จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

"อนุกรมวิธานและเอนไซม์โปรทีเอสของแบคทีเรียชอบเค็มจากอาหารหมัก"

Systematics and Proteases of Halophilic Bacteria from Fermented Foods

โดย

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กุมภาพันธ์ 2550

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

"อนุกรมวิธานและเอนไซม์โปรทีเอสของแบคทีเรียชอบเค็มจากอาหารหมัก"

Systematics and Proteases of Halophilic Bacteria from Fermented Foods

โดย

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กุมภาพันธ์ 2550

เลขหมู่ จพ ภ15
เลขทะเบียน 013447
วัน, เดือน, ปี 14 M.A.51

ชื่อโครงการวิจัย : อนุกรมวิธานและเอนไซม์โปรทีเอสของแบคทีเรียชอบเค็มจากอาหารหมัก

ชื่อผู้วิจัย : รศ. ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

เดือนปีที่ทำวิจัยเสร็จ : ธันวาคม 2549

บทคัดย่อ

การศึกษาอนุกรมวิธานแบคทีเรียชอบเค็มที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากอาหารหมักชนิดต่างๆที่เก็บจากตลาด และจากน้ำปลาที่ผลิตในจังหวัดสมุทรปราการ สมุทรสงคราม ระยอง รวมทั้งจากบูดูในจังหวัดปัตตานี รวม 110 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียชอบเค็มได้จำนวน 279 ไอโซเลต จากผลการคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสขั้นต้น พบแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง 38 ไอโซเลต และแบคทีเรียชอบเค็มสูง 7 ไอโซเลต จากการศึกษาทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียตัวแทน 82 สายพันธุ์ โดยอาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์ ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี และDNA-DNA similarity รวมทั้งการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rDNA สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางจำนวน 56 สายพันธุ์ ได้ 10 กลุ่ม โดยจัดเป็นแบคทีเรีย *Lentibacillus salicampi* 3 สายพันธุ์, *L. juripiscarius* sp. nov. 5, *L. halophilus* sp. nov. 15 สายพันธุ์, *L. kapialis* sp. nov. 2 สายพันธุ์ *Filobacillus* sp. 2 สายพันธุ์ *Virgibacillus halodenitrficans* 6 สายพันธุ์, *Virgibacillus* sp. 1 สายพันธุ์, *Marinococcus* 3 สายพันธุ์, *Salinicoccus* 15 สายพันธุ์ และ *Chromohalobacter salexigens* 4 สายพันธุ์, พบแบคทีเรียชอบเค็มสูงจำนวน 26 สายพันธุ์ ได้ 3 กลุ่ม ซึ่งพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Halobacterium salinarum* 10 สายพันธุ์, *Halococcus saccharolyticus* 1 สายพันธุ์ และ *Halococcus* sp. nov. 15 สายพันธุ์

ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรทีเอสที่ปล่อยออกนอกเซลล์ พบว่าแบคทีเรียชอบเค็มสูง (extremly halophile) สายพันธุ์ DS2-5, KS87-2 และ DB10-1 ให้ค่า specific activity 0.2230-2.6524 U/ mg protein ที่ 37°C และ 1.6452-5.4643 U/ mg protein ที่ 30°C โดยใช้ casein เป็นสับสเตรท และให้ค่า specific activities 0.7808-1.9927 U/ mg protein ที่ 37°C และ 0.3525-6.7468 U/ mg protein ที่ 30° C โดยใช้ fish powder เป็นสับสเตรท แบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง (moderate halophile) สายพันธุ์ RF2-5, RBU1-1, SSK10-5, PN2-19, SSK2-2 และ SSK3-2 ให้ค่า specific activity สูง 11.1140-29.7991 U/ mg protein ที่ 37°C และให้ค่า specific activity สูง 23.8335–32.8760 U/ mg protein ที่ 30°C โดยใช้ casein เป็นสับสเตรท และพบว่าการใช้ fish powder เป็น substrate จะให้ค่า specific activity 12.7219-29.7991 U/ mg protein ที่ 37°C และ specific activity 13.9652-49.5517 U/ mg protein ที่ 30°C นอกจากนี้ได้เลือกตรวจสอบการผลิตเอนไซม์โปรทีเอสภายในเซลล์ของแบคทีเรียชอบปานกลางบางสายพันธุ์

Project Title : Systematics and Proteases of Halophilic Bacteria from Fermented Foods

Name of the Investigators : Associate Professor Dr. Somboon Tanasupawat

Month/Year : December 2006

ABSTRACT

In order to isolate and screen for protease-producing halophiles, 279 isolates were isolated from fish sauce samples collected in Samutprakarn, Samutsongkram, and Rayong and from bu-du in Pattani provinces. Thirty-eight isolates of the moderately halophilic bacteria and 7 isolates of extremely halophilic bacteria exhibited protease activity in the primary screening. The representative 82 isolates were selected for further taxonomic studies based on their phenotypic and chemotaxonomic characteristics, DNA-DNA similarity and the phylogenetic analysis using 16S rDNA sequences. Fifty-six isolates of moderately halophilic bacteria were divided in to 10 groups. They were identified as *Lentibacillus salicampi* (3 isolates), *L. juripiscarius* sp. nov (5 isolates), *Chromohalobacter salexigens* (4 isolates), *Halobacillus* sp. (1 isolate), and *Filobacillus* sp. (1 isolate). Twenty-six isolates of extreme halophiles were identified as *Halobacterium salinarum* (10 isolates), *Halococcus saccharolyticus* (1 isolate) and *Halococcus* sp. nov. (15 isolates).

On the study of extracellular protease activity, the extreme halophiles, DS2-5, KS87-2 และ DB10-1 showed high enzyme specific activity 0.2230-2.6524 U/ mg protein at 37 °C and 1.6452-5.4643 U/ mg protein at 30 °C using casein as a substrate whereas their specific activities were 0.7808-1.9927 U/ mg protein at 37 °C and 0.3525-6.7468 U/ mg protein at 30°C using fish powder as substrates. The moderate halophiles, RF2-5, RBU1-1, SSK10-5, PN2-19, SSK2-2, and SSK3-2 showed high specificity activity 11.1140-29.7991 U/ mg protein at 37°C and 23.8335-32.8760 U/ mg protein at 30°C using casein as substrates whereas their specific activities were 12.7219-29.7991 U/ mg protein at 37°C and 13.9652-49.5517 U/ mg protein at 30°C using fish powder as substrates. The intracellular protease activities were determined for some selected strains.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ โดยอนุมัติทุนวิจัยกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปี 2545-46 เป็นเงินจำนวนทั้งสิ้น 168,000 บาท (หนึ่งแสนหกหมื่นแปดพันบาทถ้วน)

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางเภสัชศาสตร์ และศูนย์ปฏิบัติการกลาง คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุญาตให้ใช้เครื่องมือรวมทั้งภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ใช้สถานที่ในการวิจัยครั้งนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... II

กิตติกรรมประกาศ..... III

สารบัญ..... IV

สารบัญตาราง..... V

สารบัญภาพ..... VI

บทที่

1. บทนำ..... 1
2. การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4
3. วิธีการวิจัย..... 16
4. ผลการวิจัยและการอภิปรายผล..... 19
5. ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ..... 69

เอกสารอ้างอิง..... 71

ภาคผนวก 78

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ลักษณะที่แตกต่างกันของสกุล *Halobacterium, Haloferax, Haloarcula, Halococcus, Natronobacterium* และ *Natronococcus*	10
2.2	ลักษณะที่แตกต่างกันของสกุล *Halobacillus, Halomonas, Bacillus, Salibacillsu, Virgibacillus* และ *Lentibacillus*	11
2.3	คุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียชอบเค็มสูง	13
4.1	ชนิดตัวอย่างอาหารหมัก แหล่งที่มา รหัสเชื้อและจำนวนไอโซเลต	19
4.2	การย่อยเคซีนและเจลาตินของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้	23
4.5	DNA-DNA similarity ของ *Lentibacillus* กลุ่มที่ 1 และ 2	36
4.6	ลักษณะแตกต่างของ *Lentibacillus* กลุ่มที่ 1 และ 2	37
4.7	DNA-DNA similarity ของ *Lentibacillus* กลุ่มที่ 3	38
4.8	DNA-DNA similarity ของ *Lentibacillus* กลุ่มที่ 4	38
4.9	ลักษณะแตกต่างของ *Lentibacillus* species	39
4.10	ลักษณะแตกต่างของ *Filobacillus* species	41
4.11	DNA-DNA similarity ของ *Virgibacillus* species	43
4.12	ลักษณะแตกต่างของ *Virgibacillus* species	44
4.13	DNA-DNA similarity ของ *Marinococcus* species	46
4.14	ลักษณะแตกต่างของ *Marinococcus* species	47
4.15	DNA-DNA similarity ของ *Salinicoccus*	49
4.16	ลักษณะแตกต่างของ *Salinicoccus* species	50
4.17	DNA-DNA similarity ของ *Chromohalobacter* spp.	52
4.18	ลักษณะแตกต่างของ *Chromohalobacter* spp.	52
4.19	DNA-DNA similarity ของแบคทีเรีย Group A และ B	55
4.20	ลักษณะของแบคทีเรียชอบเค็มสูง Group A และ B	56
4.21	DNA-DNA similarity ของแบคทีเรียชอบเค็มสูง Group C	59
4.22	ลักษณะแตกต่างของ *Halococcus* species	60
4.23	Protease activities of isolates on casein as substrate	62
4.24	Protease activities of isolates on casein as substrate	62
4.25	Intracellular และ extracellular protease activity ของแบคทีเรียที่คัดเลือก	68

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ขั้นตอนการผลิตน้ำปลา	6
2.2	แสดงการเกิดสารประกอบเอมีน	7
4.1	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่สามารถย่อยเคซีน	25
4.2	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่สามารถย่อยเคซีน	26
4.3	ลักษณะเซลล์และสปอร์ของแบคทีเรียสกุล *Lentibacillus* สายพันธุ์ IS40-3 และ PS11-2	35
4.4	Phylogenetic tree of IS40-3, PS11-2 and PN7-6, based on 16S rDNA sequence	40
4.5	ลักษณะเซลล์และสปอร์ของแบคทีเรียสกุล *Filobacillus* สายพันธุ์ RF2-5 และ RBU1-1	41
4.6	Phylogenetic tree of RF2-5 and RBU1-1 based on 16S rDNA sequence	42
4.7	Phylogenetic tree of SSK2-2 and SSK3-2 based on 16S rDNA sequence	45
4.8	Phylogenetic tree of CS2 based on 16S rDNA sequence	48
4.9	Phylogenetic tree of PN1-2 based on 16S rDNA sequence	51
4.10	Phylogenetic tree of DS26-2 based on 16S rDNA sequence	54
4.11	Phylogenetic tree of RF6, DB5-2, and DS2-5 based on 16S rDNA sequences	57
4.12	ลักษณะโคโลนีและเซลล์ของแบคทีเรีย *Halococcus* sp. DB5-2	58

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

อาหารหมักดองของไทยมีจุลินทรีย์หลายประเภทแสดงบทบาทเกี่ยวข้องในกระบวนการหมัก เช่นในลูกแป้ง ที่ใช้ในการหมัก สาโท น้ำขาว กระแช่ และอุ พบเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Aspergillus oryzae*, *Amylomyces rouxii*, *Rhizopus* spp. และ *Mucor* spp. (Sukhumavasi และ คณะ, 1975; Lotong,1998) เชื้อ *Aspergillus oryzae* ใช้ในการผลิตโคจิเพื่อหมักซีอิ๊ว (Lotong, 1998) แบคทีเรียกรดแลคติกทำให้อาหารหมักมีรสเปรี้ยว ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus*, *P. acidilactici*, *Lactobacillus pentosus*, *L. plantarum*, *L. sake*, *L. farciminis*, *L. acidipisci*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *Weissella confusa*, *W. thailandensis*, *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* sp., *Enterococcus hirae*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *Enterococcus* sp., *Tetragenococcus halophilus* และ *T. muriaticus*, ซึ่งพบในแหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ปลาส้ม ส้มฟัก ปลาเจ่า มั่ม ผักกาดดอง ผักเสี้ยนดอง ผักกุ่มดอง หน่อไม้ดอง ถั่วงอกดอง หอมดอง กะหล่ำปลีดอง ใบเมี่ยงหมัก ข้าวหมาก ปลาร้า ปลาจ่อม กุ้งจ่อม หอยดอง ซีอิ๊ว น้ำปลา และบูดู พบ *Staphylococcus carnosus*, *S. piscifermentans*, *Bacillus* sp., *Halobacterium* sp. และ *Halococcus* sp. ในอาหารที่มีเกลือสูง (Tanasupawat และ Komagata, 1995; Tanasupawat และ คณะ, 1998; Tanasupawat และ คณะ, 2000, 2002; Tanasupawat และ Komagata, 2001) โดยเฉพาะ *Bacillus* sp. และ *Halobacterium salinarum* ในบูดูและน้ำปลา สามารถสร้างเอนไซม์โปรทีเอส (Choorit และ Prasertsan, 1992; Thongthai และ คณะ, 1992) นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียชอบเค็มและแบคทีเรียทนเค็มอีกหลายชนิดในกะปิ น้ำปลา และซีอิ๊ว (สมบูรณ์ 2543)

แบคทีเรียชอบเค็ม (Ventosa และ Nieto, 1995) ปัจจุบันสามารถจัดได้เป็นสองกลุ่มได้แก่ พวกชอบเค็มสูง (extremely halophilic archaea) ซึ่งเจริญได้เหมาะสมในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือความเข้มข้น 2.5-5.2 M (saturated NaCl) ได้แก่ เชื้อสกุล *Halobacterium*, *Haloferax*, *Haloarcula*, *Halococcus*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Methanohalobium*, *Acetohalobium*, *Actinopolyspora* และ *Ectothiorhodospira* และพวกชอบเค็มปานกลาง (moderate halophiles) เจริญได้เหมาะสมในอาหารที่มีเกลือ 0.5 ถึง 2.5 MNaCl ได้แก่ archaea bacteria พวก *Methanohalophilus*, *Halomethanococcus* แบคทีเรียแกรมบวกสกุล *Bacillus*, *Clostridium*, *Marinococcus*, *Micrococcus*, *Salinicoccus* และ *Sporosarcina* แบคทีเรียแกรมลบสกุล *Arhodomonas*, *Chromohalobacter*, *Deleya*, *Dichotomicrobium*, *Flavobacterium*, *Haloanaerobium*, *Halobacteroides*, *Haloincola*, *Halomonas*, *Halovibrio*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Spirochaeta*, *Sporohalobacter*, *Vibrio*, *Volcaniella* แอคติโนมัยซีทส์สกุล

Actinopolyspora แบคทีเรียรีดิวส์ซัลเฟตสกุล *Desulfohalobium* และ *Desulfovibrio* แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (phototroph) สกุล *Rhodospirillium, Ectothioshodospira, Chromatium* และ *Thiocapsa*

โปรทีเอสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีความสามารถในตัดพันธะเปบไทด์ของโปรตีน ทำให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและขนาดโมเลกุล การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นมีผลทำให้โปรตีนแสดงคุณสมบัติแตกต่างไปจากเดิม เช่น ความสามารถในการละลาย ความสามารถในการจับกับน้ำ ความสามารถในการทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆ ความสามารถในการเกิดเจล การเกิดโฟม ซึ่งรวมๆ กันแล้วมีผลโดยตรงต่อลักษณะปรากฏของอาหารทั้ง กลิ่น รส สี และลักษณะเนื้อสัมผัส การย่อยสลายโปรตีนมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดกระบวนการหมักของอาหารหมักหลายๆ ชนิด ทั้งจากเนื้อสัตว์และธัญพืช ตัวอย่างอาหารหมักที่เกิดจากการย่อยสลายของโปรตีน ที่สำคัญ ได้แก่ บูดู กะปิ น้ำปลา ปลาร้า ซีอิ๊ว และ ถั่วเน่า การย่อยสลายของโปรตีนเกิดได้โดยเอนไซม์ที่มีอยู่ในเนื้อหรือวัตถุดิบเริ่มต้น และจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์โปรทีเอส การย่อยสลายของโปรตีนทำให้เกิดเปปไทด์และกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ซึ่งมีผลต่อรสชาติของอาหารหมักและเป็นสารตั้งต้นที่สามารถทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบอื่นๆ ในอาหาร เช่น น้ำตาล ไขมัน เกิดเป็นสารใหม่ที่มีกลิ่น สี และลักษณะเฉพาะตัว

เนื่องจากแบคทีเรียชอบเค็มมีความสามารถในการทนเกลือมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ แบคทีเรียชอบเค็มกลุ่มนี้ จึงน่าจะมีบทบาทสำคัญในอาหารหมักที่มีเกลือสูง เช่น น้ำปลา กะปิ และบูดู ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีนและการสร้างสารให้กลิ่นรสที่เป็นลักษณะเฉพาะตัว Kim และ Dordick (1997) ได้ศึกษาโปรทีเอสของเชื้อ *Halobacterium halobium* Chaiyanan และ คณะ (1999) รายงานการค้นพบ "*Halobacillus thailandensis* " ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบเค็ม ชนิดใหม่ที่แยกได้จากน้ำปลานั้นมีลักษณะแตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ รวมทั้งความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน(Chaiyanan และ คณะ, 1999) นอกจากนี้อาจสามารถใช้เป็นหัวเชื้อเพื่อลดระยะเวลาในการหมักน้ำปลา (Chaiyanan และ คณะ, 1988) อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียชอบเค็ม และ เอนไซม์โปรทีเอสที่เชื้อดังกล่าวผลิตยังมีน้อยมาก ดังนั้นการใช้คุณลักษณะทางชีวภาพ เช่น ความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน ชนิดของเอนไซม์โปรทีเอสที่แบคทีเรียสร้างขึ้นในระหว่างการเจริญ ร่วมกับลักษณะต่างๆ ทางกายภาพ รวมทั้งความต้องการเกลือในการทำอนุกรมวิธาน น่าจะช่วยให้สามารถจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียชอบเค็มได้ละเอียดมากขึ้น ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีสำคัญในการหมักและมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการพัฒนาเป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์ เพื่อลดเวลาการหมักและให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพและปลอดภัยต่อผู้บริโภค นอกจากนี้ยังอาจนำแบคทีเรียชอบเค็มมาใช้เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติพิเศษแตกต่างจากเอนไซม์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยเฉพาะความสามารถในการทำงานในสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือสูงในอนาคต

แบคทีเรียชอบเค็มมีบทบาทย่อยโปรตีนของเนื้อปลา และบางพวกสร้างกรดทำให้อาหารมีรสเปรี้ยว พบเชื้อ พวกที่ชอบเค็มสูง ได้แก่ *Halobacterium salinarum* ในน้ำปลา (Thongthai และคณะ, 1992)และแบคทีเรียกรดแลคติกชอบเค็มปานกลางพวก *Tetragenococcus halophilus* และพบเชื้อ *Staphylococcus carnosus* และเชื้อชนิดใหม่ *Staphylococcus piscifermentaus* ในปลาหมักเช่น น้ำปลา ปลาร้า ปลาจ่อม กุ้งจ่อมและซีอิ๊ว (Tanasupawat และ คณะ, 1991; 1992) นอกจากนี้แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางบางพวกยังสามารถสร้าง exoenzymes หลายชนิด ได้แก่ amylases, nucleases, proteases และ 5'-nucleotidases เช่น เชื้อ *Micrococcus varians* subsp. *halophilus* และ *Bacillus* sp. (Kamekura และ คณะ, 1982 ; Khire และ Pant, 1992).

อย่างไรก็ตามแม้จะมีผู้วิจัยเกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ในน้ำปลา (สาโรช, 2531; ศิริเพ็ญ, 2533) แล้วก็ยังมีแบคทีเรียที่มีบทบาทในกระบวนการหมักที่น่าสนใจนอกเหนือจากจุลินทรีย์ที่กล่าวมาแต่ยังไม่มีการนำไปใช้ผลิตเป็นหัวเชื้อ และความรู้พื้นฐานของจุลินทรีย์เหล่านี้ในน้ำปลาและอาหารที่มีเกลือสูงในประเทศไทยยังมีน้อย โครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มจากอาหารหมักที่สามารถสร้างเอนไซม์โปรทีเอส และเพื่อจัดกลุ่มของแบคทีเรียเหล่านั้นโดยอาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์ รวมทั้ง DNA-DNA homology และ ลำดับเบสในช่วง 16S rDNA sequenc นอกจากนี้ยังศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรทีเอสโดยการตรวจสอบปริมาณ protease activity และโปรตีนของ แบคทีเรียชอบเค็ม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปลาหมัก (Fermented Fish) ผลิตโดยนำวัตถุดิบ เช่น ปลา มาผสมกับเกลือ และนำไปบรรจุในภาชนะที่ใช้สำหรับหมัก จะใช้เวลาหมักแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารที่จะผลิต จัดเป็นการถนอมอาหาร วิธีหนึ่งซึ่งทำได้สะดวก มีต้นทุนต่ำ และไม่ต้องใช้เทคนิคที่ซับซ้อน ตัวอย่าง เช่น น้ำปลา ปลาร้า ปลาส้ม ปลาเจ่า บูดู ปลาจ่อม กุ้งจ่อม และ กะปิ อาหารเหล่านี้มีแบคทีเรียหลายประเภทแสดงบทบาทเกี่ยวข้องในกระบวนการหมัก เช่น แบคทีเรียกรดแลคติกทำให้อาหารหมักมีรสเปรี้ยว ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus*, *P. acidilactici*, *Lactobacillus pentosus*, *L. plantarum*, *L. sake*, *L. farciminis*, *L. acidipisci*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *Weissella confusa*, *W. thailandensis*, *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* sp., *Enterococcus hirae*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus*, *Enterococcus* sp., *Tetragenococcus halophilus* และ *T. muriaticus*, ซึ่งพบในแหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ปลาส้ม ปลาเจ่า ปลาร้า ปลาจ่อม กุ้งจ่อม น้ำปลา และบูดู (Tanasupawat และ Komagata, 1995; Tanasupawat และ คณะ, 2000; Thongsanit และ คณะ, 2002) และพบ *Staphylococcus carnosus*, *S. piscifermentans*, *S. epidermis*, *Bacillus* sp., *B. licheniformis*, *B. sphaericus*,, *Micrococcus sp.*, *Pediococcus halouphilus*, *Halobacterium* sp. และ *Halococcus* sp. ในอาหารที่มีเกลือสูง โดยเฉพาะ *Bacillus* sp. *Halobacterium salinarum* และ *Halobacillus thailandensis* ในบูดูและน้ำปลา สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอส (Chaiyanan และ คณะ, 1999; Choorit และ Prasertsan, 1992; Phithakpol และ คณะ, 1995; Thongthai และ คณะ, 1992)

แบคทีเรียทนเค็มที่พบในปลาหมักมีบทบาทสำคัญต่อการผลิต เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้จะสร้างเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีน ทำให้เกิด เปปไทด์และกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ซึ่งมีผลต่อรสชาติของอาหารหมักและเป็นสารตั้งต้นที่สามารถทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบอื่นๆ ในอาหาร เช่น น้ำตาล ไขมัน เกิดเป็นสารใหม่ที่มีกลิ่น สี และลักษณะเฉพาะตัว (Chaveesuk และ คณะ, 1993; Lopetcharat และ คณะ, 2001)

เป็นที่ทราบกันว่าปลาหมักจะต้องใช้ระยะเวลาในการผลิตนาน เช่น น้ำปลาใช้เวลาการหมัก 9-18 เดือน แต่ถ้าใช้เวลาการหมักนานเกินไปจะก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลิตภัณฑ์ เช่น เกิดสารประเภทเอมีนซึ่งเป็นสารพิษ ส่วนกะปิจะใช้เวลาหมัก 4-6 เดือน จึงจะได้กะปิคุณภาพดี (Chaveesuk และ คณะ, 1993; Lopetcharat และ คณะ, 2001; Tanasupawat และ Komagata, 1995) ดังนั้นจึงมีการศึกษาการลดระยะเวลาการผลิตโดยการใช้เอนไซม์ การใช้กรด แต่ยังไม่มีวิธีใดที่นำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม (Chaiyanan และ คณะ, 1988) ขณะเดียวกันมีรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรียทนเค็มที่แยกจากปลาหมักมีจำนวนน้อย (สาโรช, 2531; ศิริเพ็ญ, 2533; Chaiyanan และ

คณะ, 1999; Thongthai และ คณะ, 1992) ส่วนการศึกษาเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียชอบเค็มที่แยกได้จากปลาหมักยังมีไม่รายงาน ส่งผลให้ไม่มีการนำเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียชอบเค็มมาศึกษาเพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำปลา หรือ อื่นๆ ดังนั้นวิทยานิพนธ์นี้จึงมุ่งเน้นที่การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียชอบเค็ม เพื่อเป็นองค์ความรู้พื้นฐานของแบคทีเรียชอบเค็มในน้ำปลาและปลาหมักชนิดอื่นๆ รวมทั้งการคัดเลือกหาแบคทีเรียชอบเค็มที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสในปริมาณสูง การทำให้โปรติเอส บริสุทธิ์ ตลอดจนการศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของเอนไซม์

2.1. ปลาหมัก (Fermented fish)

ประเทศไทยมีการถนอมอาหารจำพวกสัตว์น้ำ เช่น ปลากระตัก ปลาไส้ตัน และ กุ้ง โดยใช้เกลือซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยม เนื่องจากสะดวก ราคาไม่แพง และไม่ต้องใช้เทคนิคที่ซับซ้อน ส่งผลให้อาหารหมักมีบทบาทสำคัญต่อวิถีชีวิตของคนไทย (Chaveesuk และ คณะ, 1993; Lopetcharat และ คณะ, 2001; Phithakpol และ คณะ, 1995; Tanasupawat และ Komagata, 1995)

น้ำปลาเป็นผลิตภัณฑ์ปลาหมัก ซึ่งใช้เป็นเครื่องปรุงที่รู้จักกันมานานแล้ว โดยทั่วไปแล้วผลิตกันมากในแถบเอเชีย แต่พบว่ามีชื่อที่แตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ เช่น ไทย (น้ำปลา) มาเลเซีย (บูดู) อินโดนีเซีย (Ketjab-ikan) เวียดนาม และกัมพูชา (nouc-mam) ญี่ปุ่น (อิชิรุ) จีน (ยีสุ) และเกาหลี (aekjeot) น้ำปลาจัดเป็นผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่มีความสำคัญมากที่สุดในจำนวนผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำทั้งหมด ในแต่ละปีมีการผลิตระดับอุตสาหกรรมในปริมาณสูง นอกจากจะผลิตเพื่อบริโภคแล้ว ยังมีการส่งไปจำหน่ายยังต่างประเทศ น้ำปลาเป็นของเหลวใส สีน้ำตาล มีรสชาติเค็มเนื่องจากเกิดการย่อยสลายโปรตีนในตัวปลาเช่น ปลาไส้ตัน (*Corica sorborna*, *Stolephorus indicus*, *Stolephorus commersonii*) ปลากระตัก (*Clupeoides* sp.), *Corinal argentius*, *Trissocles setirostris*, *Crossocheilus* sp., *Cirrhinus* sp. และ *Labiobarbus* sp. กับเกลือ ในอัตราส่วน 2:1 ถึง 6:1 ขึ้นอยู่กับแต่ละประเทศ โดยใช้เวลา 6-18 เดือน ในสภาวะการหมักแบบ anaerobic หรือ facultative น้ำปลาที่ได้จะมีไนโตรเจนประมาณ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ประมาณ 80% จะอยู่ในรูปของกรดอะมิโนซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ หลังจากนั้นจะนำส่วนที่เป็นของเหลวไปตกตะกอนเป็นระยะเวลา 2-12 สัปดาห์ จะทำให้ได้น้ำปลาเกรดเอ หรือเกรดที่ 1 ขั้นตอนการผลิตน้ำปลาแสดงในภาพที่ 2.1 ส่วนกากปลาที่เหลือจากการผลิตน้ำปลาเกรด 1 จะนำมาใช้ผลิตน้ำปลาเกรดต่ำ โดยการเติมน้ำเกลือ การแต่งสีและเติมสารที่ไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคเพื่อเพิ่มสี รส และคุณภาพของน้ำปลาเกรดต่ำ

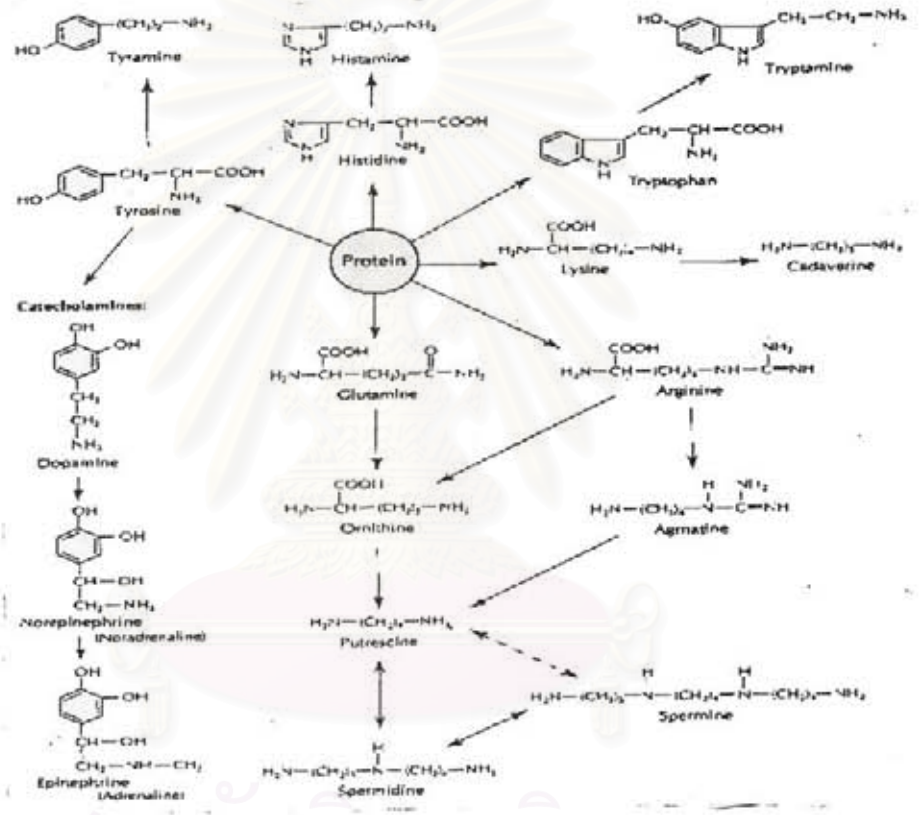
น้ำปลาที่ได้มีลักษณะพิเศษเฉพาะตัว เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ ทางเคมี และจุลินทรีย์ระหว่างการหมัก เช่น กลิ่นของน้ำปลาเกิดจากการย่อยโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติเอสจากตัวปลา และจากแบคทีเรีย ทำให้ได้เป็นเปปไทด์ และอาจถูกย่อยต่อไปอีกเป็น เอมีน คีโตแอซิด แอมโมเนีย และ คาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนพวกไขมันจะถูกย่อยโดยเอนไซม์ทำให้เกิดกรดไขมันทั้งที่ระเหยได้และระเหยไม่ได้ รวมทั้งสารพวกคีโตนและอัลดีไฮด์ รสของน้ำปลาพบว่า

ประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิด ซึ่งต่างก็มีรสเฉพาะตัว ที่พบมีเกือบทุกระยะของการหมัก ได้แก่ aspartic acid, lysine, glutamic acid, glycine, histidine, leucine และ isoleucine สีของน้ำปลาจะเปลี่ยนจากสีเหลืองอ่อนๆ ไปเป็นสีน้ำตาลแดง เมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้น ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล คือ Maillard reactions จากปฏิกิริยาของ carbonyl group ของน้ำตาล เช่น น้ำตาล ribose กับ amino group หรือสารประกอบ amine จากปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีน

ภาพที่ 2.1 ขั้นตอนการผลิตน้ำปลา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นอกจากปริมาณของไนโตรเจนในน้ำปลาแล้ว ดัชนีแสดงคุณภาพของน้ำปลา คือ ปริมาณ histamine จัดเป็นสารประกอบเอมีนเกิดจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของกรดอะมิโนและอนุพันธ์ของกรดอะมิโนนั้นๆ โดยการเกิดปฏิกิริยา decarboxylation ซึ่งสามารถพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ กลไกการเกิดสารประกอบเอมีนในอาหาร เริ่มจากโปรตีนเกิดการสลายตัว (proteolysis) เป็นกรดอะมิโนอิสระ จากนั้นเกิดปฏิกิริยา decarboxylation โดยเอนไซม์ decarboxylase จากจุลินทรีย์ที่มีในอาหารได้เป็นสารประกอบเอมีนชนิดต่างๆ ดังภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 แสดงการเกิดสารประกอบเอมีน

ปกติแล้วการรับประทานอาหารที่มีสารประกอบเอมีนจะไม่เกิดอันตราย ยกเว้นกรณีบุคคลที่เป็นโรคเกี่ยวกับความดันเลือดผิดปกติ หรือ ปริมาณสารประกอบเอมีนปริมาณสูง ทำให้ผู้บริโภคเกิดความผิดปกติ ได้แก่ จะมีผื่นแดงเกิดขึ้นในช่องปาก (burning sensation) ปวดศีรษะ ท้องร่วง คลื่นไส้ อาเจียน หัวใจเต้นแรงและเร็ว อาการเหล่านี้จะเกิดขึ้นในระยะเวลา 2-3 ชั่วโมง โดยการอาการแพ้จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความต้านทานที่แตกต่างกันของร่างกายผู้บริโภค โดยปกติแล้วปริมาณสารประกอบเอมีนที่ยอมรับให้มีได้ของ Histamine ที่ 100 มิลลิกรัม/ กิโลกรัมอาหาร

ส่วน Tyramine ยอมรับที่ 100 – 800 มิลลิกรัม/ กิโลกรัมอาหาร และ Phenylethylamine ยอมรับที่ 30 มิลลิกรัม/ กิโลกรัมอาหาร (Brink และ Damirik, 1990)

ปลาร้าจัดเป็นปลาหมัก มีสีน้ำตาลเหลืองถึงสีดำ ขึ้นอยู่กับปลาที่นำมาใช้ผลิต มีรสเค็ม มีกลิ่นและลักษณะเฉพาะ ซึ่งสามารถนำมาปรุงเป็นอาหารได้หลายชนิด ตัวอย่างปลาน้ำจืดที่นำมาใช้ทำปลาร้า เช่น ปลากระดี่ (*Trichogaster* sp.) ปลาตะเพียน *(Puntius gonionotus)* ปลาสร้อย (*Crossocheilus* sp.; *Labiobarbus lepocheilus)* และปลาช่อน (*Channa Striatus)*

กะปิ จะมีสีเข้มจนเกือบดำ และมีกลิ่นค่อนข้างแรง โดยพบว่าสีของกะปิขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่นำมาใช้ ได้แก่ เคยตาแดง *(Acetes erythraeus)* เคยตาดำ *(Mesopodopsis orientalis)* และ ปลาน้ำเค็ม (saltwater fish) เช่น กะปิที่ทำจากเคยตาดำจะมีสีม่วง และพบว่าปริมาณเกลือที่ใช้มีผลต่อระยะเวลาการเก็บกะปิ เมื่อใช้เกลือ (NaCl) 20 $\pm$ 5% จะสามารถเก็บกะปิไว้ได้ประมาณ 12 เดือน แต่เมื่อใช้เกลือ (NaCl) 30 $\pm$ 5% จะสามารถเก็บกะปิไว้ได้ประมาณ 14-16 เดือน แต่ไม่ควรเกิน 18 เดือน เพราะกลิ่นของกะปิจะค่อยๆลดลงไป

เนื่องจากน้ำปลา ปลาร้า และกะปิ จัดเป็นปลาหมักที่มีความสำคัญ และใช้เกลือในถนอมอาหาร ซึ่งสภาวะดังกล่าวนี้เหมาะสมกับกับการเจริญของแบคทีเรียชอบเค็ม (halophilic bacteria) จึงทำให้มีงานวิจัยเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มจากอาหารดังกล่าว ได้แก่ *Halobacterium salinarum*, *Halococcus* sp., *Halobacillus thailandensis*, *Tetragenococcus halophilus, T. muriaticus, Bacillus* sp., *Bacillus subtilis, B. licheniformi, B. spaericus, Pediococcus* sp., *Pediococcus halophilus, Staphylococcus* sp., *S. piscifermentans*, *Styphylococcus epidermidis, Sarcina* sp., *Micrococcus* sp., และ *Lactobacillus* sp. โดยเฉพาะ *Bacillus* sp., *Halobacterium salinarum* และ *Halobacillus thailandensis* สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ (Chaiyanan และคณะ, 1999; Lopetcharat และ คณะ, 2001; Thongthai และ คณะ, 1992; Thongsanit และ คณะ, 2002)

2.2 การจัดจำแนกแบคทีเรียชอบเค็ม (Holt และ คณะ, 1994; Ventosa และ Nieto, 1995; Ventosa และ คณะ., 1998; Vreeland และ Hochstein, 1993) จัดได้เป็น 2 กลุ่ม ตามความเข้มข้นของเกลือที่แบคทีเรียชอบเค็มเจริญได้ดีที่สุด

2.2.1 แบคทีเรียชอบเค็มสูง (extremely halophilic bacteria) แบคทีเรียกลุ่มนี้ถูกค้นพบตั้งแต่ปี 1980 เนื่องจากเกิดพื้นที่ที่มีสีแดงเป็นบริเวณกว้าง โดยเฉพาะบริเวณที่มีความเข้มขนของเกลือสูงเนื่องจากเกิดการระเหยของน้ำ เช่น Great Salt lake, Utah, the Dead Sea , Wadi Natrun, Egypt และ Magadi, Kenya และยังสามารถพบแบคทีเรียที่สร้างสารสีแดงในปลาและเครื่องหนังที่เก็บรักษาโดยการเติมเกลือเพื่อป้องกันการทำลายของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือความเข้มข้นอย่างน้อย 15% จนถึงความเข้มข้นของเกลืออิ่มตัว (saturated NaCl) และความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมประมาณ 20-25% แต่ไม่สามารถเจริญในสิ่งแวดล้อม

ที่ไม่มีเกลือ แบคทีเรียกลุ่มนี้มีทั้งรูปร่างกลม แท่ง และไม่แน่นอน แบคทีเรียชอบเค็มสูงสามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟกเจลลา และไม่เคลื่อนที่ เมื่อย้อมแกรมพบว่ากลุ่มที่มีรูปร่างแท่งจะย้อมติดแกรมลบ เซลล์จะแตกหรือเปลี่ยนเป็นลักษณะกลม เมื่อนำไปทำเป็น suspension ในน้ำ ส่วนที่มีรูปร่างกลมจะย้อมติดทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (variable) โคโลนีของแบคทีเรียชอบเค็มสูงมีสีแดงเนื่องจากมีการสร้าง carotenoid เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายจากแสงแดด จึงมักพบแบคทีเรียชอบเค็มสูงในบริเวณที่มีแสงแดด โดยแสงแดดจะทำให้เกิดการระเหยของน้ำทำให้ความเข้มข้นของเกลือเพิ่มสูงมากจนเกือบอิ่มตัว ในบางครั้งมีการสร้าง gas vacuoles ทำให้โคโลนีมีสีชมพูหรือสีขาว เชื้อในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่สร้าง phosphatidyl glycerol (PG) phosphatidyl glycerol phosphate (PGP) ซึ่งประกอบด้วยส่วนที่เรียกว่า hydrocarbon หรือ glycerol ether core (diphytanyl, $C_{20}C_{20}$; หรือ phytanyl sesterterpanyl, $C_{20}C_{25}$), glycerol และ phosphate (เฉพาะ PGP) ตัวอย่างสกุลของแบคทีเรียที่ชอบเกลือสูง เช่น *Halobacterium, Haloferax, Haloarcula, Halococcus, Natronobacterium, Natronococcus, Halorubrum, Halogeometricum, Haloterrigena, Halobaculum, Halorhadus, Natrialba, Natrinema, Natronomanas, Natronorubum, Methanohalobium, Acetohalobium, Actinopolyspora* และ *Ectothiorhodospira* โดยที่แบคทีเรียชอบเค็มสูงแต่สกุลจะมีลักษณะพิเศษที่แตกต่างกัน และลักษณะที่แตกต่างของตัวอย่างแบคทีเรียชอบเค็มสูง 6 สกุล คือ *Halobacterium, Haloferax, Haloarcula, Halococcus, Natronobacterium* และ *Natronococcus* ดังในตารางที่ 2.1 และยังพบว่าแบคทีเรียชอบเค็มสูงหลายชนิดมีความสามารถย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ เนื่องจากสามารถสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม hydrolytic enzyme เช่น DNAase, lipase, amylase, gelatinase และ protease

2.2.2 แบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง (moderate halophilic bacteria) การศึกษาลักษณะทางการกายภาพและนิเวศวิทยาของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางยังมีไม่มากเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียชอบเค็มสูง แบคทีเรียกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เจริญในสภาพแวดล้อมที่มีเกลือ เช่น saline food, hypersaline lakes, salterns, desertic, salted food, salted pond และ hypersaline soils ซึ่งมีความเข้มข้นของเกลือมากกว่าในทะเล ส่งผลให้แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสามารถเจริญได้ในความเข้มข้นของเกลือที่กว้างประมาณ 3-30% และความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญประมาณ 3-15% นอกจากแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางจะไม่สามารถเจริญในสภาพแวดล้อมที่ไม่มีเกลือเช่นเดียวกับแบคทีเรียชอบเค็มสูง และยังพบว่าเซลล์จะหดสั้นหรือมีขนาดเล็กลงที่ความเข้มข้นของเกลือต่ำ ตัวอย่างของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางได้แก่ archaea bacteria พวก *Methanohalophilus, Halomethanococcus* แบคทีเรียแกรมลบในสกุล *Arhodomonas, Chromohalobacter, Deleya, Dichotomicrobium, Flavobacterium, Haloanaerobium, Halobacteroides, Haloincola, Halomonas, Halovibrio, Paracoccus, Pseudomonas, Spirochaeta, Sporohalobacter, Vibrio, Volcaniella*

ตารางที่ 2.1 ลักษณะที่แตกต่างกันของสกุล *Halobacterium, Haloferax, Haloarcula, Halococcus, Natronobacterium* และ *Natronococcus*

Characteristics	*Haloarcula*	*Halobacterium*	*Halococcus*	*Haloferax*	*Natronobacterium*	*Natronococucus*
Cell shape	Irregular rods, triangle, rectangles	Irregular rods	Cocci	Irregular rods, disks	Irregular rods	Cocci
Cell dimension (μm)	0.3-4X0.5-5	0.5-1.2X1-6	0.5-1.5	0.4-3X0.6-3	0.5-1X2-15	1-2
Motile	Varilable	+	-	Variable	Variable	-
pH range for growth	5.0-8.0	5.0-8.0	5.0-8.0	5.0-8.0	8.5-11	8.5-11
Carbohydrates used as carbon and energy sources	+	-	Variable	+	Variable	-
Glycerol ether core lipid(s)	$C_{20}C_{20}$	$C_{20}C_{20}$	$C_{20}C_{20}$, $C_{20}C_{25}$	$C_{20}C_{20}$	$C_{20}C_{20}$, $C_{20}C_{25}$	$C_{20}C_{20}$
PGS present	+	+	-	-	-	-
Glycolipid(s) present	TGD-2	S-TGD-1, S-TeGD	S-DGD-1	S-DGD-1	-	-

* PGS, Phosphatidyl glycerol sulfate; TGD-2, glucosyl mannosyl glucosyl glycolipid; S-TGD-1, sulfated galactosyl mannosyl glucosylglycolipid; S-TeGD, Sulfated digalactosyl mannosyl glucosyl glycolipid; S-DGD-1, sulfated mannosyl glucosyl glycolipid

แบคทีเรียแกรมบวกสกุล *Halobacillus, Bacillus, Clostridium, Marinococcus, Micrococcus, Salinicoccus, Salibacillus, Lentibacillus, Virgibacillus, Gracilibacillus* และ *Sporosarcina* และยังพบเชื้อชนิดที่เจริญได้ทั้งมีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) เช่น *Flavobacterium salegens* และ *Arhodomonas aquaeolei* แอคติโนมัยสิทสกุล *Actinopolyspora* แบคทีเรียรีดิวส์ซัลเฟตสกุล *Desulfohalobium* และ *Desulfovibrio* แบคทีเรียสังเคราะห์แสง (phototroph) สกุล *Rhodospirillium, Ectothioshodospira, Chromatium* และ *Thiocapsa* โดยที่แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางแต่ละสกุลจะมีลักษณะพิเศษที่แตกต่างกัน เช่น *Halobacillus, Halomonas, Bacillus, Salibacillsu, Virgibacillus* และ *Lentibacillus* ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ลักษณะที่แตกต่างกันของสกุล *Halobacillus, Halomonas, Bacillus, Salibacillsu, Virgibacillus* และ *Lentibacillus*

Characteristics	*Halobacillus*	*Halomonas*	*Bacillus (B. halophilus)*	*Salibacillus*	*Virgibacillus*	*Lentibacillus*
Morphology	Rods	Rods	Rods	Rods	Rods	Rods
Pigmentation	Orange	None	None	None	Greyist white	None
NaCl range (%)	3-25	3.5-20	3-30	5-25	3-15	2-23
Temp (°C)	10-43	15-45	15-50	15-45	50	40
Acid production						
Arabinose	Variable	-	-	No data	+	No data
Glucose	+	+	+	+	+	-
Mannitol	-	-	-	+	-	+
Xylose	No data	-	-	-	-	No data
Hydrolysis of						
Casein	Variable	-	-	+	+	-
Tween 80	-	-	No data	-	No data	+
G+C content (mol%)	42	60.5	51.5	36.3-39.5	37	42
Cell wall type	Orn-D-Asp	No data	MK-7	MK-7	MK-7	MK-7

2.3. เอนไซม์โปรติเอส (protease)

โปรติเอสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีความสามารถในตัดพันธะเปปไทด์ของโปรตีน คำว่า protease เหมือนกับ peptidase ซึ่งประกอบด้วย endopeptidase (proteinase) และ exxopeptidase ทำให้โปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและขนาดโมเลกุล การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นมีผลทำให้โปรตีนแสดงคุณสมบัติแตกต่างไปจากเดิม เช่น ความสามารถในการละลาย ความสามารถในการจับกับน้ำ ความสามารถในการทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆ ความสามารถในการเกิดเจล การเกิดโฟม ซึ่งรวมๆ กันแล้วมีผลโดยตรงต่อลักษณะปรากฏของอาหารทั้ง กลิ่น รส สี และลักษณะเนื้อสัมผัส การย่อยสลายโปรตีนมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดกระบวนการหมักของอาหารหมักหลายๆ ชนิด ทั้งจากเนื้อสัตว์และธัญพืช ตัวอย่างอาหารหมักที่เกิดจากการย่อยสลายของโปรตีน ที่สำคัญ ได้แก่ บูดูกะปิ น้ำปลา ปลาร้า ซีอิ๊ว และ ถั่วเน่า การย่อยสลายของโปรตีนเกิดได้โดยเอนไซม์ที่มีอยู่ในเนื้อหรือวัตถุดิบเริ่มต้นและจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส การย่อยสลายของโปรตีนทำให้เกิดเปปไทด์และกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ซึ่งมีผลต่อรสชาติของอาหารหมักและเป็นสารตั้งต้นที่สามารถทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบอื่นๆ ในอาหาร เช่น น้ำตาล ไขมัน เกิดเป็นสารใหม่ที่มีกลิ่น สี และลักษณะเฉพาะตัว

เนื่องจากแบคทีเรียชอบเค็มมีความสามารถในการทนเกลือมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ แบคทีเรียชอบเค็มกลุ่มนี้ จึงน่าจะมีบทบาทสำคัญในอาหารหมักที่มีเกลือสูง เช่น น้ำปลา ปลาร้า กะปิ และบูดู ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีนและการสร้างสารให้กลิ่นรสที่เป็นลักษณะเฉพาะตัว Kim and Dordick (1997) ได้ศึกษาโปรติเอสของเชื้อ *Halobacterium halobium* Chaiyanan และ คณะ (1999) รายงานการค้นพบ *Halobacillus thailandensis* sp. nov. ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบเค็มชนิดใหม่ที่แยกได้จากน้ำปลา ซึ่งมีลักษณะแตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์อื่นๆ รวมทั้งความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน

นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับเอนไซม์โปรติเอส (extracellular protease) ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มสูง และปานกลาง ที่ไม่ได้แยกจากปลาหมัก เช่น น้ำปลา บูดู ปลาร้า และ กะปี ในประเทศไทย แต่แยกได้จากสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือเป็นองค์ประกอบ ดังต่อไปนี้

2.3.1. เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียชอบเค็มสูง การผลิตเกิดขึ้นในช่วงexponential phase เช่นการผลิต serine protease จากเชื้อ *Natrialba magadii* (เดิมคือ *Natronobacterium magadii*; haloalkaliphilic archaeobacteria) *Natronococcus occultus* NCMIB 2129 ซึ่งเป็น haloalkaliphilic bacteria *Halobacterium mediterranei* 1538, Halophilic archaebacterium 172P1, *Halobacterium halobium* ATCC 43214 และ *Halobacterium* sp. strain TuTA (Gimenez และ คณะ , 2000; Kamekura และ Seno, 1993; Ryu และ คณะ, 1994; Schmitt และ คณะ, 1990; Stepanov และ คณะ, 1992; Studdert และ คณะ, 1997) คุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียทนเค็มสูงแสดงในตารางที่ 2.3

2.3.2. เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง ปัจจุบันยังมีการศึกษาไม่มาก พบว่ามีเพียงการรายงานจาก *Pseudomonas* sp. strain CP76 ที่แยกจากน้ำ และ ตะกอนจาก solar salterns และ hypersaline soils ในประเทศสเปน เพียงสายพันธุ์เดียว ซึ่งสามารถผลิต protease CP1 (Mw = 38 kDa) โดยเชื้อผลิตเอนไซม์นี้ได้มากสุดในช่วงปลายของ exponential phase และแสดง optimal activity ที่ 55 $^{\circ}$C พีเอช 8.5 และความเข้มข้นของเกลือที่ 7.5% (Sanchez-Poroและ คณะ, 2003)

2.4 ชนิดของเอนไซม์โปรติเอส

โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีน โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่กลุ่มที่มีการซื้อขายมากถึง 60 % เนื่องจากโปรติเอสเป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาสำหรับการดำรงชีวิต จึงมีความหลากหลายและผลิตโดยสิ่งมีชีวิตทุกชนิด เช่น พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โปรติเอสจากพืชที่เป็นที่รู้จักกันดี คือ papain โปรติเอสจากสัตว์ส่วนใหญ่ผลิตจากตับอ่อน เช่น trypsin, chymotrypsin, pepsin และ rennin โปรติเอสจากจุลินทรีย์ ผลิตได้จากแบคทีเรีย รา แต่ส่วนใหญ่โปรติเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรมจะได้จากแบคทีเรีย และเป็น neutral protease ซึ่งเร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วงพีเอช 5-8 และ alkaline protease ที่เร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วงพีเอช 10 ซึ่งเหมาะกับอุตสาหกรรมซักฟอก โปรติ

เอสถูกจัดอยู่ใน subgroup ที่ 4 ของเอนไซม์กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่ม Hydrolase โดย Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology

ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียชอบเค็มสูง

Extremely halophile	Native molecular mass (kDa)	Optimal condition			Inhibitor
		NaCl	pH	Temperature (^{o}C)	
Natrialba magadii	45	1.5 M	8-10	60	DFP,PMSF, chymostatin
Halophilic archaebacterium 172P1	42-46	-	10.7	75	-
Halobacterium mediterranei 1538	41	4.5M	8-8.5	55	-
Halobacteriu halobium ATCC 43214	66	4M	10	-	DMF
Natronococcus occultus NCMIB 2129	45	1-2M	-	-	DFP,PMSF, chymotrypsin
Halobacterium sp. strain TuTA	60	-	-	-	PMSF, DFP, leupeptin

เอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางสรีรวิทยามากมาย สามารถทำงานด้วยกลไกการย่อย 2 แบบคือ

-การย่อยแบบจำกัด (limited proteolysis) เป็นการย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีนเป้าหมายจำนวนหนึ่งหรือจำนวนจำกัด เพื่อactivate หรือเปลี่ยนแปลงโปรตีนที่อยู่ในรูป inactivate เช่น การเปลี่ยน พรีฮอร์โมนเป็นฮอร์โมน

-การย่อยแบบไม่จำกัด (unlimited proteolysis) เป็นการย่อยโปรตีนเป็นกรดอะมิโน โดยโปรตีนที่ถูกย่อยมัก conjugate กันก่อนเป็น multiple molecule ของ polypeptide ubiquitin ทำให้ย่อยได้เร็วในที่มีATP อีกแนวทางประกอบด้วย compartmentation ของ โปรติเอส เช่น lysozymes โปรตีนที่อยู่ในรูป compartment จะถูกย่อยได้เร็ว

Beynon และ Bond (1990) และ Barrett (1994) แบ่งโปรติเอสตามกลไกการเร่งปฏิกิริยา คือ

1.Serine protease เป็นเอนไซม์ที่มี serine ตรงตำแหน่ง active site มีการตัดพันธะเปปไทด์ทั้งแบบ exopeptidase และ endopeptidase บริเวณ catalytic size ประกอบด้วย Serine (nucleophile), Histidine และ Aspartate (electrophile) เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 7.0-11.0 มี Isoelctric point อยู่ระหว่างพีเอช 4.0-6.0 และมีความจำเพาะกว้างต่อซับสเตรต มีมวลโมเลกุล 18-35 kDa ยกเว้น serine protease จาก *Blakeslea trispora* มีมวลโมเลกุล 126 kDa Serine protease สามารถถูกยับยั้งแบบ reversible โดย 3,4-dichloro isocoumarin (3,4-DCI), L-3-Carboxytrans-2,3-

epoxypropyl-leucylamido(4-guanidine) (E-64), diisopropylfluoro phosphate (DFP) phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) และ tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) Serine protease บางชนิดถูกยับยั้งโดย thiol reagents เช่น p-chloromercuribenzoate (PCMB)

2. Aspartic protease (acidic protease) ส่วนใหญ่ผลิตจาก ยีสต์ และรา พบน้อยมากในแบคทีเรีย ตัดพันธะเปปไทด์แบบ endopeptidase มี Aspartic residue ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วย Aspartate, Xaa และ Glycine (Xaa อาจเป็น Serine หรือ Threonine) เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พีเอช 3.0-4.0 มีมวลโมเลกุล 30-45 kDa ถูกยับยั้งการเร่งปฏิกิริยาโดย pepstatin, diazo acetyl-DL-norleucine methyl ester (DAN) และ 1,2 epoxy-3-(p-nitrophenoxy) propane (EPNP) แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ Pepsin-like enzyme ผลิตโดย *Aspergillus* spp. และ *Penicillium* spp. ส่วน Rennin-like enzymes ผลิตโดย *Endothia* spp. และ *Mucor* spp.

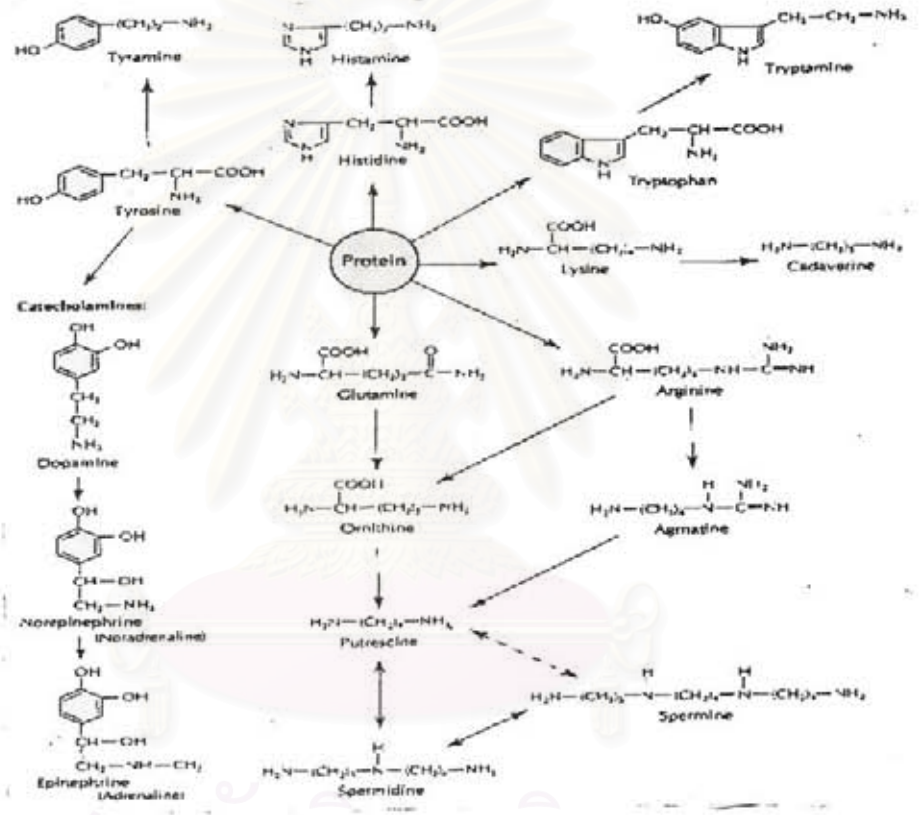
3. Cysteine/Thiol protease ที่ catalytic size ประกอบด้วย Cysteine 25, Histidine 159 และ Asparagine 175 พีเอชที่เหมาะสมคือสภาวะที่เป็นกลาง มีการเร่งปฏิกิริยาบ้างเล็กน้อยที่พีเอชต่ำ การเร่งปฏิกิริยาถูกยับยั้งได้โดย thiol group เช่น PCMB แต่ไม่ถูกยับยั้งโดย DFP หรือ metal chelating reagents

4. Metalloprotease เป็นโปรติเอสที่มีลักษณะจำเพาะ คือต้องการ divalent metal ions สำหรับเร่งในปฏิกิริยา มีทั้งแบบ exopeptidase และ endopeptidase เช่น Thermolysin จาก *Bacillus stearothermophilus* ซึ่งเป็น neutral protease ที่เป็นเปปไทด์สายเดี่ยวไม่มี disulfide bridge มีมวลโมเลกุล 34 kDa ประกอบด้วย Zn^{++} อะตอมฝังในโครงสร้างพับตัวของโปรตีน และมี Ca^{++} 4 อะต่อม ซึ่งทำให้โปรติเอสชนิดนี้ทนความร้อน

คุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสที่สามารถติดพันธะเปปไทด์ทำให้เกิดเปปไทด์ขนาดสั้นๆ จึงนำเอนไซม์โปรติเอสไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม เช่น อตุสาหกรรมผลิตสารซักล้าง (detergent) อุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมเครื่องหนัง (Rao และ คณะ, 1998)

อุตสาหกรรมผลิตสารซักล้าง ใช้เอนไซม์โปรติเอส 25% ของเอนไซม์โปรติเอสทั้งหมดที่ขายในตลาด โดยสารซักล้างที่มีชื่อทางการค้า Burnus เป็นชนิดแรก (1913) ที่ผลิตโดยมีเอนไซม์โปรติเอสเป็นองค์ระกอบ (pancreatic extract) ในปี 1956 มีการใช้เอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียเป็นองค์ประกอบใช้ชื่อทางการค้า BIO-40 โดยพบว่าสารซักล้างที่ผลิตมากที่สุด คือ ผงซักฟอก ผลิตมากถึง 13 ตันต่อปี ในปัจจุบันนี้เอนไซม์โปรติเอสที่ใช้สำหรับอุตสาหกรรมผลิตสารซักล้าง คือ เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรียสกุล *Bacillus* สำหรับอุตสาหกรรมเครื่องหนังในอดีตจะใช้โซเดียมซัลไฟด์ ซึ่งเป็นสารที่เป็นอันตรายและทำให้เกิดมลพิษ ในปัจจุบันนี้จะใช้เอนไซม์โปรติเอสเนื่องจากจะทำให้ได้เครื่องหนังที่คุณภาพดีกว่าใช้สารเคมีและไม่ทำเกิดสิ่งแวดล้อมเป็นพิษ สำหรับในอุตสาหกรรมอาหาร เช่นการผลิตเนยแข็ง ใช้เอนไซม์โปรติเอสในกลุ่ม acid aspartic protease จากทั้งสัตว์และจุลินทรีย์เพื่อตกตะกอนโปรตีนในนม นอกจากนี้ยังใช้ alkaline และ

นอกจากปริมาณของไนโตรเจนในน้ำปลาแล้ว ดัชนีแสดงคุณภาพของน้ำปลา คือ ปริมาณ histamine จัดเป็นสารประกอบเอมีนเกิดจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของกรดอะมิโนและอนุพันธ์ของกรดอะมิโนนั้นๆ โดยการเกิดปฏิกิริยา decarboxylation ซึ่งสามารถพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ กลไกการเกิดสารประกอบเอมีนในอาหาร เริ่มจากโปรตีนเกิดการสลายตัว (proteolysis) เป็นกรดอะมิโนอิสระ จากนั้นเกิดปฏิกิริยา decarboxylation โดยเอนไซม์ decarboxylase จากจุลินทรีย์ที่มีในอาหารได้เป็นสารประกอบเอมีนชนิดต่างๆ ดังภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 แสดงการเกิดสารประกอบเอมีน

ปกติแล้วการรับประทานอาหารที่มีสารประกอบเอมีนจะไม่เกิดอันตราย ยกเว้นกรณีบุคคลที่เป็นโรคเกี่ยวกับความดันเลือดผิดปกติ หรือ ปริมาณสารประกอบเอมีนปริมาณสูง ทำให้ผู้บริโภคเกิดความผิดปกติ ได้แก่ จะมีผื่นแดงเกิดขึ้นในช่องปาก (burning sensation) ปวดศีรษะ ท้องร่วง คลื่นไส้ อาเจียน หัวใจเต้นแรงและเร็ว อาการเหล่านี้จะเกิดขึ้นในระยะเวลา 2-3 ชั่วโมง โดยการอาการแพ้จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความต้านทานที่แตกต่างกันของร่างกายผู้บริโภค โดยปกติแล้วปริมาณสารประกอบเอมีนที่ยอมรับให้มีได้ของ Histamine ที่ 100 มิลลิกรัม/ กิโลกรัมอาหาร

บทที่ 3
วิธีการวิจัย

3.1 แหล่งของเชื้อ การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ

การเก็บตัวอย่าง เก็บน้ำปลาจากบ่อหมักที่มีระยะเวลาการหมักที่แตกต่างกันจากโรงงานในจังหวัดสมุทรปราการ สมุทรสงครามและชลบุรี ประมาณ 110 ตัวอย่าง และเก็บตัวอย่างอาหารหมักที่เกลือสูงได้แก่ ปลาร้า และบูดูจากตลาดสดในจังหวัดภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ ประมาณ 30 ตัวอย่าง

