเลี้ยง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาศึกษาการติดสีแบบแกรม รูปร่าง และสีของโคโลนี

3.4.2 ศึกษาความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่างๆ โดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลว SGC ที่เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ตรวจดูการเจริญของแบคทีเรียโดยสังเกตจากความขุ่นของอาหารเทียบกับอาหารเหลว SGC ที่ไม่ได้ใส่เชื้อ

3.4.3 ศึกษาความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียที่มีพีเอชต่างๆ โดยทำการเขี่ยเชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลว SGC ที่เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้นที่เหมาะสม และปรับพีเอชให้เท่ากับ 4.0-8.0 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ตรวจดูการเจริญของแบคทีเรียโดยสังเกตจากความขุ่นของอาหารเทียบกับอาหารเหลว SGC ที่ไม่ได้ใส่เชื้อ

3.4.4 ศึกษาความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียที่ความเข้มข้นของเกลือ NaCl ระดับต่างๆ โดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลว SGC ที่เติมเกลือ NaCl ระดับความเข้มข้นที่ 0-3.0 โมลาร์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ตรวจดูการเจริญของแบคทีเรียโดยสังเกตจากความขุ่นของอาหารเทียบกับอาหารเหลว SGC ที่ไม่ได้ใส่เชื้อ

3.4.5 ศึกษาลักษณะทางชีวเคมี โดยใช้เครื่องจำแนกชนิดจุลินทรีย์อัตโนมัติ VITEX 2 Compact จะทำการเตรียมเชื้อที่ต้องการทดสอบที่อยู่ในรูปสารแขวนลอย (suspension) และใส่ลงในแผ่นการ์ด VITEK หลังจากนั้นจึงนำแผ่นการ์ด VITEK ไปบ่มในตู้บ่ม และเครื่องอ่าน (reader / incubator) ของเครื่อง VITEK เครื่องจะอ่านค่าการดูดกลืนแสง (OD) ทุกๆ ชั่วโมง (kinetic reading)ในช่องบรรจุสับเตรทซึ่งเกิดการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาหรือการเจริญเติบโตของเชื้อ ในแต่ละช่องจากนั้นจะรายงานผลภายในเวลา 4-12 ชั่วโมง [61]

3.4.6 การตรวจสอบทางพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยการหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA การตรวจสอบทางพันธุศาสตร์โมเลกุลของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ จะทำการสกัดดีเอ็นเอเพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) การหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA จะใช้เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (automatic DNA sequencer) นำข้อมูลลำดับเบสของยีน 16S rDNA ที่ได้จากแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้มาหาเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (% similarity) จากนั้นทำการเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างลำดับเบสของแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้กับลำดับเบสของแบคทีเรียที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GeneBank ของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยใช้โปรแกรม BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)

3.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE

3.5.1 การศึกษาความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้อายุประมาณ 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 เพื่อวิเคราะห์การเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE

3.5.2 ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้อายุประมาณ 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 ที่เหมาะสม ปริมาตร 150 มิลลิลิตร โดยปรับพีเอชเป็น 4, 5, 6, 7, 8 นำไปบ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์การเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE

3.5.3 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้อายุประมาณ 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 ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์การเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE

3.6 การศึกษาการเจริญและผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ในถังหมัก

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้อายุประมาณ 1-2 วัน ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ที่เติมเกลือความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อแขวนลอยปริมาตร 30 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลวชนิดเดียวกันปริมาตร 300 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อต่อลงในถังหมักขนาด 5.0 ลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ปริมาตร 3,000 มิลลิลิตร ที่มีการใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ตามข้อ 3.5 อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm (ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรน้ำหนัก/นาที) ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์การเจริญโดยวัดค่าการ

ดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักเพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE

3.7 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ 5′-PDE

3.7.1 การทดสอบพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE

ทำการเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ช่วงพีเอชระหว่าง 4.0-12.0 จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE บัฟเฟอร์ที่ใช้ช่วงพีเอชระหว่าง 4.0-5.0 ใช้สารละลาย acetate buffer 0.04 โมลาร์ ช่วงพีเอชระหว่าง 6.0-7.0 ใช้สารละลาย Tris-HCl buffer 0.04 โมลาร์ ช่วงพีเอชระหว่าง 10.0-12.0 ใช้สารละลาย glycine-NaOH buffer 0.04 โมลาร์

3.7.2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE

ทำการเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสม จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE อุณหภูมิที่ใช้ในการทดสอบอยู่ในช่วงระหว่าง 30-80 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทดลองเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็น 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

3.7.3 การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ 5′-PDE ที่พีเอชต่างๆ

ทำการเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชระหว่าง 4.0-12.0 จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายเอนไซม์มาปรับพีเอชให้ได้พีเอชเริ่มต้น (พีเอชที่เหมาะสม) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ความเข้มข้น 1.0 โมลาร์ จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE ที่เหลือ (residual activity) บัฟเฟอร์และพีเอชที่ต้องการศึกษาเช่นเดียวกับที่ระบุในหัวข้อ 3.7.1

3.7.4 การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ 5′-PDE ที่อุณหภูมิต่างๆ

ทำการเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสม นำไปบ่มในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แล้วทำให้เย็นลงทันทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE ที่เหลือ (residual activity)

3.7.5 การทดสอบความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE

ทำการเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสม จากนั้นนำมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของเกลือ NaCl ในสับสเตรตให้มีปริมาณที่ความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือในสารละลายให้เป็น 0, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 โมลาร์ โดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะตามข้อ 3.7.2

3.8 การศึกษาการผลิตสารประกอบกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต (guanosine 5′-monophosphate, 5′-GMP)

3.8.1 การเตรียมเอนไซม์ 5′-PDE

นำน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียตามข้อ 3.6 มาทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ตกตะตอนส่วนใส (supernatant) ด้วยเอทานอล 99.8 เปอร์เซ็นต์ ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของเอทานอลในน้ำหมักเท่ากับ 50.0 เปอร์เซ็นต์ [57] ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงแยกตะกอนเอนไซม์ออกจากน้ำหมักโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะตอนที่ได้ไปละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม (พีเอชที่เหมาะสม) ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ นำสารละลายเอนไซม์มาทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization) ด้วยเครื่อง lyophilizer โดยนำสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 50-100 มิลลิลิตร บรรจุลงในขวดแก้วก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ทำเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไประเหิดภายใต้สภาวะสุญญากาศ นาน 12-24 ชั่วโมง จะได้เอนไซม์ที่อยู่ในรูปผงแห้งสำหรับใช้ในการผลิต 5′-GMP

3.8.2 การผลิต 5′-GMP จาก RNA ด้วยกระบวนการทางเอนไซม์

การศึกษาการผลิต 5′-GMP โดยการย่อยสลาย RNA ด้วยเอนไซม์ 5′-PDE จะเตรียมสารละลาย RNA ความเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ในบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.04 โมลาร์ ซึ่งมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ 5′-PDE ผงโดยแปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 0.1 (255 หน่วย) 0.2 (510 หน่วย) 0.3 (765 หน่วย) 0.4 (1,020 หน่วย) และ 0.5 (1,275 หน่วย) เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ในแต่ละการทดลอง (treatment) จะทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างไฮโดรไลเซท (hydrolysate) ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ 5′-PDE ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ทุกๆ 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างไฮโดรไลเซท หลังจากนั้นกรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง (filter membrane)

ขนาดของรูเท่ากับ 0.45 ไมครอน ก่อนทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

3.8.3 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP

ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ในตัวอย่างด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ดีเทคเตอร์ชนิด LDC 4100 และคอลัมน์ Lichrospher 100 NH_2 ขนาด 25×0.4 เซนติเมตร บรรจุอนุภาคขนาด 5.0 ไมครอน วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้คือ สารละลายผสมของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Na_2HPO_4-NaH_2PO_4) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 5.0 และเมธานอลในอัตราส่วน 90 ต่อ 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร ควบคุมอัตราการไหลเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 30 องศาเซลเซียส

3.8.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์อิทธิพลของการเติมเอนไซม์ 5′-PDE ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเกิดสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ที่เกิดขึ้นในแต่ละการทดลอง (treatment) ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

3.9 วิธีวิเคราะห์

3.9.1 วิธีวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ 5′-PDE

วิธีที่ใช้ในการหากิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE ดัดแปลงจากวิธีการของ Kamekura and Onishi [47]

3.9.2 วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ตามวิธีการของ Lowry *et al*. [62]

3.9.3 วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP

ปริมาณสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP วิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง

3.10 สถานที่และระยะเวลาในการทำวิจัย

3.10.1 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

3.10.2 ระยะเวลาในการทำวิจัย

เริ่มตั้งแต่เดือน กรกฎาคม 2555 ถึง เดือน พฤศจิกายน 2556

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำปลาดิบ

การแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำปลาดิบที่หมักเป็นระยะเวลา 6 เดือน โดยใช้อาหารแข็ง Sehgal and Gibbons Complex (SGC) ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0-3.0 โมลาร์ ผลการแยกแบคทีเรียจากน้ำปลาดิบแสดงดังตารางที่ 5 จากผลการทดลอง พบว่า แบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากน้ำปลาดิบมีจำนวน 14 ไอโซเลท แบคทีเรียที่แยกได้สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0, 1.0, 2.0 และ 3.0 โมลาร์ มีจำนวนเท่ากับ 2, 4, 5 และ 3 ไอโซเลท ตามลำดับ ผลการคัดแยกแบคทีเรียจากน้ำปลาดิบแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียที่มีบทบาทในกระบวนการหมักน้ำปลาจะมีแบคทีเรียหลายกลุ่มทั้งพวกที่ต้องการและไม่ต้องการเกลือในการเจริญ ได้แก่ แบคทีเรียชอบเกลือ (halophilic bacteria) และแบคทีเรียทนเกลือ (halotolerant bacteria) ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้จะมีความสามารถเจริญได้ในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl แตกต่างกันไป [42]

จากผลการทดลองซึ่งสามารถแยกแบคทีเรียจากน้ำปลาดิบที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ จะสอดคล้องกับการศึกษาของ Ok *et al.* [63] ซึ่งได้แยกแบคทีเรียจากน้ำปลาพบว่าเป็นแบคทีเรียชอบเกลือที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสมีความสามารถในการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-4.0 โมลาร์ Ikeda [57] ได้คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์นิวคลีเอสจากน้ำปลาไทย พบว่าแบคทีเรียที่แยกได้มีทั้งแบคทีเรียชอบเกลือและแบคทีเรียทนเกลือที่สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ และ Bovornreungroj [64] ซึ่งสามารถแยกแบคทีเรียชอบเกลือและแบคทีเรียทนเกลือสร้างเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสที่เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 2.0-4.0 โมลาร์ จากตัวอย่างน้ำปลาดิบของโรงงานต่างๆ ในประเทศไทย

ตารางที่ 5 จำนวนแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำปลาดิบที่มีอายุการหมัก 6 เดือน

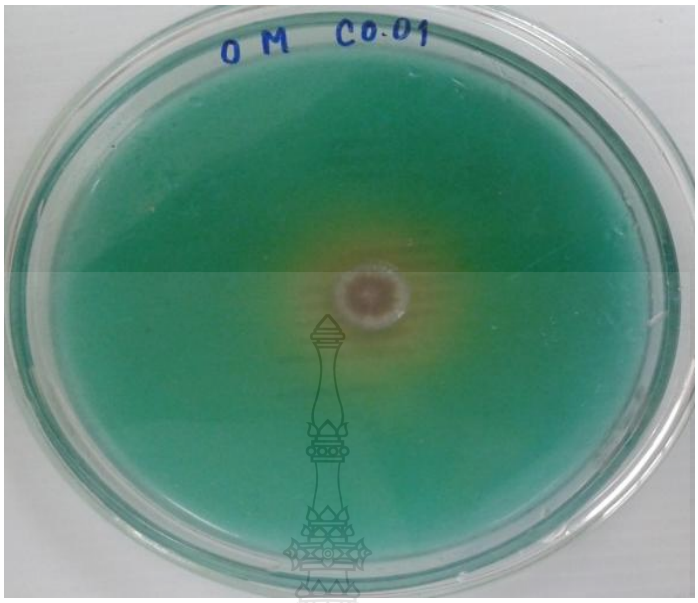
จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหาร SGC ที่ความเข้มข้นเกลือ NaCl ระดับต่างๆ (ไอโซเลท)				รวม (ไอโซเลท)
0 M NaCl	**1 M NaCl**	**2 M NaCl**	**3 M NaCl**	
2	4	5	3	14

4.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE บนอาหารแข็ง

จากการนำแบคทีเรียบริสุทธิ์ทั้ง 14 ไอโซเลท ที่ได้จากการคัดแยกในเบื้องต้นมาทำการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE บนอาหาร DNase test agar-methyl green ที่เติมเกลือ NaCl ให้มีความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 6 จากผลการทดลองพบว่าหลังจากบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน มีแบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ได้ โดยสังเกตได้จากพื้นที่ส่วนใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นบนอาหาร DNase test agar-methyl green โดยแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 จะให้อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณการเกิดพื้นที่ส่วนใสและของโคโลนีสูงที่สุดบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมเกลือ NaCl แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 สามารถผลิตเอนไซม์5′-PDE ได้สูงที่สุด โดยแบคทีเรียดังกล่าวจะผลิตเอนไซม์ 5′-PDE และขับออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) เพื่อย่อยสลายกรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (deoxyribonucleic acid, DNA) ซึ่งเป็นสับเตรตและเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับเมทิลกรีน (methyl green) ทำให้สีเขียวหายไป แล้วเกิดเป็นบริเวณใสขึ้นมา [57] (รูปที่ 15) ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 สำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 6 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE บนอาหาร DNase test agar-methyl green ที่เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์

