การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงและการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยใช้ของเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันพืชและการประยุกต์ใช้

Screening of high lipase producing bacteria and study on optimal conditions on lipase production using waste of industrial vegetable oil production and application

ปิยาภรณ์ สุภัคดำรงกุล
จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์

การวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ปีการศึกษา 2556

ชื่อเรื่อง การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงและการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยใช้ของเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันพืชและการประยุกต์ใช้
ผู้วิจัย ปิยาภรณ์ สุภัคดำรงกุล และ จันทร์เพ็ญ วิวัฒน์
สถาบัน มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ปีที่พิมพ์ 2560
สถานที่พิมพ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
แหล่งที่เก็บรายงานฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
จำนวนหน้ารายงานวิจัย 118 หน้า
คำสำคัญ การผลิตเอนไซม์ไลเปส การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ สารซักล้าง สารลดแรงตึง เอนไซม์ไลเปส
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ

บทคัดย่อ

งานวิจัยเรื่องนี้มีจุดประสงค์ในการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติเฉพาะของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินและน้ำเสีย เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในสารซักล้าง เมื่อคัดเลือกแบคทีเรีย จำนวน 141 ไอโซเลต โดยทดสอบการย่อยไขมันบนอาหารเพาะเชื้อ lipase test medium และอาหารเพาะเชื้อ tributyrin agar รวมทั้งวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยใช้ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP) เป็นสับสเตรทจากน้ำหมักที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อ Tryptic soy broth (TSB) เป็นเวลา 1 วัน พบว่ามีแบคทีเรีย จำนวน 2 ไอโซเลต ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด คือ ไอโซเลต MUM1-5 และ POSW-1 เมื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุด โดยใช้น้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 1 ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน (216.35±0.09 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) และมีการใช้เพปโตนที่ความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน (258.29±0.09 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) สำหรับอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส คือ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (277.02±0.25 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) และพีเอช 7 (260.58±0.25 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) สำหรับแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุด เมื่อมีการใช้น้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 1 ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน (235.15±0.25 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) และมีการใช้เพปโตนที่ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อ

ปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน (255.01±0.24 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) สำหรับอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส คือ อุณหภูมิห้อง 35 องศาเซลเซียส (267.18±0.05 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) และพีเอช 7 (259.08±0.10 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) ตามลำดับ

จากการศึกษาคุณสมบัติเฉพาะของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส คือ พีเอช 10 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์มีเสถียรภาพต่อความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิในช่วงกว้างระหว่างพีเอช 8-10 และอุณหภูมิ 40-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการทำงานเอนไซม์สูงขึ้นเมื่อมี $CaCl_2$, $LiCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$ สารลดแรงตึงผิว และสารอิมัลซิฟายเออร์ โดยกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสไม่ถูกกระตุ้นเมื่อมีตัวยับยั้ง β-mercaptoethanol, DTT และ PMSF จากการศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส พบว่าเอนไซม์มีเสถียรภาพต่อเฮกเซนและเมทานอลสูงที่สุด สำหรับการทดสอบกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสในสภาวะที่มีสารซักล้างชนิดผงและชนิดเหลวทั้ง 6 ชนิด ที่ความเข้มข้นของสารซักล้าง 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเอนไซม์ไลเปสในเปาซิลเวอร์นาโนมีค่ากิจกรรมเอนไซม์และเสถียรภาพของเอนไซม์สูงที่สุด และในการศึกษาผลความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสต่อสับสเตรต พบว่าเอนไซม์ไลเปสมีความจำเพาะต่อน้ำมันมะกอก tripalmitin และ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP)

สำหรับการศึกษาคุณสมบัติเฉพาะของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1 พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส คือ พีเอช 10 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์มีเสถียรภาพต่อความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิในช่วงกว้างระหว่างพีเอช 8-10 และอุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการทำงานเอนไซม์สูงขึ้นเมื่อมี $CaCl_2$, $MnCl_2$, $MgCl_2$, KCl, $ZnCl_2$ สารลดแรงตึงผิว และสารอิมัลซิฟายเออร์ โดยกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสไม่ถูกกระตุ้นเมื่อมีตัวยับยั้ง β-mercaptoethanol, DTT และ PMSF จากการศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส พบว่าเอนไซม์มีเสถียรภาพต่อเฮกเซนและเมทานอลสูงที่สุด สำหรับการทดสอบกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสในสภาวะที่มีสารซักล้างชนิดผงและชนิดเหลวทั้ง 6 ชนิด ที่ความเข้มข้นของสารซักล้าง 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเอนไซม์ไลเปสในเปาซิลเวอร์นาโนมีค่ากิจกรรมเอนไซม์และเสถียรภาพของเอนไซม์สูงที่สุด และในการศึกษาผลความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสต่อสับสเตรต พบว่าเอนไซม์ไลเปสมีความจำเพาะต่อน้ำมันมะกอก tripalmitin และ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP)

จากการทดลอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสในการขจัดไขมันบนผ้าฝ้าย พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 และ POSW-1 มีค่าเปอร์เซ็นต์การขจัดน้ำมันมะกอกออกจากผ้าฝ้ายสูงที่สุด เท่ากับ 94.05 และ 98.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับการจัดจำแนกแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16s rRNA พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 มีความคล้ายคลึงกับ *Chromobacterium violaceum* ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1 มีความคล้ายคลึงกับ *Lysinibacillus* sp. ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองเบื้องต้นที่น่าสนใจนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่นำไปสู่การศึกษาต่อทางด้านการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ และการนำเอนไซม์ไปสู่การประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมสารซักล้าง ในลำดับต่อไป

Research Title	Screening of high lipase producing bacteria and study on optimal conditions on lipase production using waste of industrial vegetable oil production and application
Researchers	Piyaporn Supakdamrongkul and Chanpen Wiwat
Institution	Huachiew Chalermprakiet University
Year of Publication	2017
Publisher	Huachiew Chalermprakiet University
Sources	Huachiew Chalermprakiet University
No. of Pages	118 pages
Keywords	Lipase production, Lipase characterization, Detergent, Surfactant, Lipase
Copyright	Huachiew Chalermprakiet University

Abstract

The focus of this study was on production and characterization of an extracellular lipase from bacteria isolated from soil and wastewater for potential application as a detergent additive. One hundred and forty-one bacterial strains were screened by oil degradation on lipase test medium and tributyrin agar. Lipase activity was measured spectrophotometrically using *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP) as the substrate from supernatant of Tryptic soy broth (TSB) after culturing for 1 day. Consequently, the strain MUM1-5 and POSW-1 were isolated as the good producers. The maximum lipase production from isolate MUM1-5 was obtained using wastewater from oil refining process 1 at concentration of 2% (v/v) of basal medium (216.35±0.09 U/mg) and peptone at concentration of 0.6% (v/v) of basal medium (258.29±0.09 U/mg). The optimal temperature and pH for lipase production were 45°C (277.02±0.25 U/mg) and pH 7 (260.58±0.25 U/mg), respectively. For the maximum lipase production from isolate POSW-1 was obtained using wastewater from oil refining process 1 at concentration of 2% (v/v) of basal medium (235.15±0.25 U/mg) and peptone at concentration of 0.4% (v/v) of basal medium (255.01±0.24

U/mg). The optimal temperature and pH for lipase production were 35°C (267.18±0.05 U/mg) and pH 7 (259.08±0.10 U/mg), respectively.

The optimum pH and temperature for the isolate MUM1-5 lipase activity were pH 10 and 60°C, respectively. The enzyme was stable in the pH range 8-10 and at 40-55°C for 1 h. Higher activity was observed in the presence of $CaCl_2$, $LiCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$, surfactants and emulsifiers but inhibited lipase activity by β-mercaptoethanol, DTT and PMSF. The enzyme was stable in hexane and methanol. The effect of lipase on activity and stability in the presence of power and liquid detergents of all 6 types at concentration of 1% was studied. The results showed that, the highest relative activity of lipase was observed in the presence of detergent Pao Silver Nano. Furthermore, this enzyme hydrolyzed olive oil, tripalmitin and *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP).

For the characterization of isolate POSW-1 lipase, the results showed that the optimum pH and temperature for enzyme activity were pH 10 and 50°C, respectively. The enzyme was stable in the pH range 8-10 and at 40-50°C for 1 h. Higher activity was observed in the presence of $CaCl_2$, $MnCl_2$, $MgCl_2$, KCl, $ZnCl_2$, surfactants and emulsifiers but inhibited lipase activity by β-mercaptoethanol, DTT and PMSF. The enzyme was stable in hexane and methanol. The results showed that, the highest relative activity of lipase was observed in the presence of detergent Pao Silver Nano and the enzyme hydrolyzed olive oil, tripalmitin and *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP).

The efficacy of removal of olive oil from the cotton by lipase from isolate MUM1-5 and POSW-1 were 94.05% and 98.45%, respectively. For the bacterial identification by 16s rRNA gene analysis, the results showed that isolate MUM1-5 and POSW-1 were *Chromobacterium violaceum* and *Lysinibacillus* sp., respectively with 99 percent of similarity. These promising results with enzyme preparation justify the undertaking of purification studies and the used of the purified enzyme in a more in-depth investigation for potential application as a detergent additive

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิจัยเรื่อง การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่แยกได้จากดินและน้ำเสียโดยการใช้ของเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันพืชและการประยุกต์ใช้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีนี้ โดยได้รับทุนอุดหนุนการทำวิจัยจากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ในการส่งเสริมและสนับสนุนงานวิจัย ขอขอบคุณบริษัทผู้ผลิตน้ำมันพืชในพื้นที่จังหวัดสมุทรปราการที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างของเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันพืชเพื่อการวิจัย ขอขอบคุณอาจารย์สุรีย์พร เอี่ยมศรี สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ที่ให้คำแนะนำในการจัดจำแนกแบคทีเรียโดยเทคนิคระดับโมเลกุล

ขอขอบคุณคณาจารย์และบุคลากรสายสนับสนุน สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฆ
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูปภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	6
ขอบเขตของการวิจัย	7
นิยามศัพท์เฉพาะ	8
สมมติฐานของการวิจัย	11
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	11
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	13
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	27
บทที่ 4 ผลการวิจัย	44
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย	88
บรรณานุกรม	94
ภาคผนวก	
ก. วิธีการเตรียมอาหารเพาะเชื้อและสารเคมี	104
ข. การคำนวณปริมาณโปรตีนและกิจกรรมเอนไซม์	109
ค. ขั้นตอนการเตรียมและวิเคราะห์โปรตีน	113
ง. ประวัติย่อผู้วิจัย	117

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3-1	องค์ประกอบของสารผสมปฏิกิริยาผสมและปริมาณที่ใช้ต่อ 1 ปฏิกิริยา ในปริมาตร 25 ไมโครลิตร สำหรับเพิ่มปริมาณยีน 16s rRNA	35
3-2	สภาวะที่ใช้ในการทำพีซีอาร์สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน 16s rRNA	35
3-3	สูตรสารซักล้าง	41
4-1	ผลการคัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างดิน	46
4-2	ผลของตัวอย่างของเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5	50
4-3	ผลของความเข้มข้นของน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 1 ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5	51
4-4	ผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5	52
4-5	ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5	54
4-6	ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเชื้อที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5	55
4-7	ผลของอุณหภูมิในการบ่มเชื้อที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5	56

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		**หน้า**
4-8	ผลของความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5	58
4-9	ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5	58
4-10	ผลของสารเคมีที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5	59
4-11	ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5	60
4-12	ผลของสารซักล้างที่มีผลต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5	61
4-13	ผลของความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 ต่อสับสเตรต	61
4-14	ผลของการซักล้างในสภาวะความเป็นด่างที่พีเอชต่าง ๆ ที่มีต่อการขจัดน้ำมันมะกอกบนผ้าฝ้าย โดยสูตรการซักล้างทั้งหมด 4 สูตร จากการใช้เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5	62
4-15	ผลของการซักล้างในสภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ ที่มีต่อการขจัดน้ำมันมะกอกบนผ้าฝ้ายโดยสูตรการซักล้างทั้งหมด 4 สูตร จากการใช้เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5	63
4-16	ผลการคัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างน้ำเสียและน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตน้ำมันพืช	67

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		**หน้า**
4-17	ผลของตัวอย่างของเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1	71
4-18	ผลของความเข้มข้นของน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 1 ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1	72
4-19	ผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1	73
4-20	ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1	75
4-21	ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเชื้อที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1	76
4-22	ผลของอุณหภูมิในการบ่มเชื้อที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1	77
4-23	ผลของความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1	79
4-24	ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1	79
4-25	ผลของสารเคมีที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1	80
4-26	ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1	81

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		**หน้า**
4-27	ผลของสารซักล้างที่มีผลต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1	82
4-28	ผลของความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1 ต่อสับสเตรต	82
4-29	ผลของการซักล้างในสภาวะความเป็นด่างที่พีเอชต่าง ๆ ที่มีต่อการขจัดน้ำมันมะกอกบนผ้าฝ้าย โดยสูตรการซักล้างทั้งหมด 4 สูตร จากการใช้เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1	84
4-30	ผลของการซักล้างในสภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ ที่มีต่อการขจัดน้ำมันมะกอกบนผ้าฝ้าย โดยสูตรการซักล้างทั้งหมด 4 สูตร จากการใช้เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1	85

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่		หน้า
4-1	ลักษณะของตะกอนขุ่นขาวรอบ ๆ โคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร lipase test medium (Tween 80 agar) ที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน	44
4-2	ลักษณะตะกอนขุ่นขาวที่เกิดขึ้นในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยคัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันด้วยวิธี Agar well diffusion บนอาหาร lipase test medium (Tween 80 agar)	45
4-3	ตัวอย่างตะกอนจากบ่อบำบัดน้ำเสีย (A) และน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันพืชและน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตน้ำมันพืช (B)	64
4-4	ลักษณะของตะกอนขุ่นขาวรอบ ๆ โคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร lipase test medium (Tween 80 agar) ที่คัดแยกได้จากน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมัน	64
4-5	ลักษณะตะกอนขุ่นขาวที่เกิดขึ้นในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยคัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียด้วยวิธี Agar well diffusion บนอาหาร lipase test medium (Tween 80 agar)	65
4-6	ลักษณะโซนใสที่เกิดขึ้นในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียด้วยวิธี Agar well diffusion บนอาหาร tributyrin agar	66
4-7	แผนภูมิวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 สเกล 0.005 แทน evolution distance ของจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนไปต่อนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่ง ตัวเลขที่จุดตัด (node) ของแผนภูมิแสดงความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างแผนภูมิด้วย Bootstrap test โดยวิธี Neighbor-Joining method	86

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4-8	แผนภูมิวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1 สเกล 0.002 แทน evolution distance ของจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนไปต่อนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่ง ตัวเลขที่จุดตัด (node) ของแผนภูมิแสดงความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างแผนภูมิด้วย Bootstrap test โดยวิธี Neighbor-Joining method	87

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันมีการนำเอนไซม์มาใช้ในอุตสาหกรรมมากขึ้น เพื่อนำมาใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี ซึ่งเอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาภายใต้สภาวะอุณหภูมิและความดันที่เหมาะสม โดยมีความจำเพาะต่อสับสเตรต สามารถสลายตัวได้เองในธรรมชาติ ดังนั้นจึงไม่ก่อให้เกิดสภาวะแวดล้อมที่เป็นพิษ และสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ โดยมีการรายงานถึงมูลค่าการใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมสูงถึง 2 ล้านดอลลาร์สหรัฐ และคาดการณ์ว่าในปี ค.ศ. 2009 จะมีมูลค่าการใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมเพิ่มสูงถึง 2.4 ล้านดอลลาร์สหรัฐ (1) รวมทั้งพบว่ามีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมซักล้างสูงถึง 60 เปอร์เซ็นต์ ของเอนไซม์ทั้งหมด (2) นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสยังมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอื่น ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง โดยเฉพาะกลุ่มทำความสะอาด อุตสาหกรรมการชะล้าง อุตสาหกรรมสารลดแรงตึงผิว อุตสาหกรรมการบำบัดน้ำเสีย อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมกระดาษ และแหล่งเชื้อเพลิงชีวภาพ เป็นต้น (3) ซึ่งการนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมต่าง ๆ เหล่านี้ เป็นที่ยอมรับเนื่องจากมีข้อดีมากกว่าการใช้วิธีทางเคมี ซึ่งไม่ต้องใช้ความดันสูงหรือผ่านหลายขั้นตอน ไม่ก่อมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม และผลผลิตที่ได้นั้นมีความสะอาด เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสจะเกิดปฏิกิริยาที่จำเพาะต่อสับสเตรต และนำกลับมาใช้ใหม่ได้

ไลเปสถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1856 โดยนักวิทยาศาสตร์ชื่อ Claude Bernard โดยเอนไซม์นี้พบในสารที่ขับออกจากตับ (pancreatic juice) ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) มีชื่อเรียกตามระบบ systematic name ว่า ไตรเอซิลกลีเซอรอลเอซิลไฮโดรเลส (triacylglycerol acylhydrolase) และมีชื่อตามรหัสหรือตามระบบตัวเลข (code or number system) คือ EC 3.1.1.3 (4) เอนไซม์ไลเปสสามารถไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ได้เป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอลตรงผิวร่วมระหว่างน้ำและน้ำมัน รวมทั้งเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ในโมเลกุลไขมันและการสร้างพันธะเอสเทอร์ (transesterification) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับของปฏิกิริยานี้ โดยพบในระบบที่มีน้ำน้อยหรือระบบที่มีสารอินทรีย์เป็นตัวทำละลาย (5)

การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสเป็นไปได้หลายแบบ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์และสภาวะการเกิดปฏิกิริยา จุลินทรีย์จะมีการสร้างเอนไซม์และปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) เพื่อให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับไขมันที่อยู่ภายนอกเซลล์ ซึ่งการย่อยสลายไขมันหรือไตรกลีเซอไรด์โดยเอนไซม์ไลเปสอาจเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์หรือไม่สมบูรณ์ก็ได้ ในกรณีที่มีการย่อยสลายไม่สมบูรณ์จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดไขมันกับโมโนกลีเซอไรด์หรือไดกลีเซอไรด์ ในกรณีที่ไตรกลีเซอไรด์ถูกย่อยสลายอย่างสมบูรณ์จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย คือ กลีเซอรอลและกรดไขมัน ในส่วนของกรดไขมันที่ได้จะเข้าสู่กระบวนการย่อยสลายภายในเซลล์โดยผ่านวิถี beta-oxidation จนกระทั่งได้เป็น acetyl-CoA และเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ (Kreb's cycle) ในลำดับต่อไป ส่วนกลีเซอรอลจะถูกย่อยสลายจนกระทั่งเข้าสู่วิถีไกลโคไลซีสได้เป็น phosphoenolpyruvate จากนั้นจึงเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ในลำดับต่อไป (6, 7) แหล่งของเอนไซม์ไลเปสที่สำคัญสามารถพบได้ทั้งในพืช สัตว์และจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจและมีบทบาทสำคัญมาก เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสที่ได้มาจากจุลินทรีย์จะมีความคงตัวสูงกว่าเอนไซม์ไลเปสจากพืชและสัตว์ และสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก ทั้งนี้เนื่องจากจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตเร็ว การควบคุมการผลิตทำได้ง่ายและคุณภาพสม่ำเสมอ รวมทั้งมีคุณสมบัติที่คงทนต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิสูง และมีความจำเพาะต่อสับสเตรตหลายชนิด (8)

เอนไซม์ไลเปสมีหลายชนิด โดยมีลักษณะที่แตกต่างกันทั้งทางด้านความจำเพาะต่อสับสเตรต กลไกในการเร่งปฏิกิริยา ลักษณะของบริเวณที่เร่งปฏิกิริยา สารยับยั้งและสารเร่งปฏิกิริยา ลำดับของกรดอะมิโนในโมเลกุล ช่วงของความเป็นกรด-ด่าง ช่วงของอุณหภูมิในการทำงาน เสถียรภาพของเอนไซม์ และน้ำหนักโมเลกุล เป็นต้น จุลินทรีย์บางสายพันธุ์ไม่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ได้เอง จำเป็นต้องอาศัยสารเหนี่ยวนำ (inducer) เพื่อช่วยให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ ซึ่งสารเหนี่ยวนำนี้อาจเป็นสารชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกับสารที่เป็นแหล่งคาร์บอนก็ได้ แบคทีเรียบางชนิดมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ดังที่มีรายงานแล้ว ได้แก่ การศึกษาคุณสมบัติเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสารซักล้าง โดยเพิ่มประสิทธิภาพในการขจัดคราบไขมันปาล์มได้ดียิ่งขึ้น (9) และในปี ค.ศ. 1994 Janssen et al. (10) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทนต่ออุณหภูมิสูงจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ Wai 28A 45 ซึ่งผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณสูงจากแหล่งอาหารที่มีไขมันอิ่มตัว งานวิจัยของ Schmidt-Dannert et al. (11) ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง จำนวน 15 สายพันธุ์ และพบว่ามีแบคทีเรียเพียง 5 สายพันธุ์ เท่านั้น ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ซึ่งเมื่อศึกษาพบว่า *B. thermocatenulatus* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด คือ 0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ค่าพีเอช 6.5 อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส และในปี ค.ศ. 1999 Dharmsthiti and Luchai (12) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp.

THL027 โดยทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 7 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อนำเอนไซม์มาทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์ไลเปสสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พีเอช 7 และเอนไซม์ไลเปสมีเสถียรภาพที่อุณหภูมิ 60-75 องศาเซลเซียส

ปัจจัยที่สำคัญในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์มักเกี่ยวข้องกับแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ในปี ค.ศ. 2012 Joseph et al. (13) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่แสดงกิจกรรมได้ดีที่อุณหภูมิต่ำจาก *Microbacterium luteolum* ซึ่งคัดแยกได้จากเทือกเขาหิมาลัย โดยการใช้น้ำมันมะกอกและกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 8.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามในการผลิตเอนไซม์ไลเปสมักมีต้นทุนในการผลิตสูงอันเนื่องมาจากสับสเตรต ซึ่งการใช้เศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรหรือของเสียทางอุตสาหกรรมนับเป็นทางเลือกใหม่เพื่อใช้แก้ปัญหาดังกล่าว (14, 15) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่มีต้นทุนในการผลิตต่ำ และสามารถหาได้ง่าย ซึ่งเป็นของเสียทางอุตสาหกรรมมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ สำหรับการศึกษาแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์ไลเปสนั้น Wang et al. (16) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทนต่อความเป็นด่างสูงจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ A30-1 (ATCC 53841) ในอาหารเพาะเชื้อซึ่งประกอบด้วยสารสกัดจากยีสต์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และแอมโมเนียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน และในปี ค.ศ. 1996 Lin et al. (17) รายงานการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทนต่อความเป็นด่างจาก *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111 ในอาหารเพาะเชื้อที่ประกอบด้วยถั่วเหลืองป่น ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพปโตน ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และสารสกัดจากยีสต์ ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ในปัจจุบันปัญหาสิ่งแวดล้อมมีสาเหตุสำคัญจากการปล่อยของเสียที่เป็นพิษจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น ของเสียที่มีความเป็นด่างสูงจากโรงงานผลิตไบโอดีเซล โดยความเป็นด่างของสารพิษนี้จะทำให้เกิดอาการแพ้ได้ หรือของเสียที่เป็นพิษจำพวกฟีนอลจากกระบวนการผลิตน้ำมัน เป็นต้น ซึ่งตัวอย่างสารพิษเหล่านี้ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมและส่งผลเสียต่อสุขภาพเป็นอย่างมาก ดังนั้นจึงมีการวิจัยและคิดค้นวิธีการนำของเสียที่เป็นพิษดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ตัวอย่างเช่น การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *P. aeruginosa* AAU2 โดยใช้ของเสียจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซล ซึ่งพบว่า *P. aeruginosa* AAU2 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ได้เท่ากับ 0.432 ยูนิตต่อลิตร (18) และ Abdelmoez et al. (19) ศึกษาการใช้ของเสียจากกระบวนการกลั่นน้ำมันและของเสียจากกระบวนผลิตสารเคมีอุตสาหกรรมที่ผลิตจากไขมันและน้ำมันจากพืชน้ำมัน (อุตสาหกรรมโอลิโอเคมี) สำหรับการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ATCC 14830 ซึ่งผลจากการศึกษาพบว่า *C. rugosa* ATCC 14830 สามารถผลิตเอนไซม์

ไลเปสได้สูงสุดถึง 7.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ของเสียจากอุตสาหกรรมโอลิโอเคมีเป็นแหล่งคาร์บอน Miranda et al. (20) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Penicillium citrinum* โดยใช้ของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งพบว่า *P. citrinum* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงถึง 5,786 ยูนิตต่อลิตร เมื่อมีการใช้ของเสียจากโรงงานกลั่นน้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงกว่าน้ำมันมะกอก โดยกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสวิเคราะห์ได้จากการใช้ไตรโอเลอีน (triolein) เป็นสับสเตรตและได้ผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็นกรดไขมันอิสระ นอกจากนี้ยังพบว่าแอมโมเนียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดี โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงถึง 6,738 ยูนิตต่อลิตร

ในปี ค.ศ. 2009 Brozzoli et al. (21) ศึกษาการประเมินค่าของของเสียที่ได้จากการสกัดน้ำมันมะกอก ในการนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *C. cylindracea* NRRL Y-17506 โดยการนำของเหลวสีดำที่ได้จากการสกัดน้ำมันมะกอกมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส ซึ่งพบว่าของเหลวสีดำที่ได้จากการสกัดน้ำมันมะกอกสามารถส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ได้ดี โดยในอาหารเพาะเชื้อจะประกอบไปด้วยของเหลวสีดำที่ได้จากกระบวนการสกัดน้ำมันมะกอก แอมโมเนียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2.4 กรัมต่อลิตร และน้ำมันมะกอก ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ไลเปสสูงถึง 10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มกลูโคส มอลต์สกัด และแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น เพปโตนและสารสกัดจากยีสต์ ไม่สามารถชักนำหรือไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ เช่นเดียวกันกับ Godoy et al. (22) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยใช้ของเสียจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลจากเมล็ดละหุ่ง ซึ่งในกระบวนการผลิตนี้จะได้ของเสียซึ่งมีค่าความเป็นด่างสูงและมีความเป็นพิษ อันก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม รวมทั้งเป็นสาเหตุให้เกิดอาการแพ้ โดยในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *P. simplicissimum* โดยกระบวนการหมักของเสียจากเมล็ดละหุ่งแบบแห้ง ซึ่งนอกจะกำจัด ricin ซึ่งเป็นสารพิษออกแล้วยังสามารถชักนำการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดถึง 44.8 ยูนิตต่อกรัม รวมทั้งสามารถลดการก่อภูมิแพ้อันเกิดจากของเสียจากเมล็ดละหุ่งถึง 16 เปอร์เซ็นต์

ในอุตสาหกรรมสารซักล้างปัจจุบันได้มีการพัฒนาผงซักฟอกโดยการใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของผงซักฟอก โดยผลิตภัณฑ์ผงซักฟอกผสมเอนไซม์ชนิดแรกที่มีการวางจำหน่ายในท้องตลาด เริ่มในปี ค.ศ. 1913 คือ ทริปซิน สำหรับผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดในระดับอุตสาหกรรมแบบเดิมนั้นจะมีการใช้น้ำยาแช่ผ้า โดยน้ำยานี้สกัดมาจากตับอ่อนของสัตว์ผสมอยู่ ต่อมามีการค้นพบส่วนประกอบที่สำคัญในน้ำสกัดที่มีผลทำความสะอาดนั้น คือ เอนไซม์โปรติเอส (protease) ชนิดทริปซิน (trypsin) และไคโมทริปซิน (chymotrypsin) จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1960 จึงได้เริ่มมีการใช้เอนไซม์จากแบคทีเรียซึ่งผลิตโดยกระบวนการหมัก พบว่า

ใช้ได้ผลดีมาก ซึ่งได้มีการนำเอาเอนไซม์ชนิดนี้ไปใช้ในการทำความสะอาด ทั้งนี้การใส่เอนไซม์ผสมกับผงซักฟอกนั้น มีวัตถุประสงค์เพื่อเร่งปฏิกิริยาการขจัดคราบสกปรก และเป็นการช่วยลดชนิดและปริมาณสารออกฤทธิ์ขจัดคราบอื่น ๆ ซึ่งเป็นการช่วยลดต้นทุนการผลิต ลดระยะเวลาการซักล้างทำความสะอาด ช่วยประหยัดพลังงานเพราะไม่ต้องใช้อุณหภูมิสูงมากในการซักล้าง ช่วยลดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม เพราะเอนไซม์สามารถย่อยสลายได้ และยังช่วยปรับสภาพเส้นใยของผ้า

การเติมเอนไซม์ลงในผงซักฟอกยังเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการชำระล้างคราบที่ติดอยู่บนเนื้อผ้า อันเนื่องมาจากการสะสมของไขมัน โปรตีนจากอาหาร หรือเลือด เป็นต้น ทั้งนี้เอนไซม์ที่นิยมเติมลงในผงซักฟอก คือ เอนไซม์โปรติเอส โดยใช้สำหรับแช่ผ้าก่อนซัก และใช้ซักผ้าเพื่อกำจัดคราบโปรตีนออกจากผ้า เอนไซม์อะไมเลส (amylase) ใช้กำจัดคราบแป้งติดแน่นบนเนื้อผ้า และเอนไซม์ไลเปส (lipase) เพื่อกำจัดคราบไขมันจากอาหารและเหงื่อบนเนื้อผ้า ปริมาณเอนไซม์ที่ผสมอยู่ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดโดยทั่วไปจะอยู่ระหว่าง 0.4-1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก (23) การใช้เอนไซม์ในสารทำความสะอาดมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยอาจกล่าวได้ว่าเป็นตลาดของเอนไซม์ที่ใหญ่ที่สุด เนื่องจากอุตสาหกรรมผลิตสารทำความสะอาดเพียงอุตสาหกรรมเดียวก็ใช้เอนไซม์ประมาณ 25-30 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณการขายเอนไซม์ทั่วโลก (24)

ในการศึกษาสภาวะที่ใช้ในการซักล้าง เช่น อุณหภูมิ และสภาวะความเป็นกรด-ด่าง หรือสารเคมีอื่น ๆ ที่เป็นส่วนประกอบของผงซักฟอก พบว่ามีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในผลิตภัณฑ์เหล่านี้ ยกตัวอย่างเช่น อุณหภูมิของน้ำที่ใช้ในการซักผ้า หากมีการลดอุณหภูมิในการซักผ้าลงเพื่อรักษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ จะส่งผลให้การขจัดคราบไขมันและแป้งที่ติดอยู่กับเสื้อผ้าไม่มีประสิทธิภาพ แต่ทั้งนี้หากต้องการจะคงอุณหภูมิของน้ำในการซักไว้ ก็จะต้องเพิ่มปริมาณเอนไซม์มากขึ้น ซึ่งจะเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิต ดังนั้นเพื่อการแก้ปัญหาดังกล่าว จึงได้มีการค้นคว้าวิจัยเพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติพิเศษตามความต้องการ เช่น เอนไซม์ที่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง หรือสารเคมีอื่น ๆ ที่เป็นส่วนประกอบของผงซักฟอก (23)

จากความสำคัญดังกล่าวข้างต้นจึงมีความสนใจที่จะทำโครงการวิจัยนี้ โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันและตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืช ทั้งนี้เพื่อให้ได้แบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณที่สูง หรือผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีคุณสมบัติที่ดี จากนั้นทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยการนำตัวอย่างของเสียจากกระบวนการกลั่นน้ำมันพืชมาเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ รวมทั้งศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ และค่าความ