การแยกเชื้อและทำให้บริสุทธิ์ นำส่วนของเหลวจากตัวอย่างประมาณ 50-100 µl หยดลงบนอาหาร Halobacterium agar (HA) ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 25% แล้วเกลี่ยด้วยแท่งแก้วงอที่ปราศจากเชื้อ (Spread plate technique) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 7-14 วัน จากนั้นเลือกเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันเป็นตัวแทนแต่ละตัวอย่างไปทำให้บริสุทธิ์โดยการ steak ลงบน HA หรืออาหารเหลว Halobacterium broth (HB) เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

3.2. การคัดเลือกเชื้อที่สร้างเอนไซม์โปรทีเอสขั้นต้นและการพิสูจน์เอกลักษณ์

นำเชื้อที่แยกได้มาตรวจสอบความสามารถย่อยเคซีนและเจลาตินแล้วจัดกลุ่มเชื้อที่ได้โดยการศึกษาลักษณะดังต่อไปนี้

3.2.1 ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและการเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง ศึกษาลักษณะเซลล์โดยการย้อมสีแกรม ดูรูปร่างและขนาดของเซลล์ การสร้างเอนโดสปอร์ และลักษณะโคโลนีของเชื้อทั้งทางด้านรูปร่าง ขนาด สี เนื้อโคโลนีความโปร่งแสงหรือความทึบแสง บนอาหาร HA และตรวจสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย (Grant และ Larsen, 1990)

3.2.2 ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี ทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลส การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส การทดสอบ Oxidation-Fermentation การทดสอบเมทธิลเรด ความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรต(Carmen และ คณะ,1978) การรีดิวส์ไนเตรต การย่อย Tween 80 การเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มี NaCl ความเข้มข้น 0, 8, และ 25% การเจริญในอาหารที่มี pH 4, 5, 8 และ 9 และการเจริญที่ระดับอุณหภูมิ 40, 45 และ 50°C (Kamekura และ Dyall-Smith, 1995)

3.2.3 การศึกษา DNA-DNA homology แยกและทำให้ DNA บริสุทธิ์ (Marmur,1961; Tamaoka,1994) นำเชื้อตัวแทนของแต่ละกลุ่มจากการคัดเลือกข้างต้น มาเลี้ยงในอาหารเหลว HB บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 3-5 วัน เก็บเซลล์โดยการปั่น แล้วทำให้เซลล์แตกด้วย lysozyme กำจัดโปรตีนและไขมันด้วย phenol-chloroform และตกตะกอนด้วย 95 % เอทานอล แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยการใช้เอ็นไซม์ RNase A (Sigma) DNA–DNA hybridization (Ezaki และ คณะ, 1989;

Tanasupawat และ คณะ ,2000) ทำการตรึง DNA ของเชื้อคัดเลือก ในปริมาณที่เท่ากัน ลงในหลุมของ microdilution plates ทำการ hybridize ด้วย DNA probe ซึ่งเตรียมมาจาก DNA ของเชื้อ type strain โดยติดฉลากด้วย photobiotin ตรวจหา photobiotin โดยการทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ streptavidin ที่เชื่อมอยู่กับเอนไซม์ peroxidase แล้วจึงทดสอบหาปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยเติมสารตั้งต้น 3,3′, 5,5′ tetramethylbenzidine ทำให้เกิดสี ตรวจสอบด้วยเครื่อง colorimetric microplate reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ 100 % homology ของ positive control (DNA จากเชื้อมาตรฐาน type strain ที่ใช้ในการเปรียบเทียบได้แก่แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางและแบคทีเรียชอบเค็มสูงเช่น *Halobacterium salinarum* JCM 8978, *Halobacterium saccharovorum* JCM 8865, *Halococcus morrhuae* JCM 8876 และ *Halococcus saccharolyticus* JCM 8878)

3.2.4 การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสาย 16S rDNA และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (phylogenetic analysis) ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสบนสาย 16S rDNA ของแบคทีเรีย ที่คัดเลือกได้ โดยวิธี Thermal DNA sequencing ด้วยเครื่อง Automated DNA sequencer ABI 377 ที่ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม primerที่ใช้กับแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางได้แก่ 9F (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 1541R (5'-AAGGAGGTGATCCAACC-3') 339F (5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 357R (5'-CTGCTGCCTCCCGTAG-3') 785F (5'GGATTAGATACCCTGGTAGTC-3'); 802R (5'-TACCAGGGTATCTAATCCC-3'); และ 1099F (5'-GCAACGAGCGCAACCC-3') และ primer ที่ใช้กับแบคทีเรียชอบเค็มสูง ได้แก่ D30F (5'-ATTCCGGTTCATCCTGC-3') D56R (5'-GYTACCTTGTTACGACTT-3') D33R (5'-TCGCGCCTGCGCCCCGT-3') และ D34R (5'-GGTCTCGCTCGTTGCCTG-3') จากนั้นนำผลที่ได้ไปทำ multiple alignment และสร้าง phylogenetic tree ด้วยวิธี neighbor-joining (Saitou และ Nei, 1987) และทำ bootstrap analyses (ทำซ้ำ 1000 ครั้ง)โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL_ X (Thompson และคณะ, 1997)

3.3. การศึกษาการผลิตเอนไซม์

3.3.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์และการเตรียมเอนไซม์ ทำการเตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยนำเชื้อจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ JCM no.168 โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางในอาหารที่มี NaCl 10 % เป็นเวลา 3 วัน และเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มสูงรหัสในอาหารที่มี NaCl 25 % เป็นเวลา 7 วัน โดยทั้งสองกลุ่มเลี้ยงในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Memmert, BE500) ที่ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที หลังจากนั้น ทำการถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 35 มิลลิลิตร และเลี้ยงในสภาวะข้างต้น

นำอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดที่ได้ใส่ในหลอด centrifuge และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และทำการแยกส่วนใสออก

จากตัวเซลล์เพื่อนำมาใช้ในการหาโปรตีนและกิจกรรมของ extracellular protease ทำการเก็บส่วนใสที่ได้ ที่ –20 องศาเซลเซียส นำเซลล์ที่แยกส่วนใสออกมาทำการล้างเซลล์ให้ปราศจาก extracellular protease และ โปรตีน โดยการเติม 25 มิลลิลิตร ของสารละลาย 0.05 M phosphate buffer pH 7.0 ที่มี NaCl 10 หรือ 25% นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสออก และทำการล้างซ้ำอีก 1 ครั้ง นำเซลล์ที่ล้างแล้ว 2 รอบมาเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 2 มิลลิลิตร และทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Sonicator (Vibra Cell VCX600) โดยใช้ amplitude 30% pulse 5 วินาที และพัก 25 วินาที จำนวน 6 รอบ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสออก จากนั้นเติมสารละลายบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร ในตะกอนและทำให้เซลล์แตกอีกรอบ นำส่วนใสทั้งหมดรวมกันเพื่อนำมาใช้ในการหาโปรตีนและกิจกรรมของ intracellular protease

3.3.2 การหาปริมาณโปรตีน โดยวิธีของ Lowry และ คณะ (1951) นำเอนไซม์ที่เจือจางในอัตราส่วนที่เหมาะสม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลาย D (50 ส่วนของสารละลาย 2% sodium carbonate ใน 0.1N NaOH และ 1 ส่วนของสารละลาย 0.5% $CuSO_4.5H_2O$ ใน 1% sodium citrate) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย 1 N Folin-Ciocalteau's phenol 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานโปรตีน โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน

3.3.3 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยใช้ Casein (Difco), Casein (Hammastens) และ Fish protein powder เป็นสับสเตรต โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก An และ คณะ (1995) นำตัวอย่างเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลาย Casein 1.5 % ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี 10 หรือ 25% NaCl ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น โดยเติมกรดไตรคลอโรอะซีติก 50% ปริมาตร 250 ไมโครลิตร หลังจากนั้น ทำการแยกสาละลายส่วนใสโดยนำไปหมุนเวียงที่ความเร็วรอบ 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้วิเคราะห์ปริมาณ TCA soluble peptide ตามวิธีของ Lowry และ คณะ (1951) โดยเปลี่ยนใช้ Tyrosine เป็นสารมาตรฐาน

สำหรับ Fish protein powder ทำปฏิกิริยาโดยใช้เอนไซม์ 1 มิลลิกรัม กับสารละลายสับสเตรต ซึ่งประกอบด้วย Fish protein powder 15 มิลลิกรัมและสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี 10 หรือ 25% NaCl ทำวัดกิจกรรมของเอนไซม์เช่นเดียวกับการใช้ Casien

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 แหล่งของเชื้อแบคทีเรีย การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อ

ผลของการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำปลาที่เก็บจากโรงงานในจังหวัดสมุทรปราการ สมุทรสงคราม ชลบุรี และระยอง และแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างอาหารหมักที่เกลือสูงได้แก่ ปลาร้า ปลาจ่อม กุ้งจ่อม บูดู ปูดอง และกะปิ จากตลาดสดในจังหวัดต่างๆรวม 110 ตัวอย่าง ได้แบคทีเรียทั้งหมด 279 ไอโซเลต ดังตารางที่ 4.1

4.2 **การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสขั้นต้นและลักษณะของเชื้อ**

ผลของการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถย่อยเคซีนและเจลาตินขั้นต้น พบว่าแบคทีเรีย 45 ไอโซเลตมีปฏิกิริยาการย่อยแบ่งได้เป็นแบคทีเรียที่ชอบเกลือปานกลาง (10% NaCl) 38 ไอโซเลต และแบคทีเรียที่ชอบเกลือสูง (20-25%) 7 ไอโซเลตดังตารางที่ 4.2 (ภาพที่ 4.1 และ 4.2) จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย 45 ไอโซเลต พบว่าเป็นแบคทีเรียรูปร่างแท่ง 40 ไอโซเลตและแบคทีเรียรูปร่างกลม 5 ไอโซเลต ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะโคโลนีเป็นสีขาว สีครีม สีครีมเหลือง บางไอโซเลตเป็นสีเหลืองและสีแดงเมื่อเจริญบนอาหารวุ้น สามารถสร้างเอนไซม์แคตาเลส ออกซิเดส และเจริญที่ 45 °C บางไอโซเลตย่อย Tween 80 ได้ ส่วนใหญ่ไม่ใช้อาร์จินีนและไม่เจริญในอาหารที่ขาด NaCl นอกจากนี้ ส่วนใหญ่ไม่สร้างกรดจากน้ำตาล glucose, galactose, xylose, mamnose, fructose, sucrose, maltose, celobiose และ trehalose ดังแสดงผลในตารางที่ 4.3 และ 4.4

ตารางที่ 4.1 ชนิดตัวอย่างอาหารหมัก แหล่งที่มา รหัสเชื้อและจำนวนไอโซเลต

ชนิดตัวอย่าง / อายุการหมัก	จำนวนตัวอย่าง	แหล่งที่มา	รหัสเชื้อ	จำนวนไอโซเลต
น้ำปลา / เริ่มหมัก	1	สมุทรปราการ	IO-1	1
น้ำปลา / 10 วัน	1		IS10-1, IS10-2, IS10-3, IS10-4	4
น้ำปลา / 20 วัน	1		IB20-2	1
น้ำปลา / 30 วัน	2		IS30-1, IB30-2	2
น้ำปลา / 40 วัน	2		IS40-1B, IB40-1, IS40-3, IS40-3B, IS40-1R, IB40-1B	6
น้ำปลา / 50 วัน	2		IS50-2(1), IB50-2(1)	2
น้ำปลา / 60 วัน	1		IB60-1	1
น้ำปลา / 2 เดือน	1	สมุทรปราการ	PS2	1
น้ำปลา / 7 เดือน	2		PS7-1, PB7-3	2

น้ำปลา / 9 เดือน	1		PS9-2	1
น้ำปลา / 10 เดือน	1		PB10-3, PB10-4	2
น้ำปลา / 11 เดือน	2		PS11-2B, PS11-2S, PS11-2, PS11-5, PB11-1	5
น้ำปลา / 12 เดือน	2		PS12-1, PS12-5, PB12-1	3
น้ำปลา / เริ่มหมัก	1	สมุทรสงคราม	KF1-3B	1
น้ำปลา / 11 วัน	1		KS11-1, KS11-2	2
น้ำปลา / 35 วัน	1		KS35-3, KS35	2
น้ำปลา / 54 วัน	1		KS54-1, KS54-2B	2
น้ำปลา / 87 วัน	1		KS87-2, KS87-3	2
น้ำปลา / 200 วัน	1		KS200-2	1
น้ำปลา / 333วัน	1		KS333-2, KS333-3B	2
น้ำปลา / 1 เดือน	2	สมุทรสงคราม	DB1-1, DB1-1B, DB1-4, DB1-11, DB1-31, DS1-5, DS1-3B	7
น้ำปลา / 2 เดือน	1		DS2-5	1
น้ำปลา / 3 เดือน	1		DS3-1, DS3-11	2
น้ำปลา / 4 เดือน	2		DS4-1, DS4-2, DB4-1, DB4-2	4
น้ำปลา / 5 เดือน	1	สมุทรสงคราม	DB5-1B, DB5-2, DB5-4	3
น้ำปลา / 6 เดือน	2		DS6-1A, DS6-1Y, DB6-4, DB6-5, DS6-6	5
น้ำปลา / 7 เดือน	1		DS7-1, DS7-4, DS7-5	3
น้ำปลา / 8 เดือน	2		DS8-2, DS8-4, DS8-5, DB8-2, DB8-4B, DB8-4,	6
น้ำปลา / 9 เดือน	1		DB9-1	1
น้ำปลา / 10 เดือน	2		DS10-3, DB10-1, DB10-2, DB10-5,	4
น้ำปลา / 18 เดือน	2		DS18-1, DB18-1	2
น้ำปลา / 26 เดือน	1		DS26-1, DS26-2	2
น้ำปลา / เริ่มหมัก	2	ชลบุรี	CSO-1-1, CSO-1-2, CBO-1, CBO-2	4
น้ำปลา / 2 เดือน	1		CS2	1
น้ำปลา / 9 เดือน	1		CS9-1	1
น้ำปลา / 10 เดือน	1		CS10	1
น้ำปลา / 2 เดือน	1	ระยอง	RF2-3, RF2-5	2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

น้ำปลา/3 เดือน	1		RF3	1
น้ำปลา/4 เดือน	1		RF4-2	1
น้ำปลา/5 เดือน	1		RF5-1, RF5-2, RF5-3, RF5-4	4
น้ำปลา/6 เดือน	1		RF6	1
น้ำปลา/11 เดือน	1		RF11-1, RF11-2, RF11-3	3
น้ำปลา/12 เดือน	1		RF12-15	1
น้ำบูดู	1	ปัตตานี	BN1-2, BN1-3	2
ปลาร้า	1	บุรีรัมย์	PR4-1, PR4-2	2
	1	บุรีรัมย์	PR5-1, PR-2	2
	1	กรุงเทพ ฯ	PJ-1-1	1
	1	กรุงเทพ ฯ	PL1-2, PL1-3	2
	1	กรุงเทพ ฯ	PC1-1, PC1-2, PC1-3	3
กะ	1	ชัยนาท	CHN1-1, CHN1-2, CHN1-3	3
	1		CHN2-1, CHN2-2, CHN2-3	3
	1		CHN3-1, CHN3-2	2
ปูด ง	1		CHN5-1, CHN5-2,	2
ปลาร้า	1		CHN6-2	1
	1		CHN7-2	1
	1		CHN8-2A, CHN8-2B, CHN8-3	3
ปลาร้า	1	ราชบุรี	RBU1-1, RBU1-2A, RBU1-2B, RBU1-3	4
ปลาจ่อม	1		RBU2-1A, RBU2-1B, RBU2-2, RBU2-3, RBU2-4	5
ปลาร้า	1		RBU3-1, RBU3-2	2
	1		RBU4-2	1
	1		RBU5-1, RBU5-2	2
กะปิ	1		RBU8-1	1
	1		RBU9-1A, RBU9-1B, RBU9-2, RBU9-3, RBU9-4	5
	1		RBU10-1, RBU10-2	2
ปลาจ่อม	1	ฉะเชิงเทรา	CC1-1, CC1-3	2
ปลาร้า	1		CC2-1, CC2-2	2
	1		CC7-1, CC7-3, CC7-4	3
	1		CC8-2A, CC8-2B	2
ไตปลา	1		CC9-1, CC9-2, CC9-3, CC9-4	4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กะปิ	1	สมุทรปราการ	PK1-1, PK1-2W, PK1-2Y, PK1-3	4
กุ้งจ่อม	1	สุรินทร์	SU1-1	1
ปลาร้า	1	บุรีรัมย์	BUR1-1, BUR1-2	2
	1		BUR2-1	1
ปลาร้า	1	พิจิตร	PC1-1	1
กะปิ	1	สมุทรสาคร	SSK1-1, SSK1-2	2
	1		SSK2-1, SSK2-2	2
	1		SSK3-1, SSK3-2, SSK3-4, SSK3-5	4
	1		SSK4-1, SSK4-2	2
	1		SSK5-1, SSK5-2S, SSK5-3, SSK5-4, SSK5-5	5
	1		SSK6-1, SSK6-2, SSK6-3, SSK6-4, SSK6-5, SSK6-6	6
ปลาร้า	1		SSK7-2, SSK7-3, SSK7-4	3
กะปิ	1		SSK8-1, SSK8-3	2
	1		SSK9-1, SSK9-2, SSK9-3, SSK9-4S, SSK9-4B, SSK9-5,	6
	1		SSK10-1, SSK10-2, SSK10-3, SSK10-4, SSK10-5	5
	1		SSK11-1, SSK11-2	2
กะปิ	1	นครศรีธรรมราช	PN1-1, PN1-2, PN1-3, PN1-4, PN1-5, PN1-6, PN1-7, PN1-8, PN1-9, PN1-10, PN1-11, PN1-12, PN1-13	13
	1		PN2-1, PN2-2, PN2-3, PN2-4, PN2-5, PN2-6, PN2-7, PN2-8, PN2-9, PN2-10, PN2-11, PN2-12, PN2-13, PN2-14, PN2-15, PN2-16, PN2-17, PN2-18, PN2-19	19
	1		PN3-1, PN3-2	2
	1		PN4-1, PN4-2, PN4-3	3
	1		PN5-1, PN5-2, PN5-3, PN5-4	4

กะปี	1	นครศรีธรรมราช	PN7-1, PN7-2, PN7-3, PN7-4, PN7-5	5
	1		PN8-1, PN8-2, PN8-3, PN8-4	4
	1		PN9-1, PN9-2, PN9-3	3
	1		PN10-1, PN10-2, PN10-3	3
	1		PN11-1, PN11-2, PN11-3	3
	1		PN12-1, PN12-2, PN12-3	3
	1		PN13-1, PN13-2, PN13-3, PN13-4	4
รวม	110			279

ตารางที่ 4.2 การย่อยเคซีนและเจลาตินของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

Strain	Casein (10 % NaCl)	Gelatin (10 % NaCl)
IS40-3	+ +	+
IO-1	+	+
PS9-2	+	+
KF1-3B	+	+
CS2	+	+
CS9-1	+	+
CS10	+	+
RF2-5	+++	++
RF5-1	+	+
RF5-2	+	+
RF12-1S	+	+
CHN2-1	+++	-
RBU1-1	+++	+++
CC7-1	+	++
BUR1-2	+	+++
SSK2-2	++	+++
SSK3-2	+++	+++
SSK3-4	+	++
SSK7-3	+++	+++
SSK7-4	+	-

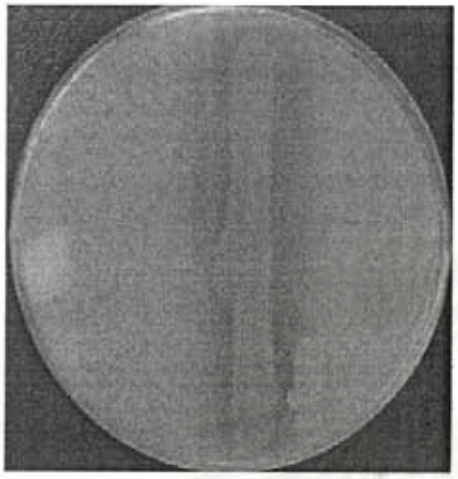
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SSK8-3	+	+
SSK9-1	+	+++
SSK9-3	+	+++
SSK10-5	++	+++
PN1-6	+	++
PN2-3	+++	++
PN2-10	++	+++
PN2-19	++	+++
PN3-1	+	+++
PN4-2	+	+++
PN5-1	+++	+++
PN5-2	+	-
PN8-4	++	+++
PN9-1	+	++
PN9-3	+	++
PN10-1	++	+++
PN10-2	+	+
PN13-3	+	++

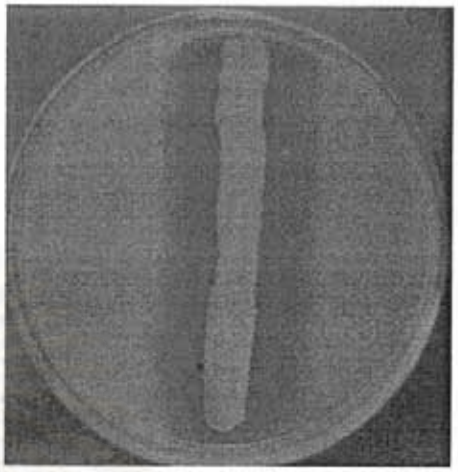
Strain	Casein (25 % NaCl)	Gelatin (25 % NaCl)
DS2-5	+++	+
DB10-5	++	+
KS87-2	++ (20% NaCl)	-
DB10-1	+++	+
DS6-1A	++	+
RF6	++	+
IB20-2	++	+

+++, strong; ++, moderate; +, weak reaction

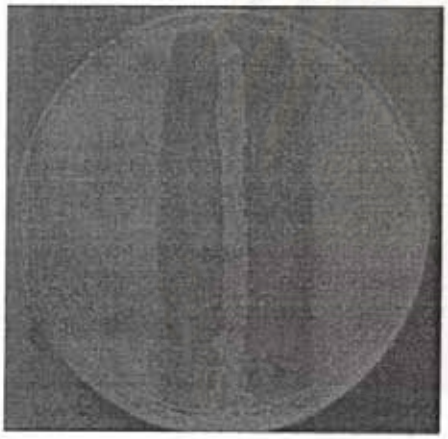
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



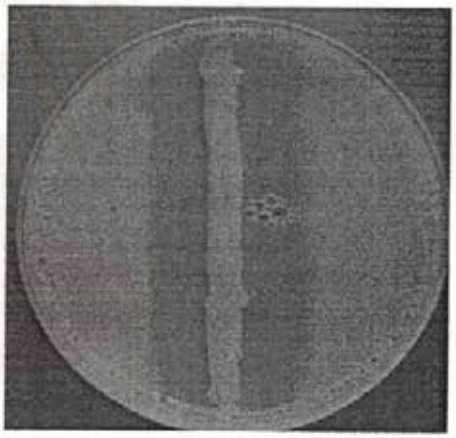
IS40-3



SSK3-2



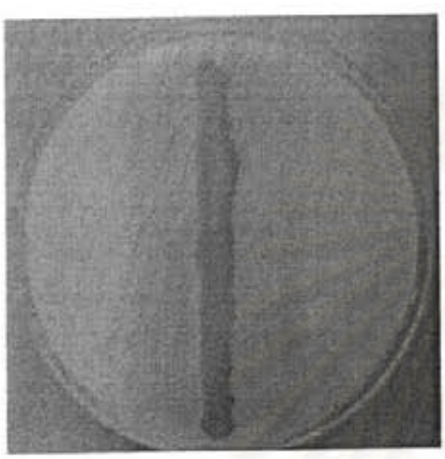
RF2-5



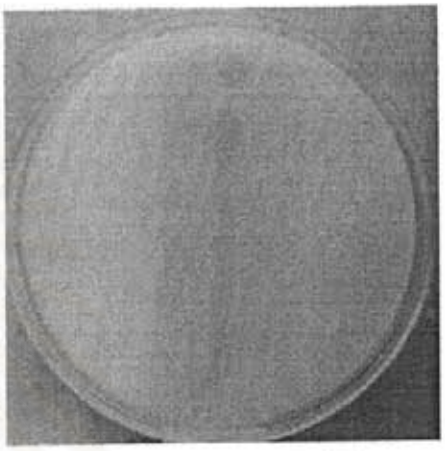
RBU1-1

ภาพที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่สามารถย่อยเคซีน

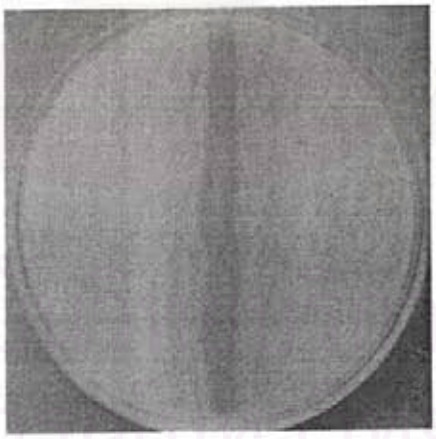
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



DS2-5



IB20-2



RF6

ภาพที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่สามารถย่อยเคซีน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียชอบเค็มที่คัดเลือกได้

Strain	Cell form	Gram	Endospore	Pigmentation	Catalase	Oxidase	Tween 80	Arginine	Growth	
									at 45 °C	in 0 % NaCl
IS40-3	Rods	+	+	White	+	+	+	-	+	-
IO-1	Rods	+	+	White	+	+	+	-	+	-
PS9-2	Rods	+	+	White	+	+	+	-	+	-
KF1-3B	Rods	+	+	White	+	+	+	-	+	-
CS2	Cocci	+	-	Cream-Yellow	+	-	-	-	-	-
CS9-1	Cocci	+	-	Cream-Yellow	+	-	-	-	-	-
CS10	Cocci	+	-	Cream-Yellow	+	-	-	-	-	-
RF2-5	Rods	+	+	White	+	+	-	-	+	-
RF5-1	Rods	+	+	White	+	-	-	-	-	-
RF5-2	Rods	+	+	White	+	+	-	-	-	-
RF12-1S	Rods	+	-	White	+	+	+	-	-	+
CHN2-1	Rods	+	+	White	+	+	-	+	+	-
RBU1-1	Rods	+	+	White	+	+	-	w	+	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Strain	Cell form	Gram	Endospore	Pigmentation	Catalase	Oxidase	Tween 80	Arginine	Growth	
									at 45 °C	in 0 % NaCl
CC7-1	Rods	+	+	White	+	+	-	+	+	-
BUR1-2	Rods	+	-	Cream	+	+	NG	-	+	-
SSK2-2	Rods	+	-	White	+	-	-	w	+	-
SSK3-2	Rods	+	+	White	+	+	-	w	+	+
SSK3-4	Rods	+	+	White	+	+	-	-	+	-
SSK7-3	Rods	+	-	Cream-Yellow	+	+	-	+	+	-
SSK7-4	Rods	+	-	Yellow	+	+	+	+	+	-
SSK8-3	Rods	+	+	White	+	+	-	+	+	-
SSK9-1	Rods	+	+	Cream	+	+	-	-	+	+
SSK9-3	Rods	+	+	Cream	+	+	-	-	+	+
SSK10-5	Rods	+	+	White	+	+	-	+	+	+
PN1-6	Rods	+	+	Cream	+	+	NG	w	-	-
PN2-3	Rods	+	+	Cream	+	+	-	+	+	-
PN2-10	Rods	+	+	Cream	+	+	-	+	+	w
PN2-19	Rods	+	-	Cream	+	+	-	+	+	+

Strain	Cell form	Gram	Endospore	Pigmentation	Catalase	Oxidase	Tween 80	Arginine	Growth	
									at 45 °C	in 0 % NaCl
PN3-1	Rods	+	-	Cream-Yellow	+	+	-	+	+	-
PN4-2	Rods	+	+	White	+	+	-	-	+	-
PN5-1	Rods	+	+	Cream	+	+	-	+	+	w
PN5-2	Rods	+	+	Orange	+	+	-	-	+	-
PN8-4	Rods	+	-	White	+	+	-	+	+	-
PN9-1	Rods	+	-	White	+	+	-	-	+	-
PN9-3	Rods	+	+	White	+	+	-	-	+	-
PN10-1	Rods	+	+	Cream	+	+	-	-	+	-
PN10-2	Rods	+	-	White	+	+	-	-	+	-
PN13-3	Rods	+	-	Cream	+	+	-	+	+	+

Strain	Cell form	Gram	Endospore	Pigmentation	Catalase	Oxidase	Tween 80	Arginine	Growth	
									at 45 °C	in 0 % NaCl
DS2-5	Rods	-/+	-	Red	+	+	-	-	+	-
DB10-5	Rods	-/+	-	Red	+	+	-	-	+	-
KS87-2	Rods	-/+	-	Red	+	+	+	-	+	-
DB10-1	Rods	-/+	-	Red	+	+	+	-	+	-
DS6-1A	Cocci	-/+	-	Red	+	+	+	-	-	-
RF6	Cocci	-/+	-	Red	+	+	-	-	-	-
IB20-2	Rods	-/+	-	Red	+	+	+	-	+	-

+, positive; w, weak; -, negative; NG, no growth

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.4 การผลิตกรดจากคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียชอบเค็มที่คัดเลือกได้

Strain	Glucose	Galactose	Xylose	Mannose	Fructose	Sucrose	Maltose	Cellobiose	Trehalose
IS40-3	+	-	+	-	+	+	+	+	-
IO-1	+	-	+	-	+	+	+	-	-
PS9-2	+	-	+	-	-	-	-	-	-
KF1-3B	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CS2	+	+	-	+	+	+	+	+	+
CS9-1	+	+	-	+	+	+	+	+	+
CS10	+	+	-	+	+	+	+	+	+
RF2-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RF5-1	+	w	-	+	+	-	-	-	-
RF5-2	+	w	-	w	-	-	-	-	-
RF12-1S	+	+	-	+	+	-	-	+	-
CHN2-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RBU1-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Strain	Glucose	Galactose	Xylose	Mannose	Fructose	Sucrose	Maltose	Cellobiose	Trehalose
CC7-1	+	w	w	+	+	-	+	w	-
BUR1-2	+	+	-	+	+	-	-	-	+
SSK2-2	+	+	-	+	+	-	-	+	-
SSK3-2	+	w	-	w	+	+	w	-	-
SSK3-4	+	w	-	w	+	-	-	-	-
SSK7-3	+	w	w	-	+	+	+	-	w
SSK7-4	+	w	w	+	+	+	+	-	+
SSK8-3	w	w	w	+	w	+	+	w	+
SSK9-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SSK9-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SSK10-5	+	-	-	w	w	w	-	-	-
PN1-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PN2-3	+	-	-	-	w	w	w	-	-
PN2-10	+	+	-	-	w	w	w	-	-
PN2-19	+	+	-	-	w	w	-	-	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Strain	Glucose	Galactose	Xylose	Mannose	Fructose	Sucrose	Maltose	Cellobiose	Trehalose
PN3-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PN4-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PN5-1	+	-	-	+	w	+	w	-	-
PN5-2	+	+	-	+	+	-	-	-	-
PN8-4	+	w	-	+	w	w	w	-	-
PN9-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PN9-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PN10-1	w	-	-	-	-	-	-	-	-
PN10-2	+	+	w	+	+	+	+	+	+
PN13-3	+	+	-	w	+	+	+	-	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Strain	Glucose	Galactose	Xylose	Mannose	Fructose	Sucrose	Maltose	Cellobiose	Trehalose
DS2-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DB10-5	-	-	+	-	-	-	-	+	-
KS87-2	-	-	+	-	-	-	-	-	-
DB10-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DS6-1A	-	-	+	-	-	-	-	-	-
RF6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IB20-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+, positive; w, weak ; -, negative

