ศักยภาพของแบคทีเรียทนเค็ม และ แบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง ทางเทคโนโลยีชีวภาพ

Potential of Halotolerant and Moderate Halophilic Bacteria for Biotechnology

ศิริลักษณ์ นามวงษ์*

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา

Sirilak Namwong*

Department of Biotechnology, Faculty of Sciences and Technology, Suan Sunandha Rajabhat University

บทคัดย่อ

แบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางเจริญเติบโตในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือ มีประสิทธิภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในด้านเทคโนโลยีชีวภาพได้หลากหลาย ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและด้านเอนไซม์เทคโนโลยี ใช้ Compatible solutes เช่น ectoine และ hydroxyectoine เป็นสารให้ความเสถียรต่อสารชีวโมเลกุล และ สารลดสภาวะเครียดของเซลล์ สำหรับเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียชอบเค็ม เช่น ไฮดานโตอิเนส อะกาเลส และ โปรติเอส และอื่นๆ ที่สามารถแสดงกิจกรรม และ มีความเสถียรในสภาวะที่มีเกลือ รวมทั้งเซลล์ของแบคทีเรียชอบเค็ม มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การผลิตอาหารหมัก และการผลิตสารให้กลิ่นรส สำหรับด้านสิ่งแวดล้อม แบคทีเรียชอบเค็มสามารถย่อยสลายสารมลพิษอินทรีย์ และ สามารถผลิตพอลีเมอร์ชีวภาพ เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพและพอลีแซคคาร์ไรด์

คำสำคัญ : แบคทีเรียทนเค็ม แบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง เครื่องสำอาง อาหาร

Abstract

Halotolerant and moderate halophilic bacteria occured to thrive in saline environments, have found a number of applications in various fields of biotechnology. In cosmetic industry and enzyme technology, compatible solutes i.e., ectoine and hydroxyectoine, are used as stabilizers of biomolecule and stress-protective agent. Their enzymes, hydantoinase, agarase, protease and so on, that are active and stable in the presence of salt contents and also halophilic cells play an essential role in food biotechnology such as production of fermented food and flavoring agents. The degradation and transformation of organic pollutants and production of biopolymers for example, biosurfactant and polysaccharides are environmental application of halophiles.

Keyword : Halotolerant, Moderate halophilic bacteria, cosmetic, food

* E-mail: sirilak.na@ssru.ac.th

บทนำ

สิ่งแวดล้อมที่มีเกลือ เช่น ทะเลสาบน้ำเค็ม (salt lake) ทะเลสาบน้ำเค็มที่มีพีเอชเป็นด่าง (soda lake) ดินเค็ม (salterns) และ อาหารหมัก (fermented food) เป็นแหล่งที่มีการค้นพบการเจริญของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง (Moderate halophilic bacteria) สามารถเจริญได้ในสภาวะที่เกลือสูงและต่ำ (0.5-30%, w/v) และ เจริญได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้มของเกลือ 5-15% (w/v) และแบคทีเรียทนเค็ม (Halotolerant) สามารถเจริญได้ดีที่สุดในสภาวะที่ไม่มีเกลือและเจริญได้ในช่วงความเข้มข้นของเกลือ 0-15% (w/v) (Oren, 2006; Galinski & Tindall, 1992; Oren, 1999; Kushner, 1978; Namwong *et al*., 2005; Margesin & Schinner, 2001) ถึงแม้ว่าแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสามารถเจริญในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือ พบว่าภายในเซลล์ของแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางมีปริมาณความเข้มข้นของไอออนของเกลือต่ำ (Na^+ และ K^+) เช่น *Halomonas elongata* เจริญในอาหารที่มีเกลือ 22% (w/v) พบว่าภายในเซลล์มีปริมาณ Na^+ และ K^+ ประมาณ 3.5% (w/v) และ 0.1% (w/v) ตามลำดับ ดังนั้นแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางปรับสมดุลของสารละลายภายในเซลล์กับภายนอกเซลล์โดยการเพิ่มปริมาณของ Compatible solutes เช่น น้ำตาล (กลูโคส) กรดอะมิโน (กรดกลูตามิค อะลานีน และ โพรลีน), Glycine betaine, Hydroxyectoine และ Ectoine การเพิ่มความเข้มข้นของ Compatible solutes ไม่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ เนื่องจากเป็นสารที่ละลายน้ำได้ดีและไม่มีผลต่อการแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ภายในเซลล์ (Galinski, 1995) สืบเนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์ต่ำ ทำให้เอนไซม์ที่พบภายในเซลล์ (Intracellular enzymes) แสดงกิจกรรมได้ในสภาวะที่มีเกลือต่ำและมีสาร Compatible solutes สำหรับเอนไซม์ที่ถูกสร้างและส่งออกนอกเซลล์ (Extracellular enzymes) สามารถแสดงกิจกรรมได้ในสภาวะที่มีเกลือและไม่มีเกลือ เช่น *Halobacillus* sp. SR5-3 ที่ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเกลือ 10% (w/v) จะสร้างเอนไซม์โปรติเอสที่สามารถแสดงกิจกรรมได้ที่ความเข้มข้นของเกลือ 0-30% (w/v) (Oren, 2002; Ventosa & Neito, 1995; Namwong *et al*., 2006)

บทความฉบับนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อรวบรวมเนื้อหาเกี่ยวข้องกับการผลิตผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง เช่น Compatible solutes (Ectoine และ Hydroxyectoine) เอนไซม์ (Hydantoinase, Agarase และ Protease) และพอลีเมอร์ชีวภาพ (สารลดแรงตึงผิวชีวภาพและพอลีแซคคาร์ไรด์) และการนำไปประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพ

การผลิตเอนไซม์ (Production of enzymes)

แบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสามารถสร้างเอนไซม์ที่แสดงกิจกรรมได้ดีที่สุดในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 จึงนำเอนไซม์ดังกล่าวไปใช้ประโยชน์ดังต่อไปนี้

