รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การคัดเลือกเอนไซม์ชอบเกลือจากแบคทีเรียเพื่อใช้ในการพัฒนาอุตสาหกรรมบูดู

Screening of Halophilic Enzymes from Bacteria for the Application in Budu Industry

โดย

นางปรียานุช บวรเรืองโรจน์
นายณัฐพงษ์ บวรเรืองโรจน์
นางสาวสาวิตรี ดือราแม
ภาควิชาจุลชีวิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สัญญาเลขที่SCI52109900010S

บทคัดย่อ

จากการหมักบูดูที่ทำขึ้นเองภายในห้องปฏิบัติการโดยใช้ปลากะตักผสมกับเกลือในอัตราส่วนปลาต่อเกลือเท่ากับ 3:1 โดยน้ำหนัก บรรจุส่วนผสมลงในภาชนะ หมักตั้งไว้กลางแจ้งเป็นเวลานาน 9 เดือน เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนของแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ในระหว่างการหมักบูดู พบว่า จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดบนอาหาร Sehgal and Gibbons Complex (SGC) ที่มีการแปรผันความเข้มข้นเกลือ NaCl ที่ 0-25%, (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3-7 วัน เพิ่มจำนวนมากขึ้นเล็กน้อยตั้งแต่ 0-2 เดือนแรก และจะลดจำนวนลงตั้งแต่เดือนที่ 3-9 ซึ่งมีแนวโน้มเช่นเดียวกันกับการเปลี่ยนแปลงจำนวนของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส และไลเปสที่เลี้ยงบนอาหาร mM73, Dnase-Methyl Green Test และ mSGC ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3-7 วัน

จากการเก็บตัวอย่างบูดูที่ได้จากการหมักเองภายในห้องปฏิบัติการ (0-9 เดือน) พบว่า แบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร SGC ที่มีความเข้มข้นเกลือ NaCl ตั้งแต่ 0, 10, 15, 20 และ 25% มีจำนวนเชื้อที่แยกได้เท่ากับ 57, 56, 33, 11 และ 10 ไอโซเลต ตามลำดับ และตัวอย่างบูดูที่ได้จากโรงงานในอำเภอสายบุรี จังหวัดปัตตานี พบว่า มีจำนวนเชื้อที่แยกได้เท่ากับ 15, 18, 12, 10 และ 9 ไอโซเลต ตามลำดับ นำเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดมาคัดเลือกความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส และไลเปสชอบเกลือสูงบนอาหารแข็ง mM73, DNase-methyl green test และ mSGC บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3-7 วัน พบว่าจำนวนของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส และไลเปส คือ 57, 136 และ 81 ไอโซเลต ตามลำดับ คัดเลือกเชื้อที่ให้ค่าประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส (FBU21217 (4.25), LBU50301 (6.85) และ LBU50502 (8.84)) ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส (FBU41201 (5.12), FBU41202 (3.70) และ FBU41206 (2.22)) และไลเปส (LBU20907 (7.69), FBU40007 (5.97) และ LBU50901 (5.29)) ได้สูง และนำไอโซเลตที่เลือกได้ดังกล่าวมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว M73, SGC และ mSGC พบว่าไอโซเลต LBU50301 FBU41201 และ LBU20907สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส ไรโบนิวคลีเอส และไลเปสได้สูงสุด ตามลำดับ นำไอโซเลตที่คัดเลือกได้มาศึกษาผลของพีเอช อุณหภูมิ และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ทั้งสามชนิด พบว่า LBU50301 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงที่สุด (0.045 AU) เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว M73 ที่ความเข้มข้นเกลือ NaCl 25%, พีเอช 8.0 อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 120 ชั่วโมง FBU41201 สามารถผลิตเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสได้สูงที่สุด (12.25 U/ml) เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว SGC ที่ความเข้มข้นเกลือ

NaCl 20% พีเอช 8.0 อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และ LBU20907 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุด (46.50 U/ml) เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว mSGC ที่ความเข้มข้นเกลือ NaCl 20% พีเอช 8.0 อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์โปรติเอส คือ พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 40°C และความเข้มข้นเกลือ NaCl 15% เอนไซม์ไรโบนิวคลีเอส คือ พีเอช 9.0 อุณหภูมิ 60°C และความเข้มข้นเกลือ NaCl 25% และเอนไซม์ไลเปส คือ พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 40°C และ ความเข้มข้นเกลือ NaCl 25%