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

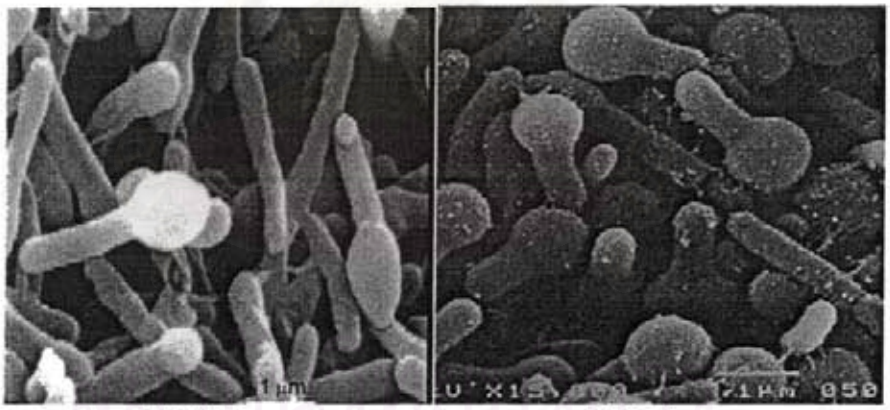
4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียตัวแทนที่น่าสนใจ

นำแบคทีเรียตัวแทนของสายพันธุ์ที่สามารถย่อยเคซีนและเจลาตินได้รวมทั้งแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่น่าสนใจจำนวน 85 สายพันธุ์มาทำการศึกษาทางอนุกรมวิธาน ผลการศึกษาพบว่าสามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางได้ ดังนี้

แบคทีเรียรูปร่างเป็นแท่งซึ่งสามารถสร้างสปอร์รูปกลมที่ปลายของเซลล์ (ภาพที่ 4.3) จัดอยู่ในสกุล *Lentibacillus* แบ่งได้เป็น 4 กลุ่มโดยอาศัย ความคล้ายคลึงของ DNA-DNA similarity (%) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 มีแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ ได้แก่ BN2-2, DB8-4 และ KS333-3B มี DNA-DNA homology มากกว่า 71 % เมื่อเทียบกับ *Lentibacillus salicampi* JCM 11462^T (ตารางที่4.5) (Wayne และคณะ 1987) จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Lentibacillus salicampi* (Yoon และคณะ 2002)

กลุ่มที่ 2 มีแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ได้แก่ IS40-3, IS40-2, IS10-5, IO-1, และ PS9-2 มี DNA-DNA similarity มากกว่า 79 % เมื่อเทียบกับ IS40-3 แต่น้อยกว่า 32% เมื่อเทียบกับ *Lentibacillus salicampi* JCM 11462^T(ตารางที่ 4.5) และจากผลความคล้ายคลึงของ 16S rDNA เพียง 95.2% เมื่อเทียบกับ *Lentibacillus salicampi* JCM 11462^T (ภาพที่ 4.4) ดังนั้นจึงจัดกลุ่มที่ 2 เป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ (Wayne และคณะ 1987; Yoon และคณะ 2002)



IS40-3 **PS11-2**

ภาพที่ 4.3 ลักษณะเซลล์และสปอร์ของแบคทีเรียสกุล *Lentibacillus* สายพันธุ์ IS40-3 และ PS11-2

ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรีย *Lentibacillus* กลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งขนาด 0.4-0.5x1.5-6 µm เรียงตัวเดี่ยวๆ เป็นคู่ หรือเป็นสายสั้น มีสปอร์ที่ปลายของเซลล์ กลุ่มที่ 2 เซลล์มักเกาะกันเป็นแท่งโค้ง สร้างสปอร์รูปกลมรีที่ปลายของเซลล์ (ภาพที่ 4.3) ทั้งสองกลุ่มสร้างเอนไซม์คาตาเลส ออกซิเดส รีดิวสไนเตรท สลายเคซีน เจลาติน และ ทวีน 80 สร้างกรดจากฟรุคโตส กลูโคส กลีเซอรอล ไรโบส และ ไซโลส ไม่สร้างยูเรียเอส ไฮโดรเจนซัลไฟด์ อินโดล

ปฏิกิริยา Voges-Proskauer และ เมทธิลเรด และไม่สลาย อาร์จินีน แป้ง ไทโรซีน ไทรบิวทีรีน เฟนนิลอะลานีน ไฮโปแซนธิล และแซนธิล เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศในอาหารที่เติมไนเตรท เจริญได้เหมาะสมในอาหารที่มี NaCl 10-15%, pH 7 และที่ 30-37°C ลักษณะแตกต่างกันของทั้งสองกลุ่มดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.6

กลุ่มที่ 3 มีแบคทีเรีย 15 สายพันธุ์ได้แก่ KF1-1,PB7-3, PS11-2, DB1-1, DS1-3B, DB4-2, DS4-2, DB5-1B, DS6-1, DS7-5, DB8-6, DB9-1, DS10-3B, DS26-3, CB0-1 มี DNA-DNA similarity มากกว่า 70.8% เมื่อเทียบกับ PS11-2 และ PB7-3 แต่น้อยกว่า 17.1%เมื่อเทียบกับ IS40-3 และ *Lentibacillus salicampi* JCM 11462^T (ตารางที่ 4.7) และจากผลความคล้ายคลึงของ 16S rDNA ของ PS11-2 เมื่อเทียบกับ IS40-3 และ *Lentibacillus salicampi* JCM 11462^T เป็น 97.3% และ 95.5% ตามลำดับ (ภาพที่ 4.4) ดังนั้นจึงจัดเชื้อทั้ง 15 สายพันธุ์อยู่ในกลุ่มชนิดเดียวกัน(Wayne และคณะ 1987) และ เป็นเชื้อชนิดใหม่ (Yoon และคณะ 2002)

ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรีย *Lentibacillus* กลุ่มที่ 3 เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่ง ขนาดกว้าง 0.4x0.6 และยาว 1.0x3.0 μm หรือมากกว่านี้ เรียงตัวเดี่ยวๆ เป็นคู่ หรือเป็นสายสั้น เคลื่อนที่ได้ สร้างสปอร์รูปกลมที่ปลายของเซลล์ (ภาพที่ 4.3) โคโลนีบนอาหารวุ้น JCM no.168 มีลักษณะกลมมีสีขาวครีม ขอบเรียบ ยกสูง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.1-0.8 มม. สร้างเอนไซม์คาตาเลส ออกซิเดส ไม่สร้างยูเรียเอส ไม่สลายเคซีน เจลาติน เอสคิวลิน อาร์จินีน แป้ง ไทโรซีน ทวีน 80 ไทรบิวทีรีน เฟนนิลอะลานีน ไฮโปแซนธิล และแซนธิล และ ไม่สร้างกรดจาก อะราบิโนส เซลโลบิโอส ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส กลีเซอรอล แลคโตส มอลโตส แมนนิตอล แมนโนส เมลิบิโอส เมลิซิโตส อินนอซิตอล แรฟฟิโนส แรมโนส ไรโบส ซาลิซิน ซอร์บิตอล ซูโครส ทรีฮาโลส และ ไซโลส ไม่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศในอาหารที่เติมไนเตรท เจริญได้ในอาหารที่มี NaCl อย่างน้อย 12% และเจริญได้เหมาะสมในอาหารที่มี เจริญได้NaCl 20-26%, pH 6-8 และที่ 30-37°C เจริญได้ที่ 40°C แต่ไม่เจริญที่ 10, 45และ 50 °C มี *meso*-DAP (diaminopimelic acid) เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ลักษณะแตกต่างกันของทั้งสองกลุ่มดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.5 DNA-DNA similarity ของ *Lentibacillus* กลุ่มที่ 1 และ 2

Strain	(%) Similarity with labelled strain (%)		
	JCM 11462^T	IS40-3^T	PS9-2
Group I BN2-2	96	1	12
DB8-4	71	1	19
KS333-3B	102	14	8
Group II IS40-3^T	12	100	113
IS40-2	32	98	111
IS10-5	27	96	118
IO-1	13	82	85
PS9-2	14	79	100
L. salicampi JCM11462^T	100	13	11

ตารางที่ 4.6 ลักษณะแตกต่างของ *Lentibacillus* กลุ่มที่ 1 และ 2

Characteristics	Group 1		Group 2	
	(3 isolates)	JCM 11462^T	(5 isolates)	IS40-3
Spore shape	SO	SO	O	O
Spore position	Terminal	Terminal	Terminal	Terminal
Motility	+	+	-	-
Colony size (mm, diameter)	0.2-1.3	0.2-1.3	0.9-3.9	1.3-3.2
Max.temperature for growth ($^{\circ}$C)	40	40	45	45
NaCl range (%)	3-25	3-25	3-30	3-30
Acid production from				
Cellobiose	w	+	-	-
D-Galactose	w	+	-	-
D-Mannose	w	+	-	-
Salicin	w	w (2)[a]	-	-
Sucrose	-	-	w (4)	w

[a]Number of weak positive strains are shown in parentheses.

กลุ่มที่ 4 มีแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ได้แก่ PN5-2 และ PN7-6 แบคทีเรีย PN7-6 มี DNA-DNA similarity มากกว่า 98%เมื่อเทียบกับ PN5-2 แต่น้อยกว่า 16.4 % เมื่อเทียบกับ IS40-3 และ PS11-2 ดังตารางที่ 4.8 และจากผลความคล้ายคลึงของ 16S rDNA ของ PN7-6 เมื่อเทียบกับ *L. salarius* KCTC 3911^T, *L. salicampi* JCM 11462^T, *L. juripiscarius* JCM 12147 ^{T} (IS40-3), *L. lacisalsi* KCTC 3915^T and PS11-2 เป็น 96.4 %, 96.2 %, 96.1%, 95.4%, และ94.7% ตามลำดับ (ภาพที่ 4.4) ดังนั้นจึงจัดแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์เป็นเชื้อชนิดเดียวกัน(Wayneและคณะ 1987) และ เป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ (Yoon และคณะ, 2002)

ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรีย *Lentibacillus* กลุ่มที่ 4 เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่ง ขนาด กว้าง 0.2x0.4 และยาว 0.6x.2.0µm เรียงตัวเดี่ยวๆ เป็นคู่ หรือเป็นสายสั้น สปอร์มีรูปร่างกลมอยู่ที่ปลายเซลล์ ไม่เคลื่อนที่ โคโลนีบนอาหารวุ้น JCM no.168 มีลักษณะกลมมีสีแดง ขอบเรียบ ยกสูง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.2-3.0 มม. สร้างเอนไซม์คาตาเลส ออกซิเดส และยูเรียเอส รีดิวสไนเตรท สลายเจลาติน และ อาร์จินีน ไม่สลาย เอสคิวลิน เคซีน แป้ง ไทโรซีน ทวีน 80 เฟนนิลอะลานีน ไฮโปแซนธิล และแซนธิล สร้างกรดจาก ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส กลีเซอรอล กลูโคส กลีเซอรอล แมนโนส แมนนิตอล ไรโบส ซอร์บิตอล และ ซูโครส ไม่สร้างกรดจาก อะมิคดาลิน อะราบิโนส เซลโลบิโอส อินูลิน แลคโตส มอลโตส เมลิบิโอส เมลิซิโตส แอลฟา-เมธิล-ดี-กลูโคไซด์ อินนอซิตอล แรฟฟิโนส แรมโนส ซาลิซิน ทรีฮาโลส และ ไซโลส เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศในอาหารที่เติมไนเตรท เจริญ

ได้เหมาะสมในอาหารที่มี NaCl 15%, pH 7 และที่ 37°C เจริญได้ในอาหารที่มี NaCl 0-28%, pH 5-9 และ เจริญได้ที่15-50°C ลักษณะแตกต่างกันจากแบคทีเรียกลุ่มอื่นดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4. 7 DNA-DNA similarity ของ *Lentibacillus* กลุ่มที่ 3

Strain	(%) Similarity with labelled strain		
	JCM11462^T	PS11-2	PB7-3
KF1-1	14.2	93	103.4
PB7-3	11.9	93.8	100
PS11-2	11.3	100	103
DB1-1	13.7	95.2	99.4
DS1-3B	13.9	97.7	95.8
DB4-2	11.5	93.4	95.4
DS4-2	11.5	88.2	97.2
DB5-1B	19.4	102.8	112.9
DS6-1	12.5	96.4	103.4
DS7-5	14	96.2	99.8
DB8-6	12.8	95.7	103.4
DB9-1	4.9	78.7	88.3
DS10-3B	17.5	96.8	90.9
DS26-3	13.3	70.8	101.4
CB0-1	11.1	84	70.9
IS40-3	12.9	17	17.1
L. salicampi JCM 11462^T	100	13	10.9

ND, not determined.

ตารางที่ 4.8 DNA-DNA similarity ของ *Lentibacillus* กลุ่มที่ 4

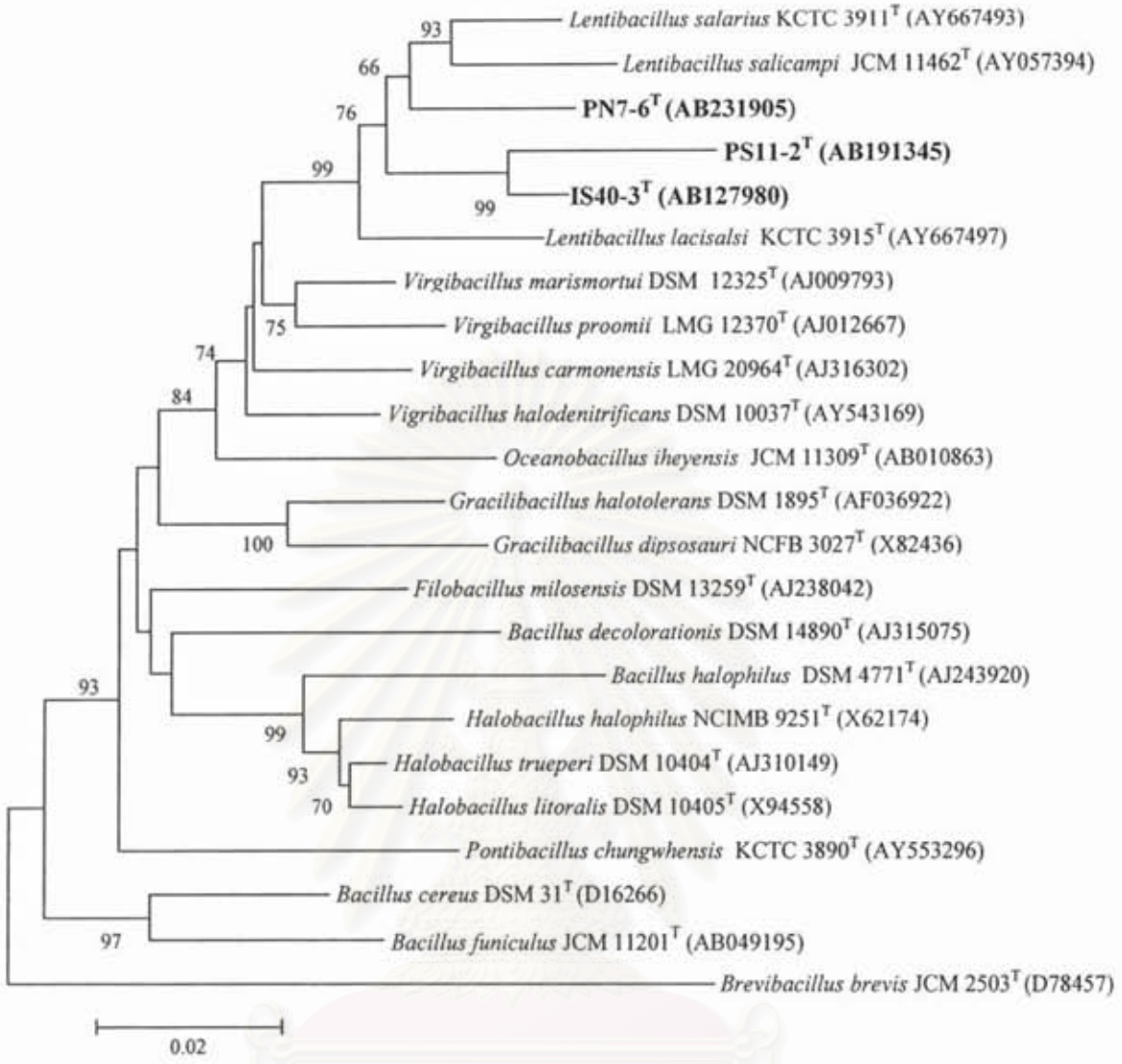
Strain	(%) Similarity with labelled strain			
	PN5-2	PN7-6	JCM11462^T	PS11-2
PN5-2	100	98	2.3	3.4
PN7-6	118	100	10.2	12.7
IS40-3	16.2	5.9	18	18.8
L. salicampi JCM 11462^T	16.5	16.4	100	4.5
PS11-2	8	6	6.2	100

ตารางที่ 4.9 ลักษณะแตกต่างของ *Lentibacillus* species

Characteristics	IS40-3	PS11-2	PN7-6	KCTC 3911^T	JCM 11462^T	KCTC3915^T
Spore shape	O	S	S	S/O	S/O	S
Pigmentation	-	-	Red	-	-	-
Motility	-	+	-	+	+	+
Colony size (mm, diameter)	1.3-3.2	0.2-.06	1.2-3.0	NA	0.2-1.3	NA
Maximum growth (°C)	45	40	50	50	40	40
NaCl range (%)	3-30	12-30	3-28	1-20	3-25	5-25
Oxidase	+	+	+	-	+	+
Nitrate reduction	+	-	+	+	+	+
Hydrolysis of aesculin	-	-	-	+	-	-
Hydrolysis of casein	+	-	-	-	+	-
Hydrolysis of Tween 80	+	-	-	-	+	-
Acid from: Cellobiose	-	-	-	NA	w	NA
D-Glucose	+	-	+	+	+	-
D-Galactose	-	-	+	NA	w	NA
D-Fructose	+	-	+	+	-	+
Maltose	-	-	-	+	w	-
D-Mannitol	-	-	+	w	-	-
D-Mannose	-	-	w	+	w	-
D-Ribose	+	-	+	+	-	+
Salicin	-	-	-	-	w	-
Sucrose	w	-	w	NA	-	NA
D-Trehalose	-	-	-	W	-	-
D-Xylose	+	-	-	+	-	w

Strains: *L. salarius* KCTC 3911^T; 3, *L. salicampi* JCM 11462^T; *L lacisalsi* KCTC 3915^T

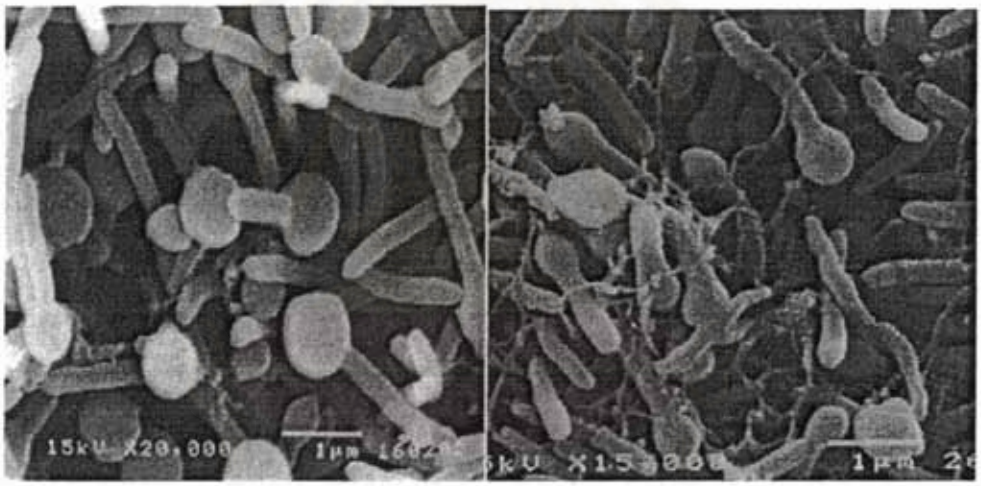
+, positive; - ,negative; w, weak; NA, not available. Spore shape: S, spherical; O, oval.



ภาพที่ 4.4 Phylogenetic tree of IS40-3, PS11-2 and PN7-6, based on 16S rDNA sequence.

แบคทีเรีย กลุ่มที่ 5 มีรูปร่างแท่งสร้างสปอร์รูปกลมรีที่ปลายของเซลล์ (ภาพที่ 4.5) มี 2 สายพันธุ์ได้แก่ RF2-5 และ RBU1-1 ทั้ง 2 สายพันธุ์ มี DNA-DNA homology เพียง 17.6 และ 23.4%เมื่อเทียบกับ *Filobacillus milosensis* JCM 12288^T และRF2-5 มี DNA-DNA homology 16.9% เมื่อเทียบกับ RBU1-1 และจากผลความคล้ายคลึงของ 16S rDNA ของ RF2-5 และ RBU1-1 เมื่อเทียบกับ *Filobacillus milosensis* JCM 12288^T เป็น 97.3 % และ 97.0 % ตามลำดับ (ภาพที่ 4.6) ดังนั้นจึงจัดแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์อยู่ในสกุลเดียวกันและเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ แต่ต่างชนิดกัน (Schlesner และคณะ, 2001)

แบคทีเรียกลุ่มที่ 5 เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่ง ย้อมติดสีแกรมบวก ขนาด 0.4-0.5 x 1.5-4 µm เคลื่อนที่ได้ สร้างสปอร์รูปกลมรีที่ปลายของเซลล์ โคโลนีบนอาหารวุ้น JCM no.168 มีลักษณะกลมมี สีขาวครีม ขอบเรียบ ยกสูง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.9-3.9 มม. สร้างเอนไซม์คาตาเลส ออกซิเดส ไม่ สร้างยูเรียเอส ไม่รีดิวสไนเตรท สามารถสลายเคซีน เจลาติน และ ทวีน 80 ไม่สลาย อาร์จินีน DNA แป้ง ไทโรซีน เฟนนิลอะลานีน ไฮโปแซนธิล และแซนธิล ไม่สร้างกรดจากอะมิคดาลิน อะ ราบิโนส เซลโลบิโอส แลคโตส มอลโตส เมลิบิโอส ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส กลีเซอรอล อินุ ลิน แลคโตส มอลโตส แมนนิตอล แมนโนส เมลิบิโอส เมลิซิโตส แอลฟ่า-เมทธิลกลูโคไซด์ อินนอซิ ตอล แรฟฟิโนส แรมโนส ไรโบส ซาลิซิน ซอร์บิตอล ซูโครส ทรีฮาโลส และ ไซโลส เจริญใน สภาวะที่ไม่มีอากาศในอาหารที่เติมไนเตรท เจริญได้ในอาหารที่มี NaCl 2-30 % และเจริญได้เหมาะสม ในอาหารที่มี เจริญได้NaCl 10-20%, pH 7 และที่ 37°C เจริญได้ที่ 15-48 °C และ มี *meso*-DAP เป็น องค์ประกอบของผนังเซลล์ ลักษณะแตกต่างกันของทั้งสองสายพันธุ์ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.10



RF2-5 **RBU1-1**

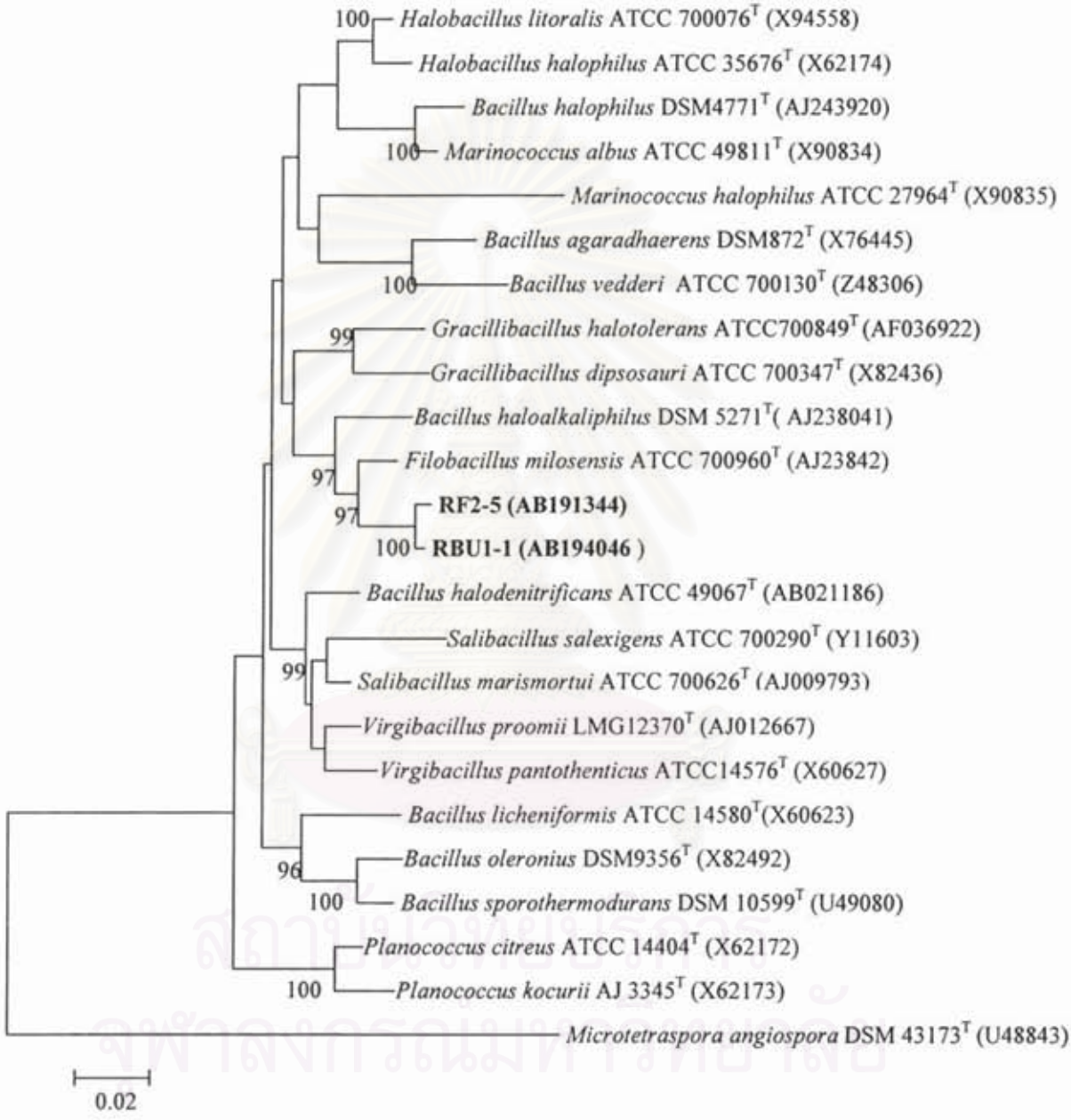
ภาพที่ 4.5 ลักษณะเซลล์และสปอร์ของแบคทีเรียสกุล *Filobacillus* สายพันธุ์ RF2-5 และ RBU1-1

ตารางที่ 4.10 ลักษณะแตกต่างของ *Filobacillus* species

Characteristics	RF2-5	RBU1-1	JCM 12288^T
Spore shape	Oval to spherical	Oval to spherical	Spherical
NaCl range (%, w/v)	2-30	2-30	2-23
Growth at pH 6.0	+	+	-
Hydrolysis of arginine	+	+	-
gelatin	+	+	-
casein	+	+	-

starch	+	+	-
Acid from glucose	+	-	-
salicin	+	-	-
Murein type	*meso*-DAP	*meso*-DAP	Ornithine

+, positive; -, negative.



ภาพที่ 4.6 Phylogenetic tree of RF2-5 and RBU1-1 based on 16S rDNA sequence

กลุ่มที่ 6 และ7 มีแบคทีเรีย 7 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 6 ได้แก่ SSK3-2, SSK9-1, SSK10-5, PN2-3, PN2-10, และ PN5-1 กลุ่มที่ 7 ได้แก่ SSK2-2 พบว่าแบคทีเรียกลุ่มที่ 6 มีDNA-DNA similarity มากกว่า 70 %เมื่อเทียบกับ *Virgibacillus halodenitrificans* JCM 12304^T (=DSM 10037^T) และ SSK3-2 (ตารางที่

4.11) และพบว่า SSK3-2 มีความคล้ายคลึงของ 16S rDNA เป็น 99.8 % เมื่อเทียบกับ *V. halodenitrificans* JCM 12304^T (ภาพที่ 4.7) และ SSK2-2 มีคล้ายคลึงเป็น 98.8% กับ *V. picturae* DSM 14867^T แบคทีเรียทั้งสองกลุ่มนี้มี *meso*-DAP เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ดังนั้นจึงจัดแบคทีเรียทั้ง 7 สายพันธุ์อยู่ในสกุลเดียวกัน และกลุ่มที่ 6 จำนวน 6 สายพันธุ์เป็น *V. halodenitrificans* และกลุ่มที่ 7 หนึ่งสายพันธุ์คล้ายคลึงกับ *V. picturae* (Arahal และคณะ 2000, Heyrman และคณะ 2003, Yoon และคณะ 2004)

แบคทีเรียกลุ่มที่ 6 และ7 เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่ง ย้อมติดสีแกรมบวก ขนาด 0.4-0.5 x 1.5-3 µm เคลื่อนที่ได้ สร้างสปอร์กลมแบบellipsoidal ที่ปลายของเซลล์ โคโลนีบนอาหารวุ้น JCM no.168 มีลักษณะกลมมีสีขาวครีม ขอบเรียบ ยกสูง สร้างเอนไซม์คาตาเลส ออกซิเดส สร้างยูเรียเอส รีดิวสไนเตรท ใช้อาร์จินีน ย่อยแป้ง ไม่สามารถย่อยเคซีน เจลาติน ไทโรซีน DNA และ ทวีน 80 เฟนนิลอะลานีน ไฮโปแซนธิล และแซนธิล สร้างกรดจากอะราบิโนส ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส ไรโบส และไซโลส ไม่สร้างกรดจากอะมิคดาลิน เซลโลบิโอส แลคโตส มอลโตส เมลิบิโอส กลีเซอรอล อินุลิน แลคโตส มอลโตส แมนนิตอล แมนโนส เมลิบิโอส เมลิซิโตส แอลฟา-เมทธิลกลูโคไซด์ อินนอซิตอล แรฟฟิโนส แรมโนส ไรโบส ซาลิซิน ซอร์บิตอล ซูโครส และ ทรีฮาโลส เจริญได้ในอาหารที่มี NaCl 3-25 % และเจริญได้เหมาะสมในอาหารที่มี NaCl 10% เจริญได้ที่ 10-45 °C และ pH 6-9 และ มี *meso*-DAP เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ลักษณะแตกต่างกันของทั้ง 7 สายพันธุ์ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4. 11 DNA-DNA similarity ของ *Virgibacillus* species.

