การผลิตวัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหารกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟตด้วยกระบวนการทางเอนไซม์

Production of Food Flavour Enhancing Guanosine 5'-Monophosphate by Enzymatic Process

อนันต์ บุญปาน[1]
อภินันท์ วัลภา[2]
คณะการจัดการธุรกิจอาหาร สถาบันการจัดการปัญญาภิวัฒน์[1]
คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี[2]
E-mail: ananboo@pim.ac.th[1]
E-mail: w_apinun@hotmail.com[2]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตวัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหารกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟตด้วยเอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรสจากแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* AN150 ซึ่งแยกมาจากน้ำปลาดิบ โดยทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์และประยุกต์ใช้เอนไซม์สำหรับผลิตสารประกอบกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต จากการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ พีเอช 7.00 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความเสถียรในช่วงพีเอชระหว่าง 6.00-9.00 และช่วงอุณหภูมิระหว่าง 40-50 องศาเซลเซียสเอนไซม์มีสมบัติเป็นเอนไซม์ที่ชอบเกลือ โดยสามารถทำงานได้ดีที่สุดในสภาพที่มีความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 2.00 โมลาร์ การผลิตสารประกอบกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟตจากกรดไรโบนิวคลีอิกโดยใช้เอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรส พบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมเท่ากับร้อยละ 0.30 โดยน้ำหนัก ทำการย่อยเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะสามารถผลิตสารประกอบกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟตได้ผลผลิตเท่ากับ 0.90 กรัมต่อกรัมกรดไรโบนิวคลีอิก

คำสำคัญ: วัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหาร สารประกอบกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต เอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรส

ABSTRACT

This research was aimed to study the production of food flavour enhancing guanosine 5′- monophosphate (5′-GMP) in food by 5′-phosphodiesterase (5′-PDE) which was produced by *Bacillus altitudinis* AN150 isolated from raw fish sauce. Optimization of the conditions for maximum 5′-PDE activity and application of enzyme in 5′-GMP production were examined. The results found that optimum pH and temperature for the activity of 5′-PDE were 7.00 and 40 °C, respectively. The enzyme was stable in the pH range between 6.00-9.00, and at temperature

between 40-50 °C. This 5′-PDE had marked halophilic enzyme property, showing maximal activity in the presence of 2.00 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 0.30% by weight. The 4-hour hydrolysis reaction gave the highest 5′-GMP yield of 0.90 g/g RNA

KEYWORDS: Food Flavour Enhancer, Guanosine 5'-Monophosphate, 5'-Phosphodiesterase