1. การผลิตสารตัวกลาง (Intermediate) สำหรับผลิต D-amino acid เช่น p-hydroxyphenylglycine และ D-phenylglycine ซึ่งใช้สำหรับเป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตยา เช่น aspoxicillin ใช้ขจัดแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในหลอดลม ขั้นตอนการผลิต D-amino acid แสดงดังภาพที่ 1 โดยมี DL-5-substituted hydantoins เป็นสารตั้งต้นและใช้เอนไซม์ไฮดานโตอิเนส (Hydantoinase) ทำหน้าที่เปลี่ยน DL-5-substituted hydantoins ไปเป็น D(-)-N-carbamoylamino acid และขั้นตอนสุดท้ายเป็นการเปลี่ยน D(-)-N-carbamoylamino acid ไปเป็น D-amino acid โดยเอนไซม์คาร์บามอยเลส (Carbamoylase) หรือ วิธีทางเคมี โดยพบว่าแบคทีเรียทนเค็ม *Pseudomonas* sp. NCIM 5109 ซึ่งเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของเกลือ 2% (w/v) และเป็นแบคทีเรียทนเค็มชนิดแรกที่มีการรายงานการผลิตเอนไซม์ไฮดานโตอิเนส (จัดอยู่ในกลุ่ม Intracellular enzyme) โดยสภาวะที่ทำให้เอนไซม์ไฮดานโตอิเนสแสดงกิจกรรมได้ดีที่สุด คือ pH 9.0-9.5 และ 30°C ดังนั้นจึงใช้สภาวะที่เอนไซม์ที่ทำงานดีที่สุดสำหรับศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการเปลี่ยน DL-5-substituted hydantoins ไปเป็น D(-)-N-carbamoylamino acid ภายใต้สภาวะที่เป็นด่างเอนไซม์ไฮดานโตอิเนสเปลี่ยน 80g ของ DL-5-phenylhydantoin/L (จัดเป็น DL-5-substituted hydantoins) ไปเป็น 82g ของ D(-)-N-carbamoylphenylglycine/L ในเวลา 24 ชั่วโมง (93% yield) และ D(-)-N- carbamoylphenylglycine (จัดเป็น D(-)-N-carbamoylamino acid) ถูกเปลี่ยนเป็น D(-)-phenylglycine (D-amino acid) ได้ 80% ด้วยวิธีทางเคมี จากการใช้เอนไซม์และปฏิกิริยาเคมีในการสังเคราะห์ทำให้สามารถเปลี่ยน DL-5-phenylhydantoin ไปเป็น D(-)-phenylglycine ได้มากถึง 65%-68% (Sudge *et al*., 1998; Kalkote *et al*., 1994)

2. การผลิตน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลโอลิโก (neoagarobiose, neoagarotetraose และ neogarohexaose)

โดยใช้เอนไซม์อะกาเลส (Agarase) จากแบคทีเรียทนเค็ม *Alteromonase* sp. ATCC 43961 ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลายวุ้น (Agar-degrading bacteria)] ย่อยสลายวุ้นทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ ข้างต้น (Stosz *et al*., 1995)

3. การผลิตสารให้กลิ่นรส (Flavoring agent) เช่น 5'-guanylic acid (5'-GMP) และ 5'-inosinic acid โดยใช้นิวคลีเอส เอช (Nuclease H) จากแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง *Micrococcus varians* supsp. *halophilus* สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแสดงกิจกรรมของเอนไซม์นิวคลีเอส เอช (Nuclease H) เพื่อย่อยสลาย RNA จนเกิดเป็นสารให้กลิ่นรส คือ 60°C และเกลือ 12% (w/v) (Kamekura *et al*.,1982)

จากการที่เอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสามารถแสดงกิจกรรมได้ในสภาวะที่มีเกลือและไม่มีเกลือ จึงทำให้สามารถนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ได้หลากหลายดังแสดงข้างต้น ดังนั้นเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียชอบเค็มจึงเป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจสำหรับอุตสาหกรรม

การผลิตอาหารหมัก (Production of Fermented food)

อาหารหมัก (Fermented Food) ผลิตโดยนำวัตถุดิบมาผสมกับเกลือจัดเป็นการถนอมอาหารวิธีที่สะดวก มีต้นทุนต่ำและไม่ต้องใช้เทคนิคที่ซับซ้อน เนื่องจากอาหารหมักเป็นอาหารพื้นบ้าน

DL-5-substituted hydantoins

⇩ D-specific hydantoinase

D(-)N-carbamoylamino acid

⇩ Carbamoylase, วิธีทางเคมี

D-amino acids

ภาพที่ 1 ขั้นตอนการสังเคราะห์ D-amino acids (Sudge *et al*., 1998)

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของเกลือที่ทำให้เอนไซม์จากแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางแสดงกิจกรรมได้ดีที่สุด

Enzyme	Microorganism	NaCl for optimal activity	References
Amylase	*Micrococcus* sp.	5.85%	Khire, 1994
	Halomonas meridiana	10%	Coronado *et al*., 2000
Nuclease H	*Micrococcus varians subsp. halophilus*	17%	Kamekura *et al*., 1978
	Micrococcus varians supsp. halophilus	12%	Kamakura *et al*.,1982
	Bacillus halophilus	8.2-18.7%	Onishi *et al*., 1983
Lipase	*Marinobacter lipolyticus*	ND	Martín *et al*., 2003
Protease	*Filobabacillus* sp. RF2-5	15-25%	Hiraga *et al*., 2005
	Halobacillus sp. SR5-3	20-25%	Namwong *et al*., 2006
Hydantoinase	*Pseudomonas* sp ATCC 55940	ND*	Joshi *et al*., 2000
	Pseudomonas sp NCIM 5109	0%	Sudge *et al*., 1998
Agarase	*Alteromonas* sp.	ND*	Stosz *et al*.,1995

* ND = no data

ของแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และมีเกลือเป็นองค์ประกอบหลัก จึงทำให้มีการศึกษาบทบาทของแบคทีเรียชอบเค็มต่อคุณภาพของอาหารหมัก โดยพบว่าแบคทีเรียชอบเค็มมีความเกี่ยวข้องกับการผลิตอาหารหมัก เช่น Nakazuke (ผักดองของญี่ปุ่น) ที่มีการนำผักผสมกับเกลือ 10-15% (w/v) พบมีการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทนเค็มรูปร่างกลมประมาณ 10^2-10^7 เซลล์ต่อกรัม ซึ่งทำหน้าที่สร้างกรดแลคติกทำให้อาหารมีรสเปรี้ยว (Kuda *et al*., 2001) สำหรับน้ำปลา ระหว่างการหมักพบการย่อยสลายโปรตีนจากเนื้อปลาซึ่งเกิดจากกิจรรมของเอนไซม์จากระบบย่อยอาหารของปลา (15% ของเอนไซม์โปรติเนสทั้งหมดพบในกากปลา) และจากจุลินทรีย์ (85% ของเอนไซม์โปรติเนสทั้งหมดพบในส่วนน้ำที่อยู่ด้านบนเนื้อปลา) โดยที่กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสที่พบในกากปลาถูกยับยั้งโดยเกลือ ในทางตรงกันข้ามเอนไซม์โปรติเนสจากจุลินทรีย์สามารถแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ได้ตลอดระยะเวลาการหมัก (Thongthai *et al*., 1990) จึงทำให้พบแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางหลายสายพันธุ์ในบ่อหมักน้ำปลา เช่น *Filobacillus* sp. RF2-5, *Halobacillus* sp. SR5-3, *Staphylococcus* sp. 1-15, *Virgibacillus* sp. SK33 และ *Virgibacillus* sp. SK37 ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเนสปริมาณสูงเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีแหล่งโปรตีนและกรดอะมิโน (Hiraga *et al*., 2005; Namwong *et al*., 2006; Yongsawatdigul *et al*., 2007) จากข้อมูลการศึกษาข้างต้นทำให้เกิดสมมุติฐานที่ว่าแบคทีเรียชอบเค็มน่าจะมีบทบาทต่อการย่อยสลายโปรตีนจากเนื้อปลาและเมื่อเติมหัวเชื้อแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสในระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาน่าจะทำให้ระยะเวลาการหมักน้ำปลาลดลง

