

บทความวิจัย (Research Article)

การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตเบต้ากลูโคซิเดสจากอาหารหมักดอง

Isolation and selection of β -glucosidase producing lactic-acid bacteria from fermented food

ธิดา ไชยวงศ์^{1*}Thida Chaiwangsri^{1*}

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกจากอาหารหมักดองและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากแบคทีเรียกรดแลกติก การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจากอาหารหมักดองจำนวน 54 ตัวอย่าง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ de Man Rogosa and Sharpe agar ที่มี Bromocresol green เป็นอินดิเคเตอร์ เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเขียวเป็นสีเหลือง พบว่าสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียได้จำนวน 64 ไอโซเลต การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไกลโคซิเดส 4 ชนิดโดยแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกได้ พบว่าเชื้อไอโซเลต RJ16 สร้างเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงที่สุดคือ 12.66 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร และเชื้อไอโซเลต RJ46 สร้างเอนไซม์เบต้าแกลูโคโนซิเดสสูงที่สุดคือ 13.11 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสโดยเชื้อไอโซเลต RJ16 ได้แก่ ระยะเวลาที่เหมาะสม อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง พีเอชตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน พบว่าเชื้อไอโซเลต RJ16 ผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า (25.20 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 4 เป็นแหล่งคาร์บอนและมีเพปโตนความเข้มข้น ร้อยละ 25 เป็นแหล่งไนโตรเจน ค่าพีเอชตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 45 °C นาน 36 ชั่วโมง การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต RJ16 โดยการตรวจสอบลักษณะพื้นฐานวิทยาและชีวเคมีพบว่าเชื้อไอโซเลต RJ16 เป็นเชื้อในสกุล *Pediococcus* sp.

คำสำคัญ: แบคทีเรียกรดแลกติก, เบต้ากลูโคซิเดส

¹ สาขาวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

¹ Division of Microbiology and Parasitology, School of Medical Science, University of Phayao, Phayao Province 56000

Corresponding author E-mail: thidach@yahoo.com

Received: 9 May 2013; Accepted: 30 March 2014

Abstract

The objectives of this research were isolation of lactic acid bacteria from fermented food and determination of the condition for β -glucosidase production from isolated lactic-acid bacteria. Lactic acid bacteria were isolated from 54 samples of fermented food using de Man Rogosa and Sharpe agar with bromocresol green as indicator. The colonies which gave a color change of the medium from green to yellow were selected and the pure cultures of 64 isolates were obtained. Glycosidase production from isolate lactic acid bacteria was carried out. It was found that lactic-acid bacteria isolate RJ16 produced the highest amount of β -glucosidase (12.66 mU/ml) and isolate RJ46 produced the highest amount of β -N-acetyl-glucosaminidase (13.11 mU/ml). Optimal conditions for β -glucosidase of isolate RJ16 were determined e.g. time course, temperature, initial pH of the medium, quantity and type of carbon source, quantity and type of nitrogen source. The results found that β -glucosidase production was enhanced twofold (25.20 mU/ml) when lactic-acid bacteria isolate RJ16 was grown in the medium containing 4% as carbon source and 25% as nitrogen source at the initial pH of 6.0, and cultivation at 45°C for 36 hours. The morphological characterization and biochemical tests for lactic-acid bacteria identification indicated that isolate RJ16 was the genus *Pediococcus* sp.

Keywords: Lactic acid bacteria, β -glucosidase

บทนำ

เอนไซม์ไกลโคซิเดส (glycosidase) มีอีกชื่อหนึ่งว่า ไกลโคไซด์ไฮโดรเลส (glycoside hydrolase) สามารถพบได้ทั้งพืชและสัตว์รวมถึงในจุลินทรีย์ และพบได้ทั้งที่เป็นเอนไซม์ที่ผลิตภายในเซลล์ (intracellular enzyme) และเอนไซม์ที่ผลิตแล้วถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งในกลุ่มไกลโคซิเดส ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม E.C. 3.2.1.21 ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรไลซิสที่ตำแหน่งพันธะกลูโคซิดิก ย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลให้กลายเป็นโอลิโกแซคคาไรด์หรือโมโนแซคคาไรด์ การจัดกลุ่มเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสตามลำดับของกรดอะมิโนในโครงสร้างแบ่งออกเป็น family 1 และ family 3 โดยเอนไซม์ที่อยู่ใน family 1 เป็นเอนไซม์ที่พบในแบคทีเรีย พืช และสัตว์ ส่วนเอนไซม์ใน family 3 เป็นเอนไซม์ที่พบในแบคทีเรียบางชนิดยีสต์ และเชื้อรา [5,7,10,11] เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้รับการพัฒนาและถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม

หลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล การผลิตเครื่องดื่ม และอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ อย่างไรก็ตามในกระบวนการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ยังคงมีอุปสรรคหลายประการที่ส่งผลให้ต้องมีการพัฒนากระบวนการผลิตเอนไซม์ ให้ได้ปริมาณมากตามความต้องการ

แบคทีเรียกรดแลกติกเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีลักษณะทั่วไป คือ ดัดสีแกรมบวก มีรูปร่างลักษณะเป็นทรงกลม รูปแท่ง มีทั้งที่เป็นแท่งสั้นและแท่งยาวหรือรูปร่างกึ่งแท่งกึ่งทรงกลม ไม่เคลื่อนที่ ส่วนใหญ่ไม่สร้างสปอร์ ยกเว้นในจีนัส *Sporolactobacillus* ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase) บางชนิดสร้างเอนไซม์คะตาเลสเทียม (pseudocatalase) ซึ่งขาดกลุ่ม porphyrin ขาดระบบไซโตโครมบางชนิดไม่ต้องการอากาศ (strictly anaerobes) บางชนิดต้องการอากาศในปริมาณน้อยและอาจเป็นพวกที่เจริญในสภาพที่มีอากาศหรือไม่มีอากาศก็ได้ (facultative anaerobes) แบคทีเรียกรดแลกติกส่วนใหญ่เป็นเชื้อประจำถิ่น ไม่ก่อให้เกิดโรค พบได้ในบริเวณเยื่อภายในในท่อนำเดินอาหารช่องคลอดของสัตว์เลี้ยงลูก

ด้วยนม ในอาหารหมักดองและผลิตภัณฑ์จากนม [12] นอกจากนี้ยังพบในพืชของเสีย อวัยวะสืบพันธุ์ ลำไส้เล็ก และทางเดินหายใจของคนและสัตว์ แบคทีเรียกรดแลกติก เป็นพวกที่มีความต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนค่อนข้างสมบูรณ์ เชื่อจะเจริญได้ในอาหารที่มี growth factor และวิตามินหลายชนิด เช่น ไบโอตินและไรโบฟลาวิน และส่วนใหญ่ต้องการสารอนินทรีย์ในปริมาณค่อนข้างสูง เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส เป็นต้น [2,3] ปัจจุบันได้มีการพัฒนาการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้เพื่อใช้เป็นกล้ำเชื้อในกระบวนการผลิตอาหารหมักหลายชนิด โดยกิจกรรมหลักของแบคทีเรียกรดแลกติกต่อผลิตภัณฑ์อาหาร คือ การเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตในส่วนผสมของอาหารให้เป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ โดยอาศัยเอนไซม์ที่เชื้อจุลินทรีย์สร้างขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก เช่น แบคทีเรียกรดแลกติกที่ใช้ในอาหารประเภทถั่วเหลืองหมักมีการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสเพื่อเปลี่ยนสารไอโซฟลาโวนส์ (isoflavones) ในถั่วเหลืองชนิดกลูโคไซด์ ซึ่งเป็นไอโซฟลาโวนส์ที่อยู่ในรูปที่ร่างกายดูดซึมและนำไปใช้ประโยชน์ได้ยากให้อยู่ในรูปของไอโซฟลาโวนส์ชนิดอะไกลโคน (aglycone) ซึ่งร่างกายสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น เดดซีน (daidzein) เจนิสทีน (genistein) และไกลซิทีน (glycitein) มีการวิจัยที่สนับสนุนว่าสาร genistein มีคุณสมบัติเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ และสามารถลดการเกิดมะเร็งในสัตว์ทดลองและในคนได้ โดยไปขัดขวางการเติบโตของเส้นเลือดใหม่ในก้อนเนื้อ (angiogenesis) และยังมีรายงานว่าอาหารหมักจากถั่วเหลือง เช่น มิโซะ (miso) และเทมเป้ พบสาร aglycone ที่เกิดจากปฏิกิริยา hydrolysis ของเอนไซม์ในระหว่างกระบวนการหมักในปริมาณสูง ซึ่งต่างจากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการหมักจะพบกลูโคไซด์ในปริมาณ ที่มากกว่า [6,9,15]

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไวน์องุ่นเพื่อเปลี่ยนกรดมาลิกในน้ำองุ่นให้เป็นกรดแลกติก ได้แก่ *Lactobacillus*, *Oenococcus oeni*, และ *Pediococcus* มีการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสซึ่งช่วยทำให้เกิดกลิ่นในไวน์โดยเปลี่ยนสารไกลโคไซด์ที่มีในองุ่นที่เป็นสารตั้งต้นของสารให้กลิ่นรสถูกปลดปล่อยออกมาสู่ไวน์ [8] ดังนั้นเชื้อแบคทีเรีย

กรดแลกติกจึงมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยสารประกอบจำพวกคาร์โบไฮเดรตดังกล่าวได้ แต่การศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์และลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลกติกยังมีไม่มากนัก โดยเฉพาะเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคซิเดส ซึ่งเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นเพื่อใช้ในการย่อยสลายสารประกอบคาร์โบไฮเดรตต้องมีสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิด เช่น ระยะเวลาที่เหมาะสมที่จะพบกิจกรรมของเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก อุณหภูมิ ความเป็นกรดต่างของอาหาร แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน เป็นต้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากอาหารหมักดอง รวมถึงศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากเชื้อที่แยกได้ เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปพัฒนากระบวนการผลิตเอนไซม์ต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

การแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติก

เก็บตัวอย่างอาหารหมักดองจำนวน 54 ตัวอย่าง โดยการสุ่มเก็บจากพื้นที่ในจังหวัดพะเยา เชียงราย เชียงใหม่ และชลบุรี แบ่งตัวอย่างเป็นอาหารหมักดองจากสัตว์ ได้แก่ ปลาจ่อม ปลาจ่อม ไข่ปลา อาหารหมักดองจากพืช ได้แก่ ผักกาดดอง ถั่วเน่าแผ่น และผลิตภัณฑ์จากกระบวนการหมักนม ได้แก่ นมเปรี้ยว และโยเกิร์ต