บทนำ

สารประกอบ 5′-นิวคลีโอไทด์(5′-Nucleotides) เป็นวัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหาร (Flavor Enhancer) ที่จะทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารรสชาติดีขึ้นเรียกว่ารสชาติ "อูมามิ" (Umami Taste) ซึ่งถูกจัดให้เป็นรสชาติที่ 5 ที่แตกต่างจากรสชาติพื้นฐาน 4 รสชาติ คือ รสหวาน รสเค็ม รสเปรี้ยว และรสขม (Bachmanov, 2010) สารประกอบนิวคลีโอไทด์ดังกล่าวคือกัวโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต (Guanosine 5′-Monophosphate: 5′-GMP) และ อิโนซีน 5′-โมโนฟอสเฟต (Inosine 5′-Monophosphate: 5′-IMP) (Wifall, Faes, Taylor-Burds, Mitzelfelt, & Delay, 2007) การใช้สารประกอบ 5′-นิวคลีโอไทด์ในการปรุงแต่งรสชาติในอาหารไม่ทำให้เกิดผลข้างเคียงกับผู้บริโภคเหมือนการใช้ผงชูรส (Monosodium Glutamate: MSG) ซึ่งการบริโภคผงชูรสในปริมาณที่มากเกินไป อาจทำให้ผู้บริโภคบางรายเกิดความผิดปกติ เช่น มีอาการชาและร้อนวูบวาบที่ปาก ลิ้น ต้นคอ ใบหน้า หน้าอก มีผื่นแดงตามตัว แน่นหน้าอก หายใจไม่สะดวก และอาจส่งผลต่อสมองในส่วนที่ควบคุมการเจริญเติบโตและระบบประสาทตา (แก้ว กังสดาลอำไพ, 2531; Husarova & Ostatnikova, 2013) การผลิต 5′-นิวคลีโอไทด์สามารถทำได้โดยการย่อยสลายกรดนิวคลีอิกให้กลายเป็นสารประกอบ 5′-นิวคลีโอไทด์ด้วยเอนไซม์ โดยสามารถใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่มีแหล่งจากจุลินทรีย์และพืช เช่น ดีออกซีไรโบนิวคลีเอส (Deoxyribonuclease: DNase) และไรโบนิวคลีเอส (Ribonuclease: RNase) ซึ่งจะย่อยสลายกรดนิวคลีอิกได้เป็นสารประกอบ นิวคลีโอไทด์ชนิดกัวโนซีนโมโนฟอสเฟต (Guanosine Monophosphate: GMP) อะดีโนซีนโมโนฟอสเฟต (Adenosine Monophosphate: AMP) ไซทิดีนโมโนฟอสเฟต (Cytidine Monophosphate: CMP) ยูริดีนโมโนฟอสเฟต (Uridine Monophosphate: UMP) และไทมีนโมโนฟอสเฟต (Thymine Monophosphate: TMP) ทั้งชนิด 2′ 3′ และ 5′ (Gundampati & Debnath, 2009; Guo-Qing, Shi, Yu, Zhen-Xing, & Jian-Shu, 2006) ส่วนเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายกรดนิวคลีอิกให้ได้เฉพาะ สารประกอบนิวคลีโอไทด์ชนิด 5′-นิวคลีโอไทด์ คือเอนไซม์ 5′-ฟอสโฟไดเอสเทอเรส (5′-Phosphodiesterase: 5′-PDE) ซึ่งจะย่อยสลายกรดไรโบนิวคลีอิก (Ribonucleic Acid: RNA) ได้สารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-โมโนฟอสเฟต (Ribonucleotide 5'-Monophosphate) เนื่องจากสารประกอบนิวคลีโอไทด์ชนิด 5′- คือ 5′-GMP และ 5′-IMP เท่านั้นที่จะทำให้เกิดรสชาติอูมามิในผลิตภัณฑ์อาหาร ดังนั้นเอนไซม์ 5′-PDE จึงมีความน่าสนใจในการนำไปใช้ผลิตวัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหาร (Deoda & Singhal, 2003; Hechang, Guangqi, Wen, Hailong, Yi, Yongdoo, & Fanguo, 2008; Shi, Ying, Zhang, Tang, Chen, Xiong, & Liu, 2007) งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทำการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE จากเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือ *Bacillus altitudinis* AN150 ซึ่งแยกจากน้ำปลาดิบ พบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่พีเอช 6.00 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีการผลิตเอนไซม์ควบคู่ไปกับการเจริญและผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเท่ากับ 382.50 หน่วย/มล. เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง

(อนันต์ บุญปาน, อรวรรณ พึ่งคำ, และ วีระสิทธิ์ สรรพมงคลไชย, 2560) งานวิจัยนี้จะทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรียชอบเกลือ Bacillus altitudinis AN150 และประยุกต์ใช้เอนไซม์สำหรับผลิตสารประกอบ 5′-GMP ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับผู้บริโภคในการเลือกใช้เป็นวัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหารนอกเหนือจากการใช้ผงชูรส และข้อมูลที่ได้จากการวิจัยจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนากระบวนการผลิต 5′-นิวคลีโอไทด์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรียชอบเกลือ *Bacillus altitudinis* AN150 และการใช้เอนไซม์สำหรับการผลิตวัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหาร 5′-GMP

ประโยชน์ที่ได้รับ

ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์สำหรับการพัฒนากระบวนการผลิตสารประกอบ 5′-GMP ในระดับอุตสาหกรรม เพื่อเป็นทางเลือกใหม่ให้กับผู้บริโภคในการเลือกใช้วัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหาร

วิธีดำเนินการวิจัย

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ 5′-PDE

แบคทีเรียชอบเกลือ *Bacillus altitudinis* AN150 ซึ่งแยกจากน้ำปลาดิบ

การผลิตเอนไซม์ 5′-PDE ในถังหมัก

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียอายุประมาณ 24 ชั่วโมง ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว Sehgal and Gibbons Complex (SGC) (Sehgal & Gibbons, 1960) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อต่อลงในถังหมักขนาด 5.00 ลิตร ซึ่งบรรจุอาหารเหลว SGC ปริมาตร 3,000 มิลลิลิตร พีเอช 6.00 ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.00 vvm (ปริมาตรอากาศ/ปริมาตรน้ำหนัก/นาที) ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง (อนันต์ บุญปาน, อรวรรณ พึ่งคำ และ วีระสิทธิ์ สรรพมงคลไชย, 2560) จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักจะได้เอนไซม์สำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ 5′-PDE

- การทดสอบพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE ทำการเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ช่วงพีเอชระหว่าง 4.00-12.00 จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส บัฟเฟอร์ที่ใช้ช่วงพีเอชระหว่าง 4.00-5.00 ใช้สารละลาย Acetate Buffer 0.04 โมลาร์ ช่วงพีเอชระหว่าง 6.00-7.00 ใช้สารละลาย Tris-HCl Buffer 0.04 โมลาร์ ช่วงพีเอชระหว่าง 10.00-12.00 ใช้สารละลาย Glycine-NaOH Buffer 0.04 โมลาร์
- การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE ทำการเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสม จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE อุณหภูมิที่ใช้ในการทดสอบอยู่ในช่วงระหว่าง 30-80 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ 5′-PDE ที่พีเอชต่างๆ ทำการเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชระหว่าง 4.00-12.00 จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายเอนไซม์มาปรับพีเอชให้ได้พีเอชเริ่มต้นโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมความเข้มข้น 1.00 โมลาร์ จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ (Residual Activity)
- การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ 5'-PDE ที่อุณหภูมิต่างๆ ทำการเจือจางเอนไซม์ให้มีความ

เข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสม นำไปบ่มในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที แล้วทำให้เย็นลงทันทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือ

- การทดสอบความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE ทำการเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชที่เหมาะสม จากนั้นนำมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของเกลือ NaCl ในสับสเตรตให้มีปริมาณที่ความเข้มข้นสุดท้ายของเกลือในสารละลายให้เป็น 0 1.00 2.00 3.00 และ 4.00 โมลาร์

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ 5′-PDE

การวิเคราะห์กิจกรรมของ 5′-PDE (ดัดแปลงจาก Fujimoto, Kuninaka, & Yoshino, 1974) โดยใช้สารละลายเอนไซม์ 1.00 มิลลิลิตร สำหรับทำปฏิกิริยากับสารละลายกรดไรโบนิวคลีอิก 1.00 มิลลิลิตร (กรดไรโบนิวคลีอิกร้อยละ 0.10 $MgSO_4.7H_2O$ 0.16 โมลาร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 0.04 โมลาร์ พีเอช 7.00) บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ด้วยการเติมสารละลายสำหรับตกตะกอนกรดนิวคลีอิก (ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดทร้อยละ 0.25 ในกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้นร้อยละ 0.25) ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อ่างน้ำแข็งนาน 20 นาที ปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนออก นำส่วนใสที่ได้ไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น 50 เท่า นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร หนึ่งหน่วยของกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เพิ่มขึ้น 1.00 หน่วยภายใต้สภาวะที่ใช้วิเคราะห์

การศึกษาการผลิตสารประกอบ 5′-GMP

- การเตรียมเอนไซม์ 5′-PDE สำหรับการใช้งาน จะนำน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียมาทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 8,000 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ตกตะกอนส่วนใส (Supernatant) ด้วยเอทานอลร้อยละ 99.80 ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของเอทานอลในน้ำหมักเท่ากับร้อยละ 50 ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงแยกตะกอนเอนไซม์ออกจากน้ำหมักโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำตะกอนที่ได้ไปละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ นำสารละลายเอนไซม์มาทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilization) ด้วยเครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilizer) จะได้เอนไซม์ที่อยู่ในรูปผงแห้งสำหรับใช้ในการผลิตสารประกอบ 5′-GMP

- การศึกษาการผลิตสารประกอบ 5′-GMP โดยการย่อยสลาย RNA ด้วยเอนไซม์ 5′-PDE จะเตรียมสารละลาย RNA ความเข้มข้น ร้อยละ 1.00 โดยน้ำหนัก ในบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.04 โมลาร์ ซึ่งมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ 5'-PDE ผง โดยแปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์เป็นร้อยละ 0.10 (2,200 หน่วย) 0.20 (4,400 หน่วย) 0.30 (6,600 หน่วย) 0.40 (8,800 หน่วย) และ 0.50 (11,000 หน่วย) โดยน้ำหนัก ในแต่ละการทดลอง (Treatment) จะทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 ชั่วโมง เก็บไฮโดรไลเซท (Hydrolysate) ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทุกๆ 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างไฮโดรไลเซท หลังจากนั้นกรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง (Filter Membrane) ขนาดของรูเท่ากับ 0.45 ไมครอน ก่อนทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ 5′-GMP ด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC)

- การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ 5′-GMP ในตัวอย่างด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง โดยใช้ดีเทคเตอร์ชนิด LDC 4100 และ