ในปี 2007 มีการรายงานประสิทธิภาพของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางร่วมกับเอนไซม์ทางการค้าในการลดระยะเวลาการหมักน้ำปลา แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่เลือกใช้ถูกคัดแยกจากน้ำปลาจากบ่อหมักที่มีอายุ 1 เดือน และมีความสามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ดี หลังจากการหมักน้ำปลา 4 เดือน พบว่าปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด (8.5-9.5 g/100 ml) ปริมาณสารประกอบที่ให้กลิ่น [2-methylbutanal (0.13-0.23 ng/ml), 2-propanone (0.9-1.1 ng/ml) n-propanal (0.04-0.07 ng/ml) butanoic acid (0.033-0.15 ng/ml)] และ ปริมาณกรดอะมิโน [กรดกลูตามิก (1.8-1.9 g/100ml) กรดแอสปาร์ติก (1g/100ml) และ ไลซีน (0.9-0.96 g/100ml)] ใกล้เคียงกับองค์ประกอบทางเคมีของน้ำปลาที่หมักนาน 12-18 เดือน สำหรับปริมาณฮีสตามีนตรวจพบในระดับต่ำกว่าข้อกำหนดของมาตราฐานของน้ำปลาไทย รวมทั้งคุณภาพน้ำปลาโดยรวม (overall acceptance) อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (Yongsawatdigul *et al*., 2007) จากการประสบความสำเร็จในการศึกษาศักยภาพของแบคทีเรียชอบเค็มในการย่อยสลายโปรตีนจากเนื้อปลาระหว่างกระบวนการหมักน้ำปลาจนกระทั่งได้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพดีใกล้เคียงกับน้ำปลาที่หมักด้วยวิธีดั้งเดิมในระดับห้องปฏิบัติการ ในอนาคตคาดว่าน่าจะมีการศึกษาการลดระยะเวลาการหมักน้ำปลาในโรงงานต้นแบบและในโรงงานผลิตน้ำปลา เพื่อเพิ่มศักยภาพในการผลิตน้ำปลาโดยใช้ต้นทุนต่ำ

การกำจัดมลพิษในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือ (Decontamination of saline environments)

1. การย่อยสลายสารอินทรีย์

ในสิ่งแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนด้วยสารอินทรีย์จากโรงงานอุตสาหกรรมมักมีเกลือเป็นองค์ประกอบ จึงทำให้สารอินทรีย์ไม่ถูกกำจัดได้อย่างสมบูรณ์โดยแบคทีเรียทั่วไป (Woolard & Irvine, 1995) ดังนั้นแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง ซึ่งสามารถเจริญได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือและสามารถเปลี่ยนสารตกค้างในน้ำเสียไปเป็นแหล่งพลังงานเหมาะสำหรับนำมาใช้สำหรับการย่อยสลายสารอินทรีย์ดังกล่าว เช่น การกำจัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตผักดองในประเทศญี่ปุ่นซึ่งมีเกลือประมาณ 15% (w/v) โดยพบว่าจุลินทรีย์ที่มีส่วนช่วยในการบำบัดน้ำเสีย คือแบคทีเรียทนเค็ม 2 ชนิด คือ *Staphylococcus* sp. และ *Bacillus cereus* ซึ่งสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือ 0-20% (w/v) และเจริญได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของเกลือ 0-10% (w/v) (Kubo *et al*., 2001)

2. การกำจัดโลหะหนัก

ในปัจจุบันมีการสะสมของโลหะหนักในสิ่งแวดล้อมเพิ่มขึ้นทุกๆ ปี จึงทำให้เพิ่มความเสี่ยงในการได้รับโลหะหนักเข้าสู่ร่างกาย เมื่อโลหะหนักสะสมในร่างกายจะทำให้มีอาการดังต่อไปนี้ เช่น ปวดหัว ความดันเลือดสูง ไตไม่ทำงาน รวมทั้งทำให้เพิ่มโอกาสในการเป็นโรคมะเร็ง (Ghazvini & Mashkani, 2009) ดังนั้นจึงมีการศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางในการกำจัดโลหะหนัก (Bioremediation of heavy metals) ในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือและไม่มีเกลือ เนื่องจากแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสามารถเจริญในสภาวะที่มีโลหะหนัก เช่น ตะกั่ว แคดเมียม ทองแดง โครเมียม ซีลีเนียม เวเนเดียม และ สังกะสี (Nieto *et al*., 1989) ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียชอบเค็มสกุล *Halomonas* ซึ่งสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีซีลีเนต (ความเข้มข้น