Strain	(%) Similarity with labelled strain	
	SSK3-2	JCM 12304^T
Group VI SSK3-2	**100**	**70.0**
SSK9-1	**94.3**	**77.3**
SSK10-5	**72.1**	**70.0**
PN2-3	**92.0**	**74.4**
PN2-10	**90.6**	**73.9**
PN5-1	**96.9**	**74.7**
V. *halodenitrificans* JCM 12304^T	**70.0**	**100**
Group VII SSK2-2	**10.8**	**12.8**

ND, not determined

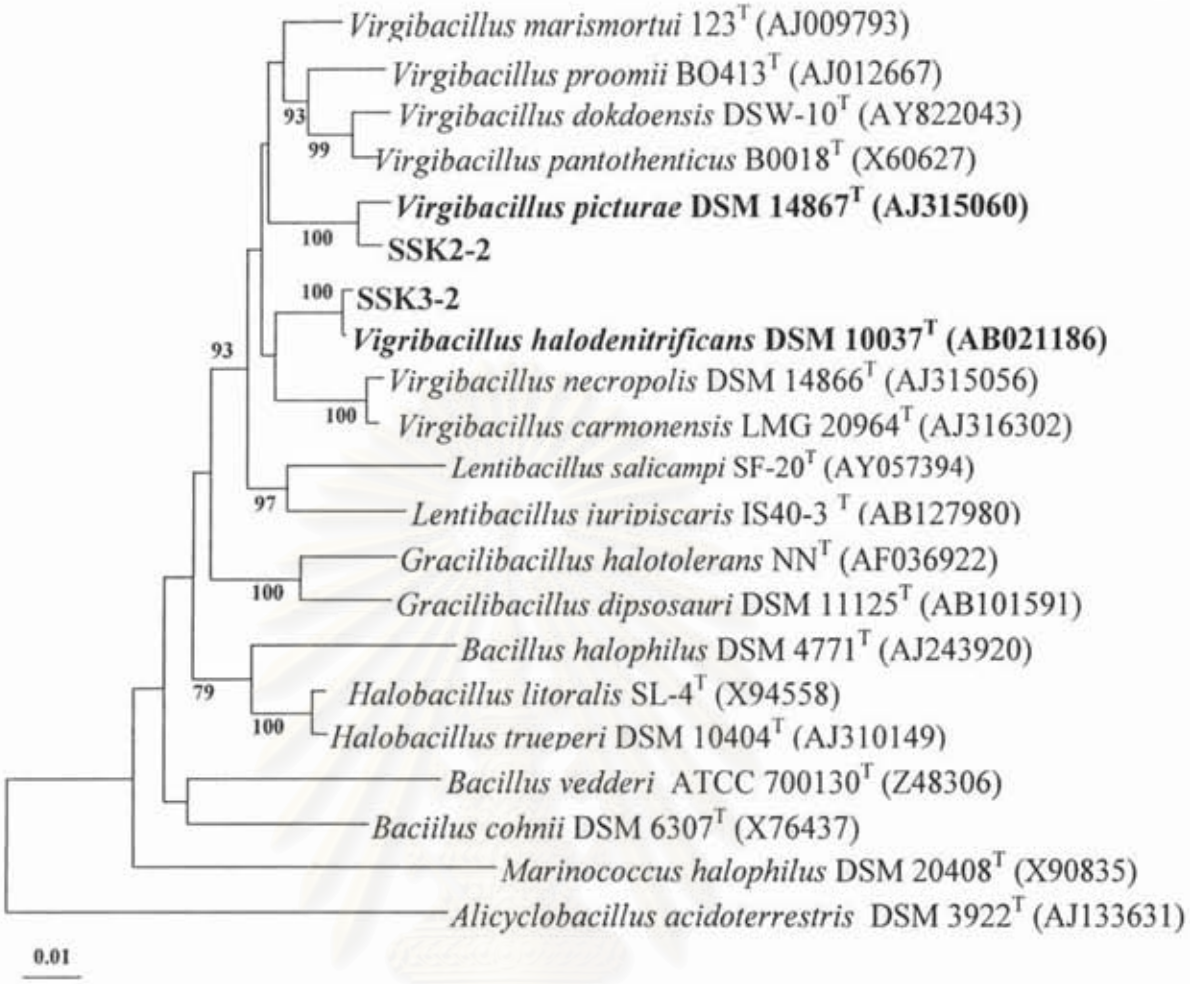
ตารางที่ 4.12 ลักษณะแตกต่างของ *Virgibacillus* species.

Characteristics	Group VI (6)	*V. halodenitrificans* JCM 12304^T	Group VII (1)	*V. picturae* KCTC 3821^T
Spore shape	E	E	E/S	E/S
Gram strain	V	V	+	+
Spore position	T/ST	T/ST	T	T
Nitrate reduction	+	+	-	+
Hydrolysis of casein	+	+	w	w
Hydrolysis of gelatin	+	+	V	V
Growth at 45 °C	+	+	-	-
Growth in 0% NaCl	V	V	-	w
Acid from:				
D-Fructose	+(-1)	+	+	w
Galactose	-(+1)	+	+	w
Glucose	+	+	+	w
Mannitol	-(+1)	V(+1)	+	w
Mannose	-(+2)	+	+	w
Melibiose	-	-	-	w
Rhamnose	-	-	-	-
Trehalose	-	+	-	V

+, positive; w, week positive; -, negative; V, variable; ND, not determined.

E, ellipsoidal; S, spherical; C, central; ST, subterminal; T, terminal.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.7 Phylogenetic tree of SSK2-2 and SSK3-2 based on 16S rDNA sequence

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลุ่มที่ 8 มีแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ได้แก่ CS2 CS9-1และ CS10 มี DNA-DNA similarity 41.7-44.2% เมื่อเทียบกับ *Marinococcus halophilus* JCM 02479 ^{T} (ตารางที่ 4.13) และพบว่า CS2 มีผลความคล้ายคลึงของลำดับเบสในช่วง 16S rDNA เป็น 99.5% เมื่อเทียบกับ *Marinococcus halophilus* JCM 02479 ^{T} (= DSM 20408^{T}) ดังแสดงไว้ในภาพที่ 4.8 และ พบว่ามี *meso*-DAP เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ดังนั้นจึงจัดแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์อยู่ในสกุลเดียวกัน และเป็นแบคทีเรีย *Marinococcus* (Li และคณะ 2005)

แบคทีเรียกลุ่มที่ 8 เซลล์มีรูปร่างกลม ย้อมติดสีแกรมบวก ขนาด 0.4-0.5 x 1.5-3 μm เคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ โคโลนีบนอาหารวุ้น JCM no.168 มีลักษณะกลมมีสีขาวครีม ขอบเรียบ ยกสูง สร้างเอนไซม์คาตาเลส ย่อยเคซีน ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส ไม่รีดิวสไนเตรท ไม่สร้างอินโดล ไม่สามารถย่อยไทโรซีน ทวีน 80 เฟนนิล อะลานีน ไฮโปแซนธิลและแซนธิล สร้างกรดจากอะราบิโนส ฟรุคโตส และมอลโตส ไม่สร้างกรดจากอินุลิน แมนโนส เมลิบิโอส เมลิซิโตส แรฟฟิโนส ซาลิซิน ซอร์บิตอล ซูโครส ทรีฮาโลสและไซโลส เจริญได้ในอาหารที่มี NaCl 5-20 % และเจริญได้เหมาะสมในอาหารที่มี NaCl 10% เจริญได้ที่ 15-45 °C และ pH 5-9 และ มี *meso*-DAP เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ลักษณะแตกต่างกันของทั้ง 3 สายพันธุ์ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.13 DNA-DNA similarity ของ *Marinococcus* species

Strain	(%) Similarity with labelled strain
	JCM 02479 ^{T}
CS2	42.9
CS9-1	44.2
CS10	41.7
M. halophilus JCM 02479 ^{T}	100

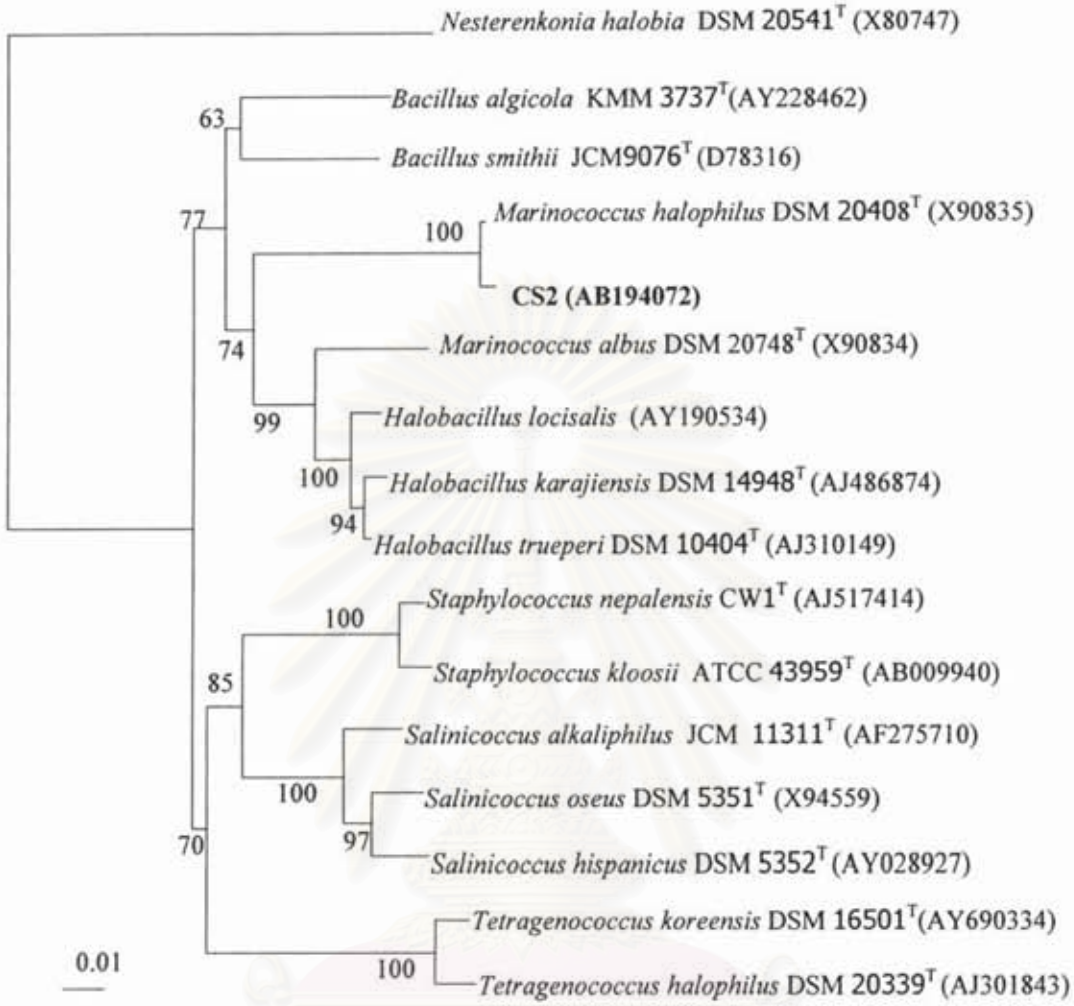
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.14 ลักษณะแตกต่างของ *Marinococcus* species

Characteristics	CS2	CS9-1	CS10	JCM 02479^T
Colony pigment	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
NaCl range (%)	5-20	5-20	5-20	5-20
pH range	5-9	5-9	6-8	6-10
Acid from				
L-Arabinose	+	+	+	+
D-Cellobiose	+	+	-	+
D-Fructose	+	+	+	+
Galactose	+	+	-	+
Glucose	+	+	-	+
Glycerol	+	+	-	+
Inulin	-	-	-	-
myo-Inositol	+	+	-	+
Lactose	+	+	-	+
Maltose	+	+	+	+
Mannitol	-	-	w	+
Mannose	-	-	-	+
Melibiose	-	-	-	+
Melezitose	-	-	-	+
D-Raffinose	-	-	-	+
Rhamnose	-	-	w	+
Ribose	w	w	w	w
Salicin	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	w
Hydrolysis of : Arginine	-	-	+	+
Gelatin	+	+	-	-
Casein	+	+	+	+
Tween 80	-	-	-	-
Starch	+	+	-	+
DNA	w	w	-	w

+, positive; w, weak positive; -, negative.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.8 Phylogenetic tree of CS2 based on 16S rDNA sequence.

กลุ่มที่ 9 มีแบคทีเรีย 15 สายพันธุ์ได้แก่ PN1-2, PN1-7, PN1-8, PN1-9, PN1-10, PN2-2, PN2-9, PN, 2-14, PN15, PN2-16, PN2-20, PN7-1, PN7-7, PN7-8 และ PN7-9 พบว่า PN1-2 มี DNA-DNA similarity มากกว่า 76.6% เมื่อเทียบกับแบคทีเรีย 14 สายพันธุ์ และ 2.0-29.0%เมื่อเทียบกับ *Salinicoccus roseus* JCM 14630^T (=DSM 5351^T) (ตารางที่ 4.15) และจากผลความคล้ายคลึงของลำดับเบสในช่วง 16S rDNA ของ PN1-2 เมื่อเทียบกับ *Salinicoccus roseus* JCM 14630^T เป็น 97.3 % (ภาพที่ 4.9) *Salinicoccus roseus* DSM 5351^T และ PN1-2 มี L-lysine เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ดังนั้นจึงจัดแบคทีเรียชนิดใหม่ทั้ง 15 สายพันธุ์ในสกุล *Salinicoccus* (Ventosa และคณะ, 1990)

แบคทีเรียกลุ่มที่ 9 เซลล์มีรูปร่างกลม ย้อมติดสีแกรมบวก ขนาด 0.6-0.8 μm ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ โคโลนีบนอาหารวุ้น JCM no.168 มีลักษณะกลมมีสีส้ม ขอบเรียบ ยกสูง สร้างเอนไซม์

คาตาเลสและ ออกซิเดส ไม่สร้างยูเรียเอส ไม่รีดิวสไนเตรท ไม่สามารถย่อยเคซีน อาร์จินีน เจลาติน แป้ง และทวีน 80 ไม่สร้างอินโดล เมธิลเรด และ VP ไม่ใช้ซิเตรทและเอสคิวลิน สร้างกรดจาก ฟรุคโตส กลูโคส กลีเซอรอล ไรโบส และ ทรีฮาโลส ไม่สร้างกรดจากอะมิคดาลิน อะราบิโนส เซลโลบิโอส กาแลคโตส กลูโคเนท อินนอซิทอล อินุลิน แลคโตส มอลโตส แมนนิตอล แมนโนส เมลิบิโอส เมลิซิโตส เมทธิลกลูโคไซด์ แรฟฟิโนส แรมโนส ซาลิซิน ซอร์บิตอล ซูโครส และ ทรีฮาโลส ไซโลส เจริญได้ในอาหารที่มี NaCl 1.5-25 % และเจริญได้เหมาะสมในอาหารที่มี NaCl 10% เจริญได้ที่ 15-45 °C และ pH 6-9 และ มี *meso*-DAP เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ลักษณะแตกต่างกันของทั้ง 4 สายพันธุ์ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.15 DNA-DNA similarity ของ *Salinicoccus*

Strain	DNA-DNA relatedness with labeled strain (%):	
	PN1-2^T	JCM 14630^T
PN1-7	97.4	16.8
PN1-8	89.0	29.0
PN1-9	95.4	10.3
PN1-10	89.9	3.0
PN2-2	76.6	5.6
PN2-9	98.8	16.1
PN2-14	92.9	17.2
PN2-15	93.4	9.9
PN2-16	82.9	2.0
PN2-20	96.7	7.3
PN7-1	91.2	16.8
PN7-7	96.4	23.0
PN7-8	85.0	14.0
PN7-9	92.5	19.0
PN1-2^T	100	17.3
S. roseus JCM 14630^T	21.7	100

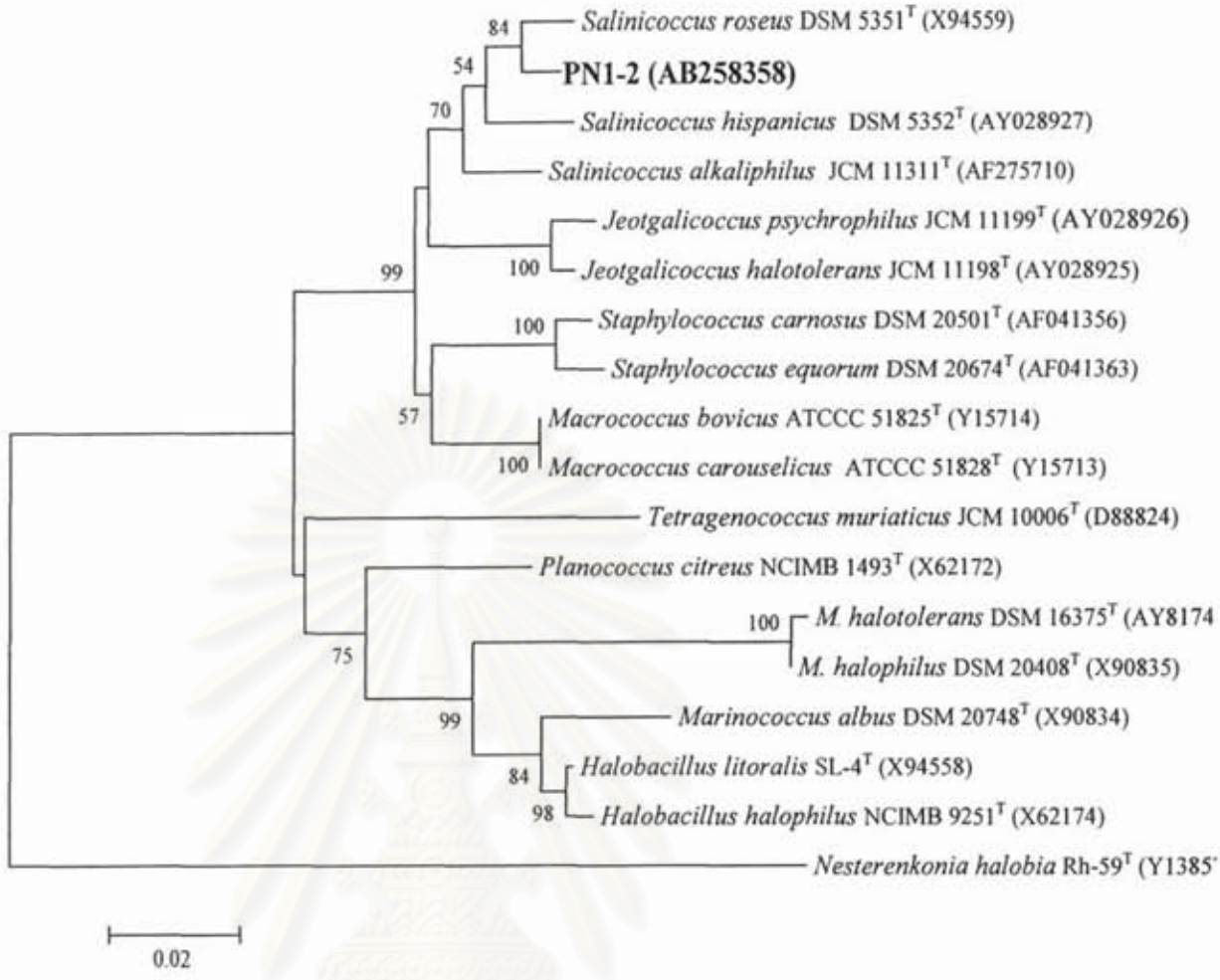
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.16 ลักษณะแตกต่างของ *Salinicoccus* species

Characteristics	1	2	3	4	5
Cell size (μm)	0.6-0.8	1-2.5	1-2.5	0.5-0.8	0.6-1.1
Colony pigmentation	Orange	Pink-red	Reddish orange	Pinkish	Light yellow
pH range for growth	6-9	5-9	6-9	6.5-11.5	7.0-8.0
Optimum pH for growth	8.5	7.5	8.0	9.5	NA
NaCl range for growth (%)	1.5-25	0.5-25	0.9-25	0.0-25	0.0-20
Temperature range for growth (°C)	15-45	15-37	15-40	10-49	4-42
Optimum temperature for growth (°C)	37	37	37	32	30-35
Methyl red test	-	-	+	-	NA
Urease	-	-	+	+	-
Nitrate reduction	-	-	+	+	+
Hydrolysis of:					
Casein	-	+	-	-	-
Aesculin	-	-	+	+	-
Gelatin	-	+	+	-	NA
Tween 80	-	+	-	-	-
Starch	-	+	-	-	-
Acid production from :					
Fructose	+	-	+	-	-
Galactose	-	-	+	-	-
D-Glucose	+	-	+	+	-
Maltose	-	-	+	-	-
D-Mannitol	-	-	+	+	+
Sucrose	-	-	NA	-	-

Strains: **1**, PN1-2; **2**, *Salinicoccus roseus* DSM 5351^T (data from Ventosa *et al.*, 1990); **3**, *S. hispanicus* DSM 5352^T (Ventosa *et al.*, 1992); **4**, *S. alkaliphilus* JCM 11311^T (Zhang *et al.*, 2002); **5**, *Jeotgalicoccus halotolerans* JCM 11198^T (Yoon *et al.*, 2003).

+, positive; -, negative; NA, no data available.



ภาพที่ 4.9 Phylogenetic tree of PN1-2 based on 16S rDNA sequence

กลุ่มที่ 10 มีแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ได้แก่ DS26-2, KS11-1, KS87-5 และ PB12 มี DNA-DNA similarity มากกว่า 97.4 %เมื่อเทียบกับ กับ *Chromohalobacter salexigens* KCTC 12941^T และ DS26-2 มี DNA-DNA similarity มากกว่า 85.6% เมื่อเทียบกับ KS11-1, KS87-5 และ PB12 (ตารางที่ 4.17) และจากผลความคล้ายคลึงของ 16S rDNA ของ DS26-2 เมื่อเทียบกับ *Chromohalobacter salexigens* KCTC 12941^T เป็น 99.3 % (ภาพที่ 4.10) และมี *meso*-DAP เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ดังนั้นจึงจัดแบคทีเรียทั้ง 4 สายพันธุ์อยู่ในสกุลเดียวกัน และเป็น *Chromohalobacter salexigens* (Arahal และคณะ, 2001)

แบคทีเรียกลุ่มที่ 10 เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่ง ย้อมติดสีแกรมลบ ขนาด 0.4-0.5 x 1.5-3 μm เคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ โคโลนีบนอาหารวุ้น JCM no.168 มีลักษณะกลมมีสีขาวครีม ขอบเรียบ ยกสูง สร้างเอนไซม์คาตาเลส ออกซิเดส สร้างยูเรียเอส รีดิวสไนเตรท และสามารถย่อยแป้ง ไม่สามารถย่อยเคซีน เจลาติน ไทโรซีน DNA เฟนนิลอะลานีน ไฮโปแซนธิล และแซนธิล ไม่สร้างอินโดล สร้างกรดจากอะราบิโนส ฟรุคโตส กาแลคโตส กลูโคส ไรโบส และไซโลส ไม่สร้างกรด

จากอะมิคดาลิน เซลโลบิโอส กลีเซอรอล อินุลิน อินนอซิทอล แลคโตส มอลโตส แมนนิตอล แมนโนส เมลิบิโอส เมลิซิโตส แรฟฟิโนส แรมโนส ซาลิซิน ซอร์บิตอล ซูโครส และ ทรีฮาโลส เจริญได้ในอาหารที่มี NaCl 3-25 % และเจริญได้เหมาะสมในอาหารที่มี NaCl 10% เจริญได้ที่ 10-45 °C และ pH 6-9 และ มี *meso*-DAP เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ลักษณะแตกต่างกันของทั้ง 4 สายพันธุ์ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.18

ตารางที่ 4.17 DNA-DNA similarity ของ *Chromohalobacter* spp.

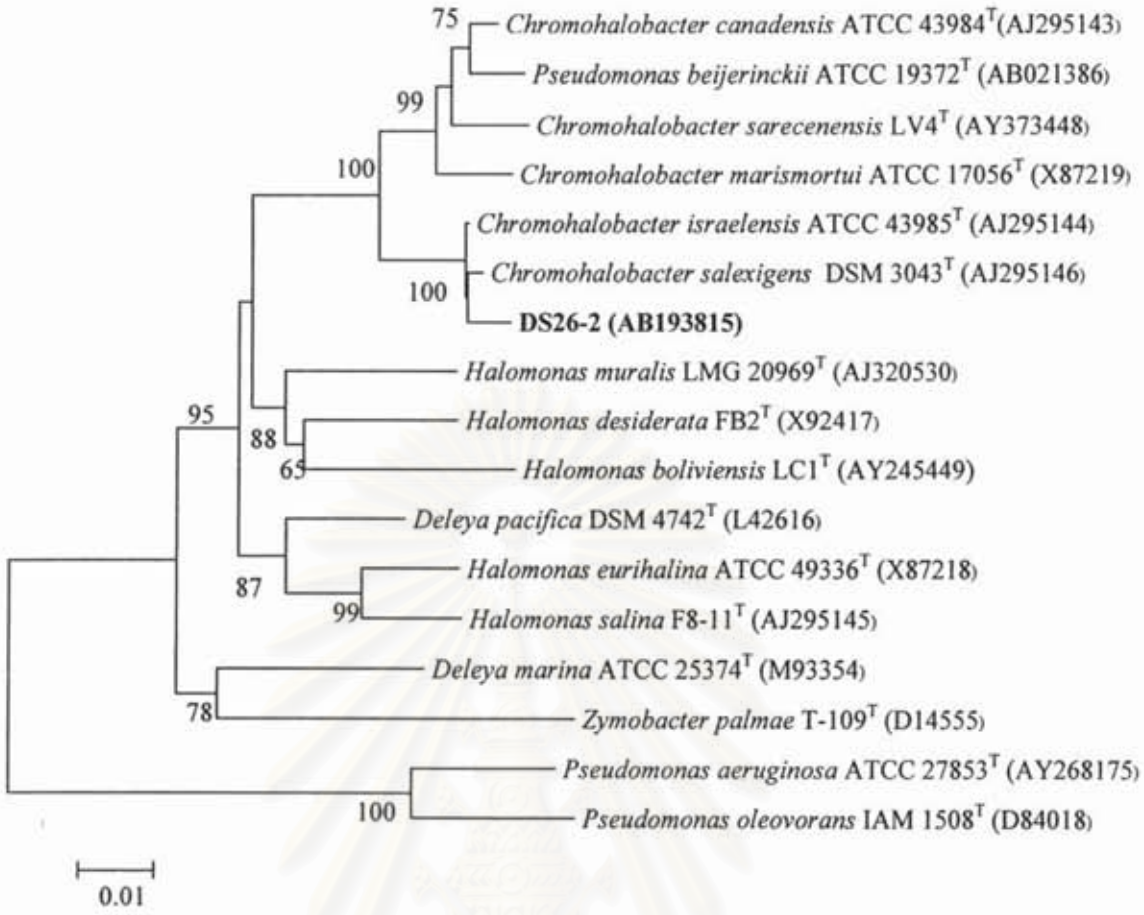
Strain	% Homology with labeled strains	
	KTCC 12941^T	DS26-2
DS26-2	97.4	100.0
KS11-1	106.1	102.9
KS87-5	102.3	101.1
PB12	105.6	100.6
C. salexigens KCTC 12941^T	100.0	85.6

ตารางที่ 4.18 ลักษณะแตกต่างกันของ *Chromohalobacter* spp.

Characteristics	DS26-2	KS87-5	KS11-1	PB12	KTCC 12941^T
Cell shape	Rods	Rods	Rods	Rods	Rods
Temperature range (° C)	10-45	10-45	10-45	10-45	10-45
NaCl range (%)	3-25	3-25	3-25	3-25	0.9-25
pH range	6-9	6-9	6-9	6-9	5-10
Acid production from					
Amygdalin	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	+	+
D-Cellobiose	-	w	-	w	w
D-Fructose	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+
Glycerol	-	-	-	-	-
Inulin	-	-	-	-	-

myo-Inositol	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-
Mannose	-	-	-	-	w
Melibiose	-	-	-	-	-
Melizitose	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-
Ribose	+	+	+	+	+
Salicin	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-	-
Xylose	+	+	+	+	+
Urease	+	+	+	+	-
Hydrolysis of					
Tyrosine	-	-	-	-	-
Gelatin	-	-	-	-	-
Casein	-	-	-	-	-
Starch	+	+	+	+	+
DNA	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-
Cell wall composition	DAP	DAP	NT	NT	DAP

+, positive; w, weak positive; -, negative; DAP, *meso*-diaminopimelic acid; NT, not tested.