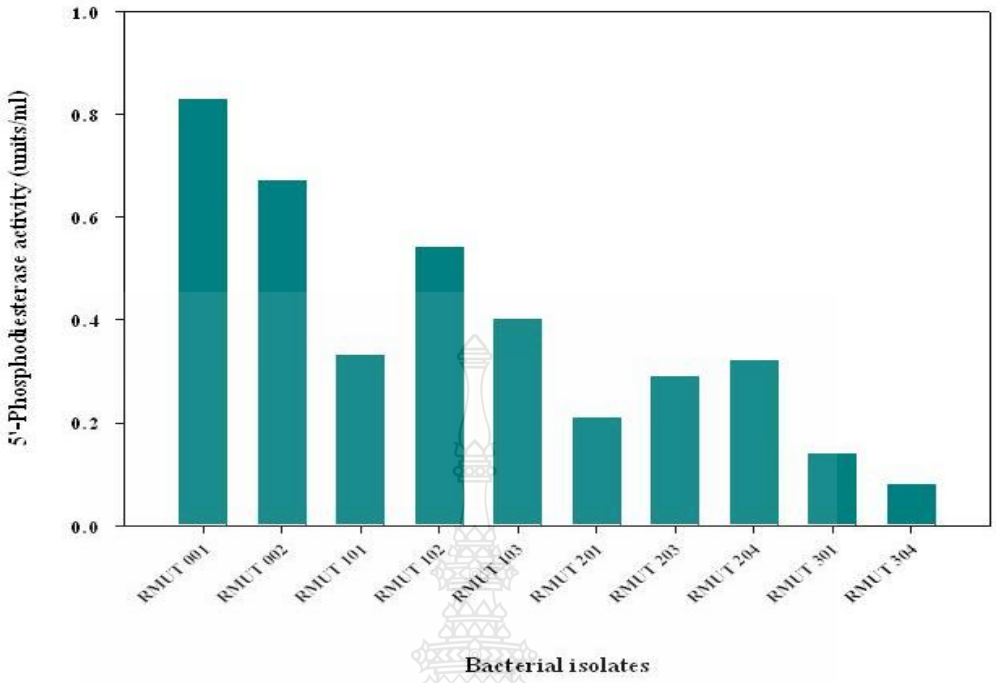
แบคทีเรียไอโซเลท	**อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใส (มม.) และเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (มม.)**			
	0 M NaCl	**1 M NaCl**	**2 M NaCl**	**3 M NaCl**
RMUT 001	2.00	-	-	-
RMUT 002	1.50	-	-	-
RMUT 101	-	1.20	-	-
RMUT 102	-	1.40	-	-
RMUT 103	-	1.30	-	-
RMUT 105	-	-	-	-
RMUT 201	-	-	1.27	-
RMUT 202	-	-	-	-
RMUT 203	-	-	1.29	-
RMUT 204	-	-	1.25	-
RMUT 205	-	-	-	-
RMUT 301	-	-	-	1.33
RMUT 303	-	-	-	-
RMUT 304			-	1.25



รูปที่ 15 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ของแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 บนอาหาร DNase test agar-methyl green

4.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ในอาหารเหลว

เมื่อนำแบคทีเรียที่ได้จากการคัดเลือกในเบื้องต้นมาทั้ง 14 ไอโซเลท มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 วัน เพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ในอาหารเหลว SGC ที่มีเกลือ NaCl ให้มีความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 16 จากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียจำนวน 14 ไอโซเลท สามารถผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ได้จำนวน 10 ไอโซเลท เมื่อทำการเพาะเลี้ยงนาน 3 วัน โดยแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 สามารถผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ได้สูงที่สุด (0.83 หน่วยต่อมิลลิลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียไอโซเลทอื่น ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE บนอาหารแข็งซึ่งแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 จะให้ค่าอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสและของโคโลนีสูงที่สุดในสภาวะที่ไม่มีเกลือ NaCl เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียไอโซเลทอื่น ดังนั้นแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 จึงถูกคัดเลือกไว้สำหรับใช้ในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ต่อไป



รูปที่ 16 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDEในอาหารเหลว SGC ที่เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์

4.4 การจำแนกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE

จากการนำแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ได้สูง มาจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมี พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก โคโลนีมีสีครีม เซลล์มีลักษณะรูปร่างท่อน และมีการจัดเรียงตัวคล้ายโซ่ สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส พีเอชระหว่าง 4-8 ในสภาวะที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ (ตารางที่ 7) การศึกษาลักษณะทางชีวเคมีโดยใช้เครื่องจำแนกชนิดจุลินทรีย์อัตโนมัติ VITEX 2 Compact แสดงผลในตารางที่ 8 จากลักษณะต่างๆทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 จะมีลักษณะที่คล้ายกับแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* [65] ซึ่งผลการจำแนกแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 จะสอดคล้องกับการศึกษาของ Suntinanalert [66] และมัทนา และสมศักดิ์ [67] ซึ่งได้แยกแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำปลาไทยพบแบคทีเรียในกลุ่มชอบเกลือและทนเกลือจีนัส *Bacillus* sp. ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์และมีบทบาทในกระบวนการหมักน้ำปลา

การตรวจสอบทางพันธุศาสตร์โมเลกุลของแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 โดยการหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA ทำการสกัดดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) และหาลำดับเบสของยีน 16S rDNA ด้วยเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (automatic DNA sequencer) ได้ลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 แสดงดังรูปที่ 17 เมื่อนำลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 มาหาเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (% similarity) โดยใช้โปรแกรม BLASTn ทำการเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างลำดับเบสของแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 กับลำดับเบสของแบคทีเรียที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GeneBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ได้ผลแสดงในตารางที่ 9 และรูปที่ 18 จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001กับลำดับเบสของแบคทีเรียที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GeneBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 มีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *Bacillus aerophilus, B. altitudinis* และ *B. stratosphericus* ที่ระดับ 99.99 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมี มาพิจารณาร่วมกับผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน16S rDNA พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 มีลักษณะต่างๆ คล้ายกับแบคทีเรีย *B. altitudinis* มากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 คือแบคทีเรีย *B. altitudinis*

ตารางที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญของแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001

Characteristics	**RMUT 001**
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 8 ลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001

Characteristics	Reaction
Gram reaction	+ve
β-xylosidase	+
L-lysine arylamidase	-
L-aspartate 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	+

ตารางที่ 8 ลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 (ต่อ)

Characteristics	Reaction
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	-

ตารางที่ 8 ลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 (ต่อ)

Characteristics	Reaction
Putrescine assimilation	-
Growth in 6.5% NaCl	+
Kanamycin resistance	-
Oleandomycin resistance	-
Esculin hydrolyse	+
Tetrazolium red	(-)
Polymixin_B resistance	-

หมายเหตุ: +ve = Gram positive bacteria

\+ = Positive reaction

\- = Negative reaction

(+) = Weak-positive reaction

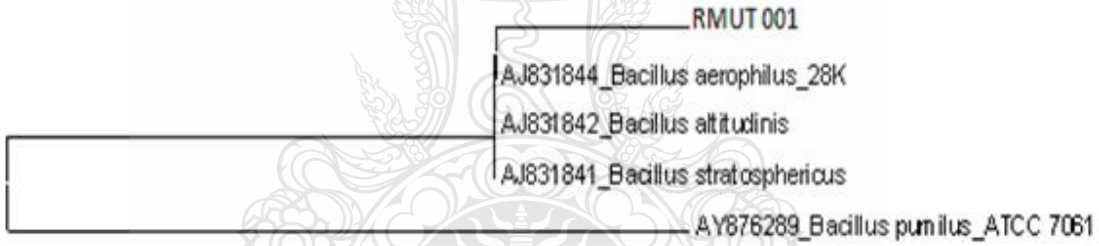
(-) = Weak-negative reaction

AGTCGAGCGG ACAGAAGGGA GCTTGCTCCC GGATGTTAGC GGCGGACGGG
TGAGTAACAC GTGGGTAACC TGCCTGTAAG ACTGGGATAA CTCCGGGAAA
CCGGAGCTAA TACCGGATAG TTCCTTGAAC CGCATGGTTC AAGGATGAAA
GACGGTTTCG GCTGTCACTT ACAGATGGAC CCGCGGCGCA TTAGCTAGTT
GGTGAGGTAA CGGCTCACCA AGGCGACGAT GCGTAGCCGA CCTGAGAGGG
TGATCGGCCA CACTGGGACT GAGACACGGC CCAGACTCCT ACGGGAGGCA
GCAGTAGGGA ATCTTCCGCA ATGGACGAAA GTCTGACGGA GCAACGCCGC
GTGAGTGATG AAGGTTTTCG GATCGTAAAG CTCTGTTGTT AGGGAAGAAC
AAGTGCAAGA GTAACTGCTT GCACCTTGAC GGTACCTAAC CAGAAAGCCA
CGGCTAACTA CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGTAGGTG GCAAGCGTTG
TCCGGAATTA TTGGGCGTAA AGGGCTCGCA GGCGGTTTCT TAAGTCTGAT
GTGAAAGCCC CCGGCTCAAC CGGGGAGGGT CATTGGAAAC TGGGAAACTT
GAGTGCAGAA GAGGAGAGTG GAATTCCACG TGTAGCGGTG AAATGCGTAG
AGATGTGGAG GAACACCAGT GGCGAAGGCG ACTCTCTGGT CTGTAACTGA
CGCTGAGGAG CGAAAGCGTG GGGAGCGAAC AGGATTAGAT ACCCTGGTAG
TCCACGCCGT AAACGATGAG TGCTAAGTGT TAGGGGGTTT CCGCCCCTTA
GTGCTGCAGC TAACGCATTA AGCACTCCGC CTGGGGAGTA CGGTCGCAAG
ACTGAAACTC AAAGGAATTG ACGGGGGCCC GCACAAGCGG TGGAGCATGT
GGTTTAATTC GAAGCAACGC GAAGAACCTT ACCAGGTCTT GACATCCTCT
GACAACCCTA GAGATAGGGC TTTCCCTTCG GGGACAGAGT GACAGGTGGT
GCATGGTTGT CGTCAGCTCG TGTCGTGAGA TGTTGGGTTA AGTCCCGCAA
CGAGCGCAAC CCTTGATCTT AGTTGCCAGC ATTCAGTTGG GCACTCTAAG
GTGACTGCCG GTGACAAACC GGAGGAAGGT GGGGATGACG TCAAATCATC
ATGCCCCTTA TGACCTGGGC TACACACGTG CTACAATGGA CAGAACAAAG
GGCTGCGAGA CCGCAAGGTT TAGCCAATCC CACAAATCTG TTCTCAGTTC
GGATCCCAGT CTGCAACTCG ACTGCGTGAA GCTGGAATCG CTAGTAATCG
CGGATCAGCA TGCCGCGGTG AATACGTTCC CGGGCCTTGT ACACACCGCC

รูปที่ 17 ลำดับเบส 16S rDNA ของแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (% similarity) ของลำดับเบส 16S rDNA ระหว่างแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001กับแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp.