2M) และ เกลือ [30% (w/v)] ที่คัดแยกจากแหล่งน้ำจากหมู่บ้าน San Joaquin รัฐ California ซึ่งแหล่งน้ำดังกล่าวมีซีลีเนตปะปนในระดับความเข้มข้นที่ทำให้ปลาและสัตว์ปีกเสียชีวิต แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสามารถเปลี่ยนซีลีเนตไปเป็นสารไม่มีพิษ คือ Dimethylselenite โดยมีอัตราการเปลี่ยนซีลีเนตไปเป็นสารไม่มีพิษ เท่ากับ 1.65 mg ต่อชั่วโมง (D'Souza *et al*., 2001) สำหรับเวเนเดียม เมื่อปะปนในสิ่งแวดล้อมมากกว่า 50 µg/L มีผลทำให้เกิดการผิดปกติทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต แต่การกำจัดเวเนเดียมพบกับปัญหา คือ ระบบบำบัดไม่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเวเนเดียมจากสิ่งแวดล้อม จึงทำให้เกิดการพัฒนาระบบการกำจัดเวเนเดียมโดยใช้เซลล์ตรึงรูปของ *Halomonas* sp. GT-83 เป็นตัวดูดซับ โดยเติมเซลล์ตรึงรูปในสารละลายเวเนเดียมที่ความเข้มข้น (0.025-0.6 µg/L) เซลล์ตรึงรูปสามารถดูดซับเวเนเดียมได้มากถึง 52.7 mg/g ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ภายในเวลา 2 ชั่วโมง ประสิทธิภาพการดูดซับได้มากกว่า 84% เมื่อมีสารละลายเวเนเดียมความเข้มข้น 0.1 µg/L (มีเกลือตั้งแต่ 0-5%, w/v) และประสิทธิภาพการดูดซับจะค่อยๆ ลดลงเหลือ 50% ที่ความเข้มข้น 0.6 µg/L (Ghazvini & Mashkani, 2009) นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียชอบเค็มที่คัดแยกจากเหมืองบริเวณ Dead sea (ไม่ได้ทำการจัดจำแนกระดับสกุล) สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของเกลือ 5-12% (w/v) มีความสามารถในการดูดซับตะกั่วได้ 84% เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีตะกั่วความเข้มข้น 500 ppm นาน 2 สัปดาห์ และการดูดซับแคดเมียม 90% เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแคดเมี่ยมความเข้มข้น 500 ppm นาน 3 สัปดาห์ (Massadeh *et al*.,2005)

3. การลดปริมาณของยาปราบศัตรูพืช

Dichlorvos (DDVP, 2,2-dichlorovynil dimethyl phosphate) จัดเป็นสารในกลุ่ม organophosphorous ซึ่งใช้เป็นยาปราบศรัตรูพืชเนื่องจากละลายน้ำได้ดี (16 mg/ml ที่ 25°C) DDVP เป็นสารพิษที่ยับยั้งการทำงานเอนไซม์ในระบบประสาท คือ Acetylcholine esterase ของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและ ไม่มีกระดูกสันหลัง และ DDVP สามารถเข้าสู่ร่างกายโดยการสูดดมและสัมผัสทางผิวหนัง ในปี 2007 Oncescu *et al*. พบแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสกุล *Halomonas* สามารถเจริญเติบโตได้ที่ความเข้มข้นเกลือ 2.3-17.5% (w/v) และ DDVP ความเข้มข้น 0.027-0.033 g/ml ระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางกับ DDVP พบว่าปริมาณของ DDVP ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงไปมาก เนื่องจากแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสะสม DDVP ไว้ภายในเซลล์ จึงทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโตลดต่ำลง โดยคาดว่าแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางอาจจะเก็บสะสม DDVP ไว้ที่โซโตพลาสซึมหรือเซลล์เมมเบรน ดังนั้นแนวทางในการนำแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางไปใช้เป็นตัวดูดซับยาปราบศัตรูพืชคล้ายกับการกำจัดโลหะหนักคือใช้ระบบบำบัดที่มีเซลล์ตรึงรูปของ *Halomonas* เนื่องจากเซลล์ตรึงรูปมีคุณสมบัติที่ไม่ละลายน้ำ ทำให้สะดวกในการแยกเซลล์ตรึงรูปของแบคทีเรียชอบเค็มที่มียาปราบศัตรูพืชสะสมภายในเซลล์ออกจากระบบบำบัด ทดแทนการใช้เซลล์อิสระซึ่งขนาดเล็กจึงทำให้ไม่สามารถแยกเซลล์ออกจากระบบบำบัด หลังจากแยกเซลล์ตรึงรูปออกจากระบบบำบัดนำเซลล์ตรึงรูปสู่ขั้นตอนการกำจัดสาร DDVP ต่อไป(Ghazvini & Mashkani, 2009)

เนื่องจากการสะสมของโลหะหนัก ยาปราบศัตตูพืช และสารอินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมทำให้ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของประชากรที่อาศัยอยู่รอบๆบริเวณดังกล่าว ดังนั้นการค้นพบแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางที่สามารถสะสมยาปราบศรัตรูพืชและละสมโลหะหนักไว้ภายในเซลล์ทั้งในสิ่งแวดล้อมที่มีและไม่มีเกลือ รวมทั้งสามารถย่อยสลายสารอินทรีย์จากโรงงานอุตสาหกรรมเพื่อเปลี่ยนเป็นแหล่งพลังงงาน จัดเป็นคุณสมบัติพี่พึงประสงค์สำหรับการนำแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียชอบเค็มไปใช้ในการลดมลพิษที่สะสมในสิ่งแวดล้อม

การผลิต Compatible solutes (Production of Compatible solutes)

แบคทีเรียชอบเค็มสามารถผลิต Compatible solutes เช่น Ectoine และ Glycine betaine เพื่อปรับสมดุลของสารละลายภายในเซลล์กับภายนอกเซลล์ โดย Compatible solutes มีคุณสมบัติเป็น Stress protectants หมายถึงสารป้องกันเซลล์ได้รับอันตรายจากสภาวะที่มีเกลือสูง ความร้อน ความเย็น และ รังสี รวมทั้งเป็นสารที่ทำหน้าที่รักษาความเสถียรให้กับเอนไซม์ กรดนิวคลีอิก และ เยื่อหุ้มเซลล์ (Galinski & Lippert, 1991; Lippert & Galinski, 1992; Louis *et al*., 1994) สำหรับในอุตสาหกรรมใช้ Ectoine เป็นองค์ประกอบของเครื่องสำอาง (Ectoine ทำหน้าที่เป็นสารป้องกันผิวเหี่ยวย่น ผิวแห้ง และ ป้องกันรังสี UV) และผลิตภัณฑ์ยา สำหรับในด้านเอนไซม์เทคโนโลยี ใช้ Glycine betaine เป็นสารให้ความเสถียรในปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase chain reaction) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Banat *et al*., 2000; Galinski, 1995; Ono *et al*., 1998; Toyoda *et al*.,1997)