ภาพที่ 4.10 Phylogenetic tree of DS26-2 based on 16S rDNA sequence

ผลการศึกษาทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียชอบเค็มสูง พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียชอบเค็มสูงได้ดังนี้

กลุ่มแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่มีรูปร่างแท่งทั้งหมด 10 สายพันธุ์ (กลุ่ม A) ได้แก่ DB1-1, DB1-11, DB1-31, DS2-5, DB10-5, IB20-2, IB60-1, IS10-4, IS30-1 และ IS50-2(1) และแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่มีรูปร่างกลม กลุ่ม B (1 สายพันธุ์) ได้แก่ RF6 พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม A มีDNA-DNA similarity มากกว่า 70 % เมื่อเทียบกับ *H. salinarum* JCM 8978^T และกลุ่ม B มีDNA-DNA similarity 79.9 % เมื่อเทียบกับ *H. saccharolyticus* JCM 8878^T (ตารางที่ 4.19) และจากผลความคล้ายคลึงของ 16S rDNA ของ DS2-5 เมื่อเทียบกับ *H . salinarum* JCM 8978^T เป็น 99.9% และ RF6 เมื่อเทียบกับ *H. saccharolyticus* JCM 8878^T เป็น 99.3% (ภาพที่ 4. 11) ดังนั้นจึงจัดแบคทีเรียทั้ง 10 สายพันธุ์ (กลุ่ม A) อยู่ในสกุลเดียวกันและเป็น *H. salinarum* (Kamekura และ Dyall-Smith, 1995) ส่วน RF6 เป็น *H. saccharolyticus* (Montero และคณะ 1989)

แบคทีเรียกลุ่ม A เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่ง ย้อมติดสีแกรมลบ ขนาด 0.4-0.5 x 1.5-3 μm เคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ โคโลนีบนอาหารวุ้น JCM no.168 มีลักษณะกลมมีสีแดง ขอบเรียบ ยกสูง สามารถ

ย่อยเคซีน และเจลาติน แต่ไม่สามารถย่อยอาร์จินินและทวีน 80 ไม่สร้างกรดจากเซลโลบิโอส กลูโคส แลคโตส แมนนิตอล เมลิบิโอส แรฟฟิโนส ซูโครส และ ทรีฮาโลส ไม่สามารถใช้อะราบิโนส กลูโคส ฟรุคโตส กาแลกโตส แรฟฟิโนส ไซโลส อาร์จินีน กลูตามิกแอซิก และเซอรีนเป็นแหล่งคาร์บอน เจริญได้ในอาหารที่มี NaCl 15-30 % และเจริญได้ที่ 10-45 °C และ pH 6-9 ลักษณะแตกต่างกันของทั้ง 2 กลุ่มแสดงไว้ในตารางที่ 4.20

ตารางที่ 4.19 DNA-DNA similarity ของแบคทีเรีย Group A และ B

Strain	**% Similarity with labelled strains**	
Group A	**JCM 8978^T**	**JCM 8876^T**
DB1-1	101.1	15.9
DB1-11	98.5	1.6
HDB1-31	92.3	4.7
DS2-5	89.5	3
DB10-5	98.8	2.7
IB20-2	94.6	13.9
IB60-1	92.9	8.9
IS10-4	87.3	2.5
IS30-1	94.6	4.8
IS50-2(1)	97.3	16.7
H. salinarum JCM 8978^T	100	8.8
Group B	RF6	JCM 8878^T
1. RF6	100	79.9
H. saccharolyticus JCM 8878^T	88.5	100

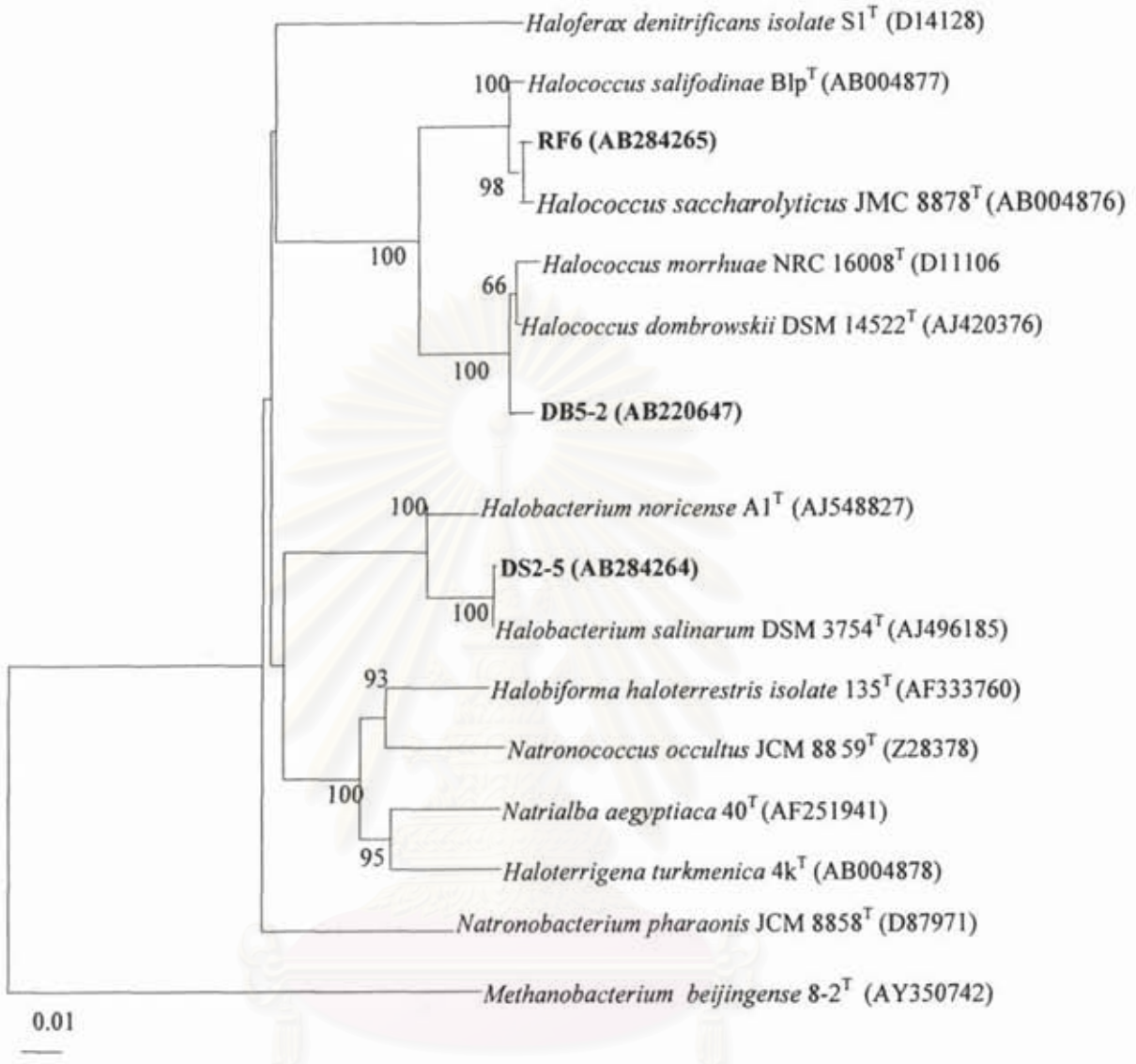
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.20 ลักษณะของแบคทีเรียชอบเค็มสูง Group A และ B

Characteristics	Group A	JCM 8978^T	Group B	JCM 8878^T
NaCl range (%)	15-30	15-30	15-30	15-30
Hydrolysis of				
Arginine	-	-	-	-
Casein	+	+	+	+
Gelatin	+	+	+	+
Tween 80	-	-	-	-
Acid from				
Arabionose				
Cellobiose	-	-	-	-
Glucose	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-
Utilization of				
Arabionose	-	-	-	-
Glucose	-	-	-	-
Fructose	-	-	-	-
Galactose	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	-
Arginine	-	-	-	-
Glutamic acid	-	-	-	-
Serine	-	-	-	-

+, positive; -, negative.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

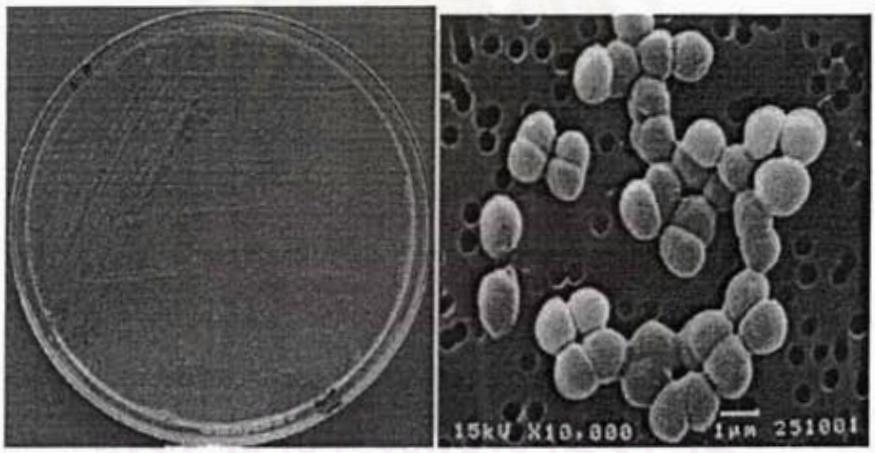


ภาพที่ 4.11 Phylogenetic tree of RF6, IS10-2, DB5-2, and DS2-5 based on 16S rDNA sequences

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลุ่มแบคทีเรียรูปร่างกลม มี15 สายพันธุ์ (Group C) พบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ มีDNA-DNA similarity มากกว่า 78.9%เมื่อเทียบกับ DB5-2 และมีDNA-DNA similarity 21.6-49.9% กับ *H. morrhuae* JCM 8876^T และ *H. dombrowskii* JCM 12289^T (ตารางที่ 4.21) และจากผลความคล้ายคลึงของ 16S rDNA ของ กลุ่ม DB5-2 และ IS10-2 เมื่อเทียบกับ *H. dombrowskii* JCM 12289^T เป็น99.1% และ *H. morrhuae* JCM 8876^T เป็น 98.6-98.7% (ภาพที่ 4.11) ดังนั้นจึงจัดแบคทีเรียทั้ง 15 สายพันธุ์อยู่ใน สกุล *Halococcus* และเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ (Kocur และ Hodgkiss, 1973; Stan-Lotter และคณะ, 2002)

แบคทีเรียกลุ่มนี้ เซลล์มีรูปร่างกลม ย้อมติดสีแกรมลบ ขนาด 0.8-1.2 μm ไม่เคลื่อนที่ โคโลนีบนอาหารวุ้น JCM no.168 มีลักษณะกลมมีสีแดงขอบเรียบ ยกสูง (ภาพที่ 4.12) สร้างเอนไซม์คาตาเลส ออกซิเดส ใช้ฟรุคโตส และกลูตามิกแอซิก ไม่สามารถรีดิวสไนเตรท ย่อยเคซีน เจลาติน อาร์จีนิน และ ทวีน 80 สร้างกรดจากอะราบิโนส เซลโลบิโอส กลูโคส แลคโตส แมนนิตอล เมลิบิโอส แรฟิโนส ซูโครส และ ทรีฮาโลส ไม่สามารถใช้อะราบิโนส กาแลกโตส แรฟิโนส ไซโลส อาร์จินีน และเซอรีน เจริญได้ในอาหารที่มี NaCl 20-30 % มี $MgCl_2$ 0.5-5% เจริญได้ที่ 15-45 °C และ pH 6-10 ลักษณะแตกต่างกันของ สายพันธุ์และ *H. dombrowskii* JCM 12289^T และ *H. morrhuae* JCM 8876^T ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.22



ภาพที่ 4.12 ลักษณะโคโลนีและเซลล์ของแบคทีเรีย *Halococcus* sp. DB5-2

ตารางที่ 4.21 DNA-DNA similarity ของแบคทีเรียชอบเค็มสูง Group C

Strain	JCM 8876^T	JCM 12289^T	DB5-2
DB5-2	36.1	41.0	100.0
IS10-2	30	21.6	91.3
DS4-1	42.3	42.3	98.4
KS35-3	49.4	45.6	78.9
DB8-2	38.6	36.7	81.1
DS7-4	43.5	47.9	97.1
DS10-5	43.5	46.6	97.5
DB10-5	45.7	41.3	86.6
DS6-1A	41.5	40.3	84.5
DS6-2	39.8	24.3	83.8
KS333-2	43.0	35.6	85.9
DB1-4	49.0	31.6	90.2
DS6-6	44.6	34.1	88.7
DB8-5	46.3	44.4	84.2
KS87-3	49.9	32.7	91.5
H. morrhuae JCM 8876^T	100.0	34.1	25.7
H. dombrowskii JCM 12289^T	ND	100.0	42.3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.22 ลักษณะแตกต่างของ *Halococcus* species

Characteristics	DB5-2 and 14 strains	*H. morrhuae* JCM 8876^T	*H. dombrowskii* JCM 12289^T
NaCl range (%)	20-30	20-30	20-30
pH range	6-10	6-10	6-10
$MgCl_2$ range (%)	0.5-5	0.5-5	0-5
Nitrate reduction	-	-	+
Catalase	+	+	+
Oxidase	+	+	+
Hydrolysis of:			
Arginine	-	-	ND
Casein	-	-	ND
Gelatin	-	-	+
Tween 80	-	-	ND
Acid from			
Arabinose	+	-	w
Cellobiose	+	-	-
Glucose	+	-	-
Lactose	+	-	-
Mannitol	+	-	-
Melibiose	+	-	-
Raffinose	+	-	-
Sucrose	+	-	-
Trehalose	+	-	-
Utilization of:			
Arabinose	-	-	+
Fructose	+	-	+
Glucose	V	-	-
Galactose	-	-	+
Raffinose	-	-	-
Xylose	-	-	+
Glutamic acid	+	-	-
Arginine	-	-	-
Serine	-	-	-

+, positive; w, weak positive; -, negative; ND, no data.

4.4 การศึกษาการผลิตเอนไซม์

ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรทีเอส ได้ใช้ casein และ fish powder เป็น substrate โดยการตรวจสอบปฏิกิริยาที่ 30° C และ 37 °C พบว่าแบคทีเรียชอบเค็มสูง (extremly halophile) สายพันธุ์ DS2-5, KS87-2 และ DB10-1 ให้ค่า specific activity 0.2230-2.6524 U/ mg protein และ unit activity 0.652-4.76 U/ ml of enzyme ที่37 °C และ specific activity 1.6452-5.4643 U/ mg protein และ 0.913-4.044 U/ ml of enzyme ที่ 30° C โดยใช้ casein เป็น substrate (ตารางที่ 4.23) และให้ค่า specific activity 0.7808-1.9927 U/ mg protein และ unit activity 2.283-6.000 U/ ml of enzyme ที่37 °C และ specific activity 0.3525-6.7468 U/ mg protein และ unit activity 0.261-5.283 U/ ml of enzyme ที่ 30° C โดยใช้ fish powder เป็น substrate (ตารางที่ 4.24)

ส่วนแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง (moderate halophile) สายพันธุ์ RF2-5และ RBU1-1สร้างเอนไซม์ได้มากที่ความเข้มข้นของเกลือ 5% อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ RF2-5, SSK10-5, PN2-19, RBU1-1, SSK2-2 และ SSK3-2 ยังสามารถสร้างเอนไซม์ได้มากที่ความเข้มข้นของเกลือ 10% ซึ่งให้ค่า specific activity สูง 11.1140-29.7991 U/ mg protein และ unit activity 15.131-27.783 U/ ml of enzyme ที่ 37° C และให้ค่า specific activity สูง 23.8335–32.8760 U/ mg protein และ unit activity 9.848-17.805 U/ ml of enzyme ที่ 30° C โดยใช้ casein เป็น substrate (ตารางที่ 4.23) และพบว่าการใช้ fish powder เป็น substrate จะให้ค่า specific activity 12.7219-29.7991 U/ mg protein และ unit activity 15.131-27.783 U/ ml of enzyme ที่ 37° C และ specific activity 13.9652-49.5517 U/ mg protein และ unit activity 6.326-17.740 U/ ml of enzyme ที่ 30° C ดังตารางที่ 4.24 เนื่องจากอาศัยผลการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rDNA ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียชอบเค็มได้เป็นแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่ต้องการเกลือในการเจริญมากกว่า 15% และแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง ดังที่กล่าวมาแล้วในข้อ 4.3 จากผลที่กล่าวมานี้จะเห็นว่าแบคทีเรียชอบเค็มสูงสามารถสร้างเอนไซม์ได้น้อยกว่าแบคทีเรียชอบปานกลางทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของเกลือที่ใส่ลงไปในอาหารซึ่งอาจมีผลต่อการวิเคราะห์การสร้างเอนไซม์ด้วย นอกจากนี้ยังได้ตรวจสอบกิจกรรมของ intracellular และ extracellular protease ของบางสายพันธุ์โดยใช้ Casein (Hammasten) และ fish powder เป็นสับสเตรทได้ผลปฏิกิริยาดังตารางที่ 4.25 อย่างไรก็ตามการศึกษาเอนไซม์โปรทีเอสจากแบคทีเรียชอบเค็มยังมีรายงานไม่มาก (Stepnov และคณะ, 1992; Studdert และคณะ, 1997; Ryu และคณะ, 1994; Gimenez และคณะ, 2000; Duong และคณะ, 1981; Sanchez-Porro และคณะ, 2003) ซึ่งยังน่าสนใจที่ต้องมีศึกษาอีก

ตารางที่ 4.23 Protease activities of isolates on casein as substrate

Isolate no.	Protein			Protease activities													
		OD	Conc Protein	OD	(750 nM)	Conc.Tyrosin		OD (750nm)		Conc. Tyroisine		Net Tyrosine		Specific activity		Unit activity	
	% NaCl	(750nm)	mg/ml			Blank (nmole)				Sample (nmole)		(nmole)		U/mg protein		U/ ml of enzyme)	
				37 C	30 C	37 C	30 C	37C	30 C	37 C	30C	37C	30 C	37C	30C	37C	30C
DS2-5	25	0.747	3.011	0.745	0.859	2539.229	2985.326	0.759	0.895	2594.013	3126.198	54.784	140.873	0.3032	3.1515	0.913	2.348
KS87-2	20	0.455	1.795	0.555	0.528	1795.735	1690.080	0.628	0.542	2081.393	1744.864	285.658	54.784	2.6524	1.6452	4.761	0.913
DB10-1	25	0.726	2.924	0.74	0.759	2519.663	2594.013	0.75	0.821	2558.795	2836.627	39.131	242.614	0.2230	5.4643	0.652	4.044
IS40-3	10	0.29	1.107	0.4	0.389	1189.200	1146.155	0.447	0.42	1373.117	1267.462	183.917	121.307	2.7690	5.0545	3.065	2.022
IO-1	10	0.3	1.149	0.581	0.646	1897.476	2151.829	0.668	0.697	2237.918	2351.399	340.442	199.570	4.9382	5.7249	5.674	3.326
PS9-2	20	0.355	1.378	0.442	0.495	1353.551	1560.947	0.543	0.547	1748.777	1764.430	395.226	203.483	4.7802	7.6728	6.587	3.391
PS11-2	10	0.445	1.753	0.555	0.52	1795.735	1658.775	0.574	0.583	1870.084	1905.302	74.349	246.527	0.7069	7.4032	1.239	4.109
KF1-3B	10	0.425	1.67	0.511	0.513	1623.557	1631.383	0.586	0.523	1917.042	1670.515	293.485	39.131	2.9290	1.2763	4.891	0.652
CS2	10	0.37	1.441	0.498	0.506	1572.686	1603.991	0.581	0.532	1897.476	1705.733	324.790	101.741	3.7565	3.4050	5.413	1.696
CS10	10	0.353	1.37	0.537	0.52	1725.298	1658.775	0.644	0.552	2144.003	1783.995	418.705	125.220	5.0937	3.8864	6.978	2.087

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Isolate no.	% NaCl	OD (750nm)	Conc Protein mg/ml	OD (750 nM) Blank (nmole)		Conc.Tyrosin Blank (nmole)		OD (750nm) Sample (nmole)		Conc. Tyroisine Sample (nmole)		Net Tyrosine (nmole)		Specific activity U/mg protein		Unit activity U/ ml of enzyme)	
				37 C	30 C	37 C	30 C	37C	30 C	37 C	30C	37C	30 C	37C	30C	37C	30C
RF2-5	5	0.295	1.128	0.512	0.507	1627.470	1607.905	1.045	0.885	3713.168	3087.067	2085.698	1479.163	30.8134	48.1498	34.762	24.653
	10	0.351	1.361	0.422	0.435	1275.289	1326.159	0.631	0.598	2093.132	1963.999	817.844	637.840	10.0122	25.1912	13.631	10.631
	15	0.335	1.295	0.565	0.49	1834.866	1541.381	0.612	0.635	2018.783	2108.785	183.917	567.404	2.3675	16.7376	3.065	9.457
SSK10-5	10	0.313	1.203	0.353	0.372	1005.283	1079.632	0.532	0.501	1705.733	1584.426	700.450	504.794	9.7033	23.8335	11.674	8.413
PN2-3	10	0.415	1.628	0.347	0.472	981.804	1470.945	0.481	0.491	1506.163	1545.294	524.359	74.349	5.3681	3.5711	8.739	1.239
PN2-10	10	0.321	1.236	0.379	0.501	1107.024	1584.426	0.556	0.512	1799.648	1627.470	692.624	43.044	9.3363	1.8929	11.544	0.717
PN2-19	10	0.322	1.241	0.345	0.369	973.978	1067.893	0.496	0.519	1564.860	1654.862	590.882	586.969	7.9381	28.3560	9.848	9.783
PN5-1	10	0.335	1.295	0.375	0.369	1091.372	1067.893	0.524	0.489	1674.428	1537.468	583.056	469.575	7.5053	20.8700	9.718	7.826
PN8-4	10	0.304	1.166	0.511	0.455	1623.557	1404.422	0.632	0.547	2097.046	1764.430	473.489	360.008	6.7702	11.7419	7.891	6.000
RF5-1	10	0.306	1.174	0.447	0.456	1373.117	1408.335	0.569	0.528	1850.518	1690.080	477.402	281.745	6.7777	10.5050	7.957	4.696
RF5-2	10	0.275	1.045	0.444	0.43	1361.377	1306.594	0.577	0.545	1881.824	1756.603	520.446	450.010	8.3020	16.8923	8.674	7.500

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Isolate no.	% NaCl	OD (750nm)	Conc Protein mg/ml	OD (750 nM) Blank (nmole)		Conc.Tyrosine Blank (nmole)		OD (750nm) Sample(nmole)		Conc. Tyroisine Sample(nmole)		Net Tyrosine (nmole)		Specific activity U/mg protein		Unit activity U/ ml of enzyme)	
				37 C	30 C	37 C	30 C	37C	30 C	37 C	30C	37C	30 C	37C	30C	37C	30C
RF12-1S	10	0.278	1.057	0.462	0.498	1431.814	1572.686	0.54	0.523	1737.038	1670.515	305.224	97.828	4.8113	3.5292	5.087	1.630
CHN2-1	10	0.449	1.770	0.525	0.462	1678.341	1431.814	0.534	0.477	1713.559	1490.511	35.218	58.697	0.3317	1.8634	0.587	0.978
RBU1-1	5	0.264	0.999	0.475	0.492	1482.684	1549.208	0.77	0.765	2637.057	2617.492	1154.373	1068.284	19.2588	37.4837	19.240	17.805
	10	0.264	0.999	0.385	0.397	1130.503	1177.460	0.649	0.576	2163.569	1877.910	1033.066	700.450	17.2350	30.3225	17.218	11.674
	15	0.277	1.053	0.561	0.524	1819.213	1674.428	0.635	0.534	2108.785	1713.559	289.572	39.131	4.5826	1.1625	4.826	0.652
CC7-1	10	0.364	1.416	0.379	0.379	1107.024	1107.024	0.499	0.487	1576.599	1529.642	469.575	422.618	5.5287	18.5848	7.826	7.044
SSK2-2	10	0.298	1.141	0.367	0.369	1060.067	1067.893	0.649	0.554	2163.569	1791.822	1103.502	723.929	16.1241	32.8760	18.392	12.065
SSK3-2	10	0.248	0.932	0.337	0.375	942.673	1091.372	0.65	0.526	2167.482	1682.254	1224.809	590.882	21.8947	29.2227	20.413	9.848
SSK7-3	10	0.369	1.436	0.502	0.473	1588.339	1474.858	0.582	0.578	1901.389	1885.737	313.050	410.878	3.6324	13.6414	5.218	6.848
PN10-1	10	0.285	1.086	0.335	0.339	934.846	950.499	0.415	0.386	1247.897	1134.416	313.050	183.917	4.8022	9.1501	5.218	3.065
PN10-2	10	0.232	0.866	0.276	0.259	703.972	637.449	0.301	0.274	801.800	696.146	97.828	58.697	1.8834	3.5445	1.630	0.978

Protease unit = 1 n mole of tyrosine/ minute/ 1ml of enzyme

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.24 Proteolytic activities of isolates on fish powder as substrate

Isolate no.	Protein			Protease activities													
		OD	Conc	OD	750 nM	Conc.Tyrosine		OD	750nm	Conc. Tyrosine		Net tyrosine		Specific activity		Unit activity	
	%NaCl	(750nm)	Protein			Blank (nmole)				Sample(nmole)		(nmole)		U/mg		U/ml of enzyme	
			mg/ml	37 C	30 C	37 C	30 C	37C	30 C	37 C	30C	37C	30 C	37C	30C	37C	30C
DS2-5	25	0.747	3.011	0.783	0.774	2687.928	2652.710	0.875	0.855	3047.936	2969.673	360.008	316.963	1.9927	6.7468	6.000	5.283
KS87-2	20	0.455	1.79463	0.528	0.503	1690.080	1592.252	0.567	0.535	1842.692	1717.472	152.612	125.220	1.4173	3.9527	2.544	2.087
DB10-1	25	0.726	2.92352	0.74	0.75	2519.663	2558.795	0.775	0.754	2656.623	2574.447	136.959	15.653	0.7808	0.3525	2.283	0.261
IS40-3	10	0.29	1.10731	0.389	0.364	1146.155	1048.327	0.453	0.413	1396.596	1240.070	250.440	191.743	3.7695	8.2152	4.174	3.196
IO-1	10	0.3	1.14896	0.666	0.548	2230.092	1768.343	0.775	0.663	2656.623	2218.353	426.531	450.010	6.1872	11.2615	7.109	7.500
PS9-2	20	0.355	1.37807	0.498	0.464	1572.686	1439.640	0.535	0.494	1717.472	1557.034	144.786	117.394	1.7511	3.9288	2.413	1.957
PS11-2	10	0.445	1.75298	0.57	0.554	1854.432	1791.822	0.63	0.6	2089.219	1971.825	234.788	180.004	2.2323	5.2633	3.913	3.000
KF1-3B	10	0.425	1.66967	0.489	0.49	1537.468	1541.381	0.541	0.498	1740.951	1572.686	203.483	31.305	2.0312	1.0670	3.391	0.522
CS2	10	0.37	1.44056	0.495	0.485	1560.947	1521.816	0.513	0.521	1631.383	1662.688	70.436	140.873	0.8149	4.7432	1.174	2.348
CS10	10	0.353	1.36974	0.498	0.494	1572.686	1557.034	0.524	0.518	1674.428	1650.949	101.741	93.915	1.2380	3.1431	1.696	1.565

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Isolate no.	Protein			Protease activities													
		OD	Conc	OD	750 nM	Conc.Tyrosine		OD	750nm	Conc. Tyrosine		Net tyrosine		Specific activity		Unit activity	
	%NaCl	(750nm)	Protein			Blank (nmole)				Sample(nmole)		(nmole)		U/mg		U/ml of enzyme	
			mg/ml	37 C	30 C	37 C	30 C	37C	30 C	37 C	30C	37C	30 C	37C	30C	37C	30C
RF2-5	5	0.295	1.12813	0.512	0.476	1627.470	1486.598	0.905	0.765	3165.330	2617.492	1537.860	1130.894	22.7199	36.8130	25.631	18.848
	10	0.351	1.36141	0.453	0.453	1396.596	1396.596	0.685	0.55	2304.441	1776.169	907.846	379.573	11.1140	13.9652	15.131	6.326
	15	0.335	1.29476	0.539	0.548	1733.125	1768.343	0.612	0.663	2018.783	2218.353	285.658	450.010	3.6771	13.9150	4.761	7.500
SSK10-5	10	0.313	1.20312	0.418	0.331	1259.636	919.194	0.709	0.571	2398.356	1858.345	1138.720	939.151	15.7745	37.4462	18.979	15.653
PN2-3	10	0.415	1.62801	0.356	0.329	1017.022	911.368	0.615	0.513	2030.522	1631.383	1013.500	720.016	10.3757	33.7086	16.892	12.000
PN2-10	10	0.321	1.23644	0.404	0.396	1204.852	1173.547	0.698	0.573	2355.312	1866.171	1150.460	692.624	15.5077	28.5736	19.174	11.544
PN2-19	10	0.322	1.24061	0.357	0.369	1020.935	1067.893	0.599	0.507	1967.912	1607.905	946.977	540.012	12.7219	25.2106	15.783	9.000
PN5-1	10	0.335	1.29476	0.402	0.376	1197.026	1095.285	0.684	0.544	2300.528	1752.690	1103.502	657.406	14.2047	27.2556	18.392	10.957
PN8-4	10	0.304	1.16563	0.355	0.359	1013.109	1028.761	0.715	0.568	2421.835	1846.605	1408.726	817.844	20.1426	38.3964	23.479	13.631
RF5-1	10	0.306	1.17396	0.455	0.421	1404.422	1271.375	0.625	0.587	2069.654	1920.955	665.232	649.579	9.4443	23.7941	11.087	10.826
RF5-2	10	0.275	1.04482	0.457	0.421	1412.248	1271.375	0.636	0.491	2112.698	1545.294	700.450	273.919	11.1734	9.9898	11.674	4.565

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Isolate no.	Protein			Protease activities													
		OD	Conc	OD	750 nM	Conc.Tyrosine		OD	750nm	Conc. Tyrosine		Net tyrosine		Specific activity		Unit activity	
	%NaCl	(750nm)	Protein			Blank (nmole)				Sample(nmole)		(nmole)		U/mg		U/ml of enzyme	
			mg/ml	37 C	30 C	37 C	30 C	37C	30 C	37 C	30C	37C	30 C	37C	30C	37C	30C
RF12-1S	10	0.278	1.05732	0.491	0.462	1545.294	1431.814	0.524	0.52	1674.428	1658.775	129.133	226.961	2.0355	7.7041	2.152	3.783
CHN2-1	10	0.449	1.76964	0.441	0.469	1349.638	1459.206	0.516	0.493	1643.123	1553.121	293.485	93.915	2.7641	3.5493	4.891	1.565
RBU1-1	5	0.264	0.999	0.539	0.508	1733.125	1611.818	0.888	0.759	3098.806	2594.013	1365.682	982.195	22.7841	30.3709	22.761	16.370
	10	0.264	0.999	0.539	0.396	1733.125	1173.547	0.701	0.56	2367.051	1815.300	633.927	641.753	10.5760	19.8439	10.565	10.696
	15	0.277	1.05315	0.539	0.439	1733.125	1341.812	0.658	0.587	2198.787	1920.955	465.662	579.143	7.3694	17.9079	7.761	9.652
CC7-1	10	0.364	1.41556	0.404	0.381	1204.852	1114.850	0.556	0.473	1799.648	1474.858	594.796	360.008	7.0031	14.8518	9.913	6.000
SSK2-2	10	0.298	1.14063	0.381	0.383	1114.850	1122.677	0.619	0.509	2046.175	1615.731	931.325	493.054	13.6083	21.5684	15.522	8.218
SSK3-2	10	0.248	0.93235	0.358	0.359	1024.848	1028.761	0.784	0.631	2691.841	2093.132	1666.993	1064.371	29.7991	49.5517	27.783	17.740
SSK7-3	10	0.369	1.43639	0.417	0.491	1255.723	1545.294	0.548	0.529	1768.343	1693.993	512.620	148.699	5.9480	5.9432	8.544	2.478
PN10-1	10	0.285	1.08648	0.394	0.352	1165.721	1001.370	0.415	0.385	1247.897	1130.503	82.176	129.133	1.2606	5.4625	1.370	2.152
PN10-2	10	0.232	0.8657	0.268	0.281	672.667	723.537	0.355	0.364	1013.109	1048.327	340.442	324.790	6.5543	20.1984	5.674	5.413

Protease unit= 1 n mole of tyrosine/ minute/ 1ml of enzyme

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.25 Intracellular และ Extracellular protease activity ของแบคทีเรียที่คัดเลือก

Substrate	Intracellular enzyme		Extracellular enzyme	
Casein (Hammasten)	Total activity (U)	Specific activity (U/ mg protein)	Total activity (U)	Specific activity (U/ mg protein)
	Casein (Hammasten)			
IS 40-3	18.07 ± 2.15	3.48 ± 0.45	2.90 ± 1.69	0.06 ± 0.03
RBU 1-1	11.15 ± 0.48	2.08 ± 0.02	3.41 ± 0.48	0.06 ± 0.01
SSK 2-2	9.12 ± 0.48	1.14 ± 0.05	19.28 ± 0.24	0.24 ± 0.00
SSK 3-2	7.94 ± 0.72	9.76 ± 1.06	73.03 ± 2.41	8.97 ± 0.13
DS 2-5	0	0	5.82 ± 0.48	6.41 ± 0.93
PB 7-3	0	0	0	0
PS 11-1	0	0	11.77 ± 0.24	5.40 ± 0.08
RF 2-5	1127.17 ± 4.34	128.88 ± 0.97	10.41 ± 1.69	7.90 ± 1.62
Fish protein powder (FPP)				
IS 40-3	4.73 ± 0.96	0.91 ± 0.19	10.92 ± 1.93	0.21 ± 0.04
RBU 1-1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	15.02 ± 2.90	0.28 ± 0.06
SSK 2-2	50.17 ± 0.72	6.25 ± 0.14	3.07 ± 1.45	0.04 ± 0.02
SSK 3-2	68.58 ± 4.78	8.51 ± 0.44	122.85 ± 5.79	1.51 ± 0.04
DS 2-5	0	0	12.82 ± 1.21	0.40 ± 0.06
PB 7-3	0	0	8.53 ± 0.97	0.15 ± 0.02
PS 11-1	21.50 ± 4.34	4.09 ± 0.78	1.71 ± 0.48	0.02 ± 0.01
RF 2-5	1250.02 ± 21.72	143.11 ± 2.23	4.27 ± 0.24	0.09 ± 0.00

1 ยูนิต เท่ากับ ปริมาณไทโรซีน 1 nmole ที่ถูกปลดปล่อยออกมาต่อนาที เมื่อใช้ Casein (Hammastens) และ FPP (Fish protein powder) เป็นสับสเตรท