การเตรียมตัวอย่างอาหารเพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก โดยตัวอย่างอาหารที่เป็นของแข็งจะหั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วชั่งน้ำหนักให้ได้ 25 กรัม ใส่ลงในสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร เขย่าให้อาหารกระจายตัวเข้ากับสารละลาย แล้วดูดตัวอย่างอาหาร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองที่มี bromocresol green เป็นอินดิเคเตอร์ ส่วนตัวอย่างอาหารที่เป็นของเหลว ดูดตัวอย่างอาหารปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่มี bromocresol green เป็นอินดิเคเตอร์ นำหลอดอาหารที่แยกเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobe) ใน anaerobic jar ตรวจสอบการเจริญของเชื้อในอาหารเหลว MRS โดยเลือกหลอดทดลองที่อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นเหลือง นำมาแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์โดยทำ spread plate และการลาก (streak) บนผิวอาหารแข็ง MRS ที่มี bromocresol green เป็นอินดิเคเตอร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ใน anaerobic jar ตรวจสอบการเจริญของเชื้อและคัดเลือกโคโลนีในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่รอบๆ โคโลนีมีการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเขียวเป็นสีเหลือง นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MRS จนได้โคโลนีเดี่ยวของเชื้อบริสุทธิ์

การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลกติก

ตรวจสอบลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลกติกที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร ได้แก่ ขนาด รูปร่าง สี ขอบโคโลนี ผิวหน้าของโคโลนี และตรวจสอบการติดสีแกรม ลักษณะรูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลกติกเพื่อบ่งบอกชนิดของเชื้อ

ตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในปริมาณสูงสุด เพื่อยืนยันเชื้อในระดับจีโนส โดยตรวจสอบคุณสมบัติดังต่อไปนี้ ความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase test) ทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 40 และ 50 °C ความสามารถในการเจริญที่ pH ต่างๆ การทนเกลือ คุณสมบัติในการหมักแบบ heterofermentative หรือ homofermentative คุณสมบัติการก่อให้เกิด acid curd ใน litmus milk ความสามารถในการทนอุณหภูมิ 55 °C นาน 15 นาที ทดสอบการเกิด oxidation-fermentation การสร้างอินโดล (indole) การใช้ citrate เป็นแหล่งคาร์บอน การทดสอบ Voges - Proskauer (VP) การรีดิวซ์ไนเตรท (nitrate reduction) การย่อยสลายเจลาติน (gelatin liquefaction) การย่อยแป้ง (starch hydrolysis) และการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ทำการ

เทียบเคียงลักษณะของเชื้อโดยใช้หนังสือ Bergey's manual of determinative bacteriology [13]

การคำนวณปริมาณเอนไซม์โกลโคซิเดส

นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปอ่านค่าปริมาณพาราไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) จากกราฟมาตรฐาน โดยปริมาณโกลโคซิเดส 1 หน่วย คือ ปริมาณเอนไซม์ที่สลายสับสเตรตพาราไนโตรฟีนิลโกลโคไซด์ (*p*-nitrophenyl glycoside) ให้เป็นพาราไนโตรฟีนอล 1.0 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิ 37 °C

การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โกลโคซิเดสและการคัดเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด

ชนิดของเอนไซม์โกลโคซิเดสที่ตรวจสอบ ได้แก่ เบต้ากลูโคซิเดส (β -glucosidase) เบต้ากาแลคโตซิเดส (β -galactosidase) แอลฟาแมนโนซิเดส (α -Mannosidase) และเบต้าเอ็นอะซิetylกลูโคซามิไนเดส (β -N-acetylglucosaminidase) วิเคราะห์ปริมาณโกลโคซิเดสโดยใช้อนุพันธ์พาราไนโตรฟีนิลโกลโคไซด์ (*p*-nitrophenyl glycosides) (sigma) เป็นสับสเตรต แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์พาราไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร การตรวจสอบกิจกรรมของ โกลโคซิเดส ทำในหลอดทดลองที่มีส่วนผสมของสารละลายต่อไปนี้ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 6.0 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ พีเอช 6.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สารละลายเอนไซม์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมสารละลายสับสเตรต อนุพันธ์พาราไนโตรฟีนิลโกลโคไซด์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เมื่อครบเวลา หยุดปฏิกิริยาโดยเติมโซเดียมบอเรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 10.0 ปริมาตร 2.7 มิลลิลิตร นำไปวัดการเกิดปฏิกิริยาโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ปีเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางจนเหมาะสม ด้วย PBS ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Coomassie Brilliant Blue R-250 ปริมาตร 3.0 มิลลิตร ผสมแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปอ่านค่าปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน โดยใช้ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน ตามวิธีของ Bradford, 1976 [14]

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

การศึกษานี้ใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่ตรวจพบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ไกลโคซิเดสชนิดที่สูงที่สุดคือ เบต้ากลูโคซิเดส โดยศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ ในช่วงเวลา 0 - 72 ชั่วโมง การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 25, 30, 37, 45, 50 และ 55 °C ตามลำดับ การศึกษาค่าพีเอชตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โดยใช้อาหารเหลว MRS ที่มีค่าพีเอชตั้งต้นเท่ากับ 4.0 - 10.0 ตามลำดับ

การศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

ปีเปตสารละลายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร Basal medium ที่มีกลูโคส (glucose) ซูโครส (sucrose) แลคโตส (lactose) เซลลูโลส (cellulose) และไคโตซาน (chitosan) เป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนแหล่งไนโตรเจน ใช้อาหาร Basal medium ที่มีแอมโมเนียมไนเตรด (NH_4NO_3) โพแทสเซียมไนเตรด (KNO_3) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ไดแอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ยีสต์เอ็กซ์แทรก (yeast extract) หรือเพปตอน (peptone) เป็นแหล่งไนโตรเจน นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ในสภาวะไม่มีออกซิเจน เมื่อครบเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ จึงนำไปตรวจสอบกิจกรรมของเบต้ากลูโคซิเดส

การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

ปีเปตสารละลายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร Basal medium ที่เติมความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อโดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0 - 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เมื่อครบเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ จึงนำไปตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไกลโคซิเดส ส่วนการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองที่มีอาหาร basal medium ที่เติมความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0 - 25 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เมื่อครบเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ จึงนำไปตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

ผลการทดลอง

การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจากอาหารหมักดอง

การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจากอาหารหมักดองและผลิตภัณฑ์นมทั้งหมดจำนวน 54 ตัวอย่าง ได้แก่ อาหารหมักดองจากสัตว์จำนวน 18 ตัวอย่าง อาหารหมักดองจากพืชจำนวน 31 ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์จากนมจำนวน 5 ตัวอย่าง โดยใช้อาหาร MRS broth ที่มี bromocresol green เป็นอินดิเคเตอร์ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง พบแบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 64 ไอโซเลต และให้หมายเลขเป็น RJ1-RJ64 นำแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกได้ทั้งหมดมาตรวจสอบการติดสีแกรม ตรวจสอบรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์และตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คิตาเลส พบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกที่ได้มีรูปร่างเป็นทรงกลม (cocci) จำนวน 31 ตัวอย่าง รูปร่างเป็นแท่งสั้น (short rod) จำนวน 14 ตัวอย่าง รูปร่างเป็นแบบกึ่งแท่งกึ่งกลม (coccobacilli)

จำนวน 7 ตัวอย่าง และรูปร่างเป็นแท่งยาว (rod) จำนวน 11 ตัวอย่าง และเชื้อทุกไอโซเลตไม่มีการสร้างเอนไซม์อะตาเลส

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกได้จากอาหารหมักดอง

เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก จำนวน 64 ไอโซเลตที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MRS agar มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน โดยมีลักษณะโคโลนีที่พบคือโคโลนีสีขาว สีครีมและสีชมพู โคโลนีส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นเมือกเยิ้ม ขอบโคโลนีเรียบ หรือหยัก และแตกแขนงคล้ายรากพืช

การบ่งบอกชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต RJ16

จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต RJ16 พบว่า เชื้อมีลักษณะโคโลนีเป็นจุดเล็กๆ สีขาวขอบเรียบ เมื่อตรวจสอบลักษณะของเชื้อใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100x พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวกย้อมติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต มีรูปร่างของเซลล์เป็นทรงกลม มีการจัดเรียงตัวเป็น 4 เซลล์ติดกัน เชื้อมีการสร้างกรดแต่ไม่สร้างก๊าซ จัดอยู่ในกลุ่ม heterofermentative และจากการทดสอบลักษณะชีวเคมีบางประการ ให้ผลทดสอบดังตารางที่ 1 เมื่อเทียบเคียงลักษณะของเชื้อกับเชื้ออ้างอิง โดยใช้หนังสือ Bergey's manual of determinative bacteriology [11] พบว่าเชื้อ

ไอโซเลต RJ16 มีลักษณะเหมือนกับเชื้อในสกุล *Pediococcus* sp. (ตารางที่ 1)

ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสปริมาณสูงที่สุด

การตรวจสอบกิจกรรมของไกลโคซิเดสโดยใช้สับสเตรตที่มีความจำเพาะกับเอนไซม์ไกลโคซิเดสชนิดต่างๆ ได้แก่ พาราไนโตรฟีนิลเบต้าดีกลูโคไพราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl β -D-glucopyranoside) พาราไนโตรฟีนิลเบต้าดีกาแลคโตไพราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside) พาราไนโตรฟีนิลแอลฟาดีแมนโนไพราโนไซด์ (*p*-nitrophenyl α -D-mannopyranoside) และพาราไนโตรฟีนิล เบต้าเอ็นอะซิติกกลูโคซามิไนด์ (*p*-nitrophenyl- β -N-acetyl D-glucosaminide) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไกลโคซิเดส 4 ชนิด พบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกได้มีการสร้างเอนไซม์ไกลโคซิเดสในปริมาณที่แตกต่างกัน โดยเชื้อไอโซเลต RJ16 มีการสร้างเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงที่สุดเท่ากับ 12.66 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร และไอโซเลต RJ 46 มีการสร้างเอนไซม์เบต้าเอ็นอะซิติกกลูโคซามิไนด์ (β -N-acetylglucosaminidase) สูงที่สุดปริมาณ 13.10 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร จึงคัดเลือกเชื้อไอโซเลต RJ16 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

ตารางที่ 1 การทดสอบทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียกรดแลกติก ไอโซเลต RJ 16 เทียบเคียงกับเชื้อในสกุล *Pediococcus* จากหนังสือ Bergey's manual of determinative bacteriology