Strains	%Similarity
	RMUT 001
1. *Bacillus aerophilus*	99.99
2. *Bacillus altitudinis*	99.99
3. *Bacillus stratosphericus*	99.99
4. *Bacillus pumilus*	93.00



รูปที่ 18 Phylogenetic tree ของแบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 ที่ได้จากการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA

4.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์5′-PDE ได้ดี โดยทำการทดสอบความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ พีเอช 4-8 และอุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว SCG บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์การเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE

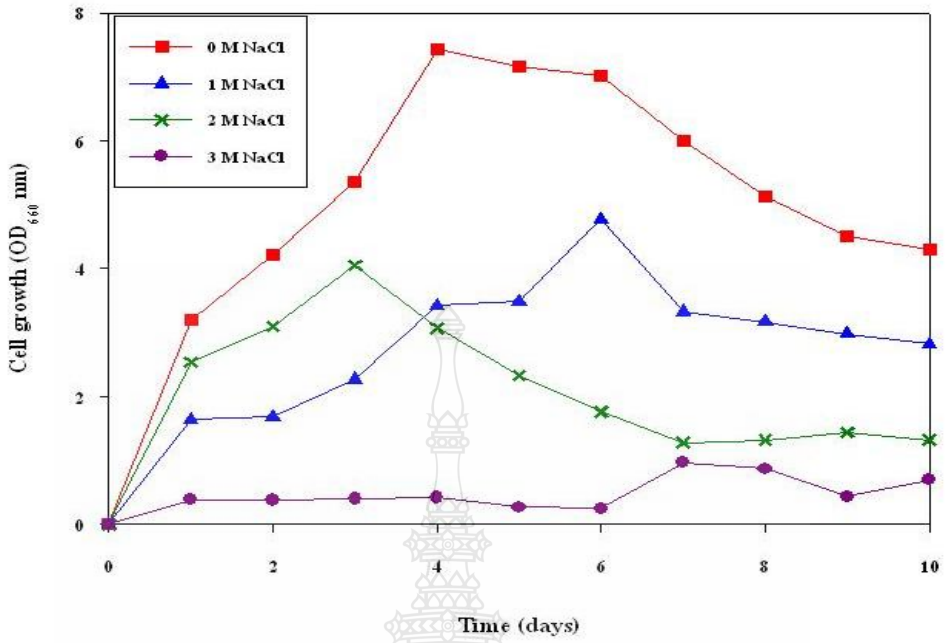
จากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001 สามารถเจริญได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือและที่มีเกลือความเข้มข้น 1.0-3.0 โมลาร์ โดยแบคทีเรียจะเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือ NaCl และการเจริญจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือ NaCl สูงขึ้น ดังผลการทดลองในรูปที่ 19 A จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001 เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียทนเกลือ (halotolerant bacteria) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการเกลือ NaCl สำหรับการเจริญ แต่สามารถทนต่อเกลือ NaCl และเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้นตั้งแต่ 2.5 โมลาร์ [42, 68] จากผลการทดลองจะสอดคล้องกับการศึกษาของ Ikeda [57] ซึ่งได้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสจากน้ำปลาไทย พบว่าแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ดังกล่าวได้สูงจะสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-4.0 โมลาร์ และเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียทนเกลือ

การศึกษาความเข้มข้นของเกลือ NaCl ต่อการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001 พบว่าแบคทีเรียสามารถที่จะผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี NaCl และไม่มีเกลือ NaCl โดยแบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ได้สูงที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือ NaCl ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีเกลือ NaCl แบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ได้ต่ำ ดังผลการทดลองในรูปที่ 19 B จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของเกลือ NaCl มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE โดยแบคทีเรียจะเจริญและผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ได้ดีที่สุดในสภาวะที่ไม่มีเกลือ NaCl ดังนั้นในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001 จะต้องเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือ NaCl จึงจะสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุด

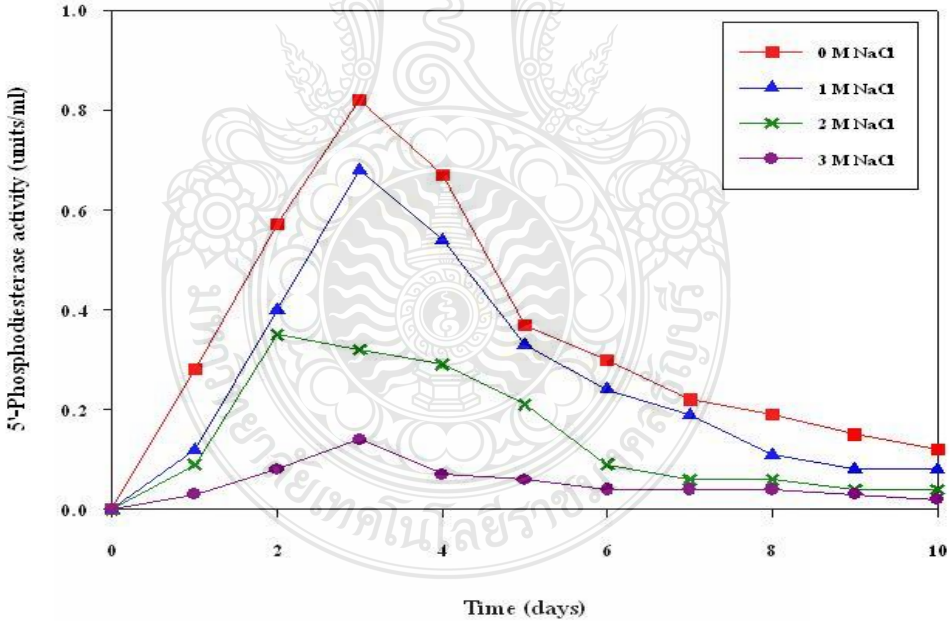
การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001 พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือ NaCl ที่มีพีเอชระหว่าง 4.0-8.0 โดยจะมีการเจริญดีที่สุดที่พีเอช 7.0 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 20 A สำหรับผลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE จะสอดคล้องกับ

ผลของพีเอชต่อการเจริญ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 20 B กล่าวคือแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในช่วงพีเอชระหว่าง 4.0-8.0 โดยจะมีการผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่พีเอช 7.0 และที่ระดับพีเอชสูงหรือต่ำกว่า 7.0 จะผลิตเอนไซม์ได้น้อย เนื่องจากเป็นระดับพีเอชที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001 แบคทีเรียจึงผลิตเอนไซม์ได้น้อยกว่าที่ระดับพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญ

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001 พบว่า พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือ NaCl พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิในช่วง 37-50 องศาเซลเซียส โดยจะมีการเจริญดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และการเจริญจะลดลงที่อุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่า 37 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 21 A สำหรับผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์คือ 37 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 21 B จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ที่อุณหภูมิต่ำหรือสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส การผลิตเอนไซม์จะได้น้อย เนื่องจากแบคทีเรียจะมีการเจริญต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นที่อุณหภูมิสูงเกินไป (40-50 องศาเซลเซียส) เอนไซม์ที่ผลิตเอนไซม์ได้อาจเกิดการเสียสภาพ ส่งผลให้เอนไซม์ที่ผลิตได้มีปริมาณต่ำ

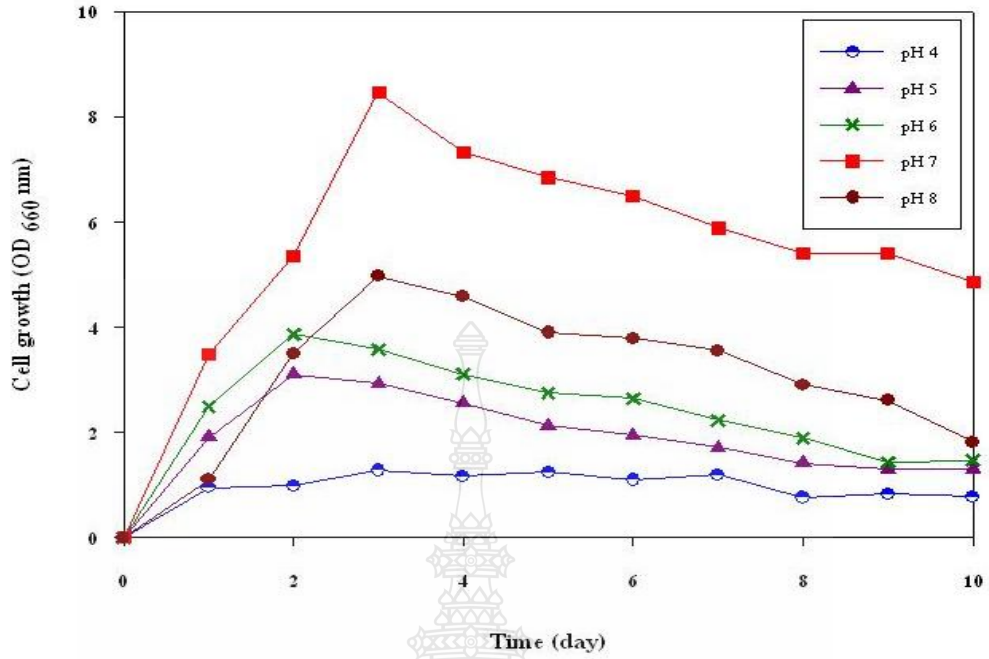


(A)

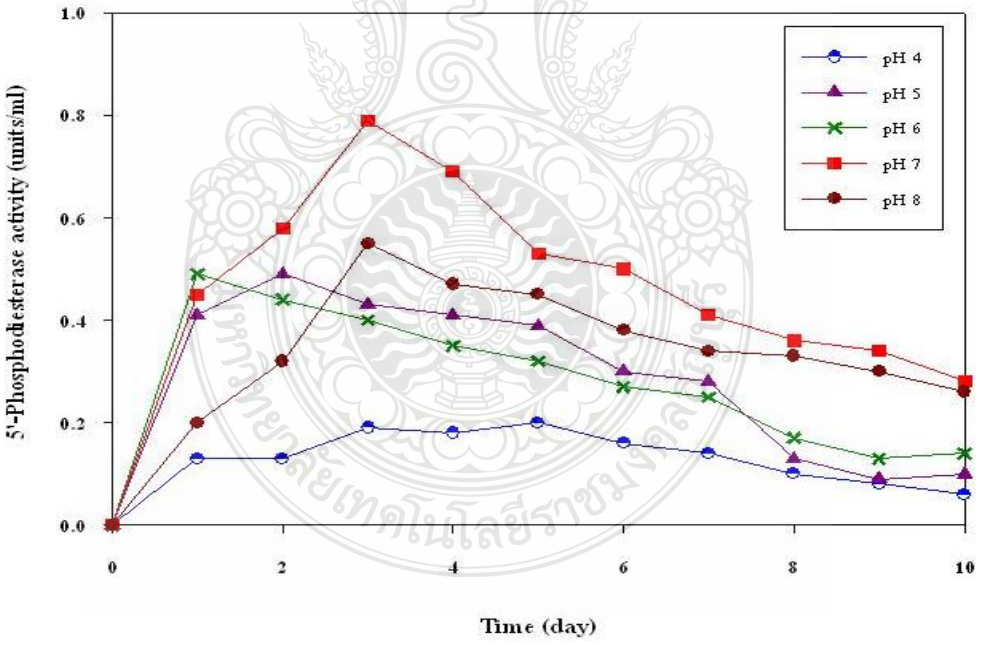


(B)

รูปที่ 19 ผลของความเข้มข้นของเกลือ NaCl ต่อการเจริญ (A) และการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE (B) ของแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001

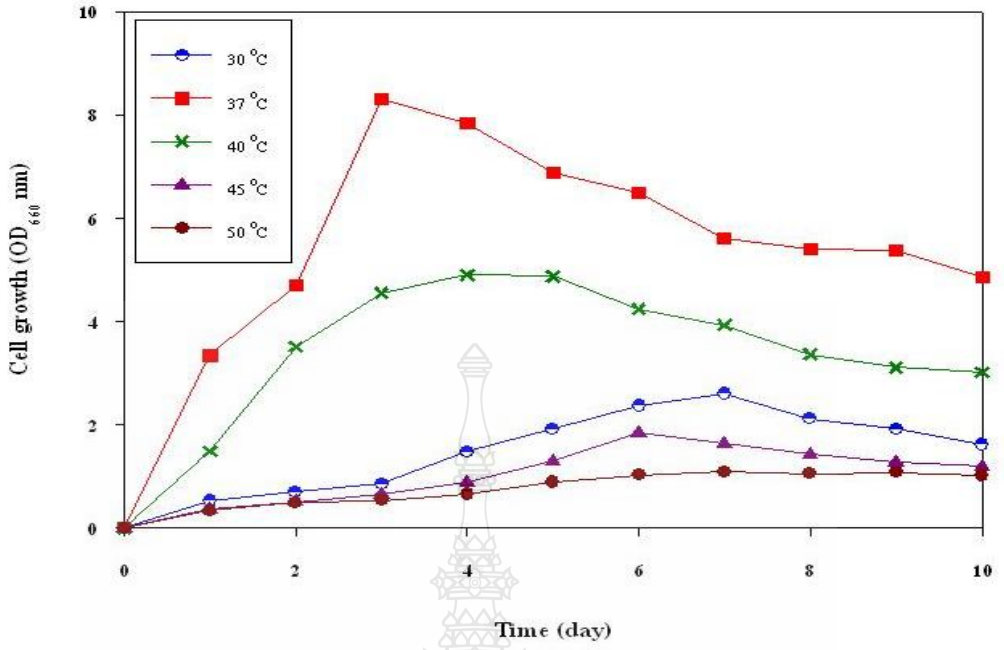


(A)

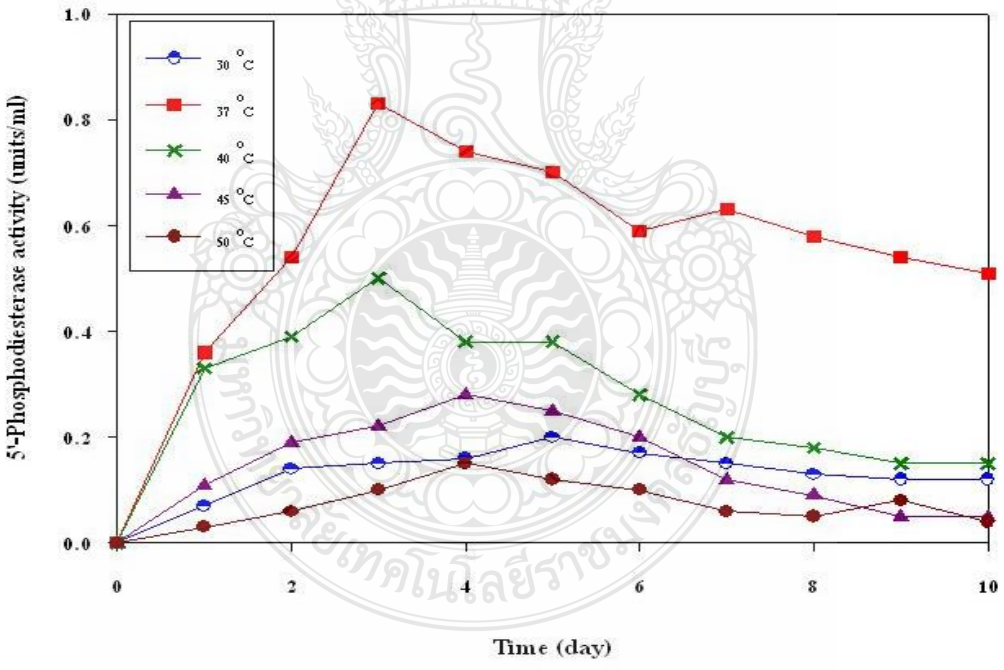


(B)