บทที่ 5

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

การวิจัยครั้งนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มจากอาหารหมักชนิดต่างๆที่เก็บจากตลาด และจากน้ำปลาที่ผลิตในจังหวัดสมุทรปราการ สมุทรสงคราม ระยอง รวมทั้งจากบูดูในจังหวัดปัตตานี รวม 110 ตัวอย่าง ได้แบคทีเรียชอบเค็มได้จำนวน 279 ไอโซเลต จากผลการคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรทีเอสขั้นต้นได้แบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง 38 ไอโซเลต และแบคทีเรียชอบเค็มสูง 7 ไอโซเลต และจากการศึกษาทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียตัวแทน 82 สายพันธุ์ ที่น่าสนใจโดยอาศัยผลจากการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ ลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี และDNA-DNA similarity รวมทั้งการวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rDNA สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางจำนวน 56 สายพันธุ์ ได้ 10 กลุ่ม เป็นสกุล *Lentibacillus* 4 สปีชีส์ได้แก่ *Lentibacillus salicampi* 3 สายพันธุ์, *Lentibacillus* sp. nov. 5, *Lentibacillus* sp. nov. 15 สายพันธุ์, *Lentibacillus* sp. nov. 2 สายพันธุ์ *Filobacillus* sp.nov. 2 สายพันธุ์ *Virgibacillus halodenitrficans* 6 สายพันธุ์, *Virgibacillus* sp. nov. 1 สายพันธุ์, *Marinococcus* sp. 3 สายพันธุ์, *Salinicoccus* sp. nov. 15 สายพันธุ์ และ *Chromohalobacter salexigens* 4 สายพันธุ์, พบแบคทีเรียชอบเค็มสูงจำนวน 26 สายพันธุ์ ได้ 3 กลุ่ม ซึ่งพิสูจน์เอกลักษณ์ได้เป็น *Halobacterium salinarum* 10 สายพันธุ์, *Halococcus saccharolyticus* 1 สายพันธุ์ และ *Halococcus* sp. nov. 15 สายพันธุ์ การวิจัยครั้งนี้พบว่าได้แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางใหม่ 6 สปีชีส์และแบคทีเรียชอบเค็มสูงใหม่ 1 สปีชีส์

ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรทีเอสโดยตรวจสอบปฏิกิริยาที่ 30° C และ 37°C พบว่าแบคทีเรียชอบเค็มสูงสายพันธุ์ DS2-5, KS87-2 และ DB10-1 ให้ค่า unit activity 0.652-4.76 U/ ml of enzyme ที่37°C และ 0.913-4.044 U/ ml of enzyme ที่ 30° C โดยใช้ casein เป็น substrate และให้ค่า unit activity 2.283-6.000 U/ ml of enzyme ที่37°C และ 0.261-5.283 U/ ml of enzyme ที่ 30° C โดยใช้ fish powder เป็น substrate ส่วนแบคทีเรียชอบปานกลางสายพันธุ์ RF2-5, SSK10-5, PN2-19, RBU1-1, SSK2-2 และ SSK3-2 สามารถสร้างเอนไซม์ได้มากที่ความเข้มข้นของเกลือ 10% ซึ่งให้ค่า unit activity 9.848-17.805 U/ ml of enzyme ที่ 30° C โดยใช้ casein เป็น substrate และพบว่าการใช้ fish powder เป็น substrate จะให้ค่า unit activity 15.131-27.783 U/ ml of enzyme ที่ 37° C และ unit activity 6.326-17.740 U/ ml of enzyme ที่ 30° C จากผลที่กล่าวมานี้จะเห็นว่าแบคทีเรียชอบเค็มสูงสามารถสร้างเอนไซม์ได้น้อยกว่าแบคทีเรียชอบปานกลางทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของเกลือที่ใส่ลงไปในอาหารซึ่งอาจมีผลต่อการวิเคราะห์การสร้างเอนไซม์ด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียชอบปานกลางบางสายพันธุ์มี intracellular proteaseด้วย

เนื่องจากประเทศไทยมีอาหารหมักหลายชนิดที่มีเกลือสูง และจากผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางและแบคทีเรียชอบเค็มสูงสปีชีส์ใหม่หรือชนิดใหม่หลายชนิด จึงควรมีการศึกษาทั้งด้านอนุกรมวิธานและเอนไซม์โปรทีเอสรวมทั้งเอนไซม์ชนิดอื่นๆในแบคทีเรียกลุ่มนี้เพิ่มเติมอีก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

ศิริเพ็ญ เวชชการัณย์.2533. สภาวะเหมาะสมสำหรับการเติบโตของแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตโปรติเอสวิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. 2543. การศึกษาแบคทีเรียชอบเค็มในอาหารหมัก ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ข้อมูลยังไม่ตีพิมพ์)

สาโรช ประเสริฐศิริวัฒน์. 2531. การเปลี่ยนแปลงของประชากรแบคทีเรียและชีวเคมีในการหมักน้ำปลา วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Arahal, D. R., Marquez, M. C., Volcani, B. E., Schleifer, K. H., and Ventosa, A. 2000. Reclassification of *Bacillus marismortui* as *Salibacillus marismortui* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50, 1501-1503.

Aral, D. R., Teresa Garcia. M., Vargas, C., Canovas, D., Nieto, J. J., and Ventosa, A. 2001. *Chromohalobacter salexigens* sp. nov., a moderately halophilic species includes *Halomonas elongata* DSM 3043 and ATCC 33174. *Int. J. Sys.t Evol. Microbiol.*, 51., 1456-1462.

Anton, J., Meseguer, I., and Rodriguez-Valera, F. 1988. Production of an extra cellular polysaccharide by *Haloferax mediterranei.. Appl. Envon. Microbiol.* 54, 2381-2386.

Barett, A. J. 1994. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidase. *Method. Enzymol.*, 244, 1-15.

Ben-Mahrez, K., Thierry, D., Sorokine, I., Danna-Muller, A., and Kohiyama, M. 1988. Detechtion of circulating antibodies against c-myc protein in cancer patient sera. *British. J. Cancer.*, 57, 529-534.

Bertrand, J.C., Almallah, M., Acquaviva, M., and Mille, G. 1990. Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic archaebacterium. *Lett.. Appl. Microbiol.* , 11, 260-263.

Beynon, R. J. and Bond, J. S. 1990. Proteolytic enzymes, a practical approach. eds. Rickwook, D. and Hames, B. D. IRL Press, Eynsham, Oxford, England. pp. 1-250.

Brink, B. and Damirik,C. 1990. Occurence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.*, 11, 73-84.

Carmen, G. and Ramirez, C. 1978. *Halobacterium vallismortis* , an amylolytic and carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Can. J. Microbiol.*, 24, 710-715.

Chaiyanan, S., Chaiyanan, S, Maugel, T., Huq, A., Robb, F.T., and Colwell, R.R. 1999. Polyphasic taxonomy of a novel *Halobacillus, Halobacillus thailandensis* sp. nov. isolated from fish sauce. *System. Appl. Microbiol.*, 22, 360-365.

Chaiyanan, S., Saranyanit, S., Chamaoot, M., and Kasornmala, C. 1988. Fish sauce fermentation by using microbial inoculation and recycling system. Food Conference'88 Bangkok, Thailand. Oct, 23-26.

Chaveesuk, R., Smith, J., and Simpson, B. 1993. Production of fish sauce and acceleration of fish sauce fermentation using proteolytic enzymes. *J. Aquatic Food Product Tech.*, 2 (3), 59-77.

Choorit, W. and Prasertsan, P. 1992. Characterization of proteases produced by newly isolated and identified proteolytic microorganisms from fermented fish (Budu). *World J. of Microbiol and Biotechnol.* 8, 284-286.

Duong, V. Q., Shimidu, U., and Taga, N. 1981. Purification and some properties of halophilic protease produced by a moderately halophilic marine *Pseudomonas* sp., *Can. J. Microbiol.*, *27*, 505 – 510.

Ebert, K., Goebel, W., and Pfeifer. F. 1984. Homologies between heterogeneous extrachromosomal DNA populations of *Halobacterium halobium* and four new isolates. *Mol. Gen. Genet.*, 194, 91-97.

Ezaki, T., Y. Hashimoto, Y., and Yabuuchi, E. 1989. Fluorometric deoxyribonucleic acid–deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness a mong bacterial strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39, 224-229.

Fernandez-Castillo, R., Rodriguez-Valera, F., Gonzalez Ramos, J., and Ruiz-Berraquero, F. 1986. Accumulation of poly (β-hydroxybutyric acid) by halobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51, 214-216.

Galinski, E.A. and Tindall, B.J. 1992. Biotechnological prospects for halophiles and halotolerant microorganisms. In *Molecular Biology and Biotechnology of Extremehalophiles*, eds. Herbert, R.D. and Sharp, R.J. pp. 76-114. London : Blackie.

Gimenez, M. I., Studdert, C. A., Sanchez, J. J., and De Castro, R. E. 2000. Extracellular protease of *Natrialba magadii:* purification and biochemical characterization. *Extremophiles.* 4, 181-188.

Grant, W.D. and Larsen, H. 1990. Extremely halophilic archaeobacteria, order Halobacteriales

ord.nov., In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.3. eds. Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfenning, N., and Holt, J.G. pp.2216-2233, Baltimore, Md.: Williams & Wilkins.

Heyrman, J., Logan, N. A., Busse, H-J., Balcaen, A., Lebbe, L., Rodriguez-Diaz, M., Swings, J., and De Vos, P. 2003. *Virgibacillus carmonensis* sp. nov., *Virgibacillus necropolis* sp. nov. and *Virgibacillus picturae* sp. nov., three novel species isolated from deteriorated mural paintings, transfer of the species of genus *Salibacillus* to *Virgibacillus*, as *Virgibacillus marismortui* comb. nov. and *Virgibacillus salexigens* comb. nov., and emended description of genus *Virgibacillus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 501-511.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P-H, A., Staley, J. T., and Williams, S. T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, ninth edition. Extremely halophilic, aerobic archaeobacteria (Halobacteria). eds. Hensyl, W. R. pp. 739-746. Baltimore, Md.: Williams & Wilkins.

Kamekura, M. and Dyall-Smith, M. L. 1995. Taxonomy of the family Halobacteriaceae and the description of two new genera, *Halorubrobacterium* and *Natrialba*. *J.Gen.Appl.Microbiol.*, 41, 333-350.

Kamekura, M., Hamakawa, T., and Onishi, H. 1982. Application of halophlilic nuclease H of *Micrococcus varians* subsp. *halophilus* to commercial production of flavoring agent 5 LGMP. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, 994-995.

Kamekura, M. and Seno, Y. 1993. Partial sequence of the gene for a serine protease from a halophilic archaeum *Haloferax mediterranei* R4, and nucleotide sequence of 16S rRNA encoding genes from several halophilic archaea. *Experimentia.*, 49, 503-513.

Khire, J.M. and Pant, A. 1992. Thermostable, salt tolerant amylase from *Bacillus* sp. 64. *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, 8 , 167-170.

Kim, J. and Dordick, J.S. 1997. Unusual salt and solvent dependence of a protease from an extreme halophile. *Biotech . Bioeng.*, 55, 471-479.

Kocur, M. and Hodgkiss, W. 1973. Taxonomic status of the genus *Halococcus* Schoop. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 23, 151-156.

Konig, H. 1988. Archaeobacteria. In *Biotechnology,* Vol. 6B, eds Rehm, H.J. and Reed, G. pp. 699-728. Weinheim : Verlag Chemie.

Li, W. J., Schumann, P., Zhang, Y. Q., Chen, G. Z., Tian, X. P., Xu, L. H., Stackebrandt, E., and

Jiang, C. L. 2005. *Marinococcus halotolerans* sp. nov., isolated from Qinghai, north-west China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**, 1801-1804.

Lopetcharat. K., Choi, Y. J., Park, J. W., and Daeschel, M. A. 2001. Fish sauce products and manufacturing: A review. *Food Rev. Int.* , 17 (1), 65-88.

Lotong, N. 1998. *Koji*. In *Microbiology of Fermented Foods,* Vol.2, ed. by Wood, B.J.B., pp. 658-695, London: Blackie Academic & Professional.

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

Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonycleic acid from microorganism. *J.Mol. Biol.*, 3, 208-218.

Montero, C. G., Ventosa, A., Rodríguez-Valera, F., Kates, M., Moldoveanu, N., and Ruiz-Berraquero, F. 1989. *Halococcus saccharolyticus* sp. nov., a new species of extremely halophilic non-alkaliphilic cocci. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 12, 167-171.

Phithakpol, B., Varanyanond, W., Reungmaneepaitoon, S., and Wood, H. 1995. The Traditional Fermented Foods of Thailand, Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University, Bangkok, Thailand, 157 pp.

Rao, M. B., Tanksale, A. M., Chatge, M. S., and Deshpande, V. V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Micorbiol. Mol. Biol. Rev.*, 597-635.

Rodriguez-Valera, F. 1992 Biotechnological potential of halobacteria. In *The Archaebacteria : Biochemistry and Biotechnology*, eds. Danson, M.J., Hough, D.W. and Lunt, G.G., pp. 135-147, London : Portland Press.

Ryu, K., Kim, J., and Dordick, J. S. 1994. Catalytic properties and potential of an extracellular protease from an extreme halophile. *Enzyme Microb. Technol.* ,16, 266-275.

Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighboring-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4, 406-425.

Sanchez-Poro, C., Mellodo, E., Bertoldo, C., Antranikian, G., and Ventosa, A. 2003. Screening and characterization of the protease CP1 produced by the moderately halophilic bacterium *Pseudomonas* sp. strain CP76. *Extremophiles.*, 7, 221-228.

Schlesner, H., Lawson, P. A., Collins, M. D., Weiss, N., Wehmeyer, U., Volker, H., and

Thomm, M. 2001. *Filobacillus milensis* gen. nov.sp. nov., a new halophilic

spore-forming bacterium with Orn-D-Glu-type peptidoglycan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51, 425-431.

Schmitt, W., Rdest, U., and Goebel, Werner. 1990. Effcient high-performance liquid chromatographic system for the purification of a halobacterium serine protease. *J. Chromatography.*, 521, 211-220.

Stan-Lotter, H., Pfaffenhuemer, M., Legat, A.., Busse, H-J., Christian Radax, C., and Gruber, C. 2002. *Halococcus dombrowskii* sp. nov., an archaeal isolate from a Permian alpine salt deposit. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 1807–1814.

Stepanov, V. M., Rudenskaya, G. N., Revina, L. P., Gryaznova, Y. B., Lysogorskaya, E. N., Filippova, I. Y., and Ivanova, I. I. 1992. A serine proteinase of an archaebacterium, *Halobacterium mediterranei. Biochem. J.* , 285, 281-286.

Studdert, C. A., De Castro, R. E., Seitz, K. H., and Sanchez, J. J. 1997. Detection and preliminary characterization of extracellular proteolytic activities of the haloalkaliphilic archaeon Natronococcus occultus. *Arch. Microbiol.*, 168, 532-535.

Sukhumavasi, J., Kato, K., and Harada, T. 1975. Glucoamylase of a strain of *Saccharomycopsis fibuligera* isolated from mould bran (loog-pang) of Thailand. *J.Fermentt.Technol.*, 53, 559-565.

Tamaoka, J. 1994. Determination of DNA base composition. In *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*, eds. Goodfellow, M. and O'Donnell, A.G., pp.463-470, New York: John Wiley and Sons Ltd.

Tanasupawat, S., Hashimoto, Y., Ezaki, T., Kozaki, M., and Komagata, K. 1991. Identification of *Staphylococcus carnosus* strains from fermented fish and soy sauce mash. *J. Gen. Appl. Microbiol.* ,37, 479-494.

Tanasupawat, S., Hashimoto, Y., Ezaki, T., Kozaki, M., and Komagata, K. 1992. *Staphylococcus piscifermentans* sp. nov., from fermented fish in Thailand. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42, 577-581.

Tanasupawat, S. and Komagata, K. 1995. Lactic acid bacteria found in fermented foods in Thailand. *World J. Microbiol. Biotech.* , 11, 253-256.

Tanasupawat, S., and Komagata, K. 2001. Lactic acid bacteria in fermented foods in Southeast Asia *In Microbial Diversity in Asia: Technology and Prospects*.ed. by Nga,

B. H., H. M. Tan, and K. Suzuki. World Scientific Publishing Co. Pte.Ltd., Singapore, 252 pp.

Tanasupawat, S., S. Okada, and Komagata, K. 1998. Lactic acid bacteria found in fermented fish in Thailand. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 44, 193-200.

Tanasupawat, S., Shida, S., Okada, S., and Komagata, K. 2000. *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand. *Int.J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50, 1479-1485.

Tanasupawat, S., J. Thongsanit, S. Okada, and Komagata, K. 2002. Lactic acid bacteria isolated from soy sauce mash in Thailand. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 48, 201-209.

Thongthai, C., McGenity, T.J., Suntinanalert, P., and Grant, W.D. 1992. Isolation and characterization of an extsemely halophilic archaeobacterium from traditional fermented Thai fish sauce. (nam-pla). *Lett. Appl. Microbiol.*, 14, 111-114.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. –G. 1997. CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25, 4876-4882.

Thongsanit, J., Tanasupawat, S., Keeratipibul, S., and Jatikavanich, S. 2002. Characteristics and identification of *Tetragenococcus halophilus* and *Tetragenococcus muriaticus* strains from fish sauce (Nam-Pla). *Jpn. J. Lactic Acid Bacteria.*, 13(1), 46-52.

Ventosa, A., Marquez, M. C., Ruiz-Berraquero, F., and Kocur, M. 1990. *Salinicoccus roseus* gen. nov., sp. nov., a new moderately halophilic Gram-positive coccus. *Syst. Appl. Microbiol.*, 13, 29-33.

Ventosa, A. and Nieto, J.J. 1995. Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World. J. Microbiol. Biotechnol.*, 11, 85-94.

Ventosa, A., Nieto, J. J., and Oren, A. 1998. Biology of moderately aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 504-544

Vreeland, E. H. and Hochstein, L. 1992. The ecology of halophilic bacteria. eds. Vreeland, E. H. and Hochstein, L. pp. 26-79, Boca Raton, Florida : CRC Press.

Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., and 9 other authors. 1987. International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc commitee on the reconcillation of approaches to bacterial systematics. *Int .J. Syst. Bacteriol.*, 37, 463-464.

Yoon, J. –H., Kang, K. H. & Park, Y. –H. 2002. *Lentibacillus salicampi* gen. nov., sp. nov., a moderlately halophilic bacterium isolated from a salt field in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 2043-2048.

Yoon, J. –H., Lee, K. –C., Weiss, N., Kang, K. H., and Park, Y. –H. 2003. *Jeotgalicoccus halotolerans* gen. nov., sp. nov. and *Jeotgalicoccus psychrophilus* sp. nov., isolated from the traditional Korean fermented seafood jeotgal. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53, 595-602.

Yoon, J. –H., Oh, T. K., and Park, Y. –H. 2004. Transfer of *Bacillus halodenitrificans* Denariaz et al. 1989 to the genus *Virgibacillus* as *Virgibacillus halodenitrificans* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 2163-2167.

Zhang, W., Xue, Y., Ma, Y., Zhou, P., Ventosa, A., and Grant, W. D. 2002. *Salinicoccus alkaliphilus* sp. nov., a novel alkaliphile and moderately halophile from Baer Soda Lake in Inner Mongolia Autonomous Region, China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52, 789-793.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำส่วนประกอบตามสูตร ผสมกับน้ำกลั่น 1000 ml. นำไปฆ่าเชื้อในเครื่องอบไอน้ำเป็นเวลา 15 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์ ที่อุณหภูมิ 121 °C ยกเว้นสูตรอาหารที่ใช้ทดสอบการสร้างกรดจากน้ำตาล และ การเจริญในอาหารที่มีเฉพาะแหล่งคาร์บอน นำไปฆ่าเชื้อในเครื่องอบไอน้ำเป็นเวลา 10 นาที ที่ความดัน 10 ปอนด์ ที่อุณหภูมิ 110 °C

1. Halobacterium medium JCM No. 168

yeast extract	5	g
Casamino acid	5	g
Sodium glutamate	1	g
Tri-sodium citrate	3	g
$MgSO_4.7H_2O$	20	g
KCl	2	g
NaCl	200	g
$FeCl_2.4H_2O$	0.362	g
$MnCl_2.4H_2O$	0.0362	g
Agar	20	g
Distilled water	1000	ml
Adjust pH 7.2 with NaOH		

2. Halobacterium medium JCM No. 169

yeast extract	10	g
Casamino acid	7.5	g
Tri-sodium citrate	3	g
$MgSO_4.7H_2O$	20	g
KCl	2	g
NaCl	250	g
$FeSO_4.4H_2O$	0.05	g
$MnSO_4.4H_2O$	0.2	g
Agar	20	g

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Distilled water	1000	ml
Adjust pH 7.2 with NaOH		

3. Halobacterium medium JCM No. 377

yeast extract	5	g
Casamino acid	5	g
Sodium glutamate	1	g
Tri-sodium citrate	3	g
$MgSO_4.7H_2O$	20	g
KCl	2	g
NaCl	100	g
$FeCl_2.4H_2O$	0.362	g
$MnCl_2.4H_2O$	0.0362	g
Agar	20	g
Distilled water	1000	ml
Adjust pH 7.2 with NaOH		

4. Marine oxidation-fermentation medium (MOF)

Casitone(Difco)	1	g
Yeast extract	0.1	g
Ammonium sulfate	0.5	g
Tris buffer	0.5	g
NaCl	6.5 หรือ 16.5	g
Phenol red 0.001%(1.0 มล. ของ 0.1%aqueous ต่อ 100 ml ของอาหาร)		
Artificial sea water	1000	ml
Adjusted pH to 7.5		

5. L-arginine agar medium

Peptone	1.0	g
NaCl	100 หรือ 200	g
K_2HPO_4	0.3	g
Phenol red,1.0% aq.solution	1.0	ml
L(+)arginine hydrochloride	10.0	g
Agar	3.0	g

Distilled water	1000	ml

Dissolve the solids in the water, adjust to pH 7.2 , distribute into tubes or screw-capped (6mm) bottles to a depth of about 16 mm(3.5ml).

6. Aesculin broth

Aesculin	1	g
Ferric citrate	0.5	g
NaCl	100 หรือ 200	g
Peptone water	1000	ml

Adjust pH 7.4

Dissolve the aesculin and iron salt in the peptone water and sterilized at 115 ºC for 10 min.

7. Casein agar

JCM NO. 168 หรือ 377 agar medium (ไม่เติม casamino acids)

Skim milk (ฆ่าเชื้อ 10 นาที ความดัน 10 ปอนด์ อุณหภูมิ 110 °C) 1% (w/v)

8. Gelatin agar

JCM NO. 168 หรือ 377 agar medium (ไม่เติม casamino acid)

Gelatin 10% (w/v)

Dissolve and adjust pH 7.2.

8. Starch agar

JCM NO. 168 หรือ 377 agar medium

Starch 10% (w/v)

Dissolve and adjust pH 7.2.

9. Tyrosine agar

JCM NO.168 หรือ 377 agar medium (ไม่เติม casamino acids)

Tyrosine 50 g

Dissolve and adjust pH 7.2.

10. Deoxyribonuclease (DNase) media

DNase test agar (Difco)	42	g
Distilled water	1000	ml

Adjust pH 7.3 ± 0.2 and heat to boiling to dissolve completely.

11. Nitrate broth

Beef extract	10	g
Peptone	10	g
NaCl	5	g
Distilled water	1000	ml

Dissolve and adjusted pH to 7.2.

12. Indole test

Bactopeptone	10	g
NaCl	100 หรือ 200	g
Distilled water	1000	ml

Dissolve and adjusted pH to 7.2.

13. Tween 80 agar medium

JCM NO.168 หรือ 377 agar medium

Tween 80	2	ml

Dissolve and adjust pH 7.2.

14. Urea agar medium

JCM NO.168 หรือ 377 agar medium (ไม่เติม casamino acids)

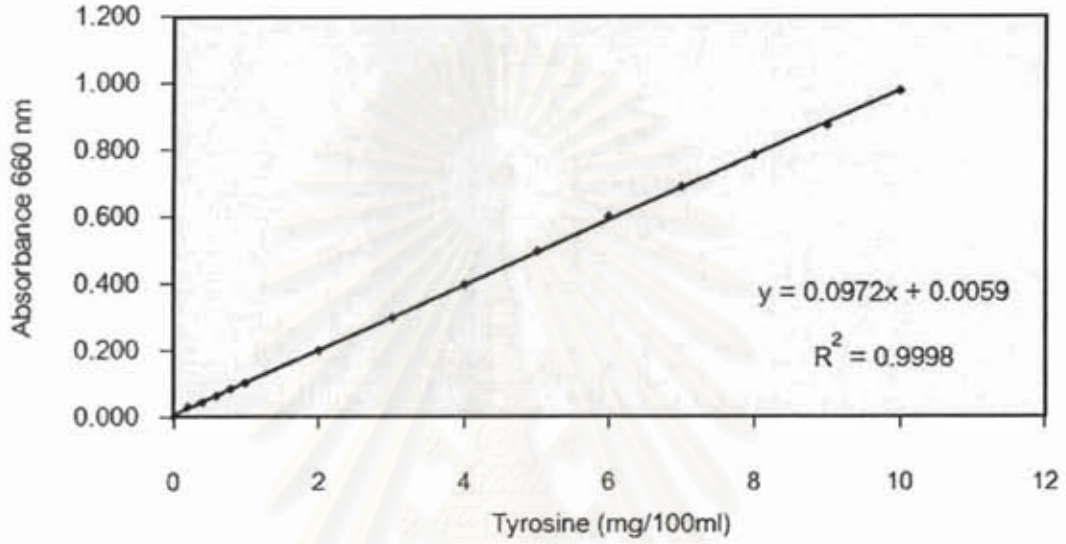
Urea (ฆ่าเชื้อด้วยการกรอง)	2% (w/v)

Dissolve and adjust pH 7.2.

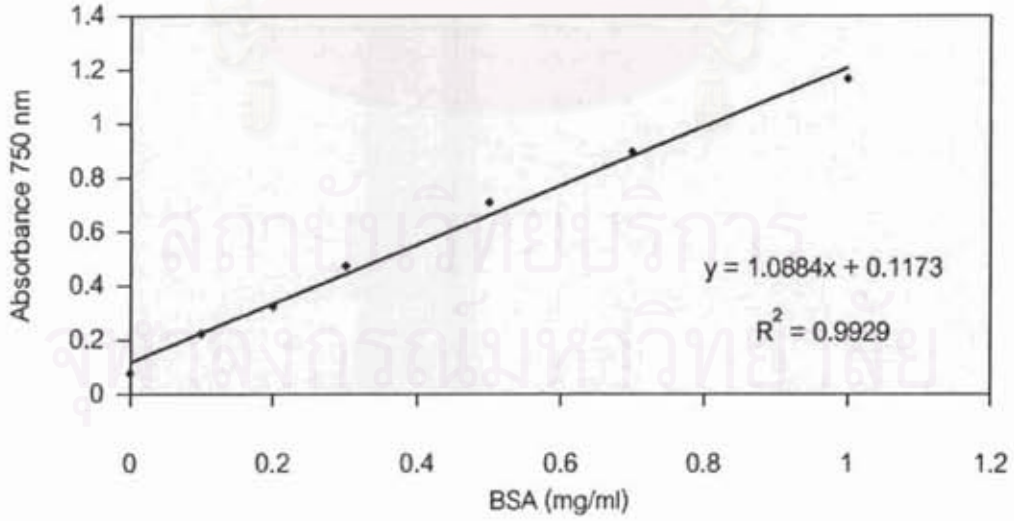
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Standard curve of tyrosine, Bovine serum albumin(BSA) and AMC

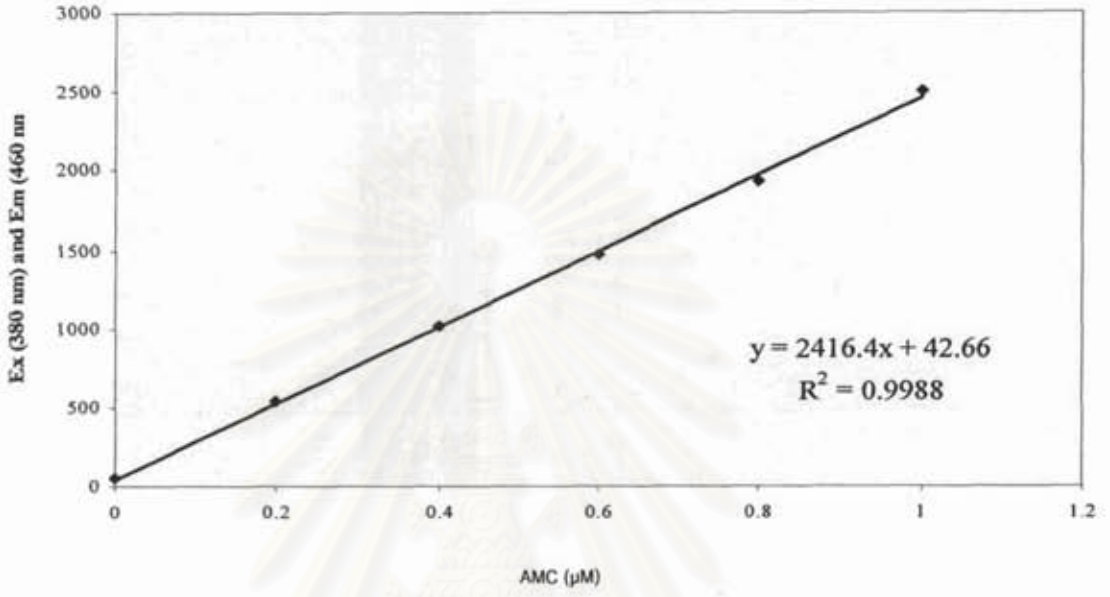
1. Standard curve of tyrosine



2. Standard curve of Bovine serum albumin (BSA)



3. **Standard curve of AMC**



Nucleotide sequences of the PCR amplified 16S rDNA

Strain IS40-3 (AB127980)

1 aggacgaacg ctggcggcgt gcctaataca tgcaagtcga gcgcgggaag caggtaatcg

61 cccttcgggg cgtgcgcctg tggaacgagc ggcggacggg tgagtaacac gtgggcaacc

121 tgcctgtaag actgggataa ctccgggaaa ccggggctaa taccggatga tgtctttcct

181 cgcatgaggg aaggctgaaa gacggccttt gtgctgtcac ttacagatgg gcccgcggcg

241 cattagttag ttggtgaggt aagagctcac caaggcgacg atgcgtagcc gacctgagag

301 ggtgatcggc cacactggga ctgagacacg gcccagactc ctacgggagg cagcagtagg

361 gaatcttccg caatggacga aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgagtga tgaaggtctt

421 cggatcgtaa aactctgttg tcagggaaga acaagcgtgg ttcgaacagg gccatgcctt

481 gacggtacct gaccagaaag ccccggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag

541 ggggcaagcg ttgtccggaa ttattgggcg taaagcgcgc gcaggcggtt tcttaagtct

601 gatgtgaaat ctcgcggctt aaccgcgagc ggtcattgga aactgggagg cttgagtaca

661 gaagaggaga gtggaattcc acgtgtagcg gtgaaatgcg tagagatgtg gaggaacacc

721 agtggcgaag gcgactctct ggtctgtaac tgacgctgag gcgcgaaagc gtgggtagcg

781 aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgtt gagtgctagg tgttaggggg