เป็นกรด-ด่างที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส ศึกษาคุณสมบัติเฉพาะของเอนไซม์ไลเปส และศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสในการกำจัดไขมันบนผ้าฝ้าย เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการศึกษาทางด้านการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ หรือการศึกษาขั้นสูงทางด้านเอนไซม์ รวมทั้งนำเอนไซม์ไลเปสไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมสารซักล้าง และอุตสาหกรรมอื่น ๆ ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากดินและน้ำเสีย และคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง

1.2.2 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ และนำไปศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปส ทั้งนี้การศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ มีดังนี้

1) ผลของชนิดและความเข้มข้นของตัวอย่างของเสียจากกระบวนการกลั่นน้ำมันพืชที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้

2) ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3) ผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงและค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเชื้อที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้

1.2.3 เพื่อศึกษาคุณสมบัติเฉพาะของเอนไซม์ไลเปส โดยศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ดังนี้

1) ผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส

2) ผลของสารเคมีและตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส

3) ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสต่อสับสเตรตชนิดต่าง ๆ

4) ผลของสารซักล้างที่มีต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส

1.2.4 เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อประสิทธิภาพในการซักล้างของเอนไซม์ไลเปส

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ในการวิจัยนี้จะทำการคัดแยกและศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จากตัวอย่างทั้งหมด 19 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นตัวอย่างดิน จำนวน 10 ตัวอย่าง ที่เก็บจากดินบริเวณถังดักไขมันหลังอาคารโภชนาการ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ และดินที่ปนเปื้อนน้ำมันบริเวณร้านอาหารต่าง ๆ และตัวอย่างน้ำเสีย จำนวน 9 ตัวอย่าง ที่เก็บจากน้ำเสียบริเวณถังดักไขมันหลังอาคารโภชนาการ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ น้ำเสียบริเวณร้านอาหารภายนอกมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ รวมทั้งตะกอนและน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตน้ำมันพืชในเขตจังหวัดสมุทรปราการ โดยใช้อาหารเพาะเชื้อ lipase test medium (Tween 80 agar) (25) และอาหารเพาะเชื้อ tributyrin agar (26) ในการคัดแยก โดยเทคนิค Spread plate จากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุด จำนวน 2 สายพันธุ์ จากตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำเสีย โดยใช้อาหารเพาะเชื้อ lipase test medium และ tributyrin agar โดยวิธี Agar well diffusion ทำการจัดจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุดโดยเทคนิคระดับโมเลกุล จากการวิเคราะห์ลำดับ 16S rDNA gene

นำแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกแล้วมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยทำการศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเชื้อ ในส่วนของแหล่งคาร์บอนทำการศึกษาโดยใช้ตัวอย่างของเสียจากกระบวนการกลั่นน้ำมันจากโรงงานผลิตน้ำมันพืช จำนวน 3 แห่ง และศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ค่าความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) สำหรับแหล่งไนโตรเจนทำการศึกษาโดยใช้เพปโตน ทริปโตน ซอยโตน ไกลซีน สารสกัดจากยีสต์ ยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสซียมไนเตรต และโซเดียมไนเตรต โดยศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ค่าความเข้มข้น 0.2-1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) อุณหภูมิทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส และสภาวะความเป็นกรด-ด่างทำการศึกษาที่พีเอช 7, 8, 9 และ 10

เอนไซม์ไลเปสที่มีประสิทธิภาพสูงซึ่งผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือกในสภาวะอาหารเพาะเชื้อที่เหมาะสม จะถูกนำมาศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ โดยศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่ค่าพีเอช 4-10 สำหรับผลของอุณหภูมิทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ทำการศึกษาผลของสารเคมีต่าง ๆ ได้แก่ ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$) แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2$) ซีเซียมคลอไรด์ ($CsCl_2$) คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) ลิเทียมคลอไรด์ ($LiCl_2$) แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2$) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) แบเรียม

คลอไรด์ ($BaCl_2$) และอลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) ในกลุ่มสารประเภทสารลดแรงตึงผิว ได้แก่ กลีเซอรอล (glycerol) โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulphate; SDS) ทวีน 20 (Tween 20) ทวีน 80 (Tween 80) ไตรตอนเอ็กซ์ 100 (Triton X-100) และโซเดียมคลอเรท (sodium cholate) ในกลุ่มสารตัวยับยั้ง ได้แก่ ไดไทโอทรีไอทอล (dithiothreitol; DTT) เอทิลลีนไดอะมีนเตตระอะซิติกแอซิค (ethylene diamine tetraacetic acid; EDTA) ฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์phenylmethylsulphonyl fluoride; PMSF) และบีต้า-เมอร์แคปโทเอทานอล (β-mercaptoethanol) สารอิมัลซิฟายเออร์ ได้แก่ กัมอะราบิค (gum arabic) และเจลาติน (gelatin) ออกซิไดซิง เอเจนท์ ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (sodium hypochlorite) สำหรับกลุ่มของตัวทำละลายอินทรีย์ ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซีเตท คลอโรฟอร์ม ไอโซโพรพานอล เอทานอล เมทานอล และอะซีโตน สำหรับการศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรตจะทำการศึกษาในน้ำมันชนิดต่าง ๆ และสับสเตรตสังเคราะห์ทั้งในกลุ่มไตรกลีเซอรอลและพารา-ไนโตรฟีนิลเอสเทอร์ นอกจากนี้ยังศึกษาผลของสารซักล้างต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ โดยใช้สารซักล้างทั้งชนิดผงและชนิดเหลว

ในการทดลองจะมีการทำ 3 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง และนำเอาผลการทดลองดังกล่าวมาวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ One-Way ANOVA นอกจากนี้ในทุกขั้นตอนของการศึกษาจะทำการวัดปริมาณโปรตีนวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ในการวิจัยครั้งนี้ได้มีการนำของเสียจากกระบวนการกลั่นน้ำมันพืชมาทำการศึกษาถึงความเหมาะสมของแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ซึ่งเป็นแนวทางสำคัญในการลดต้นทุนการผลิตเอนไซม์ไลเปส และยังเป็นการช่วยรักษาสภาพแวดล้อม โดยการนำของที่ไม่ได้ใช้แล้วหรือของเสียที่เป็นพิษต่อสภาพแวดล้อมกลับมาใช้ประโยชน์อีกครั้ง

1.4 นิยามศัพท์เฉพาะ

กลีเซอรอล (glycerol) หมายถึง สารประกอบอินทรีย์พวกแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง สูตรเคมีคือ $C_3H_8O_3$ เป็นของเหลวข้น ไม่มีสี มีจุดเดือด 290 องศาเซลเซียส ละลายน้ำได้ เป็นองค์ประกอบสำคัญของไขมันหรือน้ำมัน ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยา เครื่องสำอาง และสบู่ เป็นต้น (27)

กรดไขมัน (fatty acid) คือ กรดอินทรีย์ที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมเท่ากับ 4-24 โดยที่ปลายข้างหนึ่งเป็นหมู่คาร์บอกซิล ปลายอีกข้างหนึ่งเป็นสายยาวของนอนโพลาร์ไฮโดรคาร์บอน ทำให้กรดไขมันไม่ละลายน้ำ เป็นสายโซ่ที่อิ่มตัวหรือไม่อิ่มตัว ความยาวของสายโซ่ จำนวนและตำแหน่งของ

พันธะไม่อิ่มตัวแตกต่างกัน อยู่รวมกันเป็นลิปิดด้วยพันธะโควาเลนต์ สามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยการใช้เอนไซม์หรือสารเคมี กรดไขมันแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1. กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acids) เป็นกรดไขมันที่มีพันธะระหว่างคาร์บอนเป็นพันธะเดี่ยวทุกพันธะ ซึ่งจะเป็นของแข็งที่อุณหภูมิปกติ (ไขมัน; fat) กรดไขมันอิ่มตัวที่พบมากที่สุด ได้แก่ กรดสเตียริก กรดไขมันอิ่มตัวพบมากในไขมันสัตว์และน้ำมันมะพร้าว

2. กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids) เป็นกรดไขมันที่มีพันธะระหว่างคาร์บอนอย่างน้อย 1 ตำแหน่ง ที่เป็นพันธะคู่ ซึ่งจะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิปกติ (น้ำมัน; oil) โดยกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวสามารถถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดไขมันที่อิ่มตัวได้ (ทำให้แข็งตัว) โดยก๊าซไฮโดรเจน (H_2) จะถูกอัดเข้าไป โดยใช้ความดันสูง และทำที่อุณหภูมิ 120-210 องศาเซลเซียส ทำให้พันธะคู่ในกรดไขมันไม่อิ่มตัวกลายเป็นพันธะเดี่ยว ซึ่งจะกลายเป็นกรดไขมันอิ่มตัว กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่พบมากที่สุด ได้แก่ กรดโอเลอิก กรดไขมันไม่อิ่มตัวพบมากในน้ำมันจากพืช (27)

ไขมัน (lipid) คือ สารชีวโมเลกุลที่ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ไขมันประกอบด้วยธาตุ 3 ชนิด ได้แก่ คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เช่นเดียวกับคาร์โบไฮเดรตและโปรตีน แต่มีออกซิเจนน้อยกว่า โดยไขมันและน้ำมันมีหมู่ฟังก์ชันเหมือนเอสเทอร์ จัดเป็นสารประเภทเอสเทอร์ชนิดหนึ่งได้ ไขมันแบ่งตามลักษณะทางเคมีได้ 2 ประเภท คือ

1. ไขมันธรรมดา (simple lipid) เป็นไขมันที่ประกอบขึ้นด้วยกรดไขมันกับแอลกอฮอล์ แบ่งได้ดังนี้

1.1 ไขมันแท้ (true fat) หรือกลีเซอไรด์ (glyceride) ประกอบด้วยกลีเซอรอลกับกรดไขมัน โดยทั่วไปจะอยู่ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ ประกอบด้วย กรดไขมัน 3 โมเลกุล และกลีเซอรอล 1 โมเลกุล

1.2 ขี้ผึ้ง (wax) ประกอบด้วยกรดไขมันและแอลกอฮอล์ที่ไม่ใช่กลีเซอรอล

1.3 สเตอรอลและเอสเทอร์สเตอรอล (sterols and ester sterols) สำหรับสารทั้งสองนี้จัดเป็นอนุพันธ์ของcyclopentanoperhydrophenanthrene (steroid) nucleus ที่สามารถสร้างเป็นเอสเทอร์ได้เมื่อรวมตัวกับกรดไขมัน แต่โดยปกติสเตอรอลอิสระมีจำนวนมากกว่าเอสเทอร์ ตัวอย่างของสเตอรอล เช่น cholesterol พบมากในสัตว์ β-sitosterol พบมากในพืช และ ergosterol พบในฟังไจ

2. ไขมันเชิงประกอบ (compound lipid) เป็นไขมันที่ประกอบด้วยไขมันธรรมดากับสารอื่น ๆ มี 3 ประเภท คือ

2.1 ฟอสโฟลิปิด (phospholipid) คือ ไขมันธรรมดาที่อยู่รวมกับฟอสเฟต

2.2 ไกลโคลิปิด (glycolipid) คือ ไขมันธรรมดาที่อยู่รวมกับคาร์โบไฮเดรต

2.3 ไลโปโปรตีน (lipoprotein) คือ ไขมันธรรมดาที่อยู่รวมกับกรดอะมิโนหรือโปรตีน สำหรับไขมันมักพบในสัตว์ ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัวมากกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น ไขมันวัว ส่วนน้ำมันเป็นของเหลวมักพบในพืช ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากกว่าอิ่มตัว เช่น น้ำมันดอกทานตะวัน โดยคุณสมบัติของไขมันมีจุดเดือดสูงกว่าน้ำมัน ไม่ละลายน้ำ และละลายได้ดีในตัวทำละลายที่ไม่มีน้ำ เช่น เบนซีน (27)

สารซักฟอก (detergents) เป็นสารที่มีคุณสมบัติลดค่าแรงตึงผิวได้ชนิดหนึ่ง เนื่องจากมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยส่วนที่มีขั้วและส่วนที่ไม่มีขั้วอยู่ในโมเลกุลเดียวกัน โดยส่วนที่มีขั้ว เรียกว่า polar head และส่วนที่ไม่มีขั้วมักจะเป็น hydrocarbon chain เรียกว่า tail เวลาที่สารลดแรงตึงผิวเหล่านี้อยู่ในน้ำมันจะเรียงตัวกันในรูปแบบที่ส่วน polar head จะหันออกไปสร้าง hydrogen bonds กับโมเลกุลของน้ำ และนำด้าน hydrocarbon tail หันเข้าหากัน การเรียงตัวของสารลดแรงตึงผิวในน้ำนี้จะเป็นรูปทรงกลมคล้าย ๆ ลูกบอล เรียกว่า micelle โดยแต่ละ micelle ประกอบไปด้วยโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวหลาย ๆ ตัว การเรียงตัวเช่นนี้ทำให้สารลดแรงตึงผิวนั้นสามารถละลายได้ดีทั้งในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ คุณสมบัติของสารซักฟอกจะดึงโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ เช่น ไขมันออกมาไว้ในแกนของ micelle และลดแรงตึงผิวของน้ำได้ (28)

เอนไซม์ไลเปส (lipase) หมายถึง เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาทั้งการย่อยสลายและการสังเคราะห์พันธะเอสเทอร์ของไตรกลีเซอร์ไรด์ ซึ่งมีกรดไขมันสายยาวเป็นส่วนประกอบ เช่น ไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) ได้ผลิตผลของปฏิกิริยาเป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล หรือในทางกลับกัน เอนไซม์ไลเปสนี้สามารถเร่งปฏิกิริยาระหว่างกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระให้ได้ผลผลิตเป็นไตรเอซิลกลีเซอรอล และสังเคราะห์เอซิลกลีเซอรอลโดยปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) จากกรดไขมันและกลีเซอรอลซึ่งเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับ หรือเกิดการแลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่างเอสเทอร์ชนิดต่าง ๆ (transesterification) เอนไซม์ไลเปสแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ตามความจำเพาะต่อสับสเตรต ได้แก่

1. ความจำเพาะต่อกรดไขมัน (group specific) เอนไซม์ไลเปสมีระดับของความจำเพาะต่อกรดไขมัน เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica* จะมีความจำเพาะต่อกรดไขมันสายโซ่สั้นมากกว่าสายโซ่ยาว

2. ความจำเพาะต่อตำแหน่ง (position specific) เอนไซม์ไลเปสโดยทั่วไปมักมีความจำเพาะต่อตำแหน่งโดยเฉพาะต่อตำแหน่งที่ 1 และ 3 (1, 3-specific lipase) ของไตรกลีเซอไรด์

3. ไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อตำแหน่ง (non-position specific) หมายถึง เอนไซม์ไลเปสที่เข้าทำปฏิกิริยากับไขมันได้อย่างไม่เจาะจง จะเป็นตำแหน่งที่ 1, 2 หรือ 3 ของไตรกลีเซอไรด์ก็ได้ (29)

1.5 สมมติฐานของการวิจัย

1.5.1 สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จากตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมันและตัวอย่างน้ำเสีย

1.5.2 แบคทีเรียที่คัดแยกได้สามารถใช้ของเสียจากกระบวนการกลั่นน้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้

1.5.3 ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน สภาพความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเชื้อ และอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อปริมาณเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้

1.5.4 อุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้

1.5.5 สารเคมีและตัวทำละลายอินทรีย์มีผลต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้

1.5.6 เอนไซม์ไลเปสมีความจำเพาะต่อสับสเตรตชนิดต่าง ๆ

1.5.7 สารซักล้างทั้งชนิดเหลวและชนิดผงมีผลต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส

1.5.8 อุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อประสิทธิภาพในการซักล้างของเอนไซม์ไลเปส

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ได้แบคทีเรียจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันและตัวอย่างน้ำเสียที่มีความสามารถสูงในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