รูปที่ 20 ผลของพีเอชต่อการเจริญ (A) และการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE (B) ของแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001



(A)



(B)

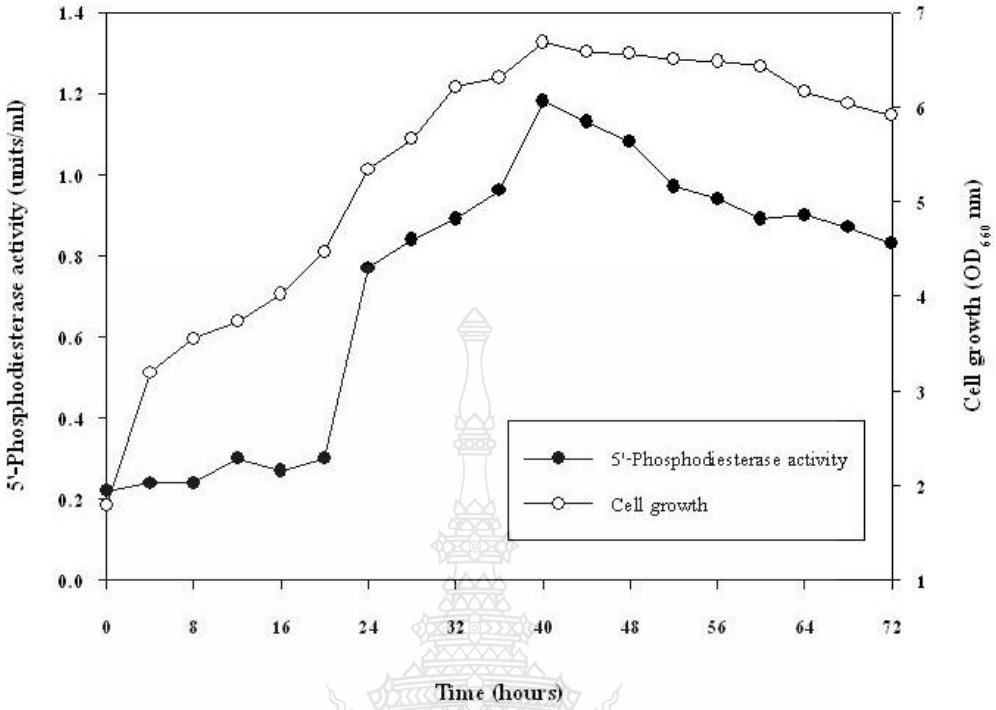
รูปที่ 21 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ (A) และการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE (B) ของแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001

4.6 การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ในถังหมัก

การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001 โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว SCG ในสภาวะที่ไม่มีเกลือ NaCl บ่มในถังหมักขนาด 5.0 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm (ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรน้ำหนัก/นาที) ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์การเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE

จากการทดลองพบว่า แบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001 มีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อทำการเพาะเลี้ยงนาน 18 ชั่วโมง จากนั้นการเจริญจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นและสูงสุดเมื่อการเพาะเลี้ยงเข้าสู่ชั่วโมงที่ 40 ชั่วโมง จากนั้นจะค่อยๆลดต่ำลงจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001 มีจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อทำการเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง จากนั้นจะค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้นและสูงสุดเมื่อการเพาะเลี้ยงเข้าสู่ชั่วโมงที่ 40 ชั่วโมง จากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์จะค่อยๆลดต่ำลงจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE เมื่อทำการเพาะเลี้ยงนาน 40 ชั่วโมง เท่ากับ 1.18 หน่วยต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 22

จากการทดลองพบว่า แบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001 มีรูปแบบการเจริญควบคู่ไปกับการผลิตในลักษณะที่เป็น growth link associate product formation โดยในขณะที่มีการเจริญจะมีการผลิตเอนไซม์ออกมาด้วย และจะมีการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเมื่อการเจริญอยู่ในระยะคงที่หรืออยู่ในระยะ stationary phase [69] การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001 ในระดับถังหมักมีการเจริญอย่างรวดเร็วและสามารถผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ได้สูงที่สุดและใช้ระยะเวลาในการผลิตเอนไซม์ที่สั้น เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การเพาะเลี้ยงในระดับถังหมักสามารถที่จะควบคุมปัจจัยต่างๆ ให้เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ได้ดีและคงที่ตลอดการเพาะเลี้ยงสิ้นสุดลงดีกว่าในระดับฟลาสก์



รูปที่ 22 การเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ของแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001 ในถังหมักขนาด 5.0 ลิตร

4.7 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ 5′-PDE

ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ 5′-PDE ที่ผลิตมาจากแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001 ในถังหมักขนาด 5.0 ลิตร โดยนำเอนไซม์ที่ผลิตได้มาทดสอบสมบัติของเอนไซม์ ดังนี้

4.7.1 การทดสอบพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE

การทดสอบพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE โดยทำการทดสอบช่วงพีเอชระหว่าง 4.0-12.0 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 23 A จากการทดลองพบว่า เอนไซม์ 5′-PDE สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 6.0 เอนไซม์จะสามารถทำงานได้ดีในช่วงที่ค่อนข้างกว้าง โดยทำงานได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมสูงสุดในในช่วงพีเอชระหว่าง 5.0-9.0 และจะพบว่าการทำงานของเอนไซม์จะลดลงในช่วงที่พีเอชมีความเป็นกรดและด่างสูง ๆ

4.7.2 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE

การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE โดยทำการทดสอบในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-80 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 6.0 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 23 B

จากการทดลองพบว่า เอนไซม์ 5′-PDE สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสามารถทำงานได้ดีในช่วงที่ค่อนข้างกว้าง โดยทำงานได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ของกิจกรรมสูงสุดในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 40-60 องศาเซลเซียส และจะพบว่าการทำงานของเอนไซม์จะลดลงในช่วงที่อุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส

4.7.3 การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ 5′-PDE ที่พีเอชต่างๆ

การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ 5′-PDE โดยทำการทดสอบช่วงพีเอชระหว่าง 4.0-12.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 24 A จากการทดลองพบว่าเอนไซม์ 5′-PDE มีความเสถียรได้สูงที่สุดที่พีเอช 4.0 โดยเอนไซม์ 5′-PDE จะมีความเสถียรได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมสูงสุดในช่วงพีเอชระหว่าง 4.0-9.0 และจะพบว่าการทำงานของเอนไซม์จะมีความเสถียรลดต่ำลงในช่วงที่พีเอชมีความเป็นด่างสูง ๆ

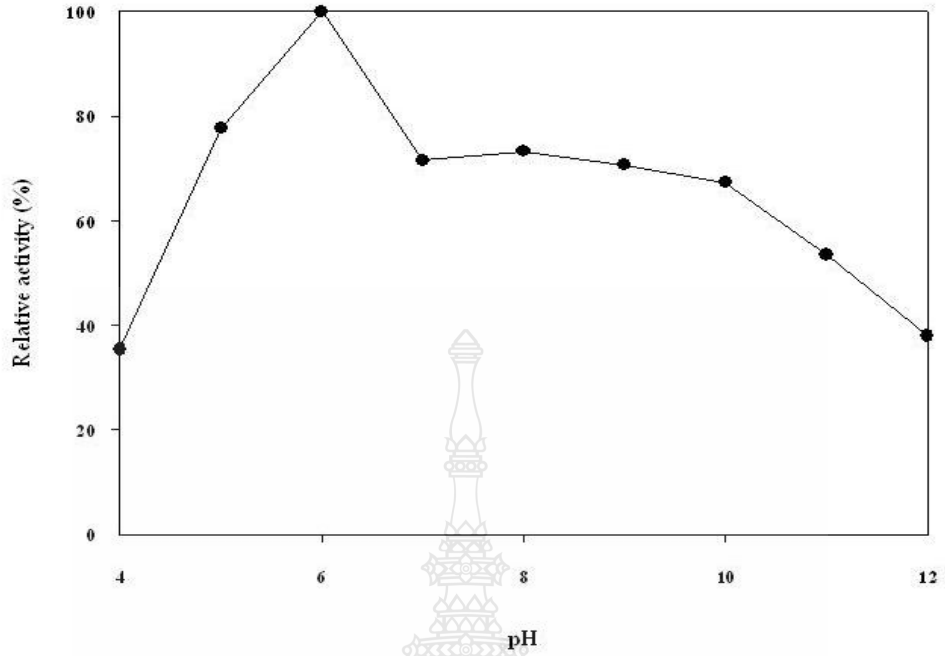
4.7.4 การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ 5′-PDE ที่อุณหภูมิต่างๆ

การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ 5′-PDE โดยทำการทดสอบในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 24 B จากการทดลองพบว่า เอนไซม์ 5′-PDE มีความเสถียรสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์ 5′-PDE จะมีความเสถียรได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมสูงสุด ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 40-50 องศาเซลเซียส และจะพบว่าการทำงานของเอนไซม์จะมีความเสถียรลดลงในช่วงที่อุณหภูมิสูงขึ้น

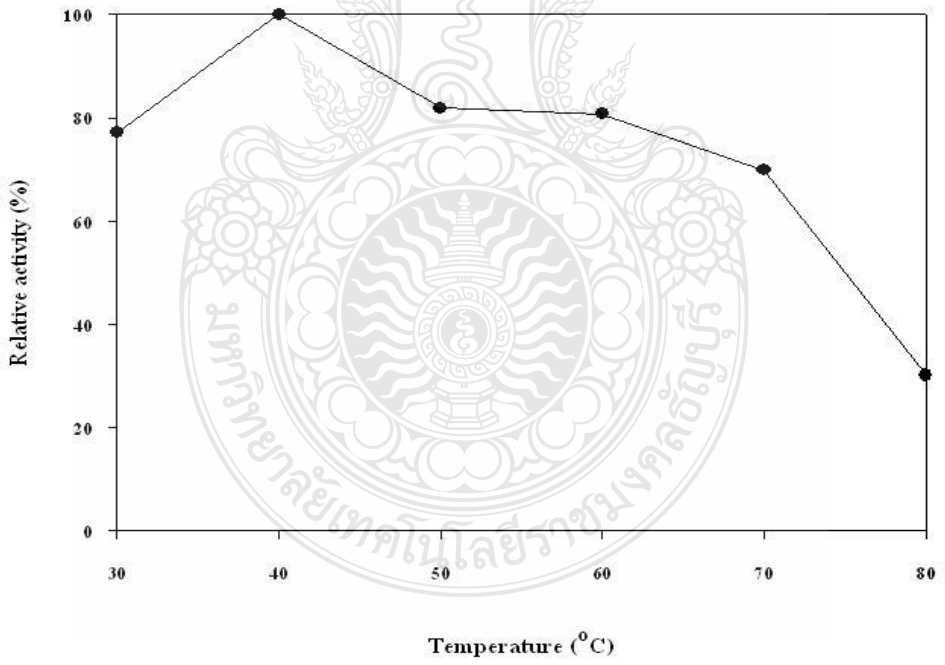
4.7.5 การทดสอบความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE

การทดสอบความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE โดยทำการทดสอบในสภาพเกลือ NaCl ระดับความเข้มข้น 0-4.0 โมลาร์ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 25 จากการทดลองพบว่า เอนไซม์ 5′-PDE สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของเกลือ NaCl 1.0 โมลาร์ โดยเอนไซม์ 5′-PDE จะสามารถทำงานได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมสูงสุดในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl ระหว่าง 0-1.0 โมลาร์ จากการทดลองนี้แสดงในเห็นว่าการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรียทนเกลือ *Bacillus altitudinis* RMUT 001 จะต้องการเกลือเพื่อให้การทำงานมีประสิทธิภาพสูงขึ้นหรือมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ที่ชอบเกลือ (halopholic enzyme) [70]

เอนไซม์ 5′-PDE จากเชื้อแบคทีเรียทนเกลือ *Bacillus altitudinis* RMUT 001 สามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีความเสถียรในช่วงพีเอชระหว่าง 4.0-9.0 และมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 40-50 องศาเซลเซียส เอนไซม์ 5′-PDE มีสมบัติเป็นเอนไซม์ที่ชอบเกลือ (halophilic enzyme) โดยสามารถทำงานได้ดีในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl เท่ากับ 1.0 โมลาร์ สมบัติดังกล่าวของเอนไซม์คล้ายกับเอนไซม์นิวคลีเอส H (nuclease H) จากเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นปานกลาง *Micrococcus varians* var. *halophilus* ซึ่งเป็นเอนไซม์นิวคลีเอสที่ชอบเกลือ (halophilic nuclease) ที่สามารถทำงานได้ดีในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl หรือ KCl ความเข้มข้น 1.0-4.0 โมลาร์ และสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย RNA และ DNA ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP [47, 48] และเอนไซม์นิวคลีเอสที่ชอบเกลือจากเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นปานกลาง *Bacillus* sp. N 23-2 ที่สามารถทำงานได้ดีในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl 1.4-3.2 โมลาร์ หรือเกลือ KCl 2.3-3.2 โมลาร์ และสามารถผลิตสารประกอบ 5′-โมโนนิวคลีโอไทด์จาก RNA และ DNA ได้ [5, 71]