841 tttccgcccc tttgtgctga agttaacgca ttaagcactc cgcctgggga gtacggccgc

901 aaggctgaaa ctcaaaagaa ttgacggggg cccgcacaag cggtggagca tgtggtttaa

961 ttcgaagcaa cgcgaagaac cttaccaggt cttgacatcc tctgacagcg gcagagatgc

1021 cgtgttccct tcggggacag agtgacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg

1081 agatgttggg ttaagtcccg taacgagcgc aacccttgat cttagttgcc agcattcagt

1141 tgggcactct aaggtgactg ccggtgacaa accggaggaa ggcggggatg acgtcaaatc

1201 atcatgcccc ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat ggatggaaca aagggaagcg

1261 aagccgtgag gtgtagcaaa tcccataaaa ccattctcag ttcggattgc aggctgcaac

1321 tcgcctgtat gaagccggaa tcgctagtaa tcgcggatca gcatgccgcg gtgaatacgt

1381 tcccgggcct tgtacacacc gcccgtcaca ccacgagagt tggcaacacc cgaagtcggt

1441 gaggtaacct tttggagcca gccgccgaag gtggggccaa tgattggggt gaagtcgtaa

1501 caaggtagcc gtatcggaag gtgc

Strain PS11-2 (AB191345)

1 cggacgggtg agtaacacgt gggcaacctg cccgaaagac cgggataact tgcggaaacg

61 tgagctaata ccggataatg cctttccccg catgggggag ggctgaaaga cggcctttgt

121 gctgtcactt acggatgggc ccgcggcgca ttagttagtt ggtgaggtaa gagctcacca

181 aggcgacgat gcgtagccga cctgagaggg tgatcggcca cactgggact gagacacggc

241 ccagactcct acgggaggca gcagtaggga atcttccgca atggacgaaa gtctgacgga

301 gcaacgccgc gtgagtgatg aaagtcttcg gatcgtaaaa ctctgttgtc agggaagaac

361 aggcgtggtt cgaacagggc catggtttga cggtacctga ccttaaagcc ccggcaaact

421 acgtgccagc agccgcggta atacgtaggg ggcgagcgtt gtccggaatt attgggcgta

481 aagggcgcgc aggcggtctt ttaagtctga tgtgacatct cgcggctcaa ccgcgagcgg

541 tcattggaaa ctgggagact tgagtacaga agaggagagt ggaattccac gtgtagcggt

601 gaaatgcgta gagatgtgga ggaacaccag tggcgaaggc gactctctgg tctgttactg

661 acgctgaggc gcgaaagcgt gggtagcgaa caggattaga taccctggta gtccacgccg

721 taaacgttga gtgctaggtg ttaggggttt ccgcccctt tgtgctgaag ttaacgcatt

781 aagcactccg cctggggagt acggccgcaa ggctgaaact caaaagaatt gacgggggcc

841 cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg cgaagaacct taccaggtct

901 tgacatcctc tgacagcggc agagatgccg tgttcccttc ggggacagag tgacaggtgg

961 tgcatggttg tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgta acgagcgcaa

1021 cccttaatct tagttgccag cattaagttg ggcactctaa ggtgactgcc ggtgacaaac

1081 cggaggaagg cggggatgac gtcaaatcat catgcccctt atgacctggg ctacacacgt

1141 gctacaatgg atggaacaaa gggacgcgaa gcggcgacgt gatagccaat cccacaaaac

1201 cattcccagt tcggattgca ggctgcaact cgcctgtatg aagccggaat cgctagtaat

1261 cgcggatcag aatgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac

1321 cacgagagtt ggcaacaccc gaagtcggtg aggcaaccat tttggagcca gccgccgaag

1381 gtggggccaa tgattggggt gaagtcgtaa

Strain PN7-6 (AB231905)

1 aatacatgca agttcagcgc gtgaagcagg catttgccct tcggggcaat tgcttgtgga

61 acgagcggcg gacgggtgag taacacgtgg gcaacctgcc tgtaagcctg ggataactcc

121 gggaaaccgg ggctaatacc ggatgacatg ccgtatcgca tgatgcggga ttgaaagacg

181 gcttttggct gtcacttaca gatgggcccg cggcgcatta gttagttggt gaggtaagag

241 ctcaccaagg cgacgatgcg tagccgacct gagagggtga tcggccacac tgggactgag

301 acacggccca gactcctacg ggaggcagca gtagggaatc ttccgcaatg gacgaaagtc

361 tgacggtgca acgccgcgtg agtgatgaag gttttcggat cgtaaaactc tgttgtcagg

421 gaagaacacg tgctgctcga agagggcagc gccttgacgg tacctgacca gaaagccccg

481 gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtaggggcc gagcgttgtc cggaattatt

541 gggcgtaaag cgcgcgcagg cggtctttta agtctgatgt gaaatcccgc ggctcaaccg

601 cgggcggtca ttggaaactg gaggacttga gtgcagaaga ggagagtgga attccacgtg

661 tagcggtgaa atgcgtagag atgtggagga acaccagtgg cgaaggcgac tctctggtct

721 gtaactgacg ctgaggtgcg aaagcatggg tagcgaacag gattagatac cctggtagtc

781 catgccgtaa acgttgagtg ctaggtgtta gggggtttcc acccctttgt gctgaagtta

841 acgcattaag cactccgcct ggggagtacg gccgcaaggc tgaaactcaa aagaattgac

901 gggggcccgc acaagcggtg gagcatgtgg tttaattcga agcaacgcga agaaccttac

961 caggtcttga catcctctga tgacggtaga gataccgtgt tcccttcggg gacagagtga

1021 caggtggtgc atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgtaacg

1081 agcgcaaccc ttgaccttag ttgccagcat tcagttgggc actctaaggt gactgccggt

1141 gacaaaccgg aggaaggcgg ggatgacgtc aaatcatcat gcccccttatg acctgggcta

1201 cacacgtgct acaatggatg gaacaaaggg cagcgaagcc gtgaggtgaa gcaaatccca

1261 caaaaccatt cccagttcgg attgcaggct gcaactcgcc tgtatgaagc cggaatcgct

1321 agtaatcgcg gatcagaatg ccgcggtgaa tacgttcccg ggccttgtac acaccgcccg

1381 tcacaccacg agagttggca acacccgaag tcggtgaggt aaccgtaagg agccagccgc

1441 cgaaggtggg gccaatgatt ggggtgaagt cgtaacaagg tagccgtatc ggaaggtgcg

1501 gctggatcac tcccta

Strain RF2-5 (AB191344)

1 aagcagactg aatccttcgg gaggacgtct gtggaacgag cggcggacgg gtgagtaaca

61 cgtgggcaac ctgcctgtaa gactgggata actccgggaa accggggcta ataccggata

121 actcatcgga tcgcatgatc cgatgttgaa agatggcttc tagctatcac ttacagatgg

181 gcccgcggcg cattagttag ttggtgaggt aacggctcac caaggccacg atgcgtagcc

241 gacctgagag ggtgatcggc cacactggga ctgagacacg gcccagactc ctacgggagg

301 cagcagtagg gaatcatccg caatggacga aagtctgacg gtgcaacgcc gcgtgagtga

361 ggaaggcctt cgggtcgtaa aactctgttg ttagggaaga acaagttccg ttcgaatagg

421 gcggagcctt gacggtacct aaccagaaag ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg

481 taatacgtag gtggcaagcg ttgtccggaa ttattgggcg taaagcgcgc gcaggcggtt

541 ccttaagtct gatgtgaaat cttgcggctc aaccgcaagc ggtcattgga aactggggaa

601 cttgaagaca gaagaggaga gcggaattcc acgtgtagcg gtgaaatgcg tagagatgtg

661 gaggaacacc agtggcgaag gcggctctct ggtctgtgct tgacgctgag gcgcgaaagc

721 gtggggagcg aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gagtgctagg

781 tgttaggggt ttccaccctt agtgctgcag ttaacgcaat aagcactccg cctggggagt

841 acgggcgcaa gggtgaaact caaaggaatt gacgggggcc cgcacaagcg gtggagcatg

901 tggtttaatt cgaagcaacg cgaagaacct taccaggtct tgacattctc ggaccaccct

961 agagataggg tcttccttc ggggaccgag tgacaggtgg tgcatggttg tcgtcagctc

1021 gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcaa cccttgatct tagttgccag

1081 cattcagttg ggcactctaa ggtgactgcc ggtgacaaac cggaggaagg tggggatgac

1141 gtcaaatcat catgcccctt atgacctggg caacacacgt gctacaatgg atggtacaat

1201 gggctgcgaa accgcgaggt gaagcaaatc ccaaaaagcc attctcagtt cggattgtag

1261 gctgcaactc gcctgcatga agccggaatc gctagtaatc gtggatcagc atgccacggt

1321 gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc ccgtcacacc acgagagttg gtaacacccg

1381 aagtcggtgg ggtaaccttt tggagctagc cgccgaaggt gggaccaatg attggggtga

1441 agtcgtaaca aggtagccgt atcggaaggt gcggctggat caacccttna t

Strain RBU1-1 (AB194046)

1 gctatnatgc aagtcgagcg cgggaagcaa actgaatcct tcgggaggaa cgtctgtgga

61 acgagcggcg gacgggtgag taacacgtgg gcaacctgcc tgtaagactg ggataactcc

121 gggaaaccgg ggctaatacc ggataactca tcggatcgca tgatccgatg ttgaaagatg

181 gcttcttgct atcacttaca gatgggcccg cggcgcatta gctagttggt gaggtaacag

241 ctcaccaagg ccacgatgcg tagccgacct gagagggtga tcggccacac tgggactgag

301 acacggccca gactcctacg ggaggcagca gtagggaatc atccgcaatg gacgaaantc

361 tgacggtgca cgccgcgtga ntgaaggaaa gccttccggt cgtaaactct gttgttaggg

421 aagaacagtt ccgttcgata gggcggagcc ttgacggtac ctaaccagaa agccacggct

481 aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt aggtggcaag cgttgtccgg aattattggg

541 cgtaaagcgc gcgcaggcgg ttccttaagt ctgatgtgaa atcttgcggc tcaaccgcaa

601 gcggtcattg gaaactgggg aacttgaaga cagaagagga gagcggaatt ccacgtgtag

661 cggtgaaatg cgtagagatg tggaggaaca ccagtggcga aggcggctct ctggtctgtg

721 cttgacgctg aggcgcgaaa gcgtggggag cgaacaggat tagataccct ggtagtccac

781 gccgtaaacg atgagtgcta ggtgttaggg ggttccaccc ttagtgctgc agttaacgca

841 ataagcactc cgcctgggga gtacggccgc aaggctgaaa ctcaaaggaa ttgacggggg

901 cccgcacaag cggtggagca tgtggtttaa ttcgaagcaa cgcgaagaac cttaccaggt

961 cttgacatcc tcggaccacc ctagagatag ggtcttccct tcggggaccg agtgacaggt

1021 ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc

1081 aacccttaac cttagttgcc agcattcagt tgggcactct aaggtgactg ccggtgacaa

1141 ccggaggaag gtggggatga cgtcaatcat catgcccctt atgacctggg cacacacgtg

1201 ctacaatgga tggtacaatg ggccgcgaag ccgcgaggtg aagcaaatcc caaaaagcca

1261 ttctcagttc ggattgtagg ctgcaactcg cctgcatgaa gccggaatcg ctagtaatcg

1321 tggatcagca tgccacggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca

1381 cgagagttgg taacacccga agtcggtggg gtaacctttt ggagctagcc gccgaaggtg

1441 ggaccaatga ttggggtgaa gtcgtaacaa ggtagccgta tcggaaggtg cntggaaaaa

1501 ncccccctcct taaa

Strain SSK3-2

GCGCGGGAAG CAAGCTGATC CTCTTCGGAG GTGACGCTTG TGGAACGAGC
GGCGGACGGG TGAGTAACAC GTGGGCAACC TGCCTGTAAG ACTGGGATAA
CCCCGGGAAA CCGGGGCTAA TACCGGATAA TACTTTTCAT CACCTGATGG
AAAGTTGAAA GGTGGCTTCT TGCTACCACT TACAGATGGG CCCGCGGCGC
ATTAGCTAGT TGGTGAGGTA ACGGCTCACC AAGGCAACGA TGCGTAGCCG
ACCTGAGAGG GTGATCGGCC ACACTGGGAC TGAGACACGG CCCAGACTCC
TACGGGAGGC AGCAGTAGGG AATCTTCCGC AATGGACGAA AGTCTGACGG
AGCAACGCCG CGGGAGTGAT GAAGGTTTTC GGATCGTAAA GCTCTGTTGT
TAGGGAAGAA CAAGTGCCGT TCGAATAGGG CGGCACCTTG ACGGTACCTA
ACCAGAAAGC CCCGGCTAAC TACGTGCCAG CAGCCGCGGT AATACGTAGG
GGGCAAGCGT TGTCCGGAAT TATTGGGCGT AAAGCGCGCG CAGGCGGTCC
TTTAAGTCTG ATGTGAAAGC CCACGGCTTA ACCGTGGAGG GTCATTGGAA
ACTGGAGGAC TTGAGTACAG AAGAGGAGAG TGGAATTCCA CGTGTAGCGG
TGAAATGCGT AGAGATGTGG AGGAACACCA GTGGCGAAGG CGACTCTCTG
GTCTGTAACT GACGCTGAGG CGCGAAAGCG TGGGGAGCGA ACAGGATTAG
ATACCCTGGT AGTCCACGCC GTAAACGATG AGTGCTAGGT GTTAGGGGGT
TTCCGCCCCT TAGTGCTGAA GTTAACGCAT TAAGCACTCC GCCTGGGGAG
TACGGCCGCA AGGCTGAAAC TCAAAAGAAT TGACGGGGGC CCGCACAAGC
GGTGGAGCAT GTGGTTTAAT TCGACGCAAC GCGAAGAACC TTACCAGGTC
TTGACATCCT CTGCAATCGG TAGAGATACC GAGTTCCCTT CGGGGACAGA
GTGACAGGTG GTGCATGGTT GTCGTCAGCT CGTGTCGTGA GATGTTGGGT
TAAGTCCCGC AACGAGCGCA ACCCTTGATC TTAGTTGCCA GCATTTAGTT
GGGCACTCTA AGGTGACTGC CGGTGACAAA CCGGAGGAAG GTGGGGATGA
CGTCAAATCA TCATGCCCCT TATGACCTGG GCTACACACG TGCTACAATG
GATGGAACAA AGGGAAGCAA AACCGCGAGG TCAAGCAAAT CCCATAAAAC
CATTCTCAGT TCGGATTGCA GGCTGCAACT CGCCTGCATG AAGCCGGAAT
CGCTAGTAAT CGCGGATCAG CATGCCGCGG TGAATACGTT CCCGGGCCTT
GTACACACCG CCCGTCACAC CACGAGAGTT GGTAACACCC GAAGTCGGTG
AGGTAACCTT TTGGAGCCAG CCGCCGAAGG TGGGACCAAT GATTGGGGTG
AAGTCGTAAC AAGGTAGCCG TATCGGAAGG TGCGGCTGGA NTNNCCTNNA

Strain SSK2-2

CATCCCCTTCGGGGGTGACGCTTATGGAATGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACA
CGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACCCCGGGAAACCGGGGCTAATA

CCGGATAACACTTTTCGTTGCATGACGAGAAGTTGAAAGGCGGCTTCGGCTGCC
ACTTACAGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCA
AGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGAC
GAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAA
ACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTCGGGTAGTAACTGACCCGGCCTTGACGGT
ACCTAACCAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA
GGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCTCGCAGGCGGTCCTT
TAAGTCTGATGTGAAATCTCGCGGCTCAACCGCGAACGGTCATTGGAAACTGGA
GGACTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCNCNTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGA
CGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC
ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGA
AGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTC
AAAAGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAA
GCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGCTATTCCTAGAGATAG
GAAGTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTG
CCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCT
ACAATGGGATGGAACAAAGGGAAGCAAAACCGCGAGGTCAAGCAAATCCCAT
AAAACCATTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGGA
ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
TACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTGGTAACACCCGAAGTCGGTGAGG
TAACCTTTTGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACCAATGATTGGGGTGAAGTC
GTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTTAAAA

Strain CS2 (AB194072)

1 ttagtttgat ccttggntca ggacgaacgc tggcggcgtg cctaatacat gcaagtcgag

61 cgcgggaagc cggcggactc cttcgggagg aaaccggtgg aacgagcggc ggacgggtga

121 gtaacacgtg ggcaacctgc cggactgatg ggaataaccc cgggaaaccg gggctaatgc

181 ccaatacgcc ctgacctcgc ctgaggtcag cggtaaagca gggatcttcg gattccttgc

241 acagttccga tgggcccgcg gcgcattagc tagtggagag gtaagggctc cccaaggcga

301 acgatgcgta gccgacctga gagggtgatc ggccacactg ggactgagac acggcccaga

361 ctcntacggg aggcagcagt agggaatcat ccgcaatggg cgaaagcctg acggtgcaac

421 gccgcgtgag tgatgaaggt tttcggatcg taaagctctg ttgacaggga agaacccacg

481 ccagtcgaac aggctggcgt gctgacggta cctgtccaga aagccccggc taactacgtg

541 ccagcagccg cggtaatacg taggggggcaa gcgttgtccg gaattattgg gcgtaaaggg

601 cacgcaggcg gtttcgtcag tccgatgtga caggccacgg ctcaaccgtg gaaggccatt

661 ggaaactgcg aaacttgagg acagaagagg agagtggaat ttccacgtgt agcggtgaaa

721 tgcgtagata tgtggaggaa caccagtggc gaaggcgact ttttggtctg tacctgacgc

781 tgaggtgcga aagcatgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc atgccgtaaa

841 cgctgagtgc taggtgttag gggtttcgat acccgtagtg ccgaagctaa cgcattaagc

901 actccgcctg gggagtacga ccgcaaggtt gaaactcaaa ggaattgacg gggcccgca

961 caagcggtgg agcatgtggt ttaattcgac gcaacgcgaa gaaccttacc agatcttgac

1021 attttccgct acgcctcgag agaggcggtt ccccttcggg ggancggaat gancaggtgg

1081 tgccatggtt ntcntcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc aacgagcgca

1141 acccctaatc ttagttgcca gcattcagtt gggcactcta aggtgactgc cggtgacaaa

1201 ccggaggaag gtggggatga cgtcaaatca tcatgcccct tatgatctgg gctacacacg

1261 tgctacaatg gatggtacaa cgggatgcga acccgcgagg gggagccaat ccagaaaagc

1321 cattctcagt tcggattgca ggctgcaact cgcctgcatg aagccggaat cgctagtaat

1381 cgcggatcag catgccgcgg tgaatacgtt tcccgggcct tgtacacacc gcccgtcaca

1441 ccacgagagt tgcaacaccc gaagttcggt gagggaacct tttggaccca gccgccgaag

1501 tggcaaa

Strain PN1-2 (AB258358)

1 tgcaagttca acgcgcagcc ccggagcttg ctctggggtc tgcgagtggc ggacgggtga

61 gtaacacgta ggcaacctac ccatcagact gggataaccg cgggaaaccg tggctaatac

121 cggataaccc tgatccccgc agggggatga gttgaaaggc ggtctttgac tgccactgat

181 ggatgggcct gcggcgcatt agctagttgg tggggtaagg gcccaccaag gcgacgatgc

241 gtagccgacc tgagagggtg atcggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac

301 gggaggcagc agtagggaat cttccgcaat ggacgcaagt ctgacggagc aacgccgcgt

361 gagtgaagaa gggtttcggc tcgtaaaact ctgttgtcag ggaagaacgc cggtgggagt

421 aactgtccat cgggtgacgg tacctgacca gaaagccacg gctaactacg tgccagcagc

481 cgcggtaata cgtaggtggc aagcgttatc cggaattatt gggcgtaaag cgcgcgtagg

541 cggttcgtta agtctgatgt gaaagccccc ggctcaaccg gggagggtca ttggaaactg

601 gcgaacttga gtgcagaaga ggagagtgga attccatgtg tagcggtgaa atgcgcagag

661 atatggagga acaccagtgg cgaaggcggc tctctggtct gcaactgacg ctgatgtgcg

721 aaagcgtggg gatcaaacag gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgagtg

781 ctaagtgtta ggggggtttcc gccccttagt gctgcagcaa acgcattaag cactccgcct

841 ggggagtacg gccgcaaggc tgaaactcaa aggaattgac ggggacccgc acaagcggtg

901 gagcatgtgg tttaattcga agcaacgcga agaaccttac caaatcttga catcctctga

961 ccgccatgga gacatggctt ccctttttggg cagagtgaca ggtggtgcat ggttgtcgtc

1021 agctcgtgtc gtgagatgtt gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt atcattagtt

1081 gccagcattc agttgggcac tctaatgaga ctgccggtga caaaccggag gaaggtgggg

1141 atgacgtcaa atcatcatgc cccttatgat ttgggctaca cacgtgctac aatggacagg

1201 ttacaaaggg cagctacgcc gcgaggccaa gcgaatccca taaaactgtt ctcagttcgg

1261 attggagtct gcaactcgac tccatgaagc tggaatcgct agtaatcgtg gatcagaatg

1321 ccacggtgaa tacgttcccg ggtcttgtac acaccgcccg tcacaccacg gaagtcggta

1381 acacctgaag ccggtgggcc aacctttatg gaggcagccg tcgaaggtgg gaccgatgac

1441 tggggtgaag tcgtaacaag gtagccgtat cggaaggtgc ggctggatca ctccttaagg

1501 ggg

Strain DS26-2 (AB193815)

1 ggggctacca tgcagtcgag cggtacaggt ccagcttgct ggatgctgac gagcggcgga

61 cgggtgagta tgcataggaa tctacccagt cgtgggggat aacctgggga aacccaggct

121 aataccgcat acgtcctacg ggaagaaagc gggggctctt cggacctcgc gcgattggat

181 gagcctatgt cggattagct ggttggtggg gtaacggctc accaaggcga cgatccgtag

241 ctggtctgag aggatgatca gccacactgg gactgagaca cggcccagac tcctacggga

301 ggcagcagtg gggaatattg gacaatgggc gaaagcctga tccagccatg ccgcgtgtgt

361 gaagaaggct ttcgggttgt aaagcacttt cagtggggaa agaaggcttg tcggccaata

421 cccggcaaga gcgacatcac ccacagaaga agcaccggct aactccgtgc cagcagccgc

481 ggtaatacgg agggtgcaag cgttaatcgg aattactggg cgtaaagcgc gcgtaggcgg

541 cttgtcacgc cgggtgtgaa agccccgggc tcaacctggg aacggcatcc ggaacgggca

601 ggctagagtg caggagagga aggtagaatt cccggtgtag cggtgaaatg cgtagagatc

661 gggaggaata ccagtggcga aggcggcctt ctggactgac actgacgctg aggtgcgaaa

721 gcgtgggtag caaacaggat tagataccct ggtagtccac gccgtaaacg atgtcnacta

781 gccgttgggt ccttgnagga nttagtggcg cagttacgcg atagtcgacc gcctggggag

841 tacggccgca aggttaaaac tcaaatgaat tgacgggggc ccgcacaagc ggtggagcat

901 gtggtttaat tcgatgcaac gcgaagaacc ttacctaccc ttgacatcct gcgaacccgg

961 aagagattcc ggggtgcctt cgggagcgca gagacaggtg ctgcatggct gtcgtcagct

1021 cgtgttgtga aatgttgggt taagtcccgt aacgagcgca acccttgtcc ctatttgcca

1081 gcgattcggt cgggaactct agggnaantg ccggtganaa accggaggnt tgtggggacg

1141 acgtcagtca tcatggccct tacgggtagg gctacacacg tgctacaatg gccggtacaa

1201 agggttgcga agccgcgagg tgaagccaat cccagaaagc cggcctcagt ccggattgga

1261 gtctgcaact cgactccatg aagtcggaat cgctagtaat cgtgcatcag aatggcacgg

1321 tgaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac catgggagtg gactgcacca

1381 gaagtggtta gcctaacttc ggagggcgat caccacggtg tggttcatga ctggggtgaa

1441 gtcgtaacaa ggtaacca

Strain DS2-5 (AB284264) =HDS2-5

1 tccgatttag ccatgctagt tgtgcgggtt tagacccgca gcggaaagct cagtaacacg

61 tggccaagct accctgtgga cgggaatact ctcgggaaac tgaggctaat ccccgataac

121 gctttgctcc tggaaggggc aaagccggaa acgctccggc gccacaggat gcggctgcgg

181 tcgattaggt agacggtggg gtaacggccc accgtgccca taatcggtac gggttgtgag

241 agcaagagcc cggagacgga atctgagaca agattccggg ccctacgggg cgcagcaggc

301 gcgaaacctt tacactgtac gaaagtgcga taaggggact ccgagtgtga aggcatagag

361 ccttcacttt tgtacaccgt aaggtggtgc acgaataaga ctgggcaaga ccgtgccagc

421 cgccgcggta ataccggcag tccgagtgat ggccgatctt atgggcctaa gcgtccgtaa

481 actggctgaa caagtccgtt gggaaatctg tccgcttaac gggcaggcgt ccagcggaaa

541 ctgttcagct tgggaccgga agacctgagg ggtacgtctg gggtaggagt gaaatcctgt

601 aatcctggac ggaccgccgg tggcgaaagc gcctcaggag aacggatccg acagtgaggg

661 acgaaagcta gggtctcgaa ccggattaga tacccgggta gtcctagctg taaacgatgt

721 ccgctaggtg tggcgcaggc tacgagcctg cgctgtgccg tagggaagcc gagaagcgga

781 ccgcctggga agtacgtctg caaggatgaa acttaaagga attggcgggg gagcactaca

841 accggaggag cctgcggttt aattggactc aaacgccgga catcttcacc agccccgaca

901 gtagtaatga cggttcaggt tgatgacctt acccgaggct actgagagga ggtgcatggc

961 cgccgtcagc tctgtaccgt gaggcgtcct gttaagtcag gcaacgagcg agacccgcac

1021 tcctaattgc cagcagtacc ctttgggtag ctgggtacat taggtggact gccgctgcca

1081 aagcggagga aggaacgggc aacggtaggt cagtatgccc cgaatgggct gggcaacacg

1141 cgggctacaa tggtcgagac aatgggaagc cactccgaga ggaggcgcta atctcctaaa

1201 ctcgatcgta gttcggattg agggctgaaa ctcgccctca tgaagctgga ttcggtagta

1261 atcgcgtgtc agcagcgcgc ggtgaatacg tccctgctcc ttgcacacac cgcccgtcaa

1321 atcacccgag tggggttcgg atgaggccgg catgcactgg tcaaactggg ctccgcaagg

1381 gg

Strain RF6 (AB284265) = HRF6

1 ctgccggagg ctattgctat cgggatccga ttcagtcatg ctagtcgcac gggctcagac

61 ccgtggcgaa tagctccgta acacgtggtc aaactaccct ctggaccggg acaccctcgg

121 gaaactgagg ctaatcctag atactgcttt catgttggaa tacagaaagc cggaaatggt

181 ccgccgccgg aggacgtgac tgcggccgat taggtagacg gtggggtaac ggcccaccgt

241 gccgataatc ggtacgggtt gtgagagcaa gaacccggag acggactctg agacaagagt

301 ccgggcccta cggggcgcag cagacgcgaa acctttacac tgcacgacag tgcgataagg

361 ggatcccgag tgcgagggca tacagtcctc gcttttcgtg accgtaaggt ggtctcagaa

421 taagggctgg ctaagaccgg tgccagccgc cgcggtaata ccggcagcca gagtgatagc

481 cactcttatt ggctaaagcg tccgtagctg gccgaacggg tccgtcggga aatccacacg

541 ctcaacgggt gggcgtccgg cggaaaccag tcggcttggg accggaggac ctgcggggta

601 cgtccggggt aggagtgaaa tcctgtaatc ccggacggac cgccggtggc gaaagcgccg

661 caggaggacg gatccgacag tgagggacga aagcttgggt ctcgaaccgg attagatacc

721 cgggtagtcc aagccgtaaa cgatgctcgc taggtgtggc gcaggctacg agcctgcgct

781 gtgccgtagg gaagccgaga agcgagccgc ctgggaagta cgtccgcaag gatgaaactt

841 aaaggaattg gcgggggagc actacaaccg gaggagcctg cggtttaatt ggactcaacg

901 ccggacatct caccggcacc gacaatgtgc agtgacggtc agtgtgatga gctacctgag

961 ccatgagagg aggtgcatgg ccgccgtcag ctcgtaccgt gaggcgtcct gttaagtcag

1021 gcaacgagcg agacccgcat ccctaattgc cagcaacacc catgtggtgg ttgggtacat

1081 tagggagact gccgctgcca aagcggagga aggaacgggc aacggtaggt cagtatgccc

1141 cgaatgtgcc gggctacacg cgggctacaa tggccgagac agtgggacgc taccccgaga

1201 ggggacgcta atctcctaac ctcggtcgta gttcggattg cgggttgaaa cccacccgca

1261 tgaagctgga ttcggtagta atcgcatttc agaagagtgc ggtgaatacg tccctgcttc

1321 cttgcacaca ccgcccgtca aagcacccga gtgaggtccg gatgaggtcg acgcaa

Strain DB5-2 (AB220647)

1 attccggttg atcctgccgg aggcgattgc tatcgaagtc cgattcaccc atgctagttg

61 tacgggttta gacccgtagc aaatagctcc gtaacacgtg gtcaaactac cctctggacc

121 gggataccct cgggaaactg aggccaatcc cagatactgc tttcatgttg gaatacagaa

181 agtcggaaac ggtccgccgc cggaggacgt gactgcggcc gattaggtag acggtggggt

241 aacggcccac cgtgccgata atcggtacgg gttgtgagag caagaacccg gagacggtat

301 ttgagacaag ataccgggcc ctacggggcg cagcaggcgc gaaaccttta cactgcacgc

361 cagtgcgata aggggacccc gagtgcgagg gcatacagtc ctcgcttttc gtgaccgtaa

421 gaaggtctca gaataagagc tgggcaagac cggtgccagc cgccgcggta ataccggcag

481 ctcgagtgat agccactatt attgggccta aagcgtccgt agccggccga acgggtccgt

541 cgggaaatcc acccgctcaa caggtggacg tccggcggaa accagtcggc ttggggccgg

601 gagaccagaa aggtacgtcc ggggtaggag tgaaatcccg taatcctgga cggaccgccg

661 gtagcgaaag cgtctctgga gaacggaccc gacggtgagg gacgaaagct tgggtctcga

721 accggattag atacccgggt agtccaagct gtaaacgatg ctcgctaggt gtggcgttgg

781 ctacgagcca gcgctgtgcc gtagggaagc cgagaagcga gccgcctggg aagtacgtcc

841 gcaaggatga aacttaaagg aattggcggg ggagcactac aaccggagga gcctgcggtt

901 taattggact caacgccgga catctcaccg gcaccgacag tgtgcagtga cagtcagtct

961 gatgggctta cttgagccac tgagaggagg tgcatggccg ccgtcaactc gtaccgtgag

1021 gcgtcctgtt aagtcaggca acgagcgaga cccgcgtcct taattgccag cagcagcctt

1081 gtgctggctg ggtacattaa ggagactgcc gtcgctaaga cggaggaagg aacgggcaac

1141 ggtaggtcag tatgccccga atgtgccggg cgacacgcgg gctacaatgg ccgagacagt

1201 gggacgctac cccgagaggg ggcgctaatc tcctaacctc ggtcgtagtt cggattgcgg

1261 gttgaaaccc acccgcatga agctggattc ggtagtaatc gcatttcaga agagtgcggt

1321 gaatacgtcc ctgctccttg cacacaccgc ccgtcaaatc acccgagtga ggtccggatg

1381 aggc