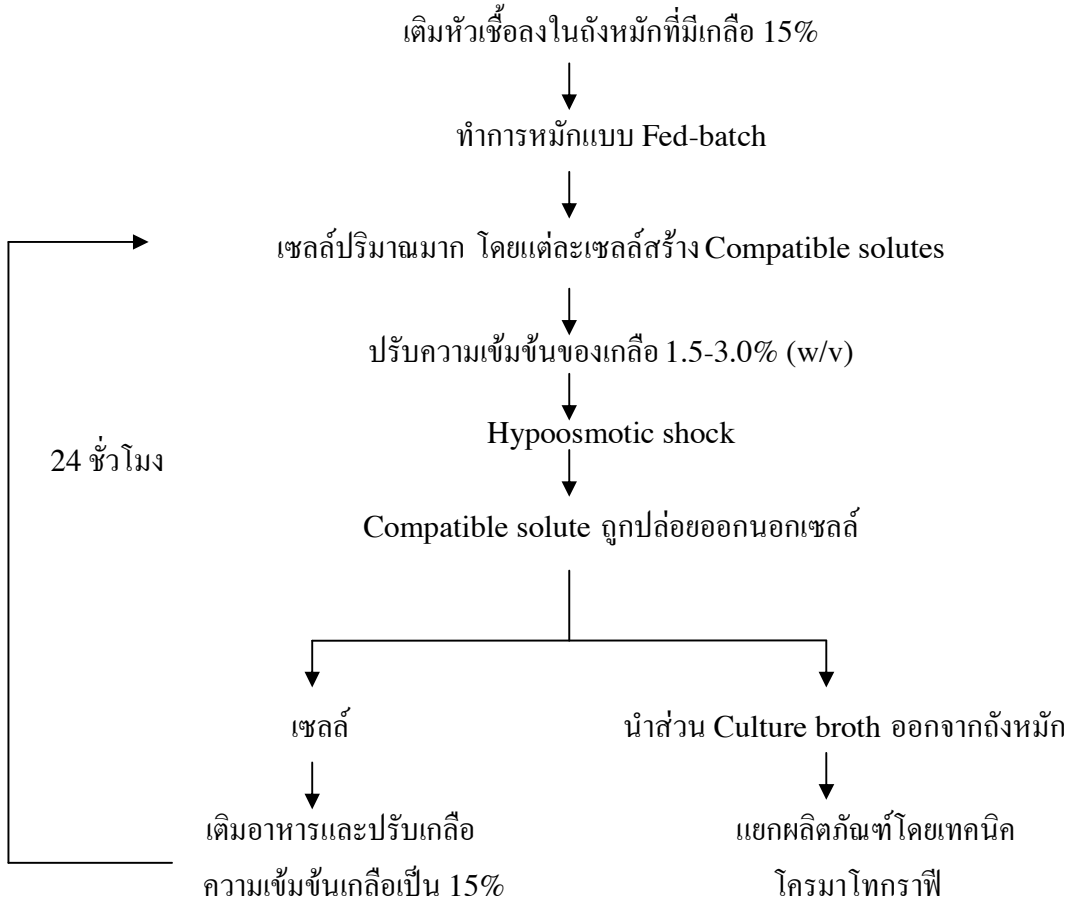
แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสองสายพันธ์ที่สามารถผลิต Compatible solutes ได้ปริมาณสูง คือ *Halomonas elongata* (ผลิต Ectoine) และ *Marinococcus* M52 (ผลิต Hydroxyectoine) โดยพบว่าCompatible solutes ที่ถูกผลิตจากแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางไม่เกิดเป็น two chiral centers หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีทั้งสารที่ต้องการและไม่ต้องการปะปน จึงทำให้นิยมใช้แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางเป็นผู้ผลิต Compatible solutes มากกว่าใช้การสังเคราะห์ทางเคมี โดยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพที่ใช้สำหรับการผลิต Compatible solutes เรียกว่า Bacterial Milking process (ภาพที่ 2) เริ่มโดยการเตรียมหัวเชื้อด้วยการหมักแบบครั้งคราว (Batch culture) สำหรับในขั้นตอนการผลิต Compatible solutes ใช้การหมักแบบกึ่งครั้งคราว (Fed-batch Fermentation) ในอาหารที่มีเกลือ 15% ขณะเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางจะผลิต Compatible solutes เพื่อปรับสมดุลของสารละลายภายในกับภายนอกเซลล์ เมื่อได้เซลล์ปริมาณเพียงพอ (48 g ของน้ำหนักเซลล์แห้ง/L) แยกเซลล์ออกจากน้ำหมักด้วยวิธีการกรอง (Crossflow filtration) ย้ายเซลล์ที่ได้ไปใส่ในถังที่มีความเข้มข้นของเกลือเพียง 3% (w/v) ทำให้เกิดสภาวะ Hypoosmotic shock แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางจะกำจัด Compatible solutes ออกจากเซลล์ เพื่อป้องกันการไหลเข้าของน้ำจนทำให้เซลล์ได้รับอันตราย ส่งผลให้ 80% ของ Compatible soulutes ถูกปลดปล่อยออกมาอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากนั้นแยกเซลล์ออกจากผลิตภัณฑ์โดยการกรอง เซลล์ที่ถูกแยกออกมาจะถูกนำกลับมาใช้เป็นผู้ผลิต Compatible solutes ในรอบถัดๆ ไป โดยนำไปใส่ในถังหมักที่มีความเข้มข้นของเกลือเป็น 15% (w/v) เพื่อกระตุ้นให้แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางเริ่มการผลิต Compatible solutes อีกครั้ง ตัวอย่างการผลิต Ectoine โดยใช้วิธี Bacterial Milking process พบว่าปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ได้ คือ 2 g ของ Ectoine ต่อลิตรต่อวัน (Sauer & Galinski, 1998) ปริมาณ Ectoine หลังจากสิ้นสุดกระบวนการผลิตได้เพียง 2 g ต่อลิตรต่อวัน อาจเนื่องมาจากยังมีสาร Compatible solutes อยู่ในเซลล์ถึง 20% เมื่อใช้วิธีการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ด้วยการละลายเซลล์ในสารละลายเกลือ 3% (w/v) ดังนั้นถ้าต้องการให้ Compatible solutes ถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์มากกว่า 80% จึงควรนำเซลล์แบคทีเรียชอบเค็มละลายในสารละลายที่มีเกลือต่ำกว่า 3% (w/v) ในปี 2010 Van-Thuoc *et al.* ได้ศึกษาความเข้มข้นของเกลือ 1.5% (w/v) ต่อการปลดปล่อย Compatible solutes โดยเพาะเลี้ยง *Halomonas boliviensis* DSM 15516^T ด้วยวิธี Bacterial Milking process [ในอาหารที่มีเกลือ 15% (w/v)] และแยกผลิตภัณฑ์โดยนำเซลล์ไปละลายในสารละลายเกลือความเข้มข้น 1.5% (w/v) ซึ่งวิธีข้างต้นสามารถผลิต Compatible solutes ได้มากกว่าวิธีของ Sauer & Galinski (1998) ประมาณ 5 เท่า หลังการเก็บเกี่ยวได้ 11.1 g ของ Ectoine ต่อลิตรต่อ วัน และ 9.1 g ของ Hydroxyectoine ต่อลิตรต่อวัน อย่างไรก็ตามการผลิต Compatible solutes จาก *Halomonas* ด้วยวิธี Bacterial Milking process และเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ด้วย Hypoosmotic shock ทำให้ได้ Compatible solutes เพียง 9-11 g ต่อลิตรต่อวัน จึงทำให้มีการศึกษาการเพิ่มการผลิต Compatible soulutes จากแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสายพันธุ์อื่นๆ เช่น *Chromohalobacter salexigens* โดยยังคงใช้วิธี Bacterial Milking process เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกและมีขั้นตอนไม่ยุ่งยาก พบว่า *Chromohalobacter salexigens* สามารถผลิต Ectoine ได้เพิ่มขึ้นถึงห้าเท่า (50.4 g ต่อลิตรต่อวัน) (Fallet *et al.*, 2010)