1.6.2 ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้

1.6.3 การนำของเสียจากกระบวนการกลั่นน้ำมันมาศึกษาการผลิตเอนไซม์ เป็นการช่วยลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ และช่วยรักษาสภาพแวดล้อม รวมทั้งสามารถนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมได้

1.6.4 ได้เอนไซม์ไลเปสที่มีคุณสมบัติทนต่อสภาวะอุณหภูมิสูง ๆ หรือทนต่อสภาวะความเป็นกรด-ด่างสูง สามารถนำเอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมสารซักล้างได้

1.6.5 ผลการทดลองทางด้านการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์จะเป็นแหล่งข้อมูลพื้นฐานสำคัญต่อการศึกษาการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ และการศึกษาด้านอื่น ๆ เช่น การนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้หรือเอนไซม์ไลเปสไปประยุกต์ใช้ทางด้านบำบัดน้ำเสีย ซึ่งเป็นแนวทางสำคัญในการศึกษาต่อไปอุตสาหกรรมอื่น ๆ

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสหรือกลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (glycerol ester hydrolase) หรือไตรเอซิลกลีเซอรอลเอซิลไฮโดรเลส (EC 3.1.1.3) (30) จัดเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์เป็นกลีเซอรอล กรดไขมัน และส่วนประกอบกลีเซอไรด์ โดยที่เอนไซม์ไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายตรงพันธะเอสเทอร์ที่พันธะระหว่างกรดโมเลกุลยาวกับกลีเซอรอลของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ เอนไซม์ไลเปสจะทำปฏิกิริยาดังกล่าวเมื่อไตรกลีเซอไรด์อยู่ในสภาพสัมผัสของน้ำและน้ำมัน (oil-water interface) (31, 4, 32)

แหล่งของเอนไซม์ไลเปสพบทั้งในสัตว์ พืช แบคทีเรีย และรา โดยในสัตว์พบในน้ำนมและตับอ่อน (pancreas) เอนไซม์ไลเปสจากพืชพบในเมล็ดที่กำลังงอก เช่น เมล็ดข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ข้าวไรย์ ฝ้าย ถั่วเหลือง และละหุ่ง เป็นต้น เอนไซม์ไลเปสจากพืชและสัตว์มีความเสถียรต่ำกว่าจุลินทรีย์และมีคุณสมบัติแตกต่างกัน สำหรับเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากแบคทีเรียจะพบทั้งที่สร้างอยู่ในเซลล์และที่ขับออกมานอกเซลล์ โดยเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากเชื้อราส่วนมากจะสร้างแล้วขับออกนอกเซลล์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารเพาะเชื้อ ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส เช่น *Pseudomonas* sp. KWI-56 (33), *P. aeruginosa* EF2 (34), *P. putida* (35), *Bacillus subtilis* DR8806 (36) และ *Stenotrophomonas maltophilia* CGMCC 4254 (37) เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์มีข้อดีกว่าเอนไซม์ไลเปสจากพืชและสัตว์ เนื่องจากจุลินทรีย์เติบโตได้รวดเร็ว และเลี้ยงง่ายกว่าสัตว์ ไม่ต้องใช้พื้นที่มาก และไม่ขึ้นกับฤดูกาล นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตได้โดยวิธีปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์ (38)

ในปี ค.ศ. 1999 Bradoo et al. (39) พบเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ทนกรดและอุณหภูมิสูงจากแหล่งต่าง ๆ เช่น กองใบไม้ ดิน และน้ำมันจากโรงงานอุตสาหกรรมในประเทศอินเดีย ซึ่งเชื้อดังกล่าว คือ *B. stearothermophilus* SB-1 และ *B. licheniformis* SB-3 มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 3 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังได้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากดินในเขตหนาว โดยผลจากการจัดจำแนกเชื้อพบว่า คือ *Acinetobacter* sp. strain no.6 ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสที่ย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ เช่น น้ำมันถั่วเหลืองได้ 60 เปอร์เซ็นต์ (ความเข้มข้นเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อ

ปริมาตร)) หลังจากเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อ LB medium ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

Fadiloglu and Erkman (40) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* โดยใช้อาหารที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน พบว่าอาหารที่มีน้ำมันมะกอก สารสกัดจากยีสต์ รวมทั้งเพปโตน มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุด คือ 5.58 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และการใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้การผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับการไม่ใช้น้ำมันมะกอก และยังทำให้มวลชีวภาพสูงด้วย มีการนำ *Acinetobacter* sp. strain SOD-1 มาใช้ย่อยสลายน้ำมันสลัด และพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายไขมันของแบคทีเรียชนิดนี้ ได้แก่ ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นของฟอสเฟตสูง และความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (41)

นอกจากนี้ Matsumiya et al. (42) ได้ทำการแยกเชื้อจากสิ่งแวดล้อมหลายแห่ง พบเชื้อ *Burkholderia* sp. DW2-1 สามารถย่อยสลายน้ำมันสลัด น้ำมันมะกอก น้ำมันงา และไขมันวัวได้ 96.7, 92.3, 90.0 และ 77.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่สามารถย่อยสลายได้ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC) ซึ่งสารที่ย่อยสลายได้นั้น ได้แก่ ไดเอซิลกลีเซอรอล (diacylglycerol) โมโนเอซิลกลีเซอรอล (monoacylglycerol) และกรดไขมัน โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์ไลเปสละลายได้ดีในน้ำแต่ไม่สามารถละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์โดยทั่วไปจะทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 5.6-8.5 และมีความคงตัวสูงในช่วงพีเอชที่เป็นกลาง และทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30 - 40 องศาเซลเซียส

ประเภทของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ซึ่งแบ่งตามความจำเพาะของกิจกรรมต่อตำแหน่งบนกลีเซอไรด์ออกเป็น 3 กลุ่ม (31, 32)

กลุ่มที่ 1 เอนไซม์ไลเปสที่กิจกรรมไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (nonspecific lipase) เอนไซม์ไลเปสในกลุ่มนี้ไม่มีความจำเพาะในการย่อยกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ แต่พบว่าสามารถย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้อย่างสมบูรณ์ ได้เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล โดยจะพบไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) หรือโมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) เป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสกลุ่มนี้ เช่น *C. cylindracae*, *Corynebacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus*

กลุ่มที่ 2 เอนไซม์ไลเปสที่กิจกรรมมีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (1,3-specific lipase)

เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีความจำเพาะต่อการย่อยกรดไขมันบนตำแหน่งที่ 1 และ 3 ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งจะย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้เป็นผลิตภัณฑ์ คือ 1,2(2,3)-diglyceride และ 2-monoglyceride เนื่องจากว่า 1,2(2,3)-diglyceride และโดยเฉพาะ 2-monoglyceride นั้นเป็นไขมันที่ไม่คงตัว เมื่อถูกบ่มเป็นระยะเวลานานจะเกิด acyl migration ได้เป็น 1,3-diglyceride และ 1(3)-monoglyceride ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเอนไซม์ดังกล่าวเข้าไปย่อยสลายจะเกิดเป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล เอนไซม์ในกลุ่มนี้ผลิตโดยเชื้อราสายพันธุ์ *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus* และ *Rhizopus* sp.

กลุ่มที่ 3 เอนไซม์ไลเปสที่กิจกรรมมีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (fatty acid specific lipase)

เอนไซม์กลุ่มนี้ย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ยกเว้นเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Geotrichum candidum* ที่จะย่อยไตรกลีเซอไรด์ที่มี cis-double bond ตรงตำแหน่งที่ 9 ได้ดี แต่สำหรับกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวที่ไม่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่งที่ 9 นั้น จะเกิดการย่อยสลายได้ไม่ดี เอนไซม์ไลเปสพวกที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์จะมีการ esterify (reverse hydrolysis) ระหว่างที่มีการย่อยสลาย ขณะที่เอนไซม์ไลเปสชนิดที่ไม่มีความจำเพาะจะไม่มีการ reverse hydrolysis จึงทำให้เอนไซม์ไลเปสพวกที่ไม่มีความจำเพาะสามารถย่อยสลายสับสเตรตได้เร็วกว่าพวกที่มีความจำเพาะ (43)

นอกจากนี้ Macrae (32) ยังได้แบ่งประเภทของเอนไซม์ไลเปสตามความจำเพาะของกิจกรรมต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ โดยอาศัยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นเอนไซม์ไลเปสที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสพันธะเอสเทอร์ในโมเลกุลของกลีเซอไรด์ กลุ่มที่สองเป็นเอนไซม์ที่เร่งการสังเคราะห์สารประกอบเอซิลกลีเซอรอล (acylglycerol) ต่าง ๆ การสังเคราะห์สารต่าง ๆ ที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส เรียกว่า ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชั่น (transesterification) ซึ่งจะเกิดขึ้นใน 4 รูปแบบ คือ เกิดขึ้นระหว่างเอสเทอร์กับกรดไขมันอิสระ (acidolysis) เอสเทอร์กับแอลกอฮอล์ (alcoholysis) เอสเทอร์กับเอสเทอร์ (ester exchange) และเอสเทอร์กับกรดอะมิโน (aminolysis) ซึ่งปฏิกิริยาเหล่านี้นั้นมีความสำคัญมากในการปรับปรุงคุณสมบัติของไขมันหรือน้ำมัน (44) รูปแบบของปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ทั้งสองแบบนี้ต่างก็มีความสำคัญในอุตสาหกรรม แต่ในกรณีของการบำบัดน้ำเสียแล้วนั้นต้องการเอนไซม์ไลเปสที่ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเท่านั้น (45)

2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

จุลินทรีย์จะเจริญได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอาหารที่เหมาะสม ซึ่งจะมีความแตกต่างกันในจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ โดยทั่วไปปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ วิตามิน ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเชื้อ อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง และออกซิเจน

1. ผลของแหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นองค์ประกอบที่มีความสำคัญในการเจริญ การสร้างองค์ประกอบเซลล์ และผลิตภัณฑ์จากเซลล์ ซึ่งโดยทั่วไปใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 50-55 เปอร์เซ็นต์ ในการสังเคราะห์เซลล์ (46) การเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนและการใช้แหล่งคาร์บอนในปริมาณที่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์เป็นสิ่งสำคัญในกระบวนการหมักเพื่อผลิตเซลล์ (47) การศึกษาจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสส่วนใหญ่จะเน้นผลผลิตในรูปของเอนไซม์มากกว่าผลผลิตที่เป็นตัวเซลล์ แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในสูตรอาหารเพาะเชื้อจึงเป็นแหล่งที่ส่งเสริมให้มีการผลิตเอนไซม์ได้สูง ได้แก่ น้ำมันและไขมันที่ได้จากพืชหรือสัตว์ต่าง ๆ เช่น น้ำมันถั่วเหลือง (46) น้ำมันมะกอก และน้ำมันปาล์ม (10, 48)

ตัวอย่างการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอน เช่น การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. โดยใช้น้ำมันมะกอก ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เติมลงในอาหารเพาะเชื้อ พบว่ามีผลในการชักนำให้ *Bacillus* sp. สร้างเอนไซม์ไลเปส (48) และในปี ค.ศ. 1992 Papaparaskevas et al. (49) รายงานว่าการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Rhodotorula glutinis* โดยผลจากการทดลองพบว่า น้ำมันปาล์มที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ส่งผลชักนำในการสร้างเอนไซม์ไลเปสมากกว่าน้ำตาลฟรุคโตสในอาหารเพาะเชื้อถึง 12 เท่า Haba et al. (50) ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยใช้น้ำมันมะกอกและน้ำมันจากดอกทานตะวันที่ได้ผ่านการนำไปทอดแล้วมาเป็นส่วนผสมในอาหารเพาะเชื้อ ซึ่งจากการศึกษาสามารถคัดเลือกแบคทีเรียและยีสต์ 47 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส และพบว่าเชื้อทั้ง 47 สายพันธุ์ โดยทั่วไปจะเป็น *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Candida*, *Rhodococcus* และ *Staphylococcus* โดยที่ *Pseudomonas* sp. 3AT มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด คือ 2,748 ยูนิตต่อลิตร และ *P. aeruginosa* ATTC 111 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 1,703.8 ยูนิตต่อลิตร

D'Annibale et al. (51) ศึกษาการใช้ของเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันมะกอก เพื่อใช้เป็นสับสเตรตสำหรับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส ซึ่งพบว่าสามารถใช้เป็นแหล่งอาหารในการเจริญของเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ โดยในการทดลองได้ทำการคัดแยกจุลินทรีย์สายพันธุ์

Geotrichum candidum (NRRL Y-552 และ Y-553), *R. arrhizus* (NRRL 2286 และ ISRIM 383), *R. oryzae* (NRRL 6431), *A. oryzae* (NRRL 1988 และ 495), *A. niger* (NRRL 334), *C. cylindracea* (NRRL Y-17506) และ *Penicillium citrinum* (NRRL 1841 และ 3754, ISRIM 118) บนอาหารเพาะเชื้อดังกล่าว ผลจากการทดลองพบว่าจุลินทรีย์ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในของเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันมะกอก และสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ โดย *C. cylindracea* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดของแหล่งไนโตรเจน และการเพิ่มน้ำมันมะกอกลงในอาหารดังกล่าวมีผลในการชักนำการผลิตเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น โดย *C. cylindracea* ผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุดถึง 9.23 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อมีการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2.4 กรัมต่อลิตร และน้ำมันมะกอก ความเข้มข้น 3.0 กรัมต่อลิตร

Abdelmoez et al. (19) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *C. rugosa* ATCC 14830 โดยการใช้ของเสียทางอุตสาหกรรม จำนวน 2 แหล่ง คือ ของเสียจากกระบวนการกลั่นน้ำมันและของเสียจากกระบวนผลิตสารเคมีอุตสาหกรรมที่ผลิตจากไขมันและน้ำมันจากพืชน้ำมัน (อุตสาหกรรมโอลิโอเคมี) ซึ่งผลจากการศึกษาพบว่า *C. rugosa* ATCC 14830 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงถึง 7 และ7.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ของเสียจากกระบวนการกลั่นน้ำมันและของเสียจากอุตสาหกรรมโอลิโอเคมีเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการผสมของเสียทางอุตสาหกรรมทั้ง 2 แหล่ง และน้ำมันมะกอกเข้าด้วยกัน เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนจะส่งผลให้ *C. rugosa* ATCC 14830 ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงถึง 10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

พิมพิกา (52) ศึกษาแบคทีเรียในดินที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยทำการเก็บตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน จากนั้นทำการแยกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี pour plate บนอาหารเพาะเชื้อที่มีน้ำมันพืช ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) และมี neutral red ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นอินดิเคเตอร์ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีไอโซเลตที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ THb3, THb5 และ THb11 เนื่องจากไอโซเลตเหล่านี้สามารถย่อยน้ำมันพืชได้กรดไขมัน ดังนั้นจึงเปลี่ยนสีของ neutral red จากสีส้มเป็นสีแดง เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากไอโซเลตทั้งสามด้วยวิธี colorimetry โดยใช้พารา-ไนโตรฟีนิลเอสเทอร์ (*p*-nitrophenyl ester) เป็นสับสเตรต พบว่าเอนไซม์ไลเปสจากไอโซเลต THb11 มีกิจกรรมของเอนไซม์มากที่สุด (127.027 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ส่วน THb3 และ THb5 มีกิจกรรมของเอนไซม์เป็น 112.162 และ 102.703 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จันทนา (53) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากผลปาล์มน้ำมันที่มีการเน่าเสีย โดยทำการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากผลปาล์มน้ำมันที่เน่าเสียได้ด้วย selective medium โดยใช้เทคนิค double layer บ่มเพาะไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ามีโคโลนีที่มีโซนใส จำนวน 56 ไอโซเลต เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 56 ไอโซเลต มาศึกษาประสิทธิภาพการผลิตกรดในอาหารเพาะเชื้อเหลว palm oil liquid medium ที่มี bromocresol purple (BCP) พบว่ามีแบคทีเรีย จำนวน 14 ไอโซเลต คือ UTCC02, UTCC03, UTCC06, UTCC09, UTCC10, UTCC 11, UTCC12, UTCC13, UTCC14, UTCC20, UTCC52, UTCC53, UTCC55 และ UTCC56 ที่สามารถผลิตกรดได้ภายในเวลา 48 ชั่วโมง จึงได้นำแบคทีเรียทั้ง 14 ไอโซเลตนี้ มาศึกษาประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันปาล์มของเอนไซม์ไลเปส และได้เลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ที่สามารถทำให้เกิดโซนใสภายใน 24 ชั่วโมง และมีโซนใสกว้างมาก 3 อันดับแรก บนอาหารทดสอบทุกชนิด ได้แก่ แบคทีเรียไอโซเลต UTCC53, UTCC55 และ UTCC56 เมื่อนำเอนไซม์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียทั้งหมด 3 ไอโซเลต ไปศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้น้ำมันมะกอกเป็นสับสเตรต พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต UTCC56 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด คือ 2,708.33 ยูนิตต่อลิตร ลำดับถัดมา คือ UTCC53 และ UTCC 55 ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 1,875 ยูนิตต่อลิตร และ 1,666.67 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ

2. ผลของแหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยถูกนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิก จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้ไนโตรเจนแตกต่างกัน บางสายพันธุ์สามารถใช้ไนโตรเจนในรูปของสารอนินทรีย์ได้ ขณะที่บางสายพันธุ์สามารถใช้ไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ได้ดี ดังนั้นในการผลิตไลเปสให้ได้ปริมาณสูงสุด จึงต้องเลือกใช้ไนโตรเจนให้เหมาะสมกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ แหล่งไนโตรเจนที่เป็นอาหารเชิงซ้อน (complex media) ได้ถูกนำมาใช้ในอาหารสำหรับผลิตเอนไซม์ไลเปสมากขึ้น เช่น corn steep liquor และกากถั่วเหลือง เนื่องจากช่วยในการกระตุ้นให้มีการผลิตไลเปส แต่กิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากแหล่งไนโตรเจนเหล่านี้ยังน้อยกว่าการใช้เพปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ดังเช่น Iizumi et al. (33) ศึกษาการผลิตไลเปสที่ทนอุณหภูมิสูงจาก *Pseudomonas* sp. KW1-56 โดยใช้อาหารเพาะเชื้อที่ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนที่เป็นเพปโตน ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และสารสกัดจากยีสต์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นอกจากนี้การใช้ยูเรียและแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ กลับมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ไลเปส โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเพาะเชื้อที่ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ได้ดี แต่จากการศึกษาของ Papaparaskevas et al. (49) พบว่า *R. glutinis* ใช้

แอมโมเนียมฟอสเฟตในการผลิตไลเปสได้ดีกว่า และ Cordenons et al. (54) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *A. calcoaceticus* โดยใช้กรดอะมิโนและทริปโตน ซึ่งพบว่าแหล่งไนโตรเจนทั้งสองแหล่งช่วยส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้ดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แอมโมเนียม สารสกัดจากยีสต์ และเพปโตน อย่างไรก็ตามปริมาณการผลิตเอนไซม์ไลเปสและความคงทนของเอนไซม์สามารถปรับปรุงโดยการใช้แอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจน

3. ผลของความเป็นกรด-ด่าง

ความเป็นกรด-ด่าง มีผลโดยตรงต่ออัตราการเจริญและระบบเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ โดยอัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะค่อย ๆ ลดลงเมื่อความเป็นกรด-ด่างสูงหรือต่ำกว่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์จะมีช่วงของความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญแตกต่างกัน บางสายพันธุ์เจริญได้ดีในสภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่างต่ำ ประมาณพีเอช 2-5 (acidophile) บางสายพันธุ์เจริญได้ดีที่ค่าพีเอชประมาณ 9-11 (alkalophile) แต่โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์ส่วนมากจะเจริญได้ดีที่สุดที่ความเป็นกรด-ด่างในระดับกลาง ๆ (neutralophile) หรือพีเอชประมาณ 7 (55) ดังนั้นการที่จะให้เชื้อมีอัตราการเจริญได้สูงและคงที่จำเป็นต้องมีการควบคุมความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเชื้อให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม

4. ผลของอุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญและการเกิดกิจกรรมของเซลล์ โดยเซลล์จะมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิของการเพาะเลี้ยง อุณหภูมิจะมีผลต่อปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์โดยอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะเร่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมีในเซลล์เพิ่มขึ้น แต่เมื่ออุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้เอนไซม์หรือโปรตีนภายในเซลล์เสียสภาพการทำงานได้ ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์จึงเป็นอุณหภูมิที่เร่งให้เกิดปฏิกิริยาเคมีในเซลล์ได้สูงสุด โดยไม่ทำให้โปรตีนหรือเอนไซม์เสียคุณสมบัติไป อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์จะแตกต่างกันออกไป บางสายพันธุ์เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส (psychrophiles) บางสายพันธุ์เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิปานกลางประมาณ 25-45 องศาเซลเซียส (mesophiles) และบางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส (thermophiles) ดังนั้นการควบคุมอุณหภูมิระหว่างการเพาะเลี้ยงให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมกับชนิดของจุลินทรีย์จึงเป็นสิ่งสำคัญ

5. ผลของไอออนของโลหะและสารเคมี

ไอออนของโลหะมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของอัตราการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย และปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ของเอนไซม์ไลเปส รวมทั้งมีผลต่อการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของกิจกรรมเอนไซม์ เช่น Kgardoputo and Ruben (56) พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *B. thermoleovorans* ถูกยับยั้งด้วยไอออนของเหล็ก (Fe^{2+}) ไอออนของโลหะบางชนิดมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย เช่น ไอออนของแคลเซียม (Ca^{2+}) ไอออนของโซเดียม (Na^{+}) และไอออนของแมกนีเซียม (Mg^{2+}) จัดเป็นไอออนที่เร่งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ไลเปส ส่วนใหญ่ไอออนของแคลเซียมมักจะเป็นไอออนที่เร่งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ โดยไอออนของแคลเซียมจะช่วยในการเปลี่ยนรูปร่างของเอนไซม์ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้น เพิ่มการดูดซึมของเอนไซม์ไลเปสที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมัน และยังช่วยกำจัดกรดไขมันออกจากผิวสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมัน Janssen et al. (10) รายงานถึงกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. ที่ชอบอุณหภูมิสูง เพิ่มขึ้นหลายเท่าในอาหารเพาะเชื้อที่เติมไอออนของแมกนีเซียม ไอออนของเหล็ก และไอออนของแคลเซียม

2.3 การใช้เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ในทางอุตสาหกรรม

2.3.1 ส่วนผสมของสารซักล้าง

ในการผลิตสารซักล้างเอนไซม์ไลเปสที่ใช้มักมีความจำเพาะต่อสับสเตรตต่ำ แต่มีความคงทนต่อสภาพที่เป็นด่าง ทนต่อสารลดแรงตึงผิว (surfactants) และอุณหภูมิสูง เอนไซม์ที่มีลักษณะตามที่ต้องการนี้เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม “surfactant lipase” นอกจากนี้ยังสามารถทำงานร่วมกับเอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส และโปรติเอสได้ด้วย (57-59) ดังนั้นเอนไซม์ในสารซักล้างจึงต้องทนต่อด่างและความร้อน เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas alkaligenes* ทำงานได้ดีที่พีเอช 7.0-11.0 อุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส มีความคงทนต่อสารลดแรงตึงผิวที่เป็นทั้ง anionic และ nonionic ในสภาพการซักล้าง (58)

2.3.2 การสร้างกลิ่นรสในอุตสาหกรรมนมและผลิตภัณฑ์จากนม

มีการใช้เอนไซม์ไลเปสเพื่อปรับปรุงกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์จากนมต่าง ๆ เช่น เนยแข็ง เนยเหลว มาการีน และนอกจากนี้ยังใช้ในการปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของนม ซึ่งเป็นผลมาจากไขมัน โปรตีน และน้ำตาลแลคโตสที่มีอยู่ในน้ำนม นอกจากนี้ยังได้นำเอนไซม์ไลเปสมาใช้ร่วมกับ

เอนไซม์โปรติเอส ในการตกตะกอนนม ปรับปรุงกลิ่นรสของนม และยังได้มีการนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้ในขบวนการผลิตครีมเทียมให้มีกลิ่นรสที่ดีขึ้น (60)

2.3.3 การย่อยสลายไขมัน

เอนไซม์ไลเปสจะสามารถย่อยสลายไขมันหรือน้ำมันให้ได้เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล ซึ่งเป็นตัวสำคัญในการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม เช่น การนำกรดไขมันมาใช้ในการผลิตสบู่ โดยเอนไซม์ไลเปสที่ใช้สำหรับวัตถุประสงค์นี้ได้มาจาก *C. rugosa* (61) และในปัจจุบันได้มีการสนใจในการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตกรดไขมันและกลีเซอรอลในทางอุตสาหกรรมมากขึ้น โดยได้มีการใช้เอนไซม์ไลเปสที่สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงในการย่อยสลายไขมันจากสัตว์ซึ่งมีจุดหลอมเหลวสูง (62)

2.3.4 อุตสาหกรรมเครื่องหนัง

ในกระบวนการผลิตเครื่องหนังจะมีขั้นตอนการเอาไขมันส่วนที่เหลือ และโปรตีนที่เสียรูปที่ติดอยู่บริเวณหนังและขนออก ซึ่งการกำจัดไขมันและโปรตีนออกจากหนังสัตว์โดยวิธีการทางเคมีจะมีประสิทธิภาพต่ำ (30) แต่ในปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์ไลเปสกับเอนไซม์โปรติเอสมาใช้ในการกำจัดไขมันและโปรตีนออกไปจากหนังสัตว์ (63)

2.3.5 การบำบัดของเสีย

ได้มีการนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้ประโยชน์ในการบำบัดของเสียในขบวนการบำบัดแบบให้อากาศ ซึ่งในกระบวนการบำบัดของเสียแบบให้อากาศจะเกิดแผ่นคราบไขมันบริเวณผิวสัมผัสของเสียกับอากาศทำให้การถ่ายเทอากาศเป็นไปได้ไม่ดี ซึ่งในอดีตได้ทำการแก้ไขปัญหานี้โดยการตักเอาคราบของไขมันออก แต่พบว่าการใช้เอนไซม์ไลเปสนั้นจะให้ผลที่ดีกว่า โดยเอนไซม์ไลเปสที่ใช้ในการบำบัดของเสียนี้ได้จาก *C. rugosa* ซึ่งต่อมาได้มีการผลิตไลเปสจากเชื้อตัวนี้ในระดับอุตสาหกรรมโดยมีชื่อทางการค้าว่า Lipase-MY และได้ถูกนำไปใช้ในประเทศอเมริกา (30, 63) นอกจานี้ยังอาจนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้ในการควบคุมการย่อยสลายของเสียในกระบวนการไร้อากาศได้ (64)

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส

กิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสมีผลมาจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

2.4.1 ความเป็นกรด-ด่าง

เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์นั้นมีทั้งที่สามารถทำงานได้ดีในสภาวะต่าง ๆ กัน เช่น เอนไซม์ไลเปสที่ได้จาก *P. stutzeri* A1501 (65) ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง สำหรับเอนไซม์ไลเปสที่ได้จาก *Aneurinibacillus thermoaerophilus* สายพันธุ์ HZ (66) สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลาง และเอนไซม์ไลเปสที่ได้จาก *Geobacillus stearothermophilus* PTL38 (67) ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด ส่วนใหญ่ไลเปสที่ได้จากแบคทีเรียทนร้อนมักจะเป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลาง และค่อนไปทางด่าง (48) ส่วนเสถียรภาพต่อค่าความเป็นกรด-ด่างของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์นั้น พบว่าส่วนใหญ่จะมีเสถียรภาพในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างที่กว้าง ยกตัวอย่างเช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Aneurinibacillus thermoaerophilus* สายพันธุ์ HZ พบว่า จะมีความคงตัวในช่วงพีเอช 4.0-9.0 (66)

2.4.2 อุณหภูมิ

เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีกิจกรรมและเสถียรภาพต่ออุณหภูมิที่แตกต่างกัน เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *P. aeruginosa* LST-03 สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (68) เอนไซม์ไลเปสจาก *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 โดยมีกิจกรรมของไลเปสมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (69) เอนไซม์ไลเปสที่ได้จาก *P. aeruginosa* LST-03 หลังจากการบ่ม เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ที่พีเอช 8 เอนไซม์ไลเปส LST-03 มีความคงตัวต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส และถูกยับยั้งเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส (68)

2.4.3 ตัวทำละลายอินทรีย์

นอกจากเอนไซม์ไลเปสจะสามารถทำปฏิกิริยาการย่อยสลายโมเลกุลของไขมันและน้ำมันในสภาวะที่มีน้ำ แต่เอนไซม์ไลเปสยังสามารถทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ และการย้ายหมู่เอสเทอร์ในสภาวะที่มีการควบคุมปริมาณน้ำในปฏิกิริยา ซึ่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ และการย้ายหมู่เอสเทอร์เป็นปฏิกิริยาที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในอุตสาหกรรมต่าง ๆ (70) เพราะจะสามารถสังเคราะห์โมเลกุลชีวรูปที่มีคุณสมบัติทางเคมี และทางกายภาพตามที่ต้องการได้ โดย

การทำปฏิกิริยาในสภาวะที่มีการควบคุมปริมาณน้ำนั้นจะมีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์มาเกี่ยวข้องในการทำปฏิกิริยา ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาถึงผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ ส่วนใหญ่ตัวทำละลายอินทรีย์มักจะลดความยืดหยุ่นในโมเลกุลของเอนไซม์และจะทำให้โมเลกุลของเอนไซม์สูญเสียสภาพธรรมชาติ ซึ่งตัวอย่างของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ไลเปส เช่น เมทานอลจะทำให้เอนไซม์ไลเปสจาก *P. stutzeri* LC2-8 (65), *B. sphaericus* MICC 7542 (71) มีความคงตัวลดลง นอกจากตัวทำละลายอินทรีย์จะทำให้ไลเปสมีความคงตัวลดลง แต่ตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิดก็สามารถเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์ไลเปสได้ เช่น ไอโซออกเทนนั้น พบว่าจะช่วยเพิ่มเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จาก *P. aeruginosa* AAU2 (18), *P. aeruginosa* LST-03 (68)

2.4.4 ไอออนของโลหะ และสารเคมี

ไอออนของโลหะบางชนิดอาจมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย เช่น Mg^{2+}, Ca^{2+}, Cu^{2+}, K^{+} (71) จัดเป็นไอออนที่เร่งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ไลเปส ส่วนใหญ่ Ca^{2+} มักจะเป็นไอออนที่เร่งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ โดยไอออนของแคลเซียมจะช่วยในการเปลี่ยนรูปร่างของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้น โดยการเพิ่มการดูดซึมของเอนไซม์ไลเปสที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมัน (oil-water interface) และยังช่วยขจัดกรดไขมันออกจากผิวสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมัน (72) จากการรายงานเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง คือ *Bacillus* sp. พบว่า Mg^{2+} และ Ba^{2+} เป็นไอออนที่กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไลเปส Cu^{2+} และ Li^{2+} ทำให้การทำงานของเอนไซม์ ไลเปสเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ไอออนของโลหะที่ทำให้การทำงานของเอนไซม์ไลเปสลดลงอย่างช้า ๆ คือ Ba^{2+}, Hg^{2+}, Fe^{3+}, Co^{2+} และ Cd^{2+} ส่วน Zn^{2+} สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส (73) และนอกจากไอออนของโลหะแล้วสารเคมีบางชนิดก็มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสด้วย เช่น ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจาก *P. stutzeri* LC2-8 ส่วน DTT และ β-mercaptoethanol ไม่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส สารลดแรงตึงผิวที่ไม่มีประจุ เช่น Triton X-100 ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเพิ่มขึ้น ในขณะที่ Tween 20 และ Tween 80 พบว่ามีการกระตุ้นที่ความเข้มข้นต่ำ แต่ในทางตรงกันข้ามกัน SDS ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส LC2-8 (65)