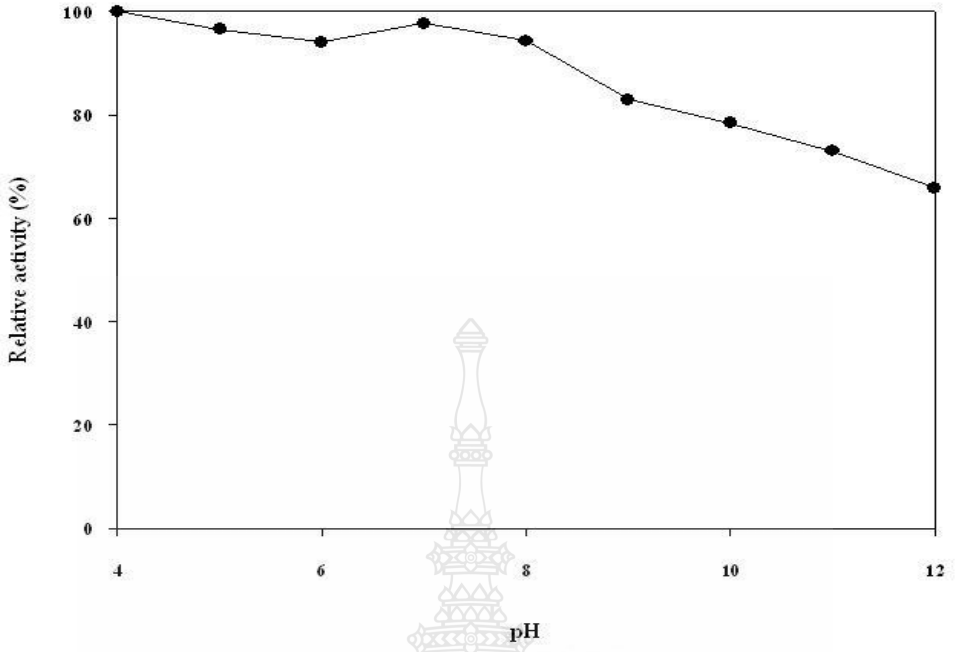


(A)

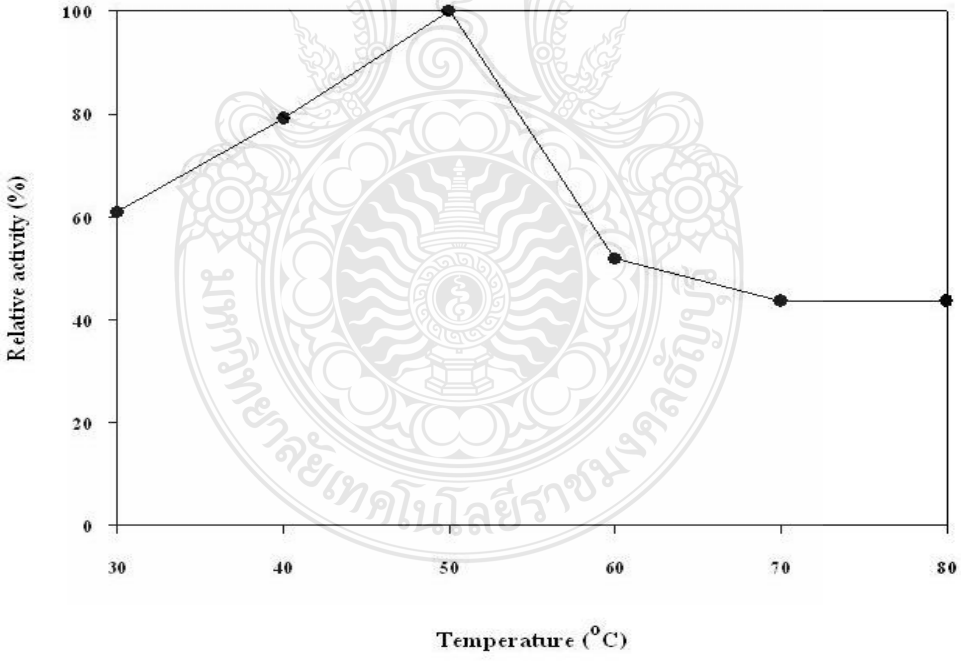


(B)

รูปที่ 23 ผลของพีเอช (A) และอุณหภูมิ (B) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001

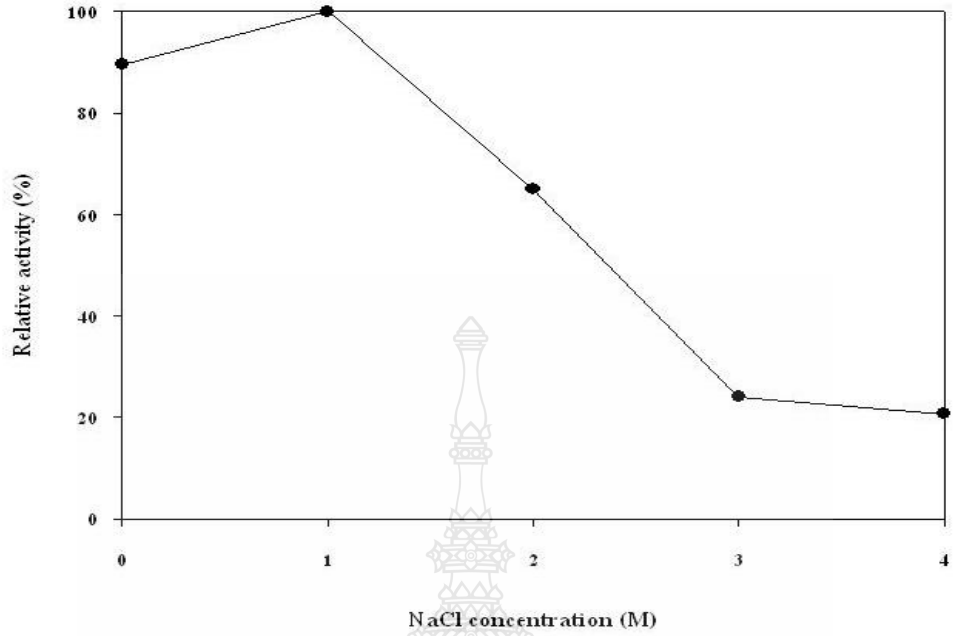


(A)



(B)

รูปที่ 24 ความเสถียรเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001 ที่พีเอช (A) และอุณหภูมิ (B) ต่างๆ



รูปที่ 25 ผลของความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001

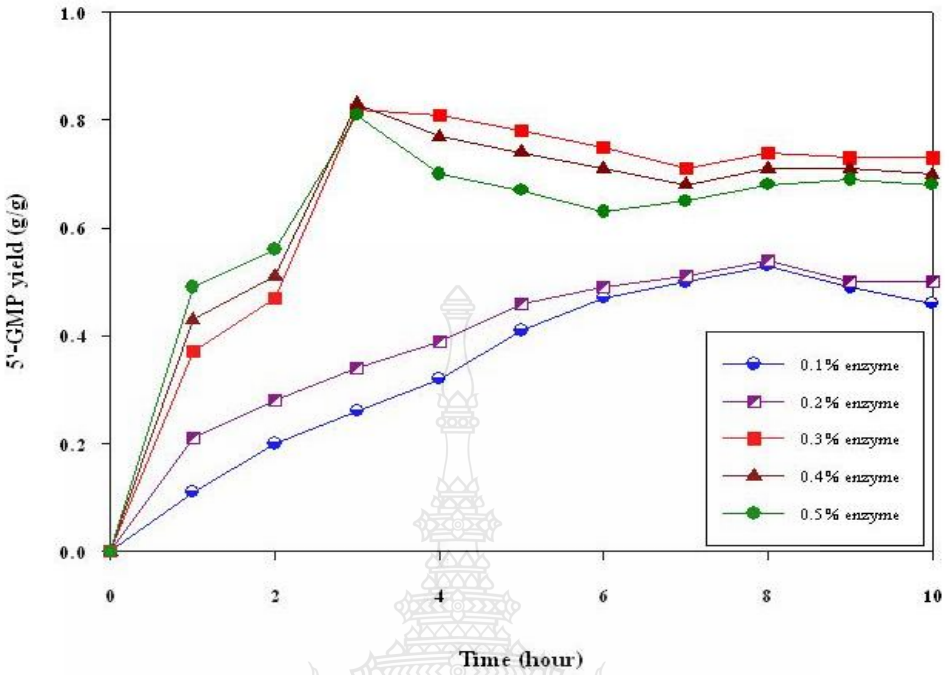
4.8 การศึกษาการผลิตสารประกอบกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต (guanosine 5′-monophosphate, 5′-GMP)

การศึกษาการผลิตสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP โดยการย่อยสลาย RNA ด้วยเอนไซม์ 5′-PDE ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 26 จากการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5′-PDE มีผลต่อปริมาณ 5′-GMP ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลาย RNA โดยจากการใช้เอนไซม์ความเข้มข้นสูง (0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์) จะทำให้เกิดปริมาณสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP สูงกว่าจากการใช้เอนไซม์ความเข้มข้นต่ำ (0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์) ปริมาณสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ที่เกิดขึ้นจะเพิ่มสูงขึ้น เมื่อระยะเวลาในการย่อยสลายนานขึ้น ในช่วงระยะเวลาการย่อยสลาย 0-3 ชั่วโมง ปริมาณสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว การใช้เอนไซม์ความเข้มข้นสูง (0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์) ปริมาณสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP จะเกิดขึ้นสูงที่สุดเมื่อทำการย่อยสลาย RNA ด้วยเอนไซม์ 5′-PDE เป็นเวลา

3 ชั่วโมง ส่วนการใช้เอนไซม์ความเข้มข้นต่ำ (0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์) จะต้องใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายนานกว่าเพื่อให้เกิดปริมาณสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP สูงที่สุด โดยจะใช้เวลาในการย่อยสลายถึง 8 ชั่วโมง การใช้เอนไซม์ 5′-PDE ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ จะได้ผลผลิตสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP เท่ากับ 0.53, 0.54, 0.82, 0.83 และ 0.81 กรัม/กรัม RNA ตามลำดับ

การวิเคราะห์อิทธิพลของการใช้เอนไซม์ 5′-PDE ในการย่อยสลาย RNA ต่อการเกิดสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomize Design, CRD) แบ่งการทดลองเป็น 5 การทดลอง (treatment) การทดลองละ 3 ซ้ำคือ การทดลองที่ 1 เติมเอนไซม์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ การทดลองที่ 2 เติมเอนไซม์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ การทดลองที่ 3 เติมเอนไซม์ 0.3 เปอร์เซ็นต์ การทดลองที่ 4 เติมเอนไซม์ 0.4 เปอร์เซ็นต์ และการทดลองที่ 5 เติมเอนไซม์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 10 จากผลการทดลองพบว่าปริมาณสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลาย RNA ของการทดลองที่เติมเอนไซม์ 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่จะแตกต่างจากการทดลองที่เติมเอนไซม์ 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยที่ปริมาณสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ที่เกิดขึ้นจากการทดลองที่เติมเอนไซม์ 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) การเติมเอนไซม์ 5′-PDE ที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นจะทำให้เกิดปริมาณสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP สูงขึ้นตามไปด้วย โดยปริมาณสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ในการทดลองที่เติมเอนไซม์ 0.4 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าสูงที่สุด แต่การเติมเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้เกิดปริมาณสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.01$) ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001 สำหรับย่อยสลาย RNA เพื่อผลิตสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP คือการใช้เอนไซม์ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์

จากการทดลองผลิตสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ด้วยการใช้เอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001 ย่อยสลาย RNA พบว่า การใช้เอนไซม์ความเข้มข้น 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ย่อยสลาย RNA เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะทำให้เกิดปริมาณสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ไม่แตกต่างกัน ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP จาก RNA คือ การใช้เอนไซม์ 5′-PDE ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ และใช้ระยะเวลาในการย่อยสลาย 3 ชั่วโมง



รูปที่ 26 ปริมาณสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลาย RNA ด้วยเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001

ตารางที่ 10 ปริมาณสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลาย RNA ด้วยเอนไซม์ 5′-PDE ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของเอนไซม์ (%)	ผลผลิต 5′-GMP[1/] (g/g)
0.1%	0.53[b]
0.2%	0.54[b]
0.3%	0.82[a]
0.4%	0.83[a]
0.5%	0.81[a]

หมายเหตุ [1/] = ตัวอักษรที่แตกต่างกันเหนือตัวเลขในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$)