จากการศึษาข้างต้นแสดงให้ทราบว่าแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางมีข้อดีที่เหมาะสำหรับนำไปใช้เป็นผู้ผลิตผลิตภัณฑ์ทางอุตสาหกรรม เนื่องจากใช้ขั้นตอนการแยกผลิตภัณฑ์เช่น Compatible soulutes เพียง 1 ขั้นตอน และเมื่อปรับปรุงขั้นตอนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ก็สามารถทำให้เพิ่มปริมาณการผลิต Compatible soulutes อย่างไรก็ตามการผลิต Compatible soulutes ยังคงประสบปัญหาด้านต้นทุนการผลิตที่สูง จึงทำให้ Compatible soulutes มีราคาแพง เช่น 50mg Ectoine ราคา 15,500 บาท [≥99.0% (HPLC) (Fluka)] และ 25 mg Hydroxyectoine ราคา 4000 บาท [≥98.0% (HPLC) (Fluka)] ดังนั้นยังมีอีกหลายแนวทางที่สามารถลดต้นทุนการผลิต Compatible soulutes เพื่อให้ Compatible soulutes กลายเป็นผลิตภัณฑ์ทางอุตสาหกรรมที่สำคัญในอนาคต เช่น การเลือกใช้วัตถุดิบราคาถูกซึ่งมักเป็นส่วนที่เหลือทิ้งจากภาคการเกษตรหรือส่วนที่เหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมเป็นแหล่งคาร์บอน หรือ แหล่งไนโตรโจนทดแทนแหล่งคาร์บอน หรือ แหล่งไนโตรโจนที่มีราคาแพง

การผลิตพอลีเมอร์ชีวภาพ (Production of Biopolymer)

1. สารลดแรงตึงผิวชีวภาพ (Biosurfactant)

สารลดแรงตึงผิว (Surfactant) มีคุณสมบัติลดแรงตึงผิวของน้ำทำให้น้ำมันสามารถละลายในน้ำได้มากขึ้น จึงถูกนำไปใช้เป็นส่วนหนึ่งของการกำจัดคราบน้ำมันในทะเล แต่การใช้



ภาพที่ 2 กระบวนการผลิต Compatible solute โดยใช้วิธี Bacterial milking (Sauer & Galinski, 1998)

สารลดแรงตึงผิวซึ่งเป็นสารเคมีมักมีสารตกค้างที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต จึงทำให้มีการศึกษาการใช้จุลินทรีย์เพื่อทำหน้าที่กำจัดคราบน้ำมัน (Microbially enhanced oil recovery, MEOR) เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพซึ่งมีคุณสมสมบัติดีกว่าสารลดแรงตึงผิวเคมี คือ ย่อยสลายได้ในธรรมชาติและไม่เป็นพิษ (Margesin& Schinner, 2001) ตัวอย่างเช่น แรมโนไลพิด (Rhamnolipids) จากแบคทีเรียทนเค็ม *Rhodococcus fascians* มีประสิทธิภาพในการลดแรงตึงผิวลงเหลือ 27 mN/m (Gesheva *et al*., 2010) อย่างไรก็ตาม การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากแบคทีเรียชอบเค็มยังประสบปัญหาเรื่องต้นทุนการผลิตที่สูงกว่าการผลิตโดยการสังเคราะห์ทางเคมีประมาณ 3-10 เท่า (Ghojavand *et al*., 2008)

2. พอลีแซคคาร์ไรด์ (Polysaccharide)

สารในกลุ่มพอลีแซคคาร์ไรด์ มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว หรือ สารช่วยตกตะกอน (Bioflocculant) เช่น Polyanionic polysaccharide (V2-7) ที่ถูกผลิตจากแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง *Halomonas eurihalina* strain F2-7 โดย V2-7 ประกอบด้วย 42% ของคาร์โบไฮเดรต (น้ำตาลเฮกโซส) และ 15% ของโปรตีน จึงทำให้เพิ่มการละลายของน้ำในน้ำมัน (Emulsifying agent) และลดความหนืด (Pseudoplastic behavior) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ต้องการของอุตสาหกรรมยา อาหาร และ การผลิตผลิตภัณฑ์ที่ย่อยสลายได้ สำหรับทางการแพทย์พบว่า V2-7 สามารถกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดขาวของคน (Calvo *et al*., 1995) เช่นเดียวกับการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ต้นทุนการผลิตยังคงสูงกว่าการผลิตโดยวิธีทางเคมี จึงมีการศึกษาการลดต้นทุนการผลิตพอลีแซคคาร์ไรด์โดยการปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี Response surface methodology เพื่อให้ได้สูตรอาหารที่กระตุ้นการผลิตพอลีแซคคาร์ไรด์ได้มากที่สุด โดยการปรับความเข้มข้นของแหล่งสารอาหารที่มีผลต่อการผลิตพอลิเมอร์พร้อมกันหลายชนิดในหนึ่งการทดลอง เช่น แหล่งคาร์บอน $MgSO_4 7H_2O$ และ NH_4Cl การปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี Response surface methodology

ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตพอลีแซคคาร์ไรด์เป็น 3 เท่า (5.58 g/l) เมื่อเพาะเลี้ยง *Halomonas* sp. V3' ในอาหารที่มีกลูโคส (16.14 g/l), $MgSO_4 7H_2O$ (2.73 g/l) และ NH_4Cl (1.97 g/l) โดย *Halomonas* sp. V3' สามารถผลิตพอลีแซคคาร์ไรด์ที่มีชื่อว่า HBF-3 ประกอบด้วยน้ำตาลแรมโนส (15.66%, w/w), กลูคูโรเนต (6.76%, w/v), น้ำตาลทีฮาโรส (0.77%, w/v), กลูโคส (2.73%, w/v), น้ำตาลแมนโนส (1.12%, w/v) และหมู่ซัลเฟต (5.30%, w/v) โดยพบว่า HBF-3 จัดเป็น สารช่วยให้เกิดการตกตะกอน (Bio-flocculamt) เนื่องจากสามารถช่วยทำให้สารอนินทรีย์ (Inorganic solid suspensions) สีย้อม (Dyes solution) โลหะหนัก (Heavy metal ions) และ น้ำเสีย (Wastewaters) เกิดการตกตะกอน (He *et al*., 2009)

สรุป

โดยภาพรวมจะเห็นว่าเซลล์ของแบคทีเรียทนเค็ม และแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางรวมทั้งผลิตภัณฑ์ที่ถูกผลิตขึ้น สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เช่นการผลิตสารตัวกลางสำหรับการผลิต D-amino acid โดยใช้เอนไซม์ไฮดานโตอิเนส (ผลิตจากแบคทีเรียทนเค็ม) การย่นระยะเวลาการหมักน้ำปลาโดยแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางร่วมกับเอนไซม์โปรติเอส เป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอางและงานในด้านเอนไซม์เทคโนโลยี (Ectoine และ Hydroxyectoine) เนื่องจาก Ectoine และ Hydroxyectoine มีคุณสมบัติช่วยทำให้สารชีวโมเลกุลมีความเสถียรและทำหน้าที่เป็นสารลดสภาวะเครียดของเซลล์ ในด้านสิ่งแวดล้อมแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสามารถผลิตพอลีเมอร์ชีวภาพ เช่น สารลดแรงตึงผิวชีวภาพและช่วยการตกตะกอน เพื่อนำไปใช้ในการกำจัดคราบน้ำมันในทะเลและตกตะกอนสารพิษ สำหรับเซลล์ของแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางสามารถดูดซับโลหะหนักและยาปราบศัตรูพืชไว้ภายในเซลล์ และสามารถย่อยสลายสารมลพิษที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมที่มีและไม่มีเกลือ อย่างไรก็ตามการนำผลิตภัณฑ์และเซลล์ของแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ยังคงประสบปัญหาในด้านต้นทุนการผลิตที่สูง จึงทำให้มีการศึกษาเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางมีอย่างต่อเนื่อง เช่น การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ และ ลดต้นทุนการผลิต เพื่อให้สามารถผลิตผลิตภัณฑ์และเซลล์ของแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางได้ปริมาณสูงโดยใช้ต้นทุนที่ต่ำ ซึ่งจะทำให้ลดค่าใช้จ่ายสำหรับการบำบัดมลพิษในสิ่งแลดล้อมและอุตสาหกรรมอื่นที่ใช้ผลิตภัณฑ์รวมทั้งเซลล์ของแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางเป็นองค์ประกอบ

เอกสารอ้างอิง

Banat, I.M., Makkar, R.S., & Cameotra, S.S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology & Biotechnology, 53*, 495–508

Coronado, M., Vargas, C., Hofemeister, J., Ventosa, A., & Nieto, J.J. (2000). Production & biochemical characterization of an α-amylase from the moderate halophile *Halomonas meridiana*. *FEMS Microbiology Letter, 183*, 67-71.

Calvo, C., Ferrer, M.R., Martínez-Chewca, F., Bejar, V., & Quesada, E. (1995). Some rheological properties of the extracellular polysaccharide produced by *Volcaniella eurihalina* F2-7. *Applied Biochemistry & Biotechnology, 55*, 45-54.

D'Souza, M.P., Amini, A., Dojka, M.A., Pickering, I.J., Dawson, S.C., Pace, N.R., & Terry, N. (2001). Identification & characterization of bacteria in a selenium-contaminated hypersaline evaporation ponds. *Applied & Environmental Microbiology, 67*, 3785-3794.

Fallet, C., Rohe, P., & Franco-Lara, E., (2010). Process optimization of the integrated synthesis and secretion of ectoine and hydroxyectoine under hyper/hypo-osmotic stress. *Biotechnology and Bioengineering*. (Inpress)

Galinski, E.A. (1995). Osmoadaptation in bacteria. *Advances in Microbial Physiology, 37*, 273–328.

Galinski, E. A., & K. Lippert. (1991). Novel compatible solutes & their potential application as stabilizers in enzyme technology. In F.Rodriguez-Valera (ed.), *General & Applied Aspects of Halophilic Microorganisms* (pp. 351–358). New York, N.Y: Plenum Press.

Galinski, E.A., & Tindall, B.J, (1992). Biotechnological prospects for halophiles and halotolerant microorganisms. In: Herbert RH, Sharp RJ (eds), *Molecular Biology and Biotechnology of Extremophiles* (pp 76–114). Blackie, Glasgow

Gesheva, V., Stackebrandt, E., & Vasileva-Tonkova, V. (2010). Biosurfactant Production by Halotolerant *Rhodococcus fascians* from Casey Station, Wilkes Land, Antarctica. *Current Microbiology*. (Inpress)

Ghazvini, P.T.M., & Mashkani, S.G. (2009). Effect of salinity on vanadate biosorption by *Halomonas* sp. GT-83: Preliminary nvestigation on biosorption by micro-PIXE technique. *Bioresource Technology, 100*, 2361–2368.

Ghojavand, H., Vahabzadeh, F., Roayaei, E., & Shahraki, A.K. (2008). Production and properties of a biosurfactant obtained from a member of the *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696). *J. Colloid and Interface Science, 324*, 172–176.

He, J., Zhen, Q., Qiu, N., Liu, Z., Baojiang Wang, B., Zongze Shao, Z., & Yu, Z. (2009). Medium optimization for the production of a novel bioflocculant from Halomonas sp. V3a' using response surface methodology. *Bioresource Technology, 100*, 5922–5927.

Hiraga, K., Nishikata, Y., Namwong, S., Tanasupawat, S., Takada, T., & Oda, K. (2005). Purification & characterization of serine proteinase from halophilic bacterium, *Filobacillus* sp. RF2-5. *Bioscience, Biotechnology, & Biochemistry, 69*, 38-44.