ความคงทนของความเข้มข้นเกลือ NaCl พีเอช อุณหภูมิ และผลของไอออนโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่า เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 4°C ยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติ-เอส ไรโบนิวคลีเอส และไลเปสในสภาวะที่มีเกลือและไม่มีเกลือเหลืออยู่สูงกว่าอุณหภูมิ 35 และ 40°C อยู่เล็กน้อย เอนไซม์โปรติเอส ไรโบนิวคลีเอส และไลเปสมีความคงทนสูงที่สุดที่ระดับพีเอช 7.0, 8.0 และ 8.0 ตามลำดับ และมีความคงทนสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 40, 45 และ 40°C ตามลำดับ และความคงทนของไอออนโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าไอออนของ Ca^{2+} มีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ไรโบนิวคลีเอส และไลเปสเพิ่มสูงขึ้นมากกว่า 100% ของกิจกรรมสูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่า ไอออนของ Hg^{2+} และ Zn^{2+} จะมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส ไรโบนิวคลีเอส และไลเปสให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ลดลง

จากการเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ พบว่าไอโซเลต LBU50301 มีลักษณะใกล้เคียงกับ *Chromohalobacter* sp. strain 08EPH117 ไอโซเลต FBU41201 พบว่าใกล้เคียงกับ *Chromohalobacter* sp. strain LY7-9 ในขณะที่ไอโซเลต LBU20907 พบว่าใกล้เคียงกับ *Virgibacillus* sp. strain IDS-20

ตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลาย RNA ของเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแผ่นเคลือบ พบว่าเอนไซม์ไรโบนิวคลีเอสที่ได้จากเชื้อไอโซเลต FBU41201 หรือเชื้อ *Chromohalobacter* sp. สามารถย่อยสลาย RNA ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นสารประกอบนิวคลีโอไทด์กัวโนซีน 5'-โมโนฟอสเฟต (Guanosine 5'-monophosphate, 5'-GMP) ซึ่งจัดเป็นสารเสริมรสชาติ

จากการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของบูดูที่หมักโดยไม่เติม (ชุดควบคุม) และเติมเอนไซม์ 5 ชุดการทดลอง ได้แก่ บูดูที่เติมเอนไซม์โปรติเอสเดือนที่ 0 (HP), บูดูที่เติมเอนไซม์โปรติเอสเดือนที่ 0 และไลเปสเดือนที่ 1 (HPL_1), บูดูที่เติมเอนไซม์โปรติเอสเดือนที่ 0 ไลเปสและไรโบนิวคลีเอส เดือนที่ 1 (HPL_1R_1), บูดูที่เติมเอนไซม์โปรติเอสเดือนที่ 0 ไลเปสเดือนที่ 1 และไรโบนิวคลีเอสเดือนที่ 2 (HPL_1R_2) และ บูดูที่เติมเอนไซม์โปรติเอสเดือนที่ 0 ไลเปสเดือนที่ 1 และไรโบนิวคลีเอสเดือนที่ 3 (HPL_1R_3) หมักบูดูเป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่า ค่าพีเอชของบูดูของชุดการทดลองทั้งหมดที่ได้มีค่าคงที่อยู่ระหว่าง 5.64-6.18 ระดับความเข้มสีน้ำตาลของ

บูดูจะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ เมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้น พบว่า บูดูที่เติมเอนไซม์โปรติเอสเดือนที่ 0 ไลเปสในเดือนที่ 1 และไรโบนิวคลีเอสในเดือนที่ 3 (HPL_1R_3) ให้สีน้ำตาลในบูดูดีที่สุด และปริมาณความเข้มข้นเกลือของบูดูของชุดการทดลองทั้งหมดอยู่ระหว่าง 27.07-30.60% ปริมาณค่าฟอร์มอลดีไฮด์ไนโตรเจนของบูดูที่เติมเอนไซม์นั้นจะให้ค่าสูงกว่าบูดูที่ไม่เติมเอนไซม์ โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 11.37-11.67 และ 9.32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับปริมาณโปรตีน พบว่า มีค่าปริมาณโปรตีนอยู่ระหว่าง 11.18-11.80 และ 9.85 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5'-GMP ของบูดูที่หมักนาน 6 เดือน พบว่า ปริมาณสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5-'GMP ที่เกิดขึ้นในบูดู HPL_1R_3 มีค่าเท่ากับ137.34 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าบูดูที่เติมเอนไซม์ชนิดอื่นๆ และบูดูที่ไม่เติม ในขณะที่ปริมาณกรดอะมิโนอิสระของบูดูในเดือนสุดท้ายของการหมัก (เดือนที่ 6) พบว่า บูดู HPL_1 (6272.22 100 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร) นั้นมีปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดสูงกว่าบูดูที่ไม่เติมเอนไซม์ (6191.72 100 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร) และพบว่ากรดอะมิโนที่มีผลต่อรสชาติที่ดีของบูดูนั้น คือ กรดกลูตามิก ซึ่งพบว่า บูดูที่เติมเอนไซม์นั้นให้ปริมาณกรดกลูตามิกสูงกว่าบูดูที่ไม่เติมเอนไซม์ และจากการประเมินทางประสาทสัมผัสของตัวอย่างผู้บริโภคต่อบูดู พบว่า บูดู HPL_1R_3 มีคะแนนของสี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวมสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และพบว่าบูดูที่เติมเอนไซม์ทุกชุดการทดลองมีคะแนนของกลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวมไม่แตกต่างกับบูดูทางการค้าที่หมักนาน 12 เดือน ดังนั้น การเติมเอนไซม์โปรติเอส ไรโบนิวคลีเอส และไลเปสร่วมกับการหมักบูดูมีผลเร่งในการย่อยสลายโปรตีน รวมทั้งมีผลช่วยในการเกิดสีน้ำตาล กลิ่น และรสชาติของบูดูให้ดียิ่งขึ้นได้

ABSTRACT

Budu made in laboratory was prepared from Katak and salt in a ratio of 3:1, (w/w). Fermentation took place under the sun for 9 months. The samples were taken during fermentation for microbiological analysis. There was an incresed in total bacterial count at the early phase (0-2 months) on Sehgal and Gibbons Complex (SGC) medium added with 0-25 %, (w/v) NaCl at 37°C for 3-7 days and slightly decreased at the late of the fermentation (3-9 months). The number of bacteria producing protease, lipase and deoxyribonuclease were the same as that of total bacterial count and cultured on mM73 agar, DNase-Methyl Green Test agar and mSGC agar, respectively at 37°C for 3-7 days.

Budu samples, collected from Budu made in our laboratory at the period of fermentation 0-9 months and factories in Sai Buri, Pattani province at a various time were screened on SGC agar medium added with 0, 10, 15, 20 and 25%, (w/v) NaCl. The total number of bacteria were isolated from Budu made in the laboratory on various NaCl concentrations were 57, 56, 33, 11 and 10 isolates and total number of bacteria, isolated from factories were 15, 18, 12, 10 and 9 isolates, respectively. In addition, all of isolates were screened for extracellular protease, deoxyribonuclease and lipase production by spotted on mM73, Bacto Dnase test and mSGC agar medium added with 0-25% NaCl at 37°C for 3-7 days. A 95, 136 and 81 isolates were produced extracellular protease, deoxyribonuclease and lipase, respectively. From these data, selected only 3 isolates which could produce high protease : FBU21217 (4.25), LBU50301 (6.85) and LBU50502 (8.84); deoxyribonuclease : FBU41201 (5.12), FBU41202 (3.70) and FBU41206 (2.22) and lipase : LBU20907 (7.69), FBU40007 (5.97) and LBU50901 (5.29) on agar plates medium, added with more than 15% of NaCl. All of these isolates were investigated for the optimum conditions of protease, lipase and ribonuclease production in liquid medium: m73, SGC and mSGC, respectively. Bacterial isolates: LBU50301, FBU41201 and LBU20907 could produce the highest protease, ribonuclease and lipase activities, respectively. In addition, the effect of NaCl concentrations, pHs, temperatures and times for the production of these three enzymes were investigated. The highest protease activity of 0.045 AU from LBU50301 was cultured in M73 broth medium added with 25% NaCl, pH 8.0 at 30°C for 120 hours,

Deleted: w

Deleted: b

Deleted: Next

Deleted: to screen of

Deleted: and were

Deleted: และ

Deleted: found that

Deleted: found

while ribonuclease and lipase activity of 12.25 U/ml and 46.50 U/ml from FBU41201 and LBU20907 were cultured in SGC and mSGC broth medium, respectively. All of these enzymes production had the highest activities as same as conditions: added with 20% NaCl, pH 8.0 at 35°C for 72 hours.