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำปลาดิบที่หมักเป็นระยะเวลา 6 เดือน โดยใช้อาหารแข็ง Sehgal and Gibbons Complex (SGC) ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 0-3.0 โมลาร์ สามารถแยกแบคทีเรียได้จำนวน 14 ไอโซเลท จากการคัดเลือกแบคทีเรีย 14 ไอโซเลทเพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE บนอาหารแข็ง DNase test agar-methyl green และในอาหารเหลว SGC ที่เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์ พบว่า แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ได้สูงที่สุดคือ แบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไปจัดจำแนกโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมโดยเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rDNA กับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น พบว่า แบคทีเรียไอโซเลท RMUT 001 คือ *Bacillus altitudinis* แบคทีเรียดังกล่าวสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีและไม่มีเกลือ NaCl โดยแบคทีเรียจะเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือ ดังนั้นแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* จึงจัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียทนเกลือ (halotolerant bacteria)

แบคทีเรียทนเกลือ *Bacillus altitudinis* RMUT 001 สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว SGC ที่ไม่มีเกลือ NaCl เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว SGC ในถังหมักขนาด 5.0 ลิตร พบว่า แบคทีเรียดังกล่าวมีการผลิตเอนไซม์ควบคู่ไปกับการเจริญ มีการผลิตเอนไซม์สูงสุดเมื่อการเจริญเติบโตอยู่ในระยะคงที่หรืออยู่ในระยะ stationary phase และผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเท่ากับ 1.18 หน่วย/มิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 40 ชั่วโมง

เอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรียทนเกลือ *Bacillus altitudinis* RMUT 001 สามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีความเสถียรในช่วงพีเอชระหว่าง 4.0-9.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และมีความเสถียรในช่วงอุณหภูมิระหว่าง40-50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เอนไซม์ 5′-PDE มีสมบัติเป็นเอนไซม์ที่ชอบเกลือ (halophilic enzyme)โดยสามารถทำงานได้ดีที่สุดในสภาพที่มีความเข้มข้นเกลือ NaCl 1.0 โมลาร์

การผลิตสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์กัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต (guanosine 5′-monophosphate, 5′-GMP) จากกรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid, RNA) โดยใช้เอนไซม์ 5′-PDE พบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับผลิตสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP เท่ากับ 0.3 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ทำการย่อยเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะสามารถผลิตสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ได้ผลผลิตเท่ากับ 0.82 กรัม/กรัม RNA

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรมีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้สารละลายเอนไซม์ (crude enzyme solution) ที่เป็นสารละลายส่วนใส (cell-free supernatant) ซึ่งได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทนเกลือ *Bacillus altitudinis* RMUT 001 สำหรับผลิตสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP

5.2.2 ควรมีการศึกษาการผลิตสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ด้วยกระบวนการหมักจากเชื้อแบคทีเรียทนเกลือ *Bacillus altitudinis* RMUT 001 โดยตรง โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี RNA เป็นส่วนประกอบ

5.2.3 ควรมีการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการแยก การทำให้บริสุทธิ์ และการทำแห้งสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ที่ได้จากการย่อยสลาย RNA ด้วยเอนไซม์ 5′-PDE

บรรณานุกรม

[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 *Penicllium citrinum* 5′-phosphodiesterases," *Agric. Biol. Chem*., vol. 25, pp. 693-701, 1961.

[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] 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.

[6] A.G. Ebert, "The dietary administration of L-monosodium glutamate, DL-monosodium glutamate and L-glutamic acid rats," *Toxicol Lett*., vol. 3, pp. 71, 1979.

[7] ปรียา ลีฬหกุล, "โมโนโซเดียมกลูตาเมต มุมมองทางโภชนาการ," ใน *โมโนโซเดียมกลูตาเมต*. บรรหาร กออนันต์ และปรียา ลีฬหกุล, กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2550, 17-29.

[8] HB. Vickery, and C.LA. Schmidt, "The history of the discovery of the amino acids," *Chem. Rev.*, vol. 9, pp. 169-318, 1931.

[9] S. Kinoshita, S. Udaka, and M. Shimano, "Production of glutamic acid using whole and immobilized cell of *Corynebacterium glutamicum*," *J Gen. Appl. Microbiol.*, vol. 3, pp. 193-205, 1957.

[10] สุวิมล กีรติพิบูล, "กระบวนการผลิตโมโนโซเดียมกลูตาเมต หนึ่งในวัตถุเจือปนอาหาร," ใน *โมโนโซเดียมกลูตาเมต*. บรรหาร กออนันต์ และปรียา ลีฬหกุล, กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2550, 1-16.

[11] AN. Glazer, and N. Hiroshi, "Metabolites from microorganisms," in *Fundamentals of Applied Microbiology*. N. Glazer and N. Hiroshi, ed, W.H. Freeman and Company, 1995, pp. 393-430.

[12] A. White, P. Handler, and E.L. Smith, *Principles of Biochemistry*, 4th ed. New York : McGraw-Hill book Company, 1968.

[13] A.L. Lehninger, *Biochemistry : The molecular basis of cell structure and function,* New York : Worth Publishers, Inc., 1970.

[14] ธาดา สืบหลินวงศ์ และนวลทิพย์ กมลวารินทร์, *ชีวเคมีทางการแพทย์*, พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2542.

[15] ดาวัลย์ ฉิมภู่, *ชีวเคมี*, พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์วิทยาลัย, 2555.

[16] กัลยาณี สวรรยาวิสุทธิ์ และพจน์ ศรีบุญลือ, "กรดนิวคลิอิกและนิวคลีโอไทด์," ใน *ตำราชีวเคมี*. พจน์ ศรีบุญลือ พัชรี บุญศิริ ชฎามาศ พินิจสุนทร และเปรมใจ อารีจิตรานุสรณ์, พิมพ์ครั้งที่ 6. ขอนแก่น : ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2555, 163-165.

[17] W. Leuchtenberger, and K. Huthmacher, "Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol.69, pp. 1-8, 2005.

[18] H. Shimazono, "Distribution of 5′-ribonucleotides in food and their application to foods," *Food Technol.*, vol. 18, No. 3, pp. 294-303, 1964.

[19] T. Nagodawithana, "Yeast-derived flavors and flavor enhancers and their probable mode of action," *Food Technol*., vol. 46, pp. 138-140, 1992.

[20] วราวรณ์ วรเศวต, "การศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ปริมาณไรโบนิวคลีโอไทด์ในอาหารโดย HPLC," วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2526.

[21] F. Olmedo, F. Iturbe, J.G. Hernandez, and A.L. Munguia, "Continuous production of 5′-ribonucleotides from yeast RNA by hydrolysis with immobilized 5′-phosphodiesterase and 5′-adenylate deaminase," *World J. of Microbiol. Biotechnol*., vol. 10, pp. 36-40, 1994.

[22] G.S. Ahluwalia, J.L. Grem, Z. Hao, and D.A. Cooney, "Metabolism and action of amino acid analog anti-cancer agents," *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 46, No. 2, pp. 243-271, 1990.

[23] A. Kuninaka, "The Nucleotides, a Rationale of Research on Flavor Potentiation. Symposium on Flavor Potentiation," Arthur D. Little: MA: *Cambridge,* pp. 4-9, 1964.

[24] S. Kodama, "On a procedure for separating inosinic acid," *J Tokyo Chem. Soc*., vol. 34, pp. 51, 1913.

[25] A. Kuninaka, "Studies on taste of ribonucleic acid derivatives," *J Agric. Chem. Soc. Jpn*., vol. 34, pp. 49-439, 1960.

[26] S. Noguchi, G. Shimura, K. Kimura, and H. Samejima, "Production of 5′-mononucleotides using immobilized 5′-phosphodiesterase and 5′-AMP deaminase," *Jounal of Solid-Phase Biochemistry,* vol. 1, No. 2, pp. 105-118, 1976

[27] H. Kato, and T. Nishimura, "Taste components and conditioning of beef, pork and chicken," in *Umami: A Basic Taste*. Y. Kawamura, et al., Eds., New York : Marcel Dekker, 1987, pp. 289.

[28] P. Cairoli, S. Pieraccini, M. Sironi, C.F. Morelli, G. Speranza, and P. Manitto, "Studies on umami taste. Synthesis of new guanosine 5′-phosphate derivatives and their synergistic effect with monosodium glutamate," *J. Agric. Food Chem*., vol. 56, pp. 1043-1050, 2008.

[29] Y.H. Sugita, "Flavor Enhancers," in *Food Additives*. A.L. Branen, P.M. Davidson, and S. Salminen, Eds., Tokyo : Marcel Dekker, Inc., 1990, pp. 259-296.

[30] J. Zhao, and G.H. Fleet, "Degradation of RNA during the autolysis of *Saccharomyces cerevisiae* produces predominantly ribonucleotides," *J Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 32, pp. 415-423, 2005.

[31] วิเชียร กิจปรีชาวนิช, *สรีรวิทยาของจุลินทรีย์.* กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2539.

[32] เรืองลักขณา จามิกรณ์, *ชีวเคมี 2.* พิมพ์ครั้งที่ 7. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง, 2539.

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

[34] 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," *Ind. J. Biotechnol.*, vol. 10, pp. 502-507, 2010.

[35] Y.G. Qing, L.E. Shi, Y. Yu, T.Z. Xing, and C.J. Shu, "Production, purification and characterization of nuclease p1 from *Penicillium citrinum*," *Process Biochem*., vol. 41, pp. 1276-1281, 2006.

[36] J.C. Black, *Microbiology : Principle and Application*, 2nd ed. Prentice Hall, 1993.

[37] K. Ikeda, "On a new seasoning," *J Tokyo Chem Soc.,* vol 30, pp. 36-820, 1909.

[38] G. Wu, and IC. Kwan, "Helical structure of disodium 5′-guanosine monophosphate self-assembly in neutral solution," *Journal of American Chemical Society*, vol. 131, No. 9, pp. 3180-3182, 2009.

[39] สมใจ ศิริโภค, *จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม*. กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ, 2550.

[40] เสาวนีย์ ธรรมสถิติ, 2547. *แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพ เซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์*. นครปฐม : สถาบันพัฒนาสาธารณสุขอาเซี่ยน มหาวิทยาลัยมหิดล, 2547.

[41] J.G. Tortora, B.R. Funke, and C.L. Case, "Classification of microorganism," in *Microbiology An Introduction.* Benjamin/Cumminds, 5th ed. California, 1995, pp. 254-258.

[42] 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.

[43] F.R. Valera, "Halophilic Bacteria," in *Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments*. vol. 1, F.R. Valera (ed.)., Florida : CRC Press, Inc., 1988. pp. 3-30.

[44] A. Ventosa, and J.J. Nieto, "Biotechnological application and potentialities of halophilic microorganisms," *World J. Microbiol. Biotechnol.,* vol. 11, pp. 85-94, 1995.

[45] D.J. Kushner, and M. Kamekura, "Physiology of halophilic eubacteria," in *Halophilic Bacteria.* vol. 1, F.R. Valera, ed., Florida **:** CRC Press Inc., 1988, pp. 109-138.

[46] G. Speelmans, B. Poolman, and W.N. Konings, "Na^+ as coupling ion in energy transduction in extremophilic bacteria and archaea," *World J. Microbiol. Biotechnol.,* vol. 11, pp. 58-70, 1995.

[47] M. Kamekura, and H. Onishi, "Halophilic nuclease from a moderately halophilic *Micrococcus varians*," *J. Bacteriol,* vol. 119, No. 2, pp. 339-344, 1974.

[48] M. Kamekura, and H. Onishi, "Properties of the halophilic nuclease of a moderately halophile *Micrococcus varians* subsp. *halophilus*," *J. Bacteriol.,* vol. 133, No. 1, pp. 59-65, 1978.

[49] M. Kamekura, T. Hamakawa, and H. Onishi, "Application of halopilic nuclease H of *Micrococcus varians* subsp. *halophilus* to commercial production of flavoring agent 5′-GMP," *Appl. Environ. Microbiol.,* vol. 44, pp. 994-995, 1982.

[50] H. Onishi, T. Mori, S. Takeushi, K. Tani, T. Kobayashi, and K. Kamekura, "Halophilic nuclease of a moderately halophilic *Bacillus* sp. : Production, Purification and Characterization," *Appl. Environ. Microbiol*., vol. 45, No. 1, pp. 24-30, 1983.

[51] A. Ventosa, "General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms," in *Taxonomy of new species of moderately halophilic eubacteria*. F. Rodriguez-Valera, ed. New York : Plenum Press, 1991, pp. 45-51.

[52] H. Yokoi, T. Watanabe, and H. Onishi, "Simultaneous analysis of 5′-mononucleotides and nucleosides in saline solution by high performance liquid chromatography," *Agric. Biol. Chem*., vol. 51, pp. 3147-3149, 1987.

[53] M. Hayashi, J. Okumura, and E. Ichishima, "Enzymatic production of 5′-deoxyribonucleotides from salmon milt," *Food Research International,* vol. 29(8), pp. 751-755, 1996.

[54] P. Sombutyanuchit, M. Suphantharika, and C. Verduyn, "Preparation of 5′-GMP-rich yeast extracts from spent brewer's yeast," *World J. Microbiol. Biotechnol.,* vol. 17, pp. 163-168, 2001.