การทดสอบ	Isolate RJ16	<i>Pediococcus</i>
การติดสีแกรม	+	+
รูปร่างเซลล์	Cocci	Cocci
การจัดเรียงตัวของเซลล์ต่อกันเป็น 4 เซลล์ (tetrads)	+	+
การสร้างสปอร์	-	-
การเคลื่อนที่	-	-
การสร้างเอนไซม์คาตาเลส	-	-
การสร้างเอนไซม์ซูโดคาตาเลส	+	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส	+	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส	+	+
การทนเกลือ NaCl		
- 6.5%	+	+
- 18%	-	-
การเจริญที่ pH		
- 4.2	+	+
- 8.5	-	-
การเกิด acid curd ใน litmus milk	+	+
การสร้างอินโดล	-	-
Voges - Proskauer	-	-
การใช้ citrate	-	-
การรีดิวซ์ไนเตรท	-	-
การย่อยสลายเจลาติน	-	-
การย่อยแป้ง	-	-
การสร้างก๊าซ	-	-

ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

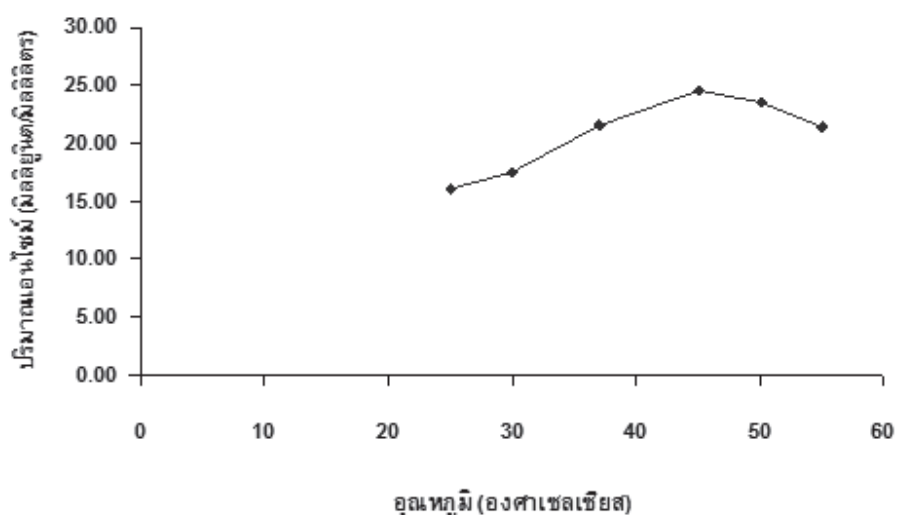
การตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสของเชื้อไอโซเลต RJ16 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว MRS โดยใช้สับสเตรตพาราไนโตรฟีนิล ดีกลูโคไพราโนไซด์ พบว่าเชื้อไอโซเลต RJ16 ผลิตเอนไซม์สูงสุดที่

อุณหภูมิ 45 °ซ คิดเป็นปริมาณเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสเท่ากับ 24.60 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิการเพาะเลี้ยงเป็น 50 °ซ และ 55 °ซ พบว่าเชื้อมีการผลิตเอนไซม์ลดลงตามลำดับ (ภาพที่ 1)

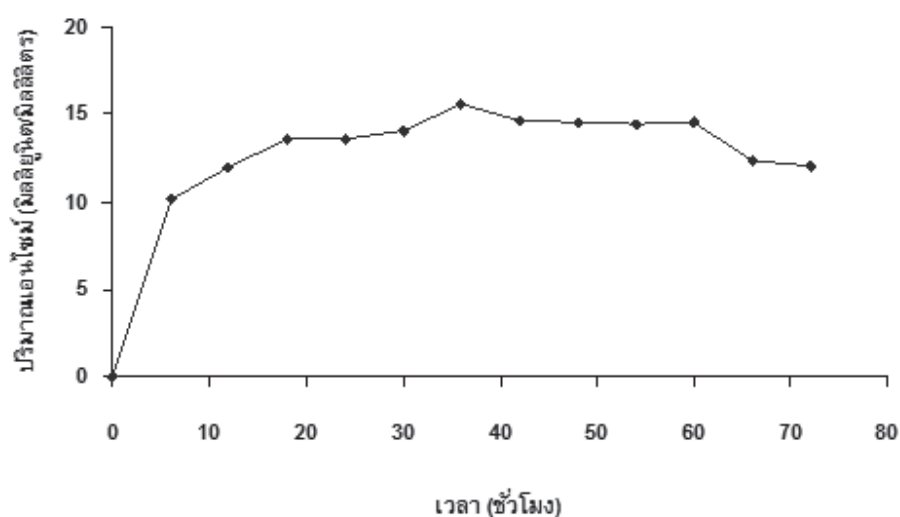
ระยะเวลาการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสของเชื้อ ไอโซเลต RJ16

การเลี้ยงเชื้อไอโซเลต RJ16 ในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 45 °ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจหากิจกรรมของเบต้ากลูโคซิเดสทุก 6 ชั่วโมง

โดยใช้สับสเตรตพาราไนโตรฟีนิล ดีกลูโคไพราโนไซด์ พบว่าเชื้อไอโซเลต RJ 16 มีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงได้ปริมาณเอนไซม์ 29.34 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 1 การผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสของเชื้อไอโซเลต RJ16 ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน



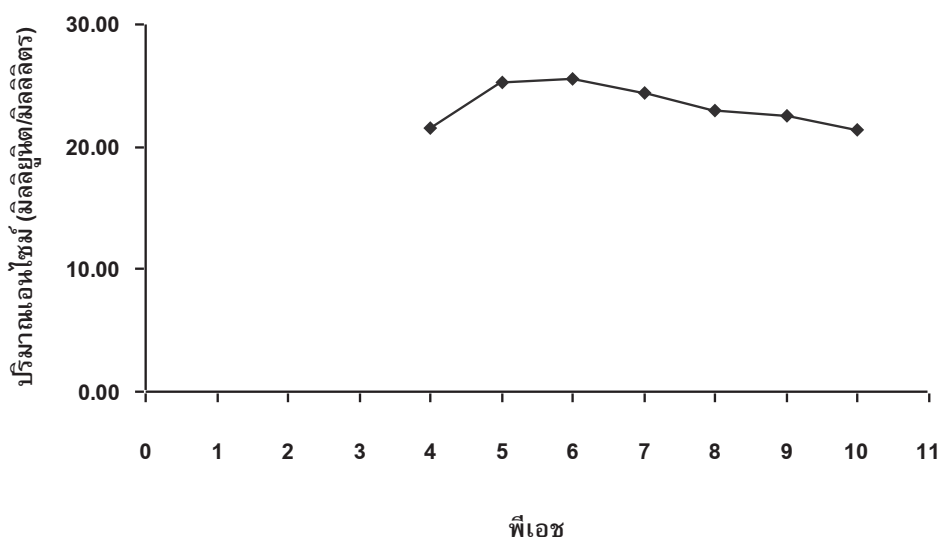
ภาพที่ 2 ระยะเวลาการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสของเชื้อไอโซเลต RJ16

ผลการศึกษาค่าพีเอชตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

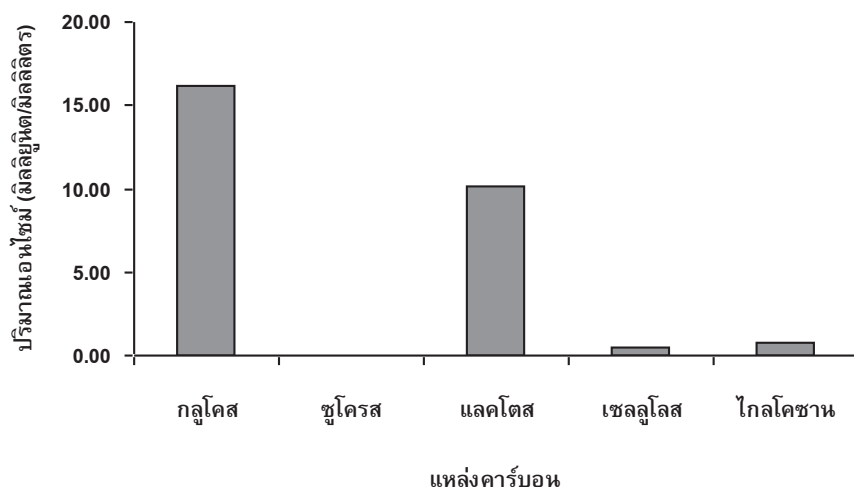
การเลี้ยงเชื้อไอโซเลต RJ 16 ในอาหารเหลว MRS ที่ปรับค่าพีเอชตั้งต้นของอาหารให้เท่ากับ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 45^oซ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจหากิจกรรมของเบต้ากลูโคซิเดส พบว่าเชื้อไอโซเลต RJ 16 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในอาหารที่มีค่าพีเอชตั้งต้นเป็นกรดสูงกว่าในอาหารที่มีค่าพีเอชตั้งต้นเป็นด่าง โดยอาหารเหลว MRS ที่มีค่าพีเอชตั้งต้นของอาหารเท่ากับ 6.0 ให้กิจกรรมของเบต้ากลูโคซิเดส สูงสุดเท่ากับ 28.53 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังภาพที่ 3

ผลการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

การตรวจหาปริมาณเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสของเชื้อไอโซเลต RJ16 ใน basal medium ที่มีแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส ซูโครส แลคโตส เซลลูโลส และไคโตซาน บ่มที่อุณหภูมิ 45^oซ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต RJ16 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน มีปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 16.20 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาได้แก่ แลคโตส ไคโตซาน เซลลูโลส ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสเท่ากับ 10.20, 0.80 และ 0.50 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสของเชื้อไอโซเลต RJ16



ภาพที่ 4 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสของเชื้อไอโซเลต RJ16

ผลการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

แบคทีเรียไอโซเลต RJ16 ที่เพาะเลี้ยงใน basal medium ที่มีกลูโคสความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ร้อยละ 0 - 10 เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต RJ16 มีแนวโน้มการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่สูงขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสที่เพิ่มขึ้น โดยกลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 20.90 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือกลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 3, 2 และ 1 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 19.33, 11.28 และ 13.58 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคสสูงกว่าร้อยละ 4 พบว่าแบคทีเรียมีการผลิตเอนไซม์ลดลง (ภาพที่ 5) จึงเลือกใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