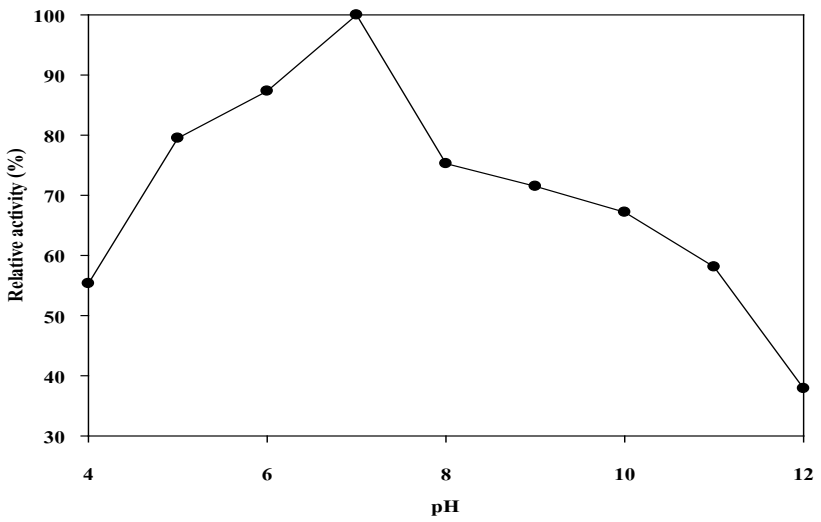
คอลัมน์ Lichrospher 100 NH_2 ขนาด 25X0.40 เซนติเมตร บรรจุอนุภาคขนาด 5.00 ไมครอน วัฏภาคเคลื่อนที่ที่ใช้คือ สารละลายผสมของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Na_2HPO_4-NaH_2PO_4) ความเข้มข้น 0.20 โมลาร์ พีเอช 5.00 และเมทานอล ในอัตราส่วนร้อยละ 90 ต่อร้อยละ 10 ปริมาตรต่อปริมาตร ควบคุมอัตราการไหลเท่ากับ 1.00 มิลลิลิตรต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 30 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ โดยวิเคราะห์อิทธิพลของการเติมเอนไซม์ 5′-PDE ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเกิดสารประกอบ 5′-GMP โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design: CRD) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปริมาณสารประกอบ 5′-GMP ที่เกิดขึ้นในแต่ละการทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

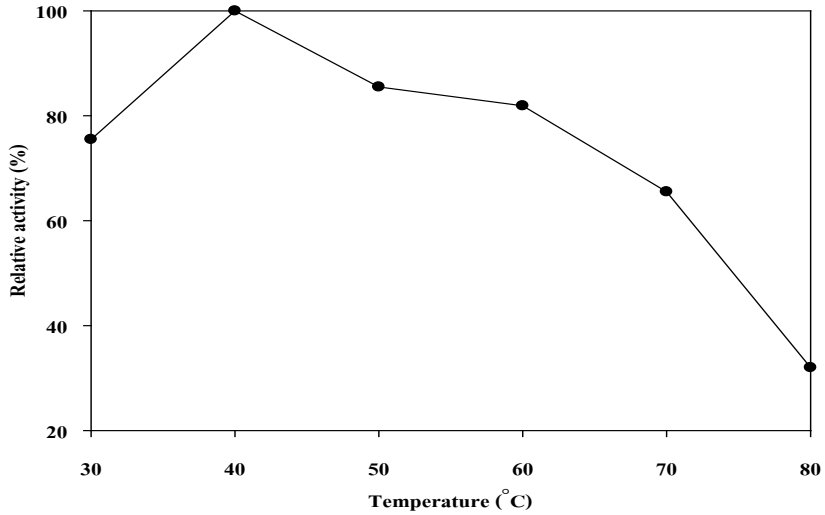
สรุปผลการวิจัยและอภิปรายผล

การศึกษาสมบัติของเอนไซม์ 5′-PDE โดยนำเอนไซม์ที่ผลิตได้มาทดสอบสมบัติของเอนไซม์ดังนี้ การทดสอบพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 1 จากการทดลองพบว่า เอนไซม์ 5′-PDE สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 7.00 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสามารถทำงานได้ดีในช่วงที่ค่อนข้างกว้าง โดยทำงานได้มากกว่าร้อยละ 70 ของกิจกรรมสูงสุดในในช่วงพีเอชระหว่าง 5.00-9.00 และจะพบว่าการทำงานของเอนไซม์จะลดลงในช่วงที่พีเอชมีความเป็นกรดและด่างสูงๆ