2.5 ประเภทของเอนไซม์ในผลิตภัณฑ์ซักผ้า (74)

เอนไซม์ที่มักมีการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ซักผ้ามี 3 กลุ่ม ได้แก่ โปรติเอส อะไมเลส และไลเปส

2.5.1 โปรติเอส

แหล่งผลิตโปรติเอสที่นิยมนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ซักผ้า ได้แก่

1. พืช เช่น ปาเปนในยางมะละกอ และโบรมิเลนในสับปะรด เป็นต้น
2. สัตว์ เช่น เอนไซม์จากตับอ่อนของสัตว์ ซึ่งมีส่วนผสมของทริปซินและไคโมทริปซิน หรือเรนเนทที่สกัดจากกระเพาะลูกวัว
3. จุลินทรีย์ เช่น โปรติเอสจากราและแบคทีเรียบางชนิด

โปรติเอสสามารถทำความสะอาดผลิตภัณฑ์ซักผ้าได้โดยการช่วยย่อยสลายคราบสกปรกที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ เช่น น้ำนม เลือด รอยเปื้อนของอาหารและคราบสกปรกบนเนื้อผ้า เป็นต้น สำหรับคราบเลือดบนเนื้อผ้า เอนไซม์จะย่อยสลายฮีโมโกลบินซึ่งเป็นสารประเภทโปรตีนทำให้เลือดถูกซักล้างออกไปได้ง่าย ในส่วนของคราบสกปรกบนคอเสื้อซึ่งประกอบไปด้วยสิ่งสกปรกจำพวกฝุ่นละอองและไขมันจากต่อมไขมันที่ยึดเกาะอยู่กับเศษเซลล์ผิวหนังที่หลุดออกจากผิวหนัง ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทโปรตีนนั้น โปรติเอสจะย่อยสลายส่วนที่เป็นโปรตีนทำให้ส่วนที่เป็นสิ่งสกปรกอื่น ๆ สามารถหลุดออกจากเนื้อผ้าได้โดยง่าย ด้วยการทำงานร่วมกับสารลดแรงตึงผิวที่เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ซักผ้า

2.5.2 อะไมเลส

อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ช่วยย่อยสลายสารพวกแป้งให้เป็นน้ำตาล มีแหล่งผลิตจากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมแป้งขนมปัง อุตสาหกรรมเบียร์ น้ำส้มสายชู น้ำผลไม้ อุตสาหกรรมทอผ้า อุตสาหกรรมกระดาษ และอุตสาหกรรมการผลิตผลิตภัณฑ์ซักผ้า เป็นต้น ในส่วนของผลิตภัณฑ์ซักผ้านั้น มีการใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่ผลิตจากแบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น *B. subtilis* หรือ *B. amyloliquefaciens* ซึ่งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสนี้สามารถทำงานได้ในช่วงพีเอชระหว่าง 4.5 ถึง 9.0 แต่ทำงานได้ดีที่สุดในช่วงพีเอช 6.5 ถึง 7.5 และในอุณหภูมิการซักที่เหมาะสม คือ 70 ถึง 85 องศาเซลเซียส

2.5.3 ไลเปส

เป็นเอนไซม์ที่ช่วยย่อยสลายไขมัน แหล่งผลิตไลเปสที่สำคัญมาจากตับอ่อนของหมูและจากจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *A. niger* และ *C. cylindracea* เป็นต้น เอนไซม์ชนิดนี้สามารถนำมาใช้ใน

อุตสาหรรมอาหาร เช่น การผลิตเนยแข็ง การผลิตผลไม้แห้ง เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ซักผ้า เพื่อช่วยขจัดสิ่งสกปรกประเภทไขมันบนเนื้อผ้า โดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Pseudomonas* ซึ่งทำงานได้ดีในช่วงพีเอชระหว่าง 7.0 ถึง 8.5 และอุณหภูมิในการซักระหว่าง 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ในการสลายคราบสกปรกขึ้นอยู่กับอุณหภูมิในการซักผ้าและความเข้มข้นของเอนไซม์ ตัวอย่างเช่น ในการซักผ้าที่อุณหภูมิต่ำกว่าค่าที่เหมาะสม ควรเพิ่มปริมาณเอนไซม์ไลเปส เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการซัก

ตัวอย่างการศึกษาเอนไซม์ไลเปสในสารซักล้าง เช่น วุฒิ (9) คัดเลือกเชื้อ *Bacillus* spp. ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีความสามารถในการย่อยน้ำมันปาล์มในสภาวะเป็นด่าง และทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสในการทำงานและเสถียรภาพในสภาวะที่มีสารซักล้างชนิดต่าง ๆ พบว่าจาก *Bacillus* ทั้งหมด จำนวน 27 สายพันธุ์ นั้น *Bacillus* sp. A12 มีศักยภาพสูงสุด ที่ความเข้มข้นของสารซักล้างร้อยละ 1.0 ไลเปสจากเชื้อ A12 สามารถทนต่อสารซักล้างได้ทุกชนิด แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารซักล้างเป็นร้อยละ 5.0 กิจกรรมไลเปสเหลือน้อยกว่าร้อยละ 6.0 ในสารซักล้างชนิดผง P1 (บรีสเพาเวอร์) P2 (แฟ้บเพอร์เฟค) P3 (เปาแฮนด์ฟอร์) และชนิดน้ำ L1 (แฟ้บเพอร์เฟคชนิดน้ำ) และ L4 (โฮม) ขณะที่ไลเปสมีเสถียรภาพสูงในสารซักล้างชนิดน้ำ L2 (ไฟน์ไลน์) L3 (แวนิช) โดยเหลือกิจกรรมมากถึงร้อยละ 11 และ 33 ตามลำดับ เมื่อแช่ไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของ crude lipase คือ ที่พีเอช 10.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีเสถียรภาพต่อพีเอช และอุณหภูมิในช่วงกว้าง ระหว่างพีเอช 6.0-10.0 และอุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และถูกยับยั้งกิจกรรมด้วย PMSF ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ และ EDTA ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และต้องการอิออนโลหะ Ca^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+} และ Co^{2+} สำหรับคืนกิจกรรมของเอนไซม์ ในขณะที่ Cu^{2+}, Fe^{2+} และ Zn^{2+} ไม่ส่งเสริมกิจกรรมเอนไซม์

รุ่งนภา และ สิรารมย์ (75) ศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลตต่าง ๆ คือ MUM 01-2, MUM 01-3, MUM 01-5, MUM 01-6, MUM 02-1, MUM 02-2, MUM 03, NAN 11-1, PA 04-1, PA 04-2, RIM 05-2, S2/5(1), S2/6(1), SA HCU2-J, SA HCU2-9 และ SA HCU2-10 พบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่พีเอช 9.0 มีผลทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต SA HCU2-9 มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงที่สุด ในขณะที่ค่าพีเอช 3.0 และ 5.0 ส่งผลให้ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ลดต่ำลง และจากการศึกษาเสถียรภาพพบว่าเอนไซม์ไลเปสในช่วงพีเอช 5.0-9.0 เอนไซม์ยังคงมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงอยู่ในช่วง 84.95-100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นโครงงานพิเศษนี้จึงมีการศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง

ต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส โดยศึกษาที่ช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง ระหว่างพีเอช 7.0-12.0 เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในสารซักล้างในขั้นต่อไป

Hemachander and Puvanakrishnan (76) ศึกษาประสิทธิภาพการขจัดคราบไขมันในการซักรีด โดยเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Ralstonia pickettii* ผลที่ได้จากการศึกษา พบว่าเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *R. pickettii* ช่วยขจัดคราบไขมันจากผ้า 24-27 เปอร์เซ็นต์ โดยมีการเติมสารทางการค้า 2 ชนิด ได้แก่ “Ariel” และ “Surf Ultra” ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม คือ เอนไซม์ไลเปส 100 ยูนิต อุณหภูมิในการซักล้าง 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และความเข้มข้นของผงซักฟอก เท่ากับ 0.6 เปอร์เซ็นต์

Mamta et al. (77) ศึกษาผลของเอนไซม์ไลเปสจาก *Staphylococcus* sp. เพื่อประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก ซึ่งผลจากการศึกษาเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จาก *S. arlettae* JPBW-1 พบว่าเอนไซม์ไลเปสมีเสถียรภาพที่ดีในการทนต่อสารลดแรงตึงผิว ผงซักฟอกทางการค้า และสารประเภทออกซิไดซิงเอเจนท์ ทั้งนี้ประสิทธิภาพการซักผ้าในขณะที่ใช้เอนไซม์ไลเปส พบว่าเพิ่มขึ้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในผงซักฟอกนอนไอโอนิกจะมากกว่าผงซักฟอกแอนไอโอนิก โดยสภาวะที่เหมาะสม คือ การใช้เอนไซม์ไลเปส 40 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 45 นาที โดยพบว่าสามารถกำจัดน้ำมันได้สูงสุด (62 เปอร์เซ็นต์) จากผ้าฝ้ายสกปรก ผลการวิจัยนี้จึงเป็นแนวทางใหม่ในการใช้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่ทนต่อสภาวะด่างสำหรับสูตรผงซักฟอกที่ปลอดสารเคมี

Xiao et al. (78) ทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะเฉพาะจาก *P. stutzeri* PS59 ซึ่งแยกได้จากแหล่งน้ำมัน Daqing (Heilongjiang PR China) เอนไซม์ไลเปสที่จะทำให้บริสุทธิ์นั้นจะตกตะกอนโดยใช้ ammonium sulphate, dialysis freeze-drying, ion exchange chromatography และ gel filtration chromatography น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไลเปสประมาณ 55 กิโลดาลตัน วัดโดยระบบ SDS-PAGE เอนไซม์ไลเปสจะแสดงกิจกรรมที่เหมาะสมที่พีเอช 8.5 และ 20 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสถูกกระตุ้นโดย metal ions เช่น Ca^{2+} และ Mn^{2+} และสารลดแรงตึงผิว เช่น Tween 80, Tween 20, sodium dodecyl benzene sulfonate และ urea ออกซิไดซิงเอเจนท์ เช่น H_2O_2 และ NaClO พบว่ามีผลกระทบเล็กน้อยต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส นอกจากนี้ตัวทำละลายอินทรีย์นั้นส่วนใหญ่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไลเปสต่อความเฉพาะเจาะจงพื้นผิวในวงกว้างและทำงานร่วมกับเอนไซม์ไลเปสในการมีสารลดแรงตึงผิว ออกซิไดซิงเอเจนท์ และสารเติมแต่งผงซักฟอกอื่น ๆ แสดงให้เห็นการประยุกต์ที่อาจเกิดขึ้นในอุตสาหกรรมการซักรีด

บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 เครื่องมือวิจัย

1. กรรไกร (scissors)
2. กระดาษกรอง Whatman no.1
3. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
4. เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)
5. คลิปหนีบถุงไดอะไลสิส (dialysis clip); Cellu.Sep T2
6. เครื่องเพาะเชื้อแบบเขย่า (shaker); Vision รุ่น VS-2030
7. เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (power supply); Bio-Rad รุ่น PowerPac 300
8. เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง (balance); Mettler รุ่น PJ 3000
9. เครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง (analytical balance); Pioneer รุ่น Item Pa 214
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำ (refrigerated centrifuge); Hermle รุ่น Z32HK
11. เครื่องผสมสาร (vortex mixer); Vortex geniez รุ่น G560E
12. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer); รุ่น Spectro SC
13. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter); Mettler รุ่น Delta 345
14. จานเพาะเชื้อ (Petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร
15. ช้อนตักสาร (spatula)
16. ชุดเครื่องกรอง (membrane filtration)
17. ตะเกียงแอลกอฮอล์
18. ตู้บ่มเชื้อ (incubator); Memmert
19. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (-80 องศาเซลเซียส); Thermo scientific รุ่น 702
20. ถุงไดอะไลสิส (dialysis tubing); Cellu.Sep T2 regenerated cellulose tubular membrane mwco: 6,000-8,000

3.1.1 เครื่องมือวิจัย (ต่อ)

21. แท่งแม่เหล็กกวนสาร (magnetic bar)
22. แท่นให้ความร้อน (hot plate); Memmert รุ่น Typwnb 29
23. แท่นกวนสาร (stirrer); Barnsteao/theriiolyne
24. บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 100, 250, 600 และ 1,000 มิลลิลิตร
25. ปิเปตต์ (pipette) ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
26. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 1-10, 10-100 และ 100-1,000 ไมโครลิตร; Biorad
27. หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 13 ×100 และ 16 ×100 มิลลิลิตร
28. หลอดพลาสติกใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสง (cuvette)
29. หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
30. หม้อนึ่งความดัน (autoclave); Hirayama รุ่น Ha-300 MII
31. ห่วงถ่ายเชื้อ (loop)
32. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath); Memmert รุ่น Sv1422
33. Bio-Rad Mini Protean II Apparatus; Bio-Rad
34. Pipette tip ขนาด 1-10, 10-100 และ 100-1,000 ไมโครลิตร

3.1.2 อาหารเพาะเชื้อและสารเคมี

1. กลีเซอรอล (glycerol); Fisher sciencific
2. กลีเซอริลไตรบิวไทเรท ($C_{15}H_{26}O_6$); Sigma
3. ไกลซีน (glycine); Merck
4. กัมอะราบิค (gum arabic); Sigma
5. คลอโรฟอร์ม (chloroform); Merck
6. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$); Ajax Finechem
7. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$); Ajax Finechem
8. แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$); Ajax Finechem
9. โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2$); Ajax Finechem
10. เจลาติน (gelatin); Biomark
11. ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$); Ajax Finechem
12. ซีเซียมคลอไรด์ ($CsCl_2$); Ajax Finechem

3.1.2 อาหารเพาะเชื้อและสารเคมี (ต่อ)

13. โซเดียมคลอเรท ($C_{24}H_{39}NaO_5$); Merck
14. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl); Ajax Finechem
15. โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต (SDS); Ajax Finechem
16. โซเดียมไฮโปคลอไรด์ (sodium hypochlorite); T.J. Baker
17. ไดไทโอทรีไอทอล (dithiothreitol, DTT); Sigma
18. ไตรตอนเอ็กซ์ 100 (Triton X-100); T.J. Baker
19. ทริสเบส (Tris-base); Sigma
20. ทวีน 20 (Tween 80); Ajax Finechem
21. ทวีน 80 (Tween 80); Ajax Finechem
22. บีต้า-เมอร์แคปโตเอทานอล (β-mercaptoethanol); Sigma
23. แบเรียมคลอไรด์ ($BaCl_2$); Ajax Finechem
24. โบวีนซีรั่มอัมบลูมิน (bovine serum albumin, BSA); Sigma
25. พารา-ไนโตรฟีนิลปาล์มมิเตท (*p*-nitrophenyl palmitate, *p*NPP); Sigma
26. เพปโตน (peptone); Biomark
27. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl); Ajax Finechem
28. ฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (phenylmethylsulphonyl fluoride, PMSF); Sigma
29. เมทานอล (methanol); Brightchem SDN BHD
30. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$); Ajax Finechem
31. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$); Carle Erba
32. ลิเทียมคลอไรด์ ($LiCl_2$); Ajax Finechem
33. วุ้นผง (agar powder); Biomark
34. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract); Ajax Finechem
35. อะซีโตน (acetone); Brightchem SDN BHD
36. อลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$); Ajax Finechem
37. เอทานอล (ethanol); Brightchem SDN BHD
38. เอทิลอะซีเตท (ethyl acetate); Merck
39. เอทิลลีนไดอะมีนเตตระอะซิติกแอซิค (EDTA); Merck
40. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$); Ajax Finechem

3.1.2 อาหารเพาะเชื้อและสารเคมี (ต่อ)

41. แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3); Ajax Finechem
42. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (APS); Ajax Finechem
43. ไอโซโพรพานอล (isopropanol); Burdick and Jackson
44. เฮกเซน (hexane); Brightchem SDN BHD
45. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2); Sigma
46. Bio-Rad protein assay; Bio-Rad

3.2 กลุ่มตัวอย่าง

3.2.1 ตัวอย่างที่เก็บมาแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ไลเปส

(1) ตัวอย่างน้ำเสีย จำนวน 9 แห่ง คือ น้ำเสียบริเวณถังดักไขมันหลังอาคารโภชนาการ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จำนวน 3 แห่ง น้ำเสียบริเวณร้านอาหารนอกมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จำนวน 3 แห่ง และน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตน้ำมันพืชในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล จำนวน 3 แห่ง

(2) ตัวอย่างดิน จำนวน 10 แห่ง คือ ดินบริเวณถังดักไขมันหลังอาคารโภชนาการ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จำนวน 2 แห่ง และดินที่ปนเปื้อนน้ำมันบริเวณร้านอาหารจากแหล่งต่าง ๆ ในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล จำนวน 8 แห่ง

ในการเก็บตัวอย่างน้ำเสียและดินเพื่อนำมาแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจะทำการเลือกจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนของน้ำมัน ทั้งนี้การเลือกแหล่งน้ำเสียหรือดินบริเวณถังดักไขมันหลังอาคารโภชนาการ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ หรือร้านอาหารจากแหล่งต่าง ๆ จะเพิ่มโอกาสในการพบแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติดังกล่าว เนื่องจากบริเวณโรงอาหารหรือร้านอาหารมีความหลากหลายของอาหาร ดังนั้นจึงมีการใช้น้ำมันชนิดต่าง ๆ ซึ่งน้ำมันต่าง ๆ เหล่านี้จะเป็นสับสเตรตที่ชักนำให้แบคทีเรียสร้างเอนไซม์ไลเปสออกมา สำหรับการเลือกน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตน้ำมันพืช เนื่องจากจะเพิ่มโอกาสในการได้แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปส และสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมในระบบบำบัดน้ำเสียได้ดี ดังนั้นแบคทีเรียที่คัดแยกได้นี้จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียได้จริง

3.2.2 ตัวอย่างของเสียในกระบวนการกลั่นน้ำมันพืชที่นำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน

ตัวอย่างของเสียจากกระบวนการกลั่น (palm fatty acid distillates, crude acid oil น้ำเสียจากกระบวนการกลั่น และกากตะกอนจากบ่อบำบัดน้ำเสีย) ของโรงงานผลิตน้ำมันพืช จำนวน 3 แห่ง ในจังหวัดสมุทรปราการ

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่แยกได้ จะมีการทำ 3 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง และนำเอาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากการศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของตัวอย่างของเสียจากกระบวนการกลั่นน้ำมันพืช ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเชื้อที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ มาวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน รวมทั้งหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ One-Way ANOVA

สำหรับการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปส จะมีการทำ 3 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง และนำเอาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากการศึกษาผลของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส ผลของสารเคมีและตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสต่อสับสเตรตชนิดต่าง ๆ และผลของสารซักล้างที่มีต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส มาวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ในการเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสระหว่างชุดควบคุมกับชุดการทดลอง

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำเสีย

1.1 เก็บตัวอย่างน้ำเสีย ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร และทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างน้ำเสีย

1.2 ปิเปตต์ตัวอย่างน้ำเสีย ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร และทำการผสม

1.3 ปิเปตต์ตัวอย่าง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเพาะเชื้อ basal medium ที่เติมน้ำมันมะกอก ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดย

อาหารมีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่พีเอช 7 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

1.4 ทำการเจือจางตัวอย่างให้ได้ความเจือจางที่ระดับ 10^{-5}, 10^{-6}, 10^{-8} และ 10^{-10}

1.5 ทำการปิเปตต์ตัวอย่างความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่บนผิวหน้าของอาหารเพาะเชื้อ lipase test medium และ tributyrin agar โดยแต่ละความเจือจางจะทำการทดลอง 2 ซ้ำ

1.6 ใช้เทคนิค Spread plate เพื่อให้ตัวอย่างกระจายทั่วผิวหน้าอาหารเพาะเชื้อ

1.7 นำจานเพาะเชื้อทั้งหมด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะของตะกอนขุ่นขาวรอบ ๆ โคโลนี บนอาหารเพาะเชื้อ lipase test medium และโซนใสรอบ ๆ โคโลนี บนอาหารเพาะเชื้อ tributyrin agar

2. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากดิน

2.1 นำตัวอย่างดินหนัก 11 กรัม ใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 99 มิลลิลิตร

2.2 ปิเปตต์ตัวอย่างน้ำดิน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเพาะเชื้อ basal medium ที่เติมน้ำมันมะกอก ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยอาหารมีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่พีเอช 7 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

2.3 ทำการเจือจางตัวอย่างให้ได้ความเจือจางที่ระดับ 10^{-4}, 10^{-5} และ 10^{-6}

2.4 ทำการปิเปตต์ตัวอย่างน้ำดิน ความเจือจางละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่บนผิวหน้าของอาหารเพาะเชื้อ lipase test medium และ tributyrin agar โดยแต่ละความเจือจางจะทำการทดลอง 2 ซ้ำ

2.5 ใช้เทคนิค Spread plate เพื่อให้ตัวอย่างสารแขวนลอยดินกระจายทั่วผิวหน้าอาหารเพาะเชื้อ

2.6 นำจานเพาะเชื้อทั้งหมด บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะของตะกอนขุ่นขาวรอบ ๆ โคโลนี บนอาหารเพาะเชื้อ lipase test medium และโซนใสรอบ ๆ โคโลนี บนอาหารเพาะเชื้อ tributyrin agar

3. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี Agar well diffusion

3.1 คัดเลือกแบคทีเรียที่มีตะกอนขุ่นขาวรอบ ๆ โคโลนี บนอาหารเพาะเชื้อ lipase test medium และโซนใสรอบ ๆ โคโลนี บนอาหารเพาะเชื้อ tributyrin agar

3.2 นำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อ TSB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3 ถ่ายเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (ให้ค่า OD_{600} มีค่าประมาณ 0.08-0.1) ลงในอาหารเพาะเชื้อ basal medium ที่เติมน้ำมันมะกอก ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร

3.4 นำเชื้อไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5 ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกส่วนที่เป็นของเหลว โดยไม่มีเซลล์ติดอยู่

3.6 นำส่วนใสมาหยอดลงในหลุมที่เจาะไว้บนอาหารเพาะเชื้อ lipase test medium และ tributyrin agar ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง รวมทั้งนำส่วนใสมาทำการวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของไลเปส โดยใช้พารา-ไนโตรฟีนิลปาล์มมิเตทเป็นสับสเตรต

3.7 ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของตะกอนขุ่นขาวรอบ ๆ โคโลนี บนอาหารเพาะเชื้อ lipase test medium และโซนใสรอบ ๆ โคโลนี บนอาหารเพาะเชื้อ tributyrin agar (หน่วยเป็นมิลลิเมตร) และคัดเลือกแบคทีเรียที่ให้ขนาดของตะกอนขุ่นขาวและขนาดของโซนใสกว้างที่สุด เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสในลำดับต่อไป

4. การระบุชนิดแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16s rRNA และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

4.1 การสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีการต้ม

4.1.1 ขีดแยกเชื้อบนอาหารเพาะเชื้อ TSA agar หรือ LB agar และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.1.2 คัดเลือกโคโลนี จำนวน 2 โคโลนี ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วแขวนลอยเซลล์ที่ได้ด้วย 1X TE Buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำมาต้มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำมาแช่น้ำแข็ง เป็นเวลา 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และนำส่วนใสใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่

4.1.3 นำดีเอ็นเอที่ได้มาเป็นแม่แบบสำหรับการเพิ่มปริมาณยีน 16s rRNA ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

4.2 การสกัดดีเอ็นเอแบบ SDS-NaCl lysis buffer

4.2.1 ขีดแยกเชื้อบนอาหารเพาะเชื้อ Trypticase soya agar (TSA) หรือ LB agar และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.2.2 คัดเลือกโคโลนี จำนวน 2 โคโลนี ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ แล้วแขวนลอยเซลล์ที่ได้ด้วย 1X TE Buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม SDS-NaCl lysis buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร

4.2.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที 10 นาที และนำส่วนใสใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่ เติมไอโซโพรพานอล ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง

4.2.4 ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทเอทานอลทิ้ง ทำให้ดีเอ็นเอแห้งโดยการเปิดฝาหลอดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อดีเอ็นเอแห้งแล้วละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 15 ไมโครลิตร จากนั้นเก็บสารละลายดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4.3 ขั้นตอนการทำพีซีอาร์

การเตรียมส่วนประกอบสำหรับทำพีซีอาร์และสภาวะที่ใช้ในการทำพีซีอาร์สำหรับเพิ่มปริมาณยีน 16s rRNA แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 3-1 และ 3-2

ตารางที่ 3-1 องค์ประกอบของสารผสมปฏิกิริยาและปริมาณที่ใช้ต่อ 1 ปฏิกิริยา ในปริมาตร 25 ไมโครลิตร สำหรับเพิ่มปริมาณยีน 16s rRNA

สารละลาย	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ	16.0	-
10X PCR buffer	2.5	1 เท่า
50 mM $MgCl_2$	0.75	1.5 มิลลิโมลาร์
10 mM dNTP mix	0.5	0.2 มิลลิโมลาร์ (แต่ละชนิด)
ไพรเมอร์		
10 µM MAS2F	1.25	0.5 ไมโครโมลาร์
10 µM MAS1R	1.25	0.5 ไมโครโมลาร์
ดีเอ็นเอแม่แบบ	2.5	-
Taq DNA polymerase	0.25	1.25 ยูนิต
ปริมาตรรวม	25.0	-

ตารางที่ 3-2 สภาวะที่ใช้ในการทำพีซีอาร์สำหรับการเพิ่มปริมาณยีน 16s rRNA

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	จำนวนรอบของปฏิกิริยา (รอบ)
Initial denaturation	94	3 นาที	1
Denaturation	94	45 วินาที	35
Annealing	55	30 วินาที	
Extention	72	1 นาที 30 วินาที	
Final extention	72	10 นาที	1

4.4 การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16s rRNA และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

ทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสของยีน 16s rRNA กับฐานข้อมูลสากล GenBank หรือ National Center for Biotechnology Information (NCBI) (เว็บไซต์ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) โดยใช้โปรแกรม BLAST และทำการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดยวิธี Neighbor-Joining method (79) โดยใช้โปรแกรม MEGA6 (80)

5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย

5.1 แหล่งคาร์บอน

5.1.1 นำแบคทีเรียที่ผ่านการคัดแยกมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อ basal medium แบ่งออกเป็น 6 ชุด โดยชุดที่ 1 เป็นชุดการทดลองควบคุมซึ่งไม่ต้องเติมแหล่งคาร์บอน ชุดที่ 2 เติมน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 1 ชุดที่ 3 เติม palm fatty acid distillates (PFAD) จากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 1 ชุดที่ 4 เติมน้ำล้างจากกระบวนการผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 2 ชุดที่ 5 เติม crude soybean acid oil (CSAO) จากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 2 ชุดที่ 6 เติมน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 3 และชุดที่ 7 เติมน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 3 ในแต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ โดยเติมตัวอย่างของเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

5.1.2 ถ่ายเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเพาะเชื้อ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (ให้ค่า OD_{600} มีค่าประมาณ 0.08-0.1)

5.1.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.1.4 ทำการวัดปริมาณโปรตีน และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

5.1.5 ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม (จากผลการทดลองเบื้องต้น) โดยศึกษาที่ค่าความเข้มข้นระหว่าง 1-5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

5.2 แหล่งไนโตรเจน

5.2.1 นำแบคทีเรียที่ผ่านการคัดแยกมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร basal medium ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนที่มีผลให้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุดจากการทดลองในข้อที่ 5.1

5.2.2 แบ่งการทดลองออกเป็น 11 ชุด โดยชุดที่ 1 เป็นชุดการทดลองควบคุมไม่ต้องเติมแหล่งไนโตรเจน ชุดที่ 2 เติมเพปโตน ชุดที่ 3 เติมซอยโตน ชุดที่ 4 เติมไกลซีน ชุดที่ 5 เติมทริปโตน ชุดที่ 6 เติมสารสกัดจากยีสต์ ชุดที่ 7 เติมยูเรีย ชุดที่ 8 เติมโพแทสซียมไนเตรต ชุดที่ 9 เติมโซเดียมไนเตรต ชุดที่ 10 เติมแอมโมเนียมไนเตรต และชุดที่ 11 เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ในแต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ โดยเติมแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

5.2.3 ถ่ายเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเพาะเชื้อ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร (ให้ค่า OD_{600} มีค่าประมาณ 0.08-0.1)

5.2.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.2.5 ทำการวัดปริมาณโปรตีน และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

5.2.6 ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม (จากผลการทดลองเบื้องต้น) โดยศึกษาที่ค่าความเข้มข้นระหว่าง 0.2-1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

5.3 สภาวะความเป็นกรด-ด่าง

5.3.1 นำแบคทีเรียที่ผ่านการคัดแยกมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อ basal medium ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีผลให้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุดจากการทดลองในข้อที่ 5.1 และ 5.2

5.3.2 แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุด ชุดที่ 1 ไม่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ชุดที่ 2 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7 ชุดที่ 3 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 8 ชุดที่ 4 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 9 ชุดที่ 5 ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 10 ในแต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ

5.3.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.3.4 ทำการวัดปริมาณโปรตีน และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

5.4 อุณหภูมิ

5.4.1 นำแบคทีเรียที่ผ่านการคัดแยกมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อ basal medium ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีผลให้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุด ภายใต้สภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อที่ 5.1-5.3

5.4.2 แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุด โดยชุดที่ 1 จะทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ชุดที่ 2 ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ชุดที่ 3 ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ชุดที่ 4 ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ชุดที่ 5 ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 55 ชุดที่ 6 ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 60 ในแต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ

5.4.3 นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.4.4 ทำการวัดปริมาณโปรตีน และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

6. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปส

6.1 ผลของความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส

แบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุด โดยบัฟเฟอร์ต่าง ๆ ที่เลือกใช้ ได้แก่

ชุดที่ 1 โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate) พีเอช 4-6

ชุดที่ 2 ซิเตรท-ฟอสเฟต (citrate-phosphate) พีเอช 6-7

ชุดที่ 3 ฟอสเฟต (phosphate) พีเอช 7-8

ชุดที่ 4 ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) พีเอช 8-9
ชุดที่ 5 ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ (glycine-NaOH) พีเอช 9-10
บัฟเฟอร์ที่ใช้มีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

6.1.1 การศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

นำสารละลายโปรตีน ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับ substrate solution ที่มีการเตรียมในบัฟเฟอร์ต่าง ๆ ข้างต้น ปริมาตร 950 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสมาวัดค่า OD_{410} แต่ละชุดการทดลองจะมีการทำ 3 ซ้ำ

6.1.2 การศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส

นำสารละลายโปรตีน ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมบัฟเฟอร์ข้างต้น ซึ่งบัฟเฟอร์จะมีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม substrate solution ที่มีการเตรียมในบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม (จากการทดลองที่ 6.1.1) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร จากนั้นทำการบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสมาวัดค่า OD_{410} แต่ละชุดการทดลองจะมีการทำ 3 ซ้ำ

6.2 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส

แบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุด ได้แก่
ชุดที่ 1 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
ชุดที่ 2 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส
ชุดที่ 3 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
ชุดที่ 4 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส
ชุดที่ 5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

6.2.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

นำสารละลายโปรตีน ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับ substrate solution ที่มีการเตรียมในบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม (จากการทดลองที่ 6.1.1) ปริมาตร 950 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสมาวัดค่า OD_{410} แต่ละชุดการทดลองจะมีการทำ 3 ซ้ำ