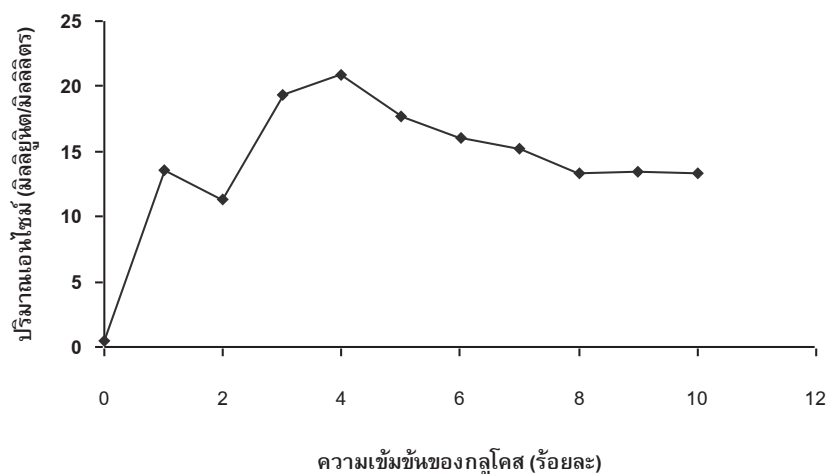
ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

การเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลต RJ16 ใน basal medium ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน ได้แก่ แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) ไดแอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ยีสต์เอ็กซ์แทรก (yeast extract) และเพปโตน (peptone) บ่มที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าเพปโตนให้ค่ากิจกรรมของเบต้ากลูโคซิเดสสูงที่สุดเท่ากับ 25.90 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาได้แก่ ยีสต์เอ็กซ์แทรก และโพแทสเซียมไนเตรต ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสเท่ากับ 10.97 และ 1.03 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนอาหารที่ใช้แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ และไดแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง จึงเลือกใช้เพปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

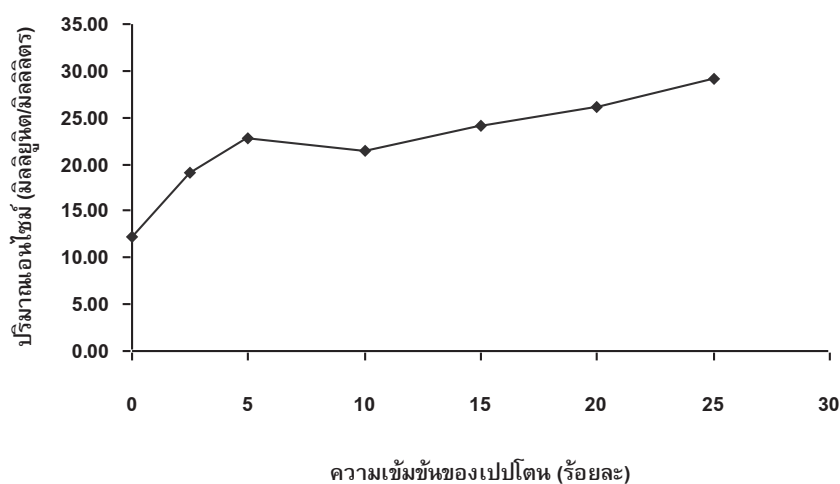
การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

แบคทีเรียไอโซเลต RJ16 ที่เพาะเลี้ยงใน basal medium ที่มีเพปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0-25 เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเพปโตนเชื้อมีการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสเพิ่มสูงขึ้น โดย

เพปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 25 ให้กิจกรรมของเบต้ากลูโคซิเดสสูงที่สุดคือ 29.14 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือเพปโตนที่ความเข้มข้นร้อยละ 20, 15, 10, 5 และ 2.5 ให้ค่ากิจกรรมของเบต้ากลูโคซิเดสเท่ากับ 26.06, 24.08, 21.48, 22.72, 19.16 และ 12.18 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 5 ความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสของเชื้อไอโซเลต RJ16



ภาพที่ 6 ความเข้มข้นของเพปโตนที่เหมาะสมการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสของเชื้อไอโซเลต RJ16

วิจารณ์และสรุปผล

การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจากอาหารหมักดองจำนวน 54 ตัวอย่าง โดยใช้อาหาร MRS ที่เติม bromocresol green เป็นอินดิเคเตอร์ พบว่าแยกเชื้อได้แบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลส จำนวน 64 ไอโซเลต การจัดจำแนกเชื้อด้วยวิธีการทางชีวเคมี พบว่าเป็นเชื้อในสกุล *Pediococcus* sp. เมื่อนำเชื้อไปตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ไกลโคซิเดส พบว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกได้มีการผลิตเอนไซม์ไกลโคซิเดส 4 ชนิด คือ เบต้ากลูโคซิเดส เบต้ากาแลคโตซิเดส แอลฟาแมนโนซิเดส และเบต้าเอ็นอะซิทิกลูโคซามิโนซิเดส โดยเชื้อไอโซเลต RJ 16 ผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสปริมาณสูงกว่าเอนไซม์ไกลโคซิเดสชนิดอื่น ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 12.66 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต RJ16 ได้แก่ ระยะเวลา อุณหภูมิ พีเอช แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อไอโซเลต RJ 16 ในอาหาร basal medium ที่มีกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 4 เป็นแหล่งคาร์บอน และเพปโตนความเข้มข้นร้อยละ 25 เป็นแหล่งไนโตรเจน ค่าพีเอชตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 45 °C เวลา 36 ชั่วโมง เชื้อให้ค่ากิจกรรมของเบต้ากลูโคซิเดสเพิ่มขึ้นเป็น 25.20 มิลลิยูนิตต่อมิลลิลิตร และวัดปริมาณโปรตีนได้เท่ากับ 0.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อศึกษาระยะเวลาต่อการเติบโตของเชื้อไอโซเลต RJ16 พบว่าการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วง log phase คือที่เวลาระหว่าง 6 ถึง 18 ชั่วโมงของการเจริญ และเชื้อไอโซเลต RJ16 จะสามารถผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้สูงสุดเมื่อเข้าสู่ระยะ stationary phase ซึ่งเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าเมื่อใช้กลูโคสร้อยละ 4.0 (น้ำหนักโดยปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้สูงสุด เมื่อความเข้มข้นของ