ภาพที่ 1 ผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE

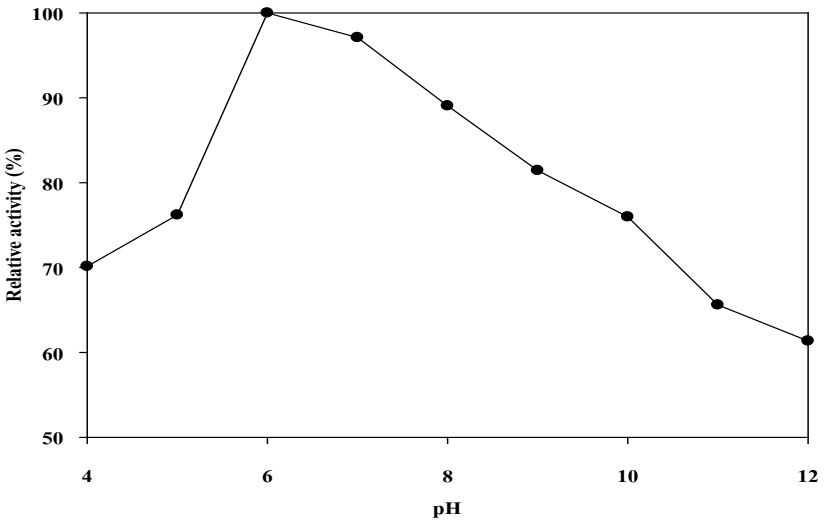
การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE โดยทำการทดสอบในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 30-80 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 7.00 ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 2 จากการทดลองพบว่า เอนไซม์ 5′-PDE สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสามารถทำงานได้ดีในช่วงที่ค่อนข้างกว้าง โดยทำงานได้มากกว่าร้อยละ 80 ของกิจกรรมสูงสุดในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 40-60 องศาเซลเซียส และจะพบว่าการทำงานของเอนไซม์จะลดลงในช่วงที่อุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส



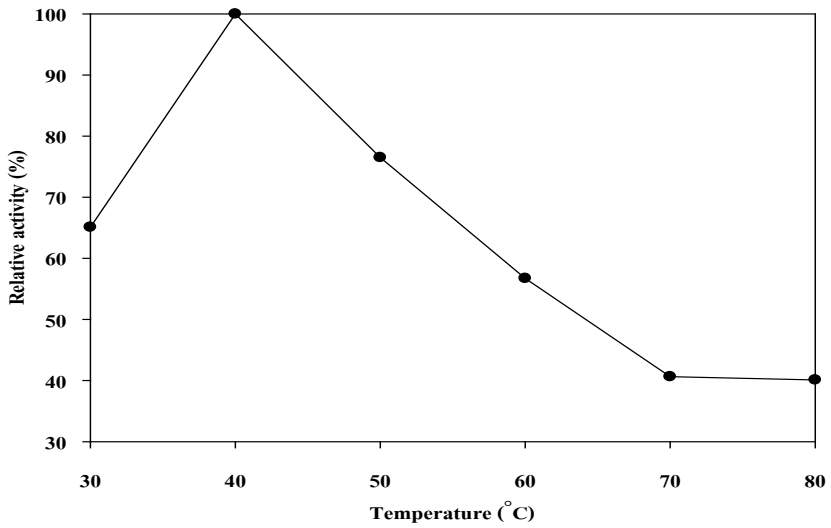
ภาพที่ 2 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE

การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ 5′-PDE โดยทำการทดสอบช่วงพีเอชระหว่าง 4.00-12.00 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 3 จากการทดลองพบว่า เอนไซม์ 5′-PDE มีความเสถียรได้สูงที่สุดที่พีเอช 6.00 โดยเอนไซม์ 5′-PDE จะมีความเสถียรได้มากกว่าร้อยละ 80 ของกิจกรรมสูงสุดในช่วงพีเอชระหว่าง 6.00-9.00 และจะพบว่าการทำงานของเอนไซม์จะมีความเสถียรลดต่ำลงในช่วงที่พีเอชมีความเป็นด่างสูงๆ

การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ 5′-PDE อุณหภูมิระหว่าง 30-80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4 จากการทดลองพบว่า เอนไซม์ 5′-PDE มีความเสถียรสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์ 5′-PDE จะมีความเสถียรได้มากกว่าร้อยละ 70 ของกิจกรรมสูงสุด ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 40-50 องศาเซลเซียส และจะพบว่าการทำงานของเอนไซม์จะมีความเสถียรลดลงในช่วงที่อุณหภูมิสูงขึ้น



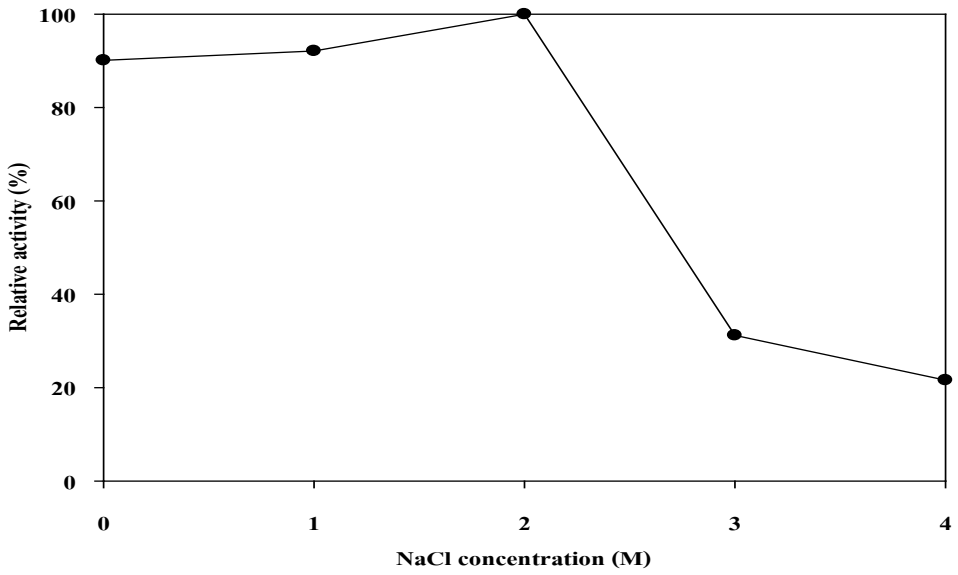
ภาพที่ 3 ความเสถียรของเอนไซม์ 5′-PDE ที่พีเอชต่างๆ