Isolates LBU50301, FBU41201 and LBU20907 were studied for the optimum enzymes activities: pH, temperature and NaCl concentration. Isolates LBU50301 exhibited the highest protease activity: 6.0, 40°C and 15% NaCl. The optimal conditions for ribonuclease activity of FBU41201: 9.0, 60°C and 25% NaCl. While lipase activity of LBU20907: 7.0, 40°C and 25% NaCl, respectively.

The stability of NaCl concentration, pH, temperature and metal ions for those three enzymes activities were stable in non-NaCl and NaCl conditions, all of them were higher activities at 4°C than 35 and 40°C. protease, ribonuclease and lipase were stable at pH 7.0, 8.0 and 8.0 and 40, 45 and 40°C, respectively. Moreover, the stability of metal ions for the all enzymes activity were stimulated by Ca^{2+} which showed higher than 100% of residual activity and inhibited by Hg^{2+} and Zn^{2+}.

Identification by partial 16s rRNA gene sequencing of selected isolates showed that LBU50301, FBU41201 and LBU20907 were identified as *Chromohalobacter* sp. strain 08EPH117, *Chromohalobacter* sp. strain LY7-9 and *Virgibacillus* sp. strain IDS-20, respectively.

Determination of RNA degradation of ribonuclease showed that ribonuclease producing by *Chromohalobacter* sp. FBU41201 could be break down RNA into guanosine 5'-monophosphate (5'GMP), an important flavoring enhancer.

Budu fermentation was carried out by Katak (Anchovy fish) and salt in a ratio of 3:1, (w/w) which divided by 6 experiments : without added halophilic enzymes (control), added halophilic enzymes: added halophilic protease in the 0 month and lipase in the first month (HPL_1), added halophilic protease in the 0 month lipase and ribonuclease in the first month (HPL_1R_1), added halophilic protease in the 0 month lipase in the first month and ribonuclease in the second month (HPL_1R_2) and added halophilic protease in the 0 month lipase in the first month and ribonuclease in the third month (HPL_1R_3). Fermentation took place under the sun for 6 months. Chemical quality analysis of Budu samples such as the pH value, color measurement, NaCl content, formaldehyde nitrogen content, protein content, 5'GMP content, free fatty acid and free

Deleted: under the same conditions

Deleted: The optimal conditions such as

Deleted: for three enzymes activity from the selected

Deleted: i

Deleted: c

Deleted: l.

Deleted: y

Deleted: found that three enzymes activity

Deleted: which enzymes activity at temperature of

Deleted: higher

Deleted: at temperature of

Deleted: at the highest temperature

Deleted: digest

Deleted:

Deleted:

Deleted: After that to study,

Deleted: c

amino acids content were investigated. The results indicated that pH values of all samples were not significant different, the pH was between 5.64-6.18. While the color changes in Budu during the fermentation found that HPL_1R_3 had the best color of Budu. In addition, NaCl content was 27.07-30.60%. The formaldehyde nitrogen content of all Budu added halophilic enzymes: HP, HPL_1, HPL_1R_1, HPL_1R_2 and HPL_1R_3 had higher than the control (11.37-11.67 and 9.32 g/l, respectively). Similar result of Budu added halophilic enzymes samples showed protein content (11.18-11.80 g/l) higher than the control (9.85 g/l). The HPL_1R_3 was the highest amount of 5'GMP content (137.34 mg/l) when compared to other experiments but it was lower than commercial of Budu, fermented for 12 months (158.64 mg/l). The amount of free amino acid of HPL_1 (6,272.22 100 mg/100 ml) was higher than the control (6,191.72 100 mg/ 100 ml). However, glutamic acid is an amino acid, influence to good flavor of Budu. The glutamic acid content of Budu added halophilic enzymes samples were higher than control. In addition, sensory tests were evaluated by using hedonic scale (9 levels), indicated that HPL_1R_3 had the highest scores of color, aroma, flavor and overall acceptance compared to other samples and significant different compared to control at 95% confidence interval ($p<0.05$). Moreover, Budu added halophilic enzymes samples had not scores significant different compared to commercial of Budu. Therefore, adding of halophilic enzymes: protease, ribonuclease and lipase during Budu fermentation could accelerate protein hydrolysis for shorten fermentation and may lead to apply in Budu fermentation for color, aroma and flavor improvement.

Deleted: samples

Deleted:

Deleted: b

Deleted: b

Deleted:

Deleted: b

Deleted: And

Deleted: b

Deleted: b