กลูโคสมากกว่าร้อยละ 4.0 (น้ำหนักโดยปริมาตร) การผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสลดลง ซึ่งอาจมีสาเหตุเนื่องจากปริมาณของกลูโคสที่มากขึ้นทำให้ปริมาณออกซิเจน (dissolved oxygen) ในอาหารลดลง จุลินทรีย์จึงใช้ออกซิเจนที่อยู่ในอาหารได้ยากขึ้น การเจริญจึงลดลง และผลิตเอนไซม์ได้น้อยลง หรืออาจเกิดจาก end product repression ที่เกิดขึ้นจากการย่อยกลูโคสที่ความเข้มข้นสูง ไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์ก็เป็นได้ [4] การผลิตเอนไซม์ให้ได้ปริมาณสูงจากเชื้อที่มีการดัดแปลงพันธุกรรมเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกให้มีการผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่สูงขึ้นได้ จากการศึกษาของประมุข ภาณุสุขสถิตย์ และคณะ (2551) พบว่า การผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสโดยใช้เชื้อยีสต์ *Pichia pastoris* สายพันธุ์กลายที่มีการโคลนยีนเพื่อเปลี่ยนตำแหน่งของกรดอะมิโนอะลานีนตำแหน่งที่ 454 เป็นกรดอะมิโนแอสปาราจีน (A454N) ซึ่งเป็นตำแหน่งอะไกลโคน หรือบริเวณใกล้เคียงกับตำแหน่งเร่ง (active site) จะทำให้เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสมีกิจกรรมเอนไซม์ที่สูงขึ้น ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้นกว่าเดิมร้อยละ 32 [1]

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนจากงบประมาณเงินรายได้ มหาวิทยาลัยนเรศวร พะเยา ปีงบประมาณ 2551 และขอขอบคุณนางสาววิภากรณ์ อารมณ์สวะ ที่มีส่วนร่วมช่วยเหลือในงานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. ประมุข ภาณุสุขสถิตย์, ณธิดา อารีย์, สิริรัตน์ ชำมิ่ง. การผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากเชื้อรีคอมบิแนนท์ *Pichia pastoris* YW-11430 และ *Pichia pastoris* YM-11430 ด้วยวิธีการหมักแบบครั้งคราว. ใน: เอกสารการประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ: 29 มกราคม – 1 กุมภาพันธ์ 2551. หน้า 1-8

2. ศุภชัย กิตโร. การแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียและหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติก. ภาควิชาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2541.
3. สุรัชย์ เตชะเอ้อย. ผลการยับยั้งของแลคติกแอซิดแบคทีเรียต่อการเจริญของ *Escherichia coli* *Staphylococcus aureus* และ *Saccharomyces cerevisiae* ในการเพาะเลี้ยงร่วมกัน. ภาควิชาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 2546.
4. สุวรรณ ศักดิ์ดาสถาพร, กนก รัตน์กนกชัย, คิน เลย์ คู. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิต alkaline amylase และศึกษาสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์. ใน: เอกสารการประชุมทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ: 3 - 7 กุมภาพันธ์ 2546. หน้า 153-160.
5. Barman TE. Enzyme Handbook, vol. II: EC 3.2.1.21. New York: Springer-Verlag; 1969. pp.578-579.
6. Chi H., Lee B, You H, Park M, Ji G. Differential transformation of ginsenosides from *Panax ginseng* by lactic acid bacteria. J. Microbiol. Biotechnol. 2006;16:1629-1633.
7. Henrissat BA. classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. Biochem. J. 1991; 280: 309-316.
8. Michlmayr H, Schumann C, Wurbs P, Nuno M, da Silva BB, Rogl V, Kulbe KD, del Hierro AM. A β -glucosidase from *Oenococcus oeni* ATCC BAA-1163 with potential for aroma release in wine: cloning and expression in *E. coli*. World J Microbiol Biotechnol. 2010; 26:1281-1289.
9. Marazza JA, Garroa MS, de Giori GS. Aglycone production by *Lactobacillus rhamnosus* CRL981 during soymilk fermentation. Food Microbiology, 2009; 26(3): 333-339.
10. Marques AR, Coutinho PM, Videira P, Fialho AM, Sa-Correia I. Sphingomonas paucimobilis β -glucosidase BglI: A member of a new bacterial subfamily in glycoside hydrolase family 1. Biochem J. 2003; 370: 793-804.
11. Murray P, Aro N, Collins C, Grassick A, Penttila M, Saloheimo M, Tuohy M. Expression in *Trichoderma reesei* and characterization of a thermostable family 3 β -glucosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces emersonii*. Protein Expres. Purif. 2004;38: 248-257.
12. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG. (editors). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins. 1986.
13. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Stanley JT and Williams ST. (editors). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. USA: The Williams and Wilkins Company/Baltimore: 1994. pp. 566-568.
14. Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.* 1976. 72: 248-254.
15. Donkor ON, Shah NP. Production of beta-glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* In soymilk. J Food Sci. 2008; 73(1): 15-20.