ภาพที่ 4 ความเสถียรของเอนไซม์ 5′-PDE ที่อุณหภูมิต่างๆ

การทดสอบความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 5 จากการทดลองพบว่า เอนไซม์ 5′-PDE สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของเกลือ NaCl 2.00 โมลาร์ โดยเอนไซม์ 5′-PDE จะสามารถทำงานได้มากกว่าร้อยละ 80 ของกิจกรรมสูงสุด ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl ระหว่าง 0-2.00 โมลาร์ จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรียชอบเกลือ *Bacillus altitudinis* AN150 จะต้องการเกลือเพื่อให้การทำงานมีประสิทธิภาพสูงขึ้นหรือมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ที่ชอบเกลือ (Halophilic Enzyme) (Madern, Ebel, & Zaccai, 2000)

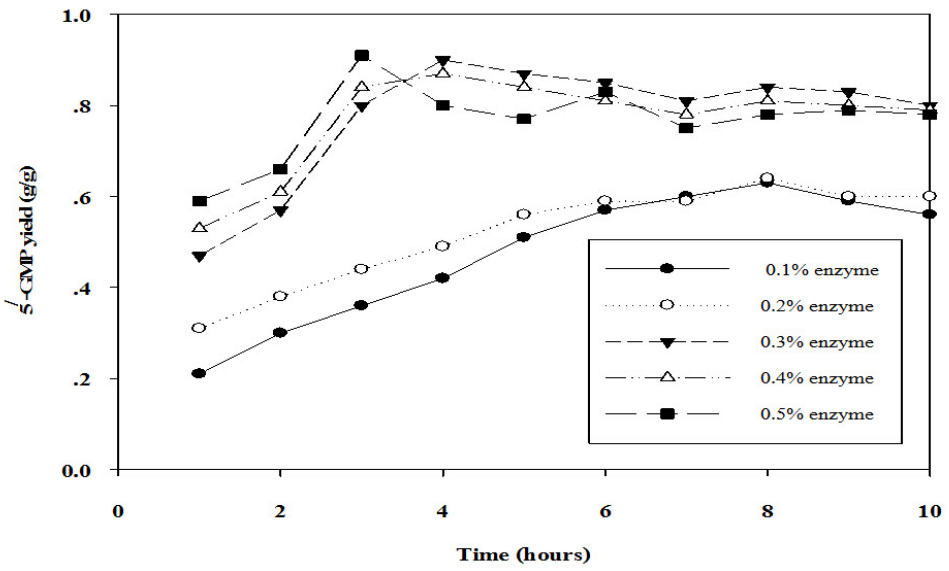
เอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรียชอบเกลือ *Bacillus altitudinis* AN150 สามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 7.00 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีความเสถียรในช่วงพีเอชระหว่าง 6.00-9.00 ช่วงอุณหภูมิระหว่าง 40-50 องศาเซลเซียส เอนไซม์ 5′-PDE มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ที่ชอบเกลือ (Halophilic Enzyme) โดยที่สามารถทำงานได้ดีในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl เท่ากับ 2.00 โมลาร์ สมบัติดังกล่าวของเอนไซม์คล้ายกับเอนไซม์นิวคลีเอส H (Nuclease H) จากเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นปานกลาง *Micrococcus varians var. halophilus* ซึ่งเป็นเอนไซม์นิวคลีเอสที่ชอบเกลือ (Halophilic Nuclease) ที่สามารถทำงานได้ดีในสภาพที่มีเกลือ NaCl หรือ KCl ความเข้มข้น 1.00-4.00 โมลาร์ และสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย RNA และ DNA ได้ ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นสารประกอบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP (Kamekura & Onishi 1974; Kamekura & Onishi ,1978) และเอนไซม์นิวคลีเอสที่ชอบเกลือจากแบคทีเรียชอบเกลือความเข้มข้นปานกลาง *Bacillus* sp. N 23-2 ที่สามารถทำงานได้ดีในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl 1.40-3.20 โมลาร์ หรือเกลือ KCl 2.30-3.20 โมลาร์ และสามารถผลิตสารประกอบ 5′-โมโนนิวคลีโอไทด์จาก RNA และ DNA ได้ (Onishi, Mori, Takeushi, Tani, Kobayashi, & Kamekura, 1983)