Joshi, R., Ravindranathan, T., Bastawade, K.B., Gkhale, D. V., Kalkote, U.R., & Sudge, S.S. (2000). Halophilic *Pseudomonas* strain having accession no. NCIM 5209 (ATCC 55940) and a process for preparing D(-)*N*carbamoylphenylglycine using said strain. Patent US6121024.

Kalkote, U.R., Joshi, R.R., Joshi, R.A., & Ravindranathan, T. (1994). An improved process for the preparation of D())phenylglycine from D-(-)-carbamoylphenylglycine. Indian patent NF/61/1994.

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

Kamekura, M., Hamakawa, T., & Onishi, H. (1982). Application of halophilic nuclease H of *Micrococcus varians* subsp. *halophilus* to commercial production of flavoring agent 5'-GMP. *Applied & Environmental Microbiology, 44*, 994-995.

Khire, J.M. (1994). Production of moderately halophilic amylase by newly isolated *Micrococcus* sp. 4 from a salt pan. *Letters in Applied Microbiology, 19*, 210-212.

Kubo, M., Hiroe, J., Murakami, M., Fukami, H., & Tachiki, T. (2001). Treatment of hypersaline-containing wastewater with salt-tolerant microorganisms. *Journal of Bioscience & Bioengineering, 91*, 222-224.

Kuda, T., Miyamoto, H., Sakajiri, M., Ando, K., & Yano, T. 2001. Microflora of fish nukazuke made in Ishikawa, *Japan Nippon Suisan Gakkaishi, 67*, 296-301.

Kushner, D.J., (1978). Life in high salt & solute concentrations. In: Kushner, D.J. (ed), *Microbial life in extreme environments* (pp 317–368). London: Academic Press.

Lippert, K., & Galinski, E.A. (1992). Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing & drying. *Applied Microbiology & Biotechnology, 37*, 61-65.

Louis, P., Trüper, H.G., & Galinski, E.A. (1994). Survival of Escherichia coli during drying & storage in the presence of compatible solutes. *Applied Microbiology & Biotechnology, 41*, 648-68.

Margesin, R., & Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles, 5*, 73–83

Martín, S., Márquez, M.C., Sánchez-Porro, C., Mellado, E., Arahal, D.R., & Ventosa, A. (2003) *Marinobacter lipolyticus* sp. nov., a novel moderate halophile with lipolytic activity. I*nternational Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, *53*, 1383-1387.

Massadeh, A.M., Al-Momani, F.A., & Haddad, H.I. (2005). Removal of Lead & Cadmium by Halophilic Bacteria Isolated from the Dead Sea Shore, Jordan. *Biological Trace Element Research, 108*, 259-269l.

Namwong, S., Hiraga, K., Takada, K., Tanasupawat, S., & Oda, K. (2006). A halophilic serine proteinase from *Halobacillus* sp. SR5-3 isolated from fish sauce: purification & characterization. *Bioscience, Biotechnology, & Biochemistry*, *70*(6), 1395-1401.

Namwong, S., Tanasupawat, S., Smitinont, T., Vises-sanguan, W., Kudo, T., & Itoh, T. (2005). Isolation of *Lentibacillus salicampi strains & Lentibacillus juripiscarius* sp. nov. isolated from fish sauce in Thailand. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 55*, 315-20.

Nieto, J.J., Fernández-Castillo, R., Márquez, M.C., Ventosa, A., Quesada, E., & Ruiz-Berraquero, F. 1989. Survey of metal tolerance in moderately halophilic eubacteria. *Applied & Environmental Microbiology, 55*, 2385-2390.

Oncescu, T., Oancea, P., Enache, M., Popescu, G., Dumitru, L., & Kamekura, M. (2007). Halophilic bacteria are able to decontaminate dichlorvos, a pesticide, from saline environments. *Central European Journal of Biology, 2*(4), 563–573.

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

Ono. H., Okuda. M., Tongpim. S., Imai. K., Shinmyo. A., Sakuda. S., Kaneko. Y., Murooka Y., & Takano M. (1998) Accumulation of compatible solutes, ectoine and hydroxyectoine, in a moderate halophile, *Halomonas elongata* KS3 isolated from dry salty land in Thailand. *Journal of Fermentation and Bioengineering, 85*, 362–368

Oren. A. (2006). The Order Halobacteriales. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K-H., Erko Stackebrandt, E., (Eds), *Prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria*, Vol 3 (pp.113–164). New York, USA

Oren, A. (1999). Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology & Molecular Biololgy Reviews, 63*, 334–348

Oren, A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, & applications. J*ournal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, *28*, 56-63.

Sauer, T., & Galinski, E.A. (1998). Bacterial milking: a novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnology & Bioengineering, 57*, 306-313.

Stosz, S.K., Weiner, R.M., & Coyne, V.E. (1995). Agarase system from *Alteromonas* strain 2–40. Patent US5418156. 1995 May 23.

Sudge, S.S., Bastawde, K.B., Gokhale, D.B., Kalkote, U.R., & Ravindranathan, T. (1998). Production of D-hydantoinase by halophilic *Pseudomonas* sp. NCIM 5109. *Applied Microbiology & Biotechnology, 49*, 594–599.

Thongthai, C., Panbanggred, W., Khoprasert, C., & Dhaveetiyanond, S. (1990) Protease activity in the tradi-tional process of fish sauce fermentation. In: Reilly PJA, Parry RWH, Bariles LE, editors. Post-Harvest Technology, Preservation and quality o fish in Southeast Asia, Manila: Echanis Press. p. 61-5.

Toyoda, Y., Oowaya, K., Takano, M., & Shibata, S. (1997). Stabilization of enzyme. Patent JP9143167. 1997 June 3.

Van-Thuoc, D., Guzmána, H., Quillaguamán, J., & Hatti-Kaula, R. (2010). High productivity of ectoines by *Halomonas boliviensis* using a combined two-step fed-batch culture & milking process. *Journal of Biotechnology, 147*, 46–51.

Ventosa, A., & Nieto, J.J. 1995. Biotechnological applications & potentialities of halophilic microorganisms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology, 11*, 85-94.

Woolard, C.R., & Irvine, R.L. (1995). Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor. *Water Research, 29*, 1159–1168.

Yongsawatdigul, J., Rodtong, S., & Raksakulthai, N. (2007). Acceleration of Thai fish sauce fermentation using proteinases & bacterial starter cultures. *Food Microbiology & Food Safety, 72*, 382-390.