[55] S. Beluhan, I. Karmelic, S. Novak, and V. Maric, "Partial purification and biochemical characterization of alkaline 5′-phosphodiesterase from barley malt sprouts," *Biotechnol. Lett.*, vol. 25, pp. 1099-2003, 2003.

[56] 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.

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

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

[59] N.R. Krieg, and J.G. Holt, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, Baltimore : Willoams & Wilkins, 1984.

[60] P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2**,** Baltimore : Williams & Wilkins, 1986.

[61] B.B. Enne, and R.B. Rijkelt, "Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms," *Int. J. Food Microbiol.*, vol 50, pp. 119-130, 1999.

[62] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and N.J. Randall, "Protein measurement with the folin phenol reagent," *J. Biol. Chem.*, vol. 193, pp. 265-275, 1951.

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

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

[65] S. Shivaji, P. Chaturvedi, K. Suresh, G. S. N. Reddy, C.B.S. Dutt, M. Wainwright, J.V. Narlikar, and P. M. Bhargava, "*Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.,* vol. 56, pp. 1465–1473, 2006.

[66] P. Suntinanalert, "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, 1978.

[67] มัทนา แสงจินดาวงษ์ และสมศักดิ์ วินิจนันทรัตน์, "การศึกษาชนิดและปริมาณแบคทีเรียในระยะต้นของการทำน้ำปลา," *วารสารประมง*, 33(1), 69-72, 2527.

[68] M.J. Garabito, M.C. Maquez, and A. Ventosa, “Halotolerant *Bacillus* diversity in hypersaline Environments,” *Can. J. Microbiol.,* vol. 44, pp 95-102, 1998.

[69] 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.

[70] D. Madern, C. Ebel, and G. Zaccai, “Halophilic adaptation of enzymes,” *Extremophiles*, vol. 4, pp. 91-98, 2000.

[71] A. Ventosa, "General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms,” in *Taxonomy of new species of moderately halophilic eubacteria*. F. Rodriguez-Valera, ed., New York : Plenum Press, 1991, pp. 45-51.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Sehgal and Gibbons Complex (SGC) medium

Casamino acids	7.5	กรัม
Yeast extract	10.0	กรัม
KCl	2.0	กรัม
Sodium citrate	3.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	20.0	กรัม
$FeCl_2.7H_2O$	0.01	กรัม
Agar	18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอช 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Bacto DNase test medium

Bacto tryptose	20.0	กรัม
Deoxyribonucleic acid	2.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Bacto agar	15.0	กรัม
Methyl green	0.05	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
สารเคมีและวิธีการที่ใช้ในการทดสอบเชื้อ

1. สีที่ใช้ย้อมแกรม

1.1 Ammonium oxalate crystal violet

Crystal violet	2.0	กรัม
Ethanol 95%	20.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งสองให้เข้ากัน แล้วเติม ammonium oxalate aqueous solution เข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ลงไป 80 มิลลิลิตร

1.2 Gram's iodine

Crystal's iodine	1.0	กรัม
Potassium iodine	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300	กรัม

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน แล้วเก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล เพื่อป้องกันแสง ถ้าเก็บไว้นานจนสารละลายเป็นสีเหลืองไม่ควรนำไปทดสอบ

1.3 Ethanol 95%

เมื่อต้องการนำไปใช้ให้เจือจางลงด้วยน้ำกลั่น

1.4 Safranin water solution

สารละลาย safranin	10	มิลลิลิตร
(2.5% ของ safranin ละลายใน ethanol 95%)		
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย safranin กับน้ำกลั่นให้เข้ากัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองก่อนนำมาใช้

2. วิธีย้อมแกรม

ทำการ smear เชื้อแบคทีเรียที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง ลงบนสไลด์ที่สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสไลด์มาลนไฟให้เปลวไฟผ่านใต้สไลด์ตรงรอย smear อย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง หยดสี crystal violet ให้ท่วมบริเวณ smear เป็นเวลา 1 นาที เทสีล้างด้วยน้ำเล็กน้อย หยด gram's iodine ให้ท่วม smear ทิ้งไว้นาน 1 นาที เทไอโอดีนทิ้ง ล้างด้วยน้ำแล้วจึงหยดด้วย 95% ethanol ประมาณ 15-20 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำทันที ซับด้วยกระดาษซับ แล้วจึงหยดสี safranin water solution ลงบริเวณ smear นาน 1 นาที เทสีทิ้ง ซับด้วยกระดาษซับให้แห้ง แล้วจึงนำไปส่องตรวจดูลักษณะรูปร่าง การติดสี แกรม และการเรียงตัวของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์

ภาคผนวก ค
การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

1. สารละลาย Acetate buffer

Solution A : 0.04 M acetic acid (CH_3COOH เข้มข้น ปริมาตร 2.30 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร)

Solution B : 0.04 M sodium acetate ($CH_3COONa.3H_2O$ 5.44 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ

2. สารละลาย Tris-acetate buffer

Solution A : 0.04 M acetic acid (CH_3COOH เข้มข้น ปริมาตร 2.30 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร)

Solution B : 0.04 M Tris-(hydroxymethyl)aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$ 4.84 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ

3. สารละลาย Tris-HCl buffer

Solution A : 0.04 M hydrochloric acid (HCl ปริมาตร 3.45 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร)

Solution B : 0.04 M Tris-(hydroxymethyl)aminomethane ($C_4H_{11}NO_3$ 4.84 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ

4. สารละลาย Glycine-NaOH buffer

Solution A : 0.04 M glycine (NH_2CH_2COOH 3.00 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร)

Solution B : 0.04 M sodium hydroxide (NaOH 1.60 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ

ภาคผนวก ง
วิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรส

1.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1.1.1 สารละลายกรดไรโบนิวคลีอิก (RNA solution) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยละลายกรดไรโบนิวคลีอิก (ribonucleic acid) 0.1 กรัม เกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 11 กรัม และแมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.25 กรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 0.04 โมลาร์ ที่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอช 7

1.1.2 เอทานอล ความเข้มข้น 99.8 เปอร์เซ็นต์

1.2 วิธีวิเคราะห์

1.2.1 ดูดสารละลายกรดไรโบนิวคลีอิก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง นำไปบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

1.2.2 ดูดสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง

1.2.3 หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยเอทานอลความเข้มข้น 99.8เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อ่างน้ำแข็ง (ice-bath) นาน 20 นาที

1.2.4 นำไปปั่นเหวี่ยงแยกตะตอนออกที่ความเร็ว 6,000รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

1.2.5 นำส่วนใสที่ได้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปผสมกับน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร

1.2.6 ชุดควบคุม (control) จะบ่มเฉพาะสารละลายกรดไรโบนิวคลีอิก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงดูดสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วตามด้วยเอทานอลความเข้มข้น 99.8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ลงไป เพื่อหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ทันที ตั้งทิ้งไว้ที่อ่างน้ำแข็ง นาน 20 นาที จากนั้นจึงดำเนินวิธีการตามข้อ 1.2.4-1.2.5

1.3 วิธีการคำนวณ

กำหนดให้ 1 หน่วยของกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 1 เท่า ภายใต้สภาวะที่ใช้วิเคราะห์

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)} = \frac{A - B}{B} \times \text{อัตราการเจือจาง}$$

หมายเหตุ ค่า A คือ ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

ค่า B คือ ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม (control)

2. การวิเคราะห์โปรตีน

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

2.1.1 สารละลาย A : ละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) 0.5 กรัมและโซเดียมซิเตรท ($C_6H_5O_7Na_3$) 1 กรัม ในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2.1.2 สารละลาย B : ละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 20 กรัม และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 4 กรัม ในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

2.1.3 สารละลาย C : ผสมสารละลายB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กับสารละลาย A ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (เตรียมแล้วใช้ทันที)

2.1.4 สารละลาย D : ผสมสารละลาย Folin-Ciocalteau ปริมาตร 10 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (เตรียมแล้วใช้ทันที)

2.1.5 สารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2 การเตรียม standard protein curve

2.2.1 นำสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลาย C ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5-10 นาที

2.2.2 เติมสารละลาย D ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20-30 นาที

2.2.3 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ชุดควบคุมให้ใช้น้ำกลั่น

2.2.4 เขียนกราฟ standard protein curve ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร กับค่าความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin

2.3 เตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นโปรตีนไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.3.1 ดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับการเตรียม standard protein curve

2.3.2 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ไปเทียบหาปริมาณโปรตีนจากกราฟ standard protein curve

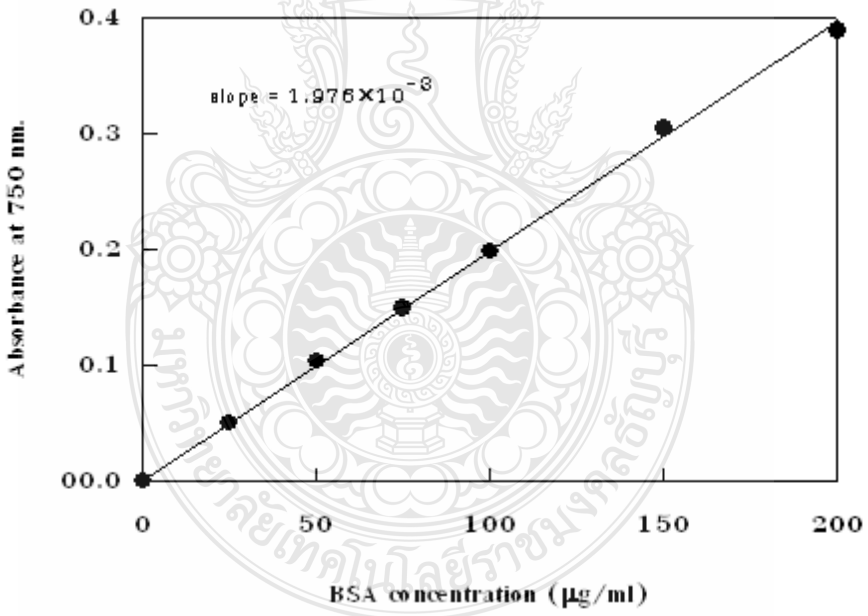
2.4 การคำนวณ

ความเข้มข้นโปรตีน (มิลลิกรัม/ลิตร)

$$= \frac{\text{(ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร)} \times \text{(อัตราการเจือจาง)}}{\text{(ความชันของกราฟมาตรฐาน)}}$$

ตารางที่ 11 การเตรียมสารละลายมาตรฐานโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นโปรตีน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	สารละลายมาตรฐานโปรตีน (ไมโครลิตร)
0	500	0
25	437.5	62.5
50	375	125
75	312.5	187.5
100	250	250
150	125	375
200	0	500



รูปที่ 27 กราฟมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA)

3. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี HPLC

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 เครื่องควบคุมระบบ (system controller) Shimadzu LC-3A

3.1.2 คอลัมน์ Lichrospher 100 NH_2 (E. Merck) ขนาด 25×0.4 เซนติเมตร

3.1.3 LDC 4100 spectrophotometer monitor

3.1.4 Shimadzu LC-3A High Performance Liquid Chromatography

3.1.5 Shimadzu GR 1A integrator

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.2.1 สารละลายมาตรฐานกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต (guanosine 5′-monophosphate; 5′-GMP) เตรียมให้มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำกลั่น กรองด้วยกระดาษกรอง (membrane filter) ขนาดรู 0.45 ไมครอน

3.2.2 วัฏภาคเคลื่อนที่ เตรียมโดยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Na_2HPO_4-NaH_2PO_4) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 5 และเมธานอล (methanol) อัตราส่วน 90 ต่อ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) กรองด้วยกระดาษกรองขนาดรู 0.45 ไมครอน ทำการไล่อากาศออกด้วยเครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 15 นาที

3.3 วิธีวิเคราะห์

3.3.1 ตั้งค่าตัวแปรต่างๆ ของเครื่องควบคุมระบบ (system controller) Shimadzu LC 3A อัตราการไหล (flow rate) 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ oven 30 องศาเซลเซียส

3.3.2 ตั้งค่าความยาวคลื่นของ LDC 4100 spectrophotometer monitor ให้เท่ากับ 254 นาโนเมตร