ภาพที่ 5 ผลของความเข้มข้นเกลือ NaCl ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ 5′-PDE

การศึกษาการผลิตสารประกอบ 5′-GMP

การศึกษาการผลิตสารประกอบ 5′-GMP โดยการย่อยสลาย RNA ด้วยเอนไซม์ 5′-PDE ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 6 จากการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ 5′-PDE มีผลต่อปริมาณ 5′-GMP ที่เกิดขึ้น โดยการใช้เอนไซม์ 5′-PDE ความเข้มข้นสูง (ร้อยละ 0.30 0.40 และ 0.50) จะทำให้เกิดปริมาณสารประกอบ 5′-GMP สูงกว่าจากการใช้เอนไซม์ความเข้มข้นต่ำ (ร้อยละ 0.10 และ 0.20) ปริมาณสารประกอบ 5′-GMP ที่เกิดขึ้นจะเพิ่มสูงขึ้น เมื่อระยะเวลาในการย่อยสลายนานขึ้น โดยช่วงระยะเวลาการย่อยสลาย 0-4 ชั่วโมง ปริมาณของสารประกอบ 5′-GMP จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว การใช้เอนไซม์ความเข้มข้นสูง (ร้อยละ 0.30 0.40 และ 0.50) ปริมาณสารประกอบ 5′-GMP จะเกิดขึ้นสูงที่สุดเมื่อทำการย่อยสลาย RNA เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ส่วนการใช้เอนไซม์ความเข้มข้นต่ำ (ร้อยละ 0.10 และ 0.20) จะต้องใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายนานกว่าเพื่อให้เกิดปริมาณสารประกอบ 5′-GMP สูงที่สุด โดยจะใช้เวลาในการย่อยสลายถึง 8 ชั่วโมง การใช้เอนไซม์ 5′-PDE ความเข้มข้นร้อยละ 0.10 0.20 0.30 0.40 และ 0.50 จะได้ผลผลิตสารประกอบ 5′-GMP เท่ากับ 0.63 0.64 0.90 0.91 และ 0.91 กรัม/กรัม RNA ตามลำดับ



ภาพที่ 6 ปริมาณสารประกอบ 5′-GMP ที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยสลาย RNA ด้วยเอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรีย *Bacillus altitudinis* AN150

การวิเคราะห์อิทธิพลของการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลาย RNA ต่อการเกิดสารประกอบ 5′-GMP โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomize Design: CRD) แบ่งการทดลองเป็น 5 การทดลอง การทดลองละ 3 ซ้ำ คือ การเติมเอนไซม์ร้อยละ 0.10 0.20 0.30 0.40 และ 0.50 ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 1 จากผลการทดลองพบว่าปริมาณสารประกอบ 5′-GMP ที่เกิดขึ้นจากการเติมเอนไซม์ร้อยละ 0.10 และ 0.20 มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่จะแตกต่างจากการทดลองที่เติมเอนไซม์ร้อยละ 0.30 0.40 และ 0.50 อย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) การเติมเอนไซม์ 5′-PDE ที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นจะทำให้เกิดปริมาณสารประกอบ 5′-GMP สูงขึ้นตามไปด้วย โดยปริมาณสารประกอบไรโบนิวคลีโอไทด์ 5′-GMP ที่เกิดขึ้นจากการเติมเอนไซม์ร้อยละ 0.50 จะมีค่าสูงที่สุด การเติมเอนไซม์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.30 0.40 และ 0.50 จะทำให้เกิดปริมาณสารประกอบ 5′-GMP ที่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ดังนั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ 5′-PDE สำหรับผลิตสารประกอบ 5′-GMP คือการใช้เอนไซม์ความเข้มข้นร้อยละ 0.30

จากการทดลองผลิตสารประกอบ 5′-GMP ด้วยการใช้เอนไซม์ 5′-PDE จากแบคทีเรียชอเกลือ *Bacillus altitudinis* AN150 ย่อยสลาย RNA พบว่า การใช้เอนไซม์ความเข้มข้นร้อยละ 0.30 0.40 และ 0.50 ย่อยสลาย RNA เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะทำให้เกิดปริมาณสารประกอบ 5′-GMP ที่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารประกอบ 5′-GMP จาก RNA คือ การใช้เอนไซม์ 5′-PDE ความเข้มข้นร้อยละ 0.30 และใช้ระยะเวลาในการย่อยสลาย 4 ชั่วโมง

