ชื่อวิทยานิพนธ์	การย่อยสลายสีย้อมเอโซด้วยเอโซรีดักเทส (AzoR1) จากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ORB7106
ผู้เขียน	นางสาวสุกัลยา บริสุทธิ์
สาขาวิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2553

บทคัดย่อ

สีย้อมเอโซเป็นสารประกอบอะโรมาติกที่มีพันธะเอโซหนึ่งพันธะหรือมากกว่าในสูตรโครงสร้าง มักพบองค์ประกอบทางเคมีของสีเอโซที่ย่อยสลายได้ยากในน้ำทิ้งแม้หลังการบำบัดแล้ว จึงส่งผลให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ต่อมามีการศึกษาการควบคุมการแสดงออกของยีน *azoR1* ในแบคทีเรีย แกรมบวก *Bacillus subtilis* และพบว่ายีน *azoR1* สังเคราะห์เป็นโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโนคล้ายคลึงกันกับ FMN-dependent NADH-azoreductase ในการสร้างเอนไซม์ เอโซรีดักเทส เรียกว่า AzoR1 เอนไซม์เอโซรีดักเทส เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสีย้อมเอโซได้ โดยการตัดพันธะของหมู่เอโซ จากการวิเคราะห์โดยวิธีไมโครอาเรย์ และโปรติโอมิก พบว่า ยีน *azoR1* และโปรตีน AzoR1 มีปริมาณเพิ่มขึ้นใน *B. subtilis* ที่มีการกลายพันธุ์ของยีน *yodB* (ORB7106) ในการศึกษานี้ จึงเป็นการศึกษาความสามารถของ *B. subtilis* ORB7106 ในการย่อยสลายสีย้อมเอโซประเภท Azobenzene, Methyl red, Orange G และ Congo red ที่ความเข้มข้น 10- 200 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยศึกษาการย่อยสลายสีย้อมในสภาวะที่แตกต่างกันของอุณหภูมิ ตั้งแต่ 25-45 องศาเซลเซียส และ ที่พีเอช 5-9 บนอาหารแข็งและในอาหารเหลว จากการทดสอบบนอาหารแข็ง พบว่า *B. subtilis* ORB7106 สามารถเจริญและย่อยสลายสี Methyl red และ Congo red ได้ดี ที่ทุกความเข้มข้นสีสังเกตจากส่วนใสรอบโคโลนี การย่อยสลายสีย้อมในอาหารเหลว พบว่า *B. subtilis* ORB7106 สามารถย่อยสลายสี Methyl red และ Congo red ได้ถึง ร้อยละ 80.25-97.15 ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนสีย้อม Azobenzene และOrange G ย่อยสลายได้เพียงเล็กน้อย จากผลการย่อยสลาย พบว่า *B. subtilis* ORB7106 มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสีย้อมเอโซดีกว่า *B. subtilis* JH642 อย่างมีนัยสำคัญ โดย *B. subtilis* ORB7106 สร้างเอนไซม์เอโซรีดักเทส (AzoR1) ชนิด Intracellular enzyme ที่ต้องการ NADH เป็นโคแฟคเตอร์ในการย่อยสลายสีย้อม และพบว่า ประสิทธิภาพของเอนไซม์เอโซรีดักเทสเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อเลี้ยง *B. subtilis* JH642 ในสภาวะที่มีสี Methyl red เป็นตัวชักนำ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เอโซรีดักเทส (AzoR1) มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสีย้อม

Prince of Songkla University Pattani Campus

Thesis Title	Decolorization of Azo Dyes by Azoreductase (AzoR1) from *Bacillus subtilis* ORB7106
Author	Miss Sukallaya Borisut
Major Program	Applied Biology
Academic Year	2010

ABSTRACT

Azo dyes are aromatic compounds bearing one or more azo bonds with great structural variety. They are frequently found in a chemically unchanged form even after waste-water treatment, so they are regarded as pollutants. Recent studies uncovered the control of *azoR1* gene expression in Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. The *azoR1* gene encodes a putative FMN-dependent NADH-azoreductase referred to as AzoR1. Azoreductases have been characterized as enzymes that can decolorize azo dyes by reducing azo groups. The levels of *azoR1* transcription and AzoR1 protein synthesis in *yodB* mutant cells (*B. subtilis* ORB7106) were increased confirmed by microarray and proteomic analyses. This study demonstrated the ability of *B. subtilis* ORB7106 in decolorization of azo dyes over the wide range of dye concentrations (10-200 mg/L) pH (5-9) and temperatures (25-45°C) on both agar plates and liquid cultures. Appearance of clear zones around bacterial colonies due to the reduction of Methyl red and Congo red were observed on agar plates at 25-45°C and pH 5-9. In liquid culture, high decolorization efficiency (80.25-97.15%) was achieved within 48 hr of incubation for Methyl red and Congo red but decolorizing activities were limited for Azobenzene and Orange G. The decolorization efficacy of *B. subtilis* ORB7106 was significantly better than the wild type strain (*B. subtilis* JH642). AzoR1 was characterized as intracellular enzyme having the decolorizing activity of Methyl red in a NADH dependent manner. In addition, azoreductase activity was 2 folds increased when *B. subtilis* JH642 cell culture was induced by Methyl red. There data indicated that the observed dye decolorization was mainly due to degradation by AzoR1.

Prince of Songkla University Pattani Campus