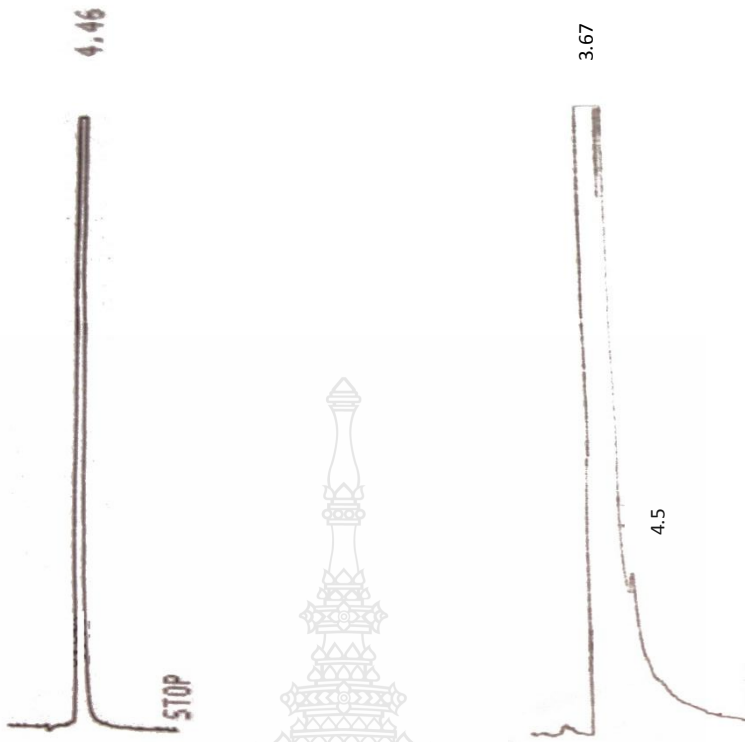
3.3.3 ฉีดสารละลายมาตรฐานปริมาตร 10 ไมโครลิตร ตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ด้วยแรงดันสูงจากปั๊ม เมื่อสารตัวอย่างเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์จะเกิดการดูดกลืนคลื่นแสงของสารที่เคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์และส่งสัญญาณไปที่เครื่องรวบรวมสัญญาณ (integretor) แสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม ซึ่งแสดงเวลาที่ตัวอย่างสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ถูกหน่วงอยู่ในคอลัมน์ (retention time) และพื้นที่ใต้กราฟโครมาโทแกรมของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP โดยเวลาที่ถูกหน่วงในคอลัมน์ของสารชนิดเดียวกันจะเท่ากัน ดังนั้นจึงใช้เวลาที่ถูกหน่วงในคอลัมน์เป็นตัวบ่งบอกสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ในตัวอย่างเปรียบเทียบกับเวลาของสารประกอบนิวคลีโอไทด์มาตรฐาน นำพื้นที่ใต้โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานที่ทำการฉีดที่ความเข้มข้น

ต่างๆ มาเขียนกราฟมาตรฐานเพื่อใช้หาความเข้มข้นของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ในตัวอย่าง

3.3.4 ฉีดสารตัวอย่างที่ได้เจือจางให้เหมาะสมที่ให้พื้นที่ใต้กราฟอยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน เปรียบเทียบระยะเวลาที่ถูกหน่วง (retention time) เพื่อหาชนิดสารประกอบนิวคลีโอไทด์กับเวลาที่ถูกหน่วงของสารประกอบนิวคลีโอไทด์มาตรฐาน และนำพื้นที่ใต้โครมาโทแกรมที่ได้มาทำการคำนวณความเข้มข้นของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ในตัวอย่าง

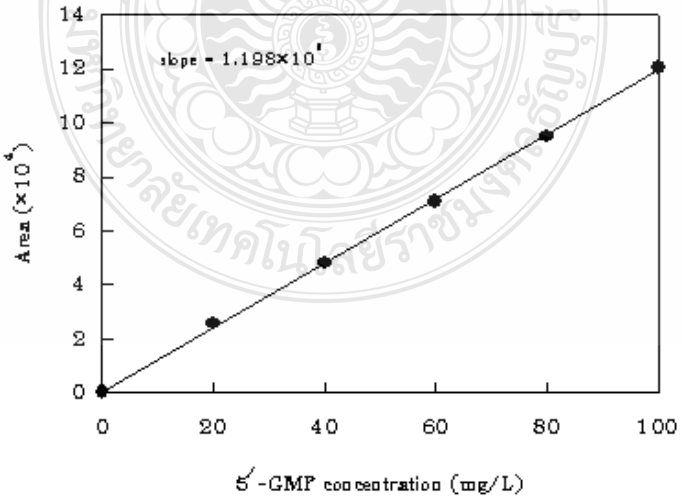
3.4 วิธีการคำนวณ

$$\text{ความเข้มข้น 5′-GMP (มก./มล.)} = \frac{(\text{พื้นที่ใต้โครมาโทแกรม}) \times (\text{การเจือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน})}$$



(A) (B)

รูปที่ 28 โครมาโทแกรมของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP มาตรฐาน (A) และสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ที่ได้จากการย่อยสลาย RNA ด้วยเอนไซม์ 5′-PDE (B) (โดย Retention time 4.46 (A) และ 4.50 (B) คือ 5′-GMP)



รูปที่ 29 กราฟมาตรฐานสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP

ภาคผนวก จ

ผลการทดลอง

ตารางที่ 12 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรียที่แยกจากน้ำปลาบนอาหารแข็งที่เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์

NaCl (M)	Isolate no.	Clear zone (A) (mm)	Colony size (B) (mm)	A/B ratio (mm/mm)
0	RMUT 001	10.00	5.00	2.00
	RMUT 002	15.00	10.00	1.50
1	RMUT 101	18.00	15.00	1.20
	RMUT 102	14.00	10.00	1.40
	RMUT 103	13.00	10.00	1.30
	RMUT 105	-	-	-
2	RMUT 201	19.00	15.00	1.27
	RMUT 202	-	-	-
	RMUT 203	18.00	14.00	1.29
	RMUT 204	10.00	8.00	1.25
	RMUT 205	-	-	-
3	RMUT 301	12.00	9.00	1.33
	RMUT 303	-	-	-
	RMUT 304	10.00	8.00	1.25

ตารางที่ 13 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ของแบคทีเรียในอาหารเหลว SGC ที่เติมเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0-3.0 โมลาร์

Bacterial isolates	**กิจกรรมเอนไซม์ 5′-PDE (หน่วย/มิลลิลิตร)**
RMUT 001	0.83
RMUT 002	0.67
RMUT 101	0.33
RMUT 102	0.54
RMUT 103	0.40
RMUT 201	0.21
RMUT 203	0.29
RMUT 204	0.32
RMUT 301	0.14
RMUT 304	0.08

ตารางที่ 14 ผลของความเข้มข้นเกลือ NaCl ต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001

เวลา (วัน)	การเจริญของเซลล์ (OD_{660} nm)			
	0 M NaCl	**1 M NaCl**	**2 M NaCl**	**3 M NaCl**
0	0.00	0.00	0.00	0.00
1	3.20	1.64	2.54	0.39
2	4.22	1.68	3.10	0.38
3	5.36	2.27	4.05	0.40
4	7.44	3.42	3.07	0.42
5	7.17	3.48	2.33	0.27
6	7.02	4.77	1.76	0.25
7	6.01	3.33	1.28	0.97
8	5.13	3.17	1.32	0.87
9	4.50	2.98	1.44	0.44
10	4.31	2.82	1.32	0.70

ตารางที่ 15 ผลของความเข้มข้นเกลือ NaCl ต่อการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ของแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001

เวลา (วัน)	กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE (หน่วย/มิลลิลิตร)			
	0 M NaCl	**1 M NaCl**	**2 M NaCl**	**3 M NaCl**
0	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.28	0.12	0.09	0.03
2	0.57	0.40	0.35	0.08
3	0.82	0.68	0.32	0.14
4	0.67	0.54	0.29	0.07
5	0.37	0.33	0.21	0.06
6	0.30	0.24	0.09	0.04
7	0.22	0.19	0.06	0.04
8	0.19	0.11	0.06	0.04
9	0.15	0.08	0.04	0.03
10	0.12	0.08	0.04	0.02

ตารางที่ 16 ผลของพีเอชต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001

เวลา (วัน)	การเจริญของเซลล์ (OD_{660} nm)				
	pH 4	**pH 5**	**pH 6**	**pH 7**	**pH 8**
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.95	1.91	2.49	3.49	1.11
2	0.99	3.10	3.86	5.34	3.50
3	1.28	2.94	3.58	8.45	4.97
4	1.17	2.56	3.10	7.31	4.58
5	1.24	2.13	2.75	6.84	3.90
6	1.10	1.94	2.64	6.48	3.78
7	1.19	1.72	2.23	5.88	3.55
8	0.76	1.42	1.89	5.41	2.90
9	0.83	1.31	1.43	5.41	2.61
10	0.78	1.31	1.47	4.85	1.81

ตารางที่ 17 ผลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ของแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001

เวลา (วัน)	กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE (หน่วย/มิลลิลิตร)				
	pH 4	**pH 5**	**pH 6**	**pH 7**	**pH 8**
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.13	0.41	0.49	0.45	0.20
2	0.13	0.49	0.44	0.58	0.32
3	0.19	0.43	0.40	0.79	0.55
4	0.18	0.41	0.35	0.69	0.47
5	0.20	0.39	0.32	0.53	0.45
6	0.16	0.30	0.27	0.50	0.38
7	0.14	0.28	0.25	0.41	0.34
8	0.10	0.13	0.17	0.36	0.33
9	0.08	0.09	0.13	0.34	0.30
10	0.06	0.10	0.14	0.28	0.26

ตารางที่ 18 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001

เวลา (วัน)	การเจริญของเซลล์ (OD_{660} nm)				
	30 °C	**37 °C**	**40 °C**	**45 °C**	**50 °C**
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.53	3.34	1.49	0.36	0.34
2	0.70	4.70	3.51	0.51	0.49
3	0.86	8.31	4.55	0.65	0.54
4	1.48	7.84	4.90	0.89	0.66
5	1.92	6.88	4.87	1.30	0.89
6	2.37	6.48	4.24	1.84	1.03
7	2.60	5.60	3.93	1.64	1.09
8	2.12	5.41	3.36	1.43	1.05
9	1.92	5.37	3.11	1.28	1.08
10	1.62	4.85	3.02	1.20	1.02

ตารางที่ 19 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ของแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001

เวลา (วัน)	กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE (หน่วย/มิลลิลิตร)				
	30 °C	**37 °C**	**40 °C**	**45 °C**	**50 °C**
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.07	0.36	0.33	0.11	0.03
2	0.14	0.54	0.39	0.19	0.06
3	0.15	0.83	0.50	0.22	0.10
4	0.16	0.74	0.38	0.28	0.15
5	0.20	0.70	0.38	0.25	0.12
6	0.17	0.59	0.28	0.20	0.10
7	0.15	0.63	0.20	0.12	0.06
8	0.13	0.58	0.18	0.09	0.05
9	0.12	0.54	0.15	0.05	0.08
10	0.12	0.51	0.15	0.05	0.04

ตารางที่ 20 การเจริญและการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ของแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	การเจริญของเซลล์ (OD_{660} nm)	กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE (หน่วย/มิลลิลิตร)
0	1.79	0.22
4	3.19	0.24
8	3.55	0.24
12	3.73	0.30
16	4.02	0.27
20	4.47	0.30
24	5.34	0.77
28	5.66	0.84
32	6.21	0.89
36	6.31	0.96
40	6.68	1.18
44	6.58	1.13
48	6.56	1.08
52	6.50	0.97
56	6.48	0.94
60	6.43	0.89
64	6.16	0.90
68	6.03	0.87
72	5.91	0.83

ตารางที่ 21 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001

พีเอช	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
4.0	35.34
5.0	77.59
6.0	100.00
7.0	71.55
8.0	73.28
9.0	70.69
10.0	67.24
11.0	53.44
12.0	37.93

ตารางที่ 22 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001

อุณหภูมิ (°C)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
30	77.11
40	100.00
50	81.93
60	80.72
70	69.88
80	30.12

ตารางที่ 23 ความเสถียรของเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001 ที่พีเอชต่างๆ

พีเอช	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
4.0	100.00
5.0	96.59
6.0	94.09
7.0	97.73
8.0	94.32
9.0	82.95
10.0	78.41
11.0	72.95
12.0	65.82

ตารางที่ 24 ความเสถียรของเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001 ที่อุณหภูมิต่างๆ

อุณหภูมิ (°C)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
30	60.91
40	79.09
50	100.00
60	51.82
70	43.64
80	43.64

ตารางที่ 25 ผลของความเข้มข้นเกลือ NaCl ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* RMUT 001

ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ (โมลาร์)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
0	89.57
1	100.00
2	65.00
3	24.00
4	20.71

ตารางที่ 26 ปริมาณสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ที่ได้จากการย่อยสลาย RNA ด้วยเอนไซม์ 5′-PDE ความเข้มข้นต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณของ 5′-GMP (mg/L)				
	ความเข้มข้นของเอนไซม์				
	0.1%	**0.2%**	**0.3%**	**0.4%**	**0.5%**
1	0.11	0.21	0.37	0.43	0.49
2	0.20	0.28	0.47	0.51	0.56
3	0.26	0.34	0.82	0.84	0.81
4	0.32	0.39	0.80	0.77	0.70
5	0.41	0.46	0.78	0.74	0.67
6	0.47	0.49	0.75	0.71	0.73
7	0.50	0.49	0.71	0.68	0.65
8	0.53	0.54	0.74	0.71	0.68
9	0.49	0.50	0.73	0.71	0.69
10	0.46	0.50	0.73	0.70	0.68

ภาคผนวก ฉ
การวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ 27 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างปริมาณสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ที่ได้จากการย่อยสลาย RNA ด้วยเอนไซม์ 5′-PDE โดยใช้วิธี Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ F-test ทดสอบความมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Source	df	Sum of Square	Mean Square	F
Treatment	4	0.299	0.075	36.173*
Error	10	0.021	0.002	
Total	14	0.320		

หมายเหตุ * = แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาววัชรีวรรณ บุญส่งศรี
วัน เดือน ปีเกิด	22 มกราคม 2532
ที่อยู่	41/45 หมู่ 4 ต.เขาสามยอด อ.เมือง จ.ลพบุรี 15000
การศึกษา	วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี (พ.ศ. 2553)
เบอร์โทรศัพท์	08 6603 5659
อีเมล์	watcharewan_b@hotmail.com