ตารางที่ 1 ปริมาณสารประกอบ 5′-GMP ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลาย RNA ด้วยเอนไซม์ 5′-PDE เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของเอนไซม์ (ร้อยละ)	ผลผลิต 5′-GMP[1/] (กรัม/กรัม)
0.10	0.63±0.50[b]
0.20	0.64±0.69[b]
0.30	0.90±0.46[a]
0.40	0.87±0.70[a]
0.50	0.91±0.67[a]

หมายเหตุ ข้อมูลที่แสดงคือค่าเฉลี่ยจากการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

[1/] = ตัวอักษรที่แตกต่างกันเหนือตัวเลขแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษากระบวนการที่เหมาะสมในการแยกสารประกอบ 5′-GMP ที่ผลิตได้

2. ควรมีการศึกษาการผลิตสารประกอบอิโนซีน 5'-โมโนฟอสเฟต ซึ่งเป็นวัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหารในกลุ่มนิวคลีโอไทด์ที่สามารถใช้ร่วมกับ 5′-GMP ได้

เอกสารอ้างอิง

แก้ว กังสดาลอำไพ. 2531. ผงชูรสอีกครั้ง. **นิตยสารหมอชาวบ้าน,** 32(378): 44-47.

อนันต์ บุญปาน, อรวรรณ พึ่งคำ, และ วีระสิทธิ์ สรรพมงคลไชย. 2560. การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ 5'-ฟอสโฟไดเอสเทอเรสเพื่อใช้ผลิตวัตถุปรุงแต่งรสชาติในอาหาร. **วารสารมหาวิทยาลัยคริสเตียน,** 23(1): 27-41.

Bachmanov, A. 2010. Umami: Fifth taste? Flavor enhancer?. **Perfumer & Flavorist,** 35(4): 52-57.

Deoda, A. J., & Singhal, R. S. 2003. 5'-Phosphodiesterases (5'-PDE) from germinated barley for hydrolysis of RNA to produce flavor nucleotides. **Bioresource Technology,** 88(3): 245-250.

Fujimoto, M., Kuninaka, A., & Yoshino, H. 1974. Purification of a nuclease from *Penicillium citrinum.* **Agricultural and Biological Chemistry Journal,** 38(4): 777-783.

Gundampati, R. K., & Debnath, M. 2009. Extracellular ribonuclease from *Aspergillus niger:* Process optimization for production. **International Journal of Engineering and Technology,** 1(4): 317-320.

Guo-Qing, Y., Shi, L. E., Yu, Y., Zhen-Xing, T., & Jian-Shu, C. 2006. Production, purification and characterization of nuclease p1 from *Penicillium citrinum.* **Process Biochemistry,** 41(6): 1276-1281.

Hechang, Z., Guangqi, C., Wen, C., Hailong, L., Yi, G., Yongdoo, P., & Fanguo, M. 2008. Extraction and DNA digestion of 5'-phosphodiesterases from malt root. **Tsinghua Science and Technology,** 13(4): 480-484.

Husarova, V., & Ostatnikova, D. 2013. Monosodium glutamate toxic effects and their implications for human intake: A review. **JMED Research,** 1(1): 1-12.

Kamekura, M., & Onishi, H. 1974. Halophilic nuclease from a moderately halophilic *Micrococcus varians.* **Journal of Bacteriology,** 119(2): 339-344.

Kamekura, M., & Onishi, H. 1978. Properties of the halophilic nuclease of a moderately halophile, *Micrococcus varians* subsp. halophilus. **Journal of Bacteriology,** 133(1): 59-65.

Madern, D., Ebel, C., & Zaccai, G. 2000. Halophilic adaptation of enzymes. **Extremophiles,** 4(2): 91-98.

Onishi, H., Mori, T., Takeushi, S., Tani, K., Kobayashi, T., & Kamekura, K. 1983. Halophilic nuclease of a moderately halophilic *Bacillus* sp.:production, purification and characterization. **Applied and Environmental Microbiology,** 45(1): 24-30.

Sehgal, S. N., & Gibbons, N. E. 1960. Effect of metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum.* **Canada Journal of Microbiology,** 6(2): 165-169.

Shi, L. E., Ying, G. O., Zhang, X. Y., Tang, Z. X., Chen, J. S., Xiong, W. Y., & Liu, H. Z. 2007. Medium optimization for 5'-phosphodiesterase production from *Penicillium citrinum* using response surface methodology. **Food Technology and Biotechnology,** 45(2): 126-133.

Wifall, T. C., Faes,T. M., Taylor-Burds, C. C., Mitzelfelt, J. D., & Delay, E. R. 2007. An analysis of 5'-inosine and 5'-guanosine monophosphate taste in rats. **Chemical Senses,** 32(2): 161-172.