6.2.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส

นำสารละลายโปรตีน ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับบัพเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม (จากการทดลองที่ 6.1.1) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม substrate solution ที่มีการเตรียมในบัพเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม (จากการทดลองที่ 6.1.1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที วัดค่า OD_{410} แต่ละชุดการทดลองจะมีการทำ 3 ซ้ำ

6.3 ผลของสารเคมีที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

การศึกษานี้เป็นการวัดกิจกรรมและตรวจสอบเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส ภายหลังการบ่มเอนไซม์กับสารต่าง ๆ แล้ว ซึ่งสารเคมีที่นำมาทดสอบ ได้แก่ ไอออนของโลหะ สาร ลดแรงตึงผิว สารอิมัลซิฟายเออร์ สารยับยั้ง และออกซิไดซิงเอเจนท์

แบ่งการทดลองออกเป็น 6 ชุด ได้แก่

ชุดที่ 1 ชุดควบคุม

ชุดที่ 2 ไอออนโลหะ ได้แก่ ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$) แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2$) ซีเซียมคลอไรด์ ($CsCl_2$) คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) ลิเทียมคลอไรด์ ($LiCl_2$) แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2$) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) แบเรียมคลอไรด์ ($BaCl_2$) และอลูมิเนียมคลอไรด์ ($AlCl_3$) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

ชุดที่ 3 สารลดแรงตึงผิว ได้แก่ กลีเซอรอล (glycerol) โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulphate; SDS) ทวีน 20 (Tween 20) ทวีน 80 (Tween 80) ไตรตอนเอ็กซ์ 100 (Triton X-100) และโซเดียมคลอเรท (sodium cholate) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

ชุดที่ 4 สารอิมัลซิฟายเออร์ ได้แก่ กัมอะราบิค (gum arabic) และเจลาติน (gelatin) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

ชุดที่ 5 สารยับยั้ง ได้แก่ ไดไทโอทรีไอทอล (dithiothreitol; DTT) เอธิลลีนไดอะมีนเตตระอะซิติกแอซิค (ethylene diamine tetraacetic acid; EDTA) ฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ phenylmethylsulphonyl fluoride; PMSF) และบีต้า-เมอร์แคปโทเอทานอล (β-mercaptoethanol) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

ชุดที่ 6 ออกซิไดซิงเอเจนท์ ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (sodium hypochlorite) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

นำสารละลายโปรตีนปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารเคมีปริมาตร 10 ไมโครลิตร และเติม substrate solution ที่เตรียมในบัพเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม (จากการทดลองที่ 6.1.1) ปริมาตร 940 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่า OD_{410} ชุดควบคุมเตรียมโดยนำสารละลายโปรตีนปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับ substrate solution ปริมาตร 940 ไมโครลิตรและน้ำกลั่นปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยแต่ละชุดการทดลองจะทำ 3 ซ้ำ

6.4 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส

ปิเปตต์สารละลายโปรตีนปริมาตร 20 ไมโครลิตร (กิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 1-4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ลงบน filter paper ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในตัวทำละลายอินทรีย์ประเภทที่ไม่ละลายน้ำ ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำ filter paper ออกมาเพื่อระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออก ทำการเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7 ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร

กรณีทำการศึกษากับตัวทำละลายอินทรีย์ประเภทที่ละลายน้ำได้ จะทำการผสมสารละลายโปรตีนปริมาตร 10 ไมโครลิตร กับตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาตร 990 ไมโครลิตร (81) นำสารละลายผสมดังกล่าวปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับ substrate solution ที่มีการเตรียมในบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม (จากการทดลองที่ 6.1.1) ปริมาตร 950 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสมาวัดค่า OD_{410} แต่ละชุดการทดลองจะมีการทำ 3 ซ้ำ

6.5 การศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรต

ศึกษาผลของความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรตในน้ำมันชนิดต่าง ๆ และสับสเตรตสังเคราะห์ทั้งในกลุ่มไตรกลีเซอรอลและพารา-ไนโตรฟีนิลเอสเทอร์ สำหรับการศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสับสเตรตสังเคราะห์ในกลุ่มพารา-ไนโตรฟีนิลเอสเทอร์ จะนำสารละลายโปรตีนปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับ substrate solution ที่เตรียมในบัพเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม (จากการทดลองที่ 6.1.1) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่า OD_{410}

สำหรับการศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ต่อน้ำมันชนิดต่าง ๆ และสับสเตรตสังเคราะห์ในกลุ่มไตรกลีเซอรอล จะนำสารละลายโปรตีนปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับ substrate solution ที่เตรียมในบัพเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม (จากการทดลองที่ 6.1.1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริคความเข้มข้น 6 นอร์มอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมเป็นเวลา 1 นาที และเติมไอโซออกเทนปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 1 นาที นำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดไขมันอิสระโดยวิธี Colorimetric method (82) ทั้งนี้แต่ละชุดการทดลองจะทำ 3 ซ้ำ

6.6 ผลของสารซักล้างที่มีต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส

ศึกษาผลของสารซักล้างที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยทำการเตรียมสารซักล้างความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตรสำหรับสารซักล้างชนิดผง และปริมาตรต่อปริมาตรสำหรับสารซักล้างชนิดเหลว) ทำการผสมเอนไซม์กับสารซักล้างในอัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารซักล้างเท่ากับ 1 ต่อ 2 จากนั้นตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ทันที สำหรับการศึกษาผลของสารซักล้างที่มีต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส ทำโดยเติมเอนไซม์ลงในสารซักล้างความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตรสำหรับสารซักล้างชนิดผง และปริมาตรต่อปริมาตรสำหรับสารซักล้างชนิดเหลว) ในอัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารซักล้างเท่ากับ 1 ต่อ 2 ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (83) จากนั้นตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์

7. การศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสในการกำจัดไขมันบนผ้าฝ้าย (76)

7.1 การเตรียมสารซักล้าง

ในการเตรียมสารซักล้างทั้ง 4 สูตร แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 3-3

ตารางที่ 3-3 สูตรสารซักล้าง

สูตรที่	สารละลาย	ปริมาตร (มิลลิลิตร)			
		Buffer (B)	Lipase (L)	Detergent (D)	Water (W)
1	B	2	-	-	3
2	B+L	2	0.25	-	2.75
3	B+D	2	-	2.5	0.5
4	B+L+D	2	0.25	2.5	0.25

หมายเหตุ: B คือ บัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8,
บัฟเฟอร์ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9
บัฟเฟอร์ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 10
L คือ เอนไซม์ไลเปส (100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
D คือ สารซักล้าง ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

7.2 การเตรียมผ้าเปื้อนน้ำมันมะกอก

นำผ้าฝ้ายที่มีขนาด 2.5 x 2.5 เซนติเมตร มากำจัดไขมันด้วยไดคลอโรมีเทน เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำผ้าที่ได้มาทำรอยเปื้อน โดยใช้น้ำมันมะกอกที่ผสมกับเฮกเซนในอัตราส่วน 50:500 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตต์น้ำมันมะกอก ปริมาตร 350 ไมโครลิตร ลงบนผ้าฝ้ายต่อขนาด 2.5 x 2.5 เซนติเมตร

7.3 การซักล้าง

นำผ้าฝ้ายที่มีรอยเปื้อนน้ำมันมะกอกมาซักล้างกับสารซักล้างชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 3-3 นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่สภาวะการซักล้างต่าง ๆ ตามที่กำหนด คือ ความเป็นกรด-ด่างของบัฟเฟอร์ ที่พีเอช 8, 9 และ 10 และอุณหภูมิในการซักล้างที่ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเทสารละลายซักล้างออก และทำการล้างผ้า จำนวน 2 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที

7.4 การคำนวณปริมาณน้ำมันมะกอกที่ถูกขจัดออกจากผ้าฝ้าย

ปริมาณน้ำมันมะกอกที่ถูกขจัดออกจากผ้าฝ้ายสามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์น้ำมันมะกอกที่ถูกขจัดออก} = [(W_a - W_b) / W_a] \times 100$$

หมายเหตุ: W_a คือ น้ำหนักของน้ำมันมะกอกในผ้าฝ้ายก่อนการซักล้าง
W_b คือ น้ำหนักของน้ำมันมะกอกในผ้าฝ้ายหลังการซักล้าง

8. เตรียมสารละลายโปรตีนและการแยกเอนไซม์ไลเปส

นำอาหารที่เพาะเชื้อจากการทดลองในข้อที่ 5.1-5.4 ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารเพาะเชื้อเหลว จากนั้นนำส่วนใสมาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ อิ่มตัว และนำเกลือออกด้วยวิธี dialysis (ภาคผนวก ค หมายเลข 1 และ 2)

9. การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford

ทำการวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (84) โดยใช้โบวีนซีรั่มอัมบลูมิน (bovine serum albumin, BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวก ข หมายเลข 1)

10. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสทำตามวิธี photometric assay (85) โดยใช้ *p*-nitrophenyl palmitate เป็นสารตั้งต้น โดยที่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 1 หน่วย (ยูนิต) มีค่าเท่ากับ *p*-nitrophenol ถูกผลิตออกมาในปริมาณ 1 นาโนโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ได้ทำการวิเคราะห์ (ภาคผนวก ค หมายเลข 3)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากดิน

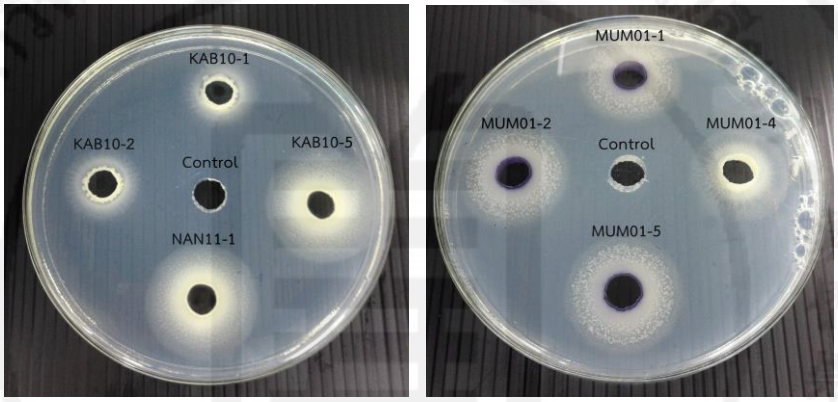
จากการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างดินในบริเวณต่าง ๆ จำนวน 10 แห่ง คือ ดินบริเวณถังดักไขมันหลังอาคารโภชนาการ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ดินที่ปนเปื้อนน้ำมันบริเวณร้านอาหารต่าง ๆ เช่น ร้านอาหารมุมอร่อย จังหวัดสมุทรปราการ ดินที่ปนเปื้อนน้ำมันบริเวณร้านอาหารครัวป้าศรี จังหวัดสมุทรปราการ ดินที่ปนเปื้อนน้ำมันบริเวณร้านอาหารครัวริมรั้ว จังหวัดสมุทรปราการ ดินที่ปนเปื้อนน้ำมันบริเวณร้านอาหารฝ้ายคำ จังหวัดกรุงเทพมหานคร ดินที่ปนเปื้อนน้ำมันบริเวณร้านอาหารครัวชัยนาท จังหวัดลพบุรี และดินที่ปนเปื้อนน้ำมันบริเวณร้านอาหารครัวแสงแก้ว จังหวัดน่าน บนอาหาร lipase test medium (Tween 80 agar) โดยใช้เทคนิค Spread plate พบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจำนวน 56 ไอโซเลต (ตารางที่ 1) ซึ่งสังเกตจากตะกอนขุ่นขาวรอบ ๆ โคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร lipase test medium (Tween 80 agar) (ภาพที่ 4-1)

ภาพที่ 4-1 ลักษณะของตะกอนขุ่นขาวรอบ ๆ โคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร lipase test medium (Tween 80 agar) ที่คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมัน

4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียจากดินที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้บนอาหารเพาะเชื้อ lipase test medium (Tween 80) และทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อ TSB โดยวิธี Agar well diffusion โดยสังเกตจากการสร้างตะกอนขุ่นขาว พบว่าไอโซเลต MUM1-5 มีการสร้าง

โซนตะกอนขุ่นขาวกว้างที่สุด คือ 36.60 มิลลิเมตร ลำดับรองลงมา คือ ไอโซเลต RIM5-3 มีขนาด 30.0 มิลลิเมตร สำหรับ HCU07, HCU2-9 และ KAB10-3 มีขนาด 28.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4-2 และตารางที่ 4-1 สำหรับการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสบนอาหารเพาะเชื้อ tributyrin agar โดยวิธี Agar well diffusion โดยสังเกตจากโซนใส พบว่า ไอโซเลต MUM 1-5 มีการสร้างโซนใสกว้างที่สุด คือ 19.50 มิลลิเมตร รองลงมา คือ ไอโซเลต NAN11-2 มีขนาด 18.75 มิลลิเมตร ไอโซเลต PA4-3 มีขนาด 17.0 มิลลิเมตร ไอโซเลต PA4-2 มีขนาด 16.70 มิลลิเมตร ไอโซเลต HCU3-2, RIM5-1 และ PRA1-2 มีขนาด 16.50 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-1



ภาพที่ 4-2 ลักษณะตะกอนขุ่นขาวที่เกิดขึ้นในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยคัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันด้วยวิธี Agar well diffusion บนอาหาร lipase test medium (Tween 80 agar)

จากนั้นทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อ TSB ด้วยวิธี photometric assay พบว่าไอโซเลต MUM1-5 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด เท่ากับ 215.56 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ ไอโซเลต HCU2-10 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส เท่ากับ 200.07 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ไอโซเลต HCU2-11 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส เท่ากับ 190.58 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ไอโซเลต HCU2-9 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส เท่ากับ 189.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และไอโซเลต MUM1-1 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส เท่ากับ 176.74 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้ในการคัดเลือกไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุด พบว่าคือไอโซเลต MUM1-5 (ตารางที่ 4-1)

ตารางที่ 4-1 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างดิน

ลำดับ	รหัสไอโซเลต	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)		กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
		Lipase test medium	Tributyrin agar	
1	MUM1-1	25.60	14.00	176.74
2	MUM1-2	26.00	15.50	123.35
3	MUM1-3	22.00	14.00	98.06
4	MUM1-4	17.00	12.00	80.03
5	MUM1-5	36.60	19.50	215.56
6	MUM1-6	19.30	13.50	170.10
7	MUM2-1	24.60	14.40	14.81
8	MUM2-2	17.00	13.00	2.75
9	MUM2-3	23.00	14.70	24.75
10	MUM3-1	25.30	13.00	14.31
11	HCU07	28.00	14.00	112.14
12	HCU1-1	13.00	13.00	12.72
13	HCU1-3	16.00	14.00	56.17
14	HCU1-4	10.50	12.00	3.75
15	HCU2-1	17.00	12.00	138.64
16	HCU2-2	10.00	12.50	1.76
17	HCU2-9	28.00	13.30	189.50
18	HCU2-10	15.50	13.00	200.07
19	HCU2-11	15.00	14.25	190.58
20	HCU2-12	15.50	13.20	89.42
21	HCU3-2	21.00	16.50	126.32
22	HCU6-1	18.00	14.00	94.26
23	HCU6-2	26.00	15.00	35.83
24	RIM5-1	23.00	16.50	2.33
25	RIM5-2	21.00	13.00	4.70
26	RIM5-3	30.00	14.30	1.98

ตารางที่ 4-1 (ต่อ)

ลำดับ	รหัสไอโซเลต	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)		กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
		Lipase test medium	Tributyrin agar	
27	FAI1-1	12.40	10.50	2.81
28	FAI1-2	19.00	12.50	7.72
29	FAI1-3	11.60	11.00	5.10
30	FAI1-4	18.10	14.20	71.07
31	FAI1-5	15.70	9.00	0.44
32	FAI1-6	24.30	12.50	14.48
33	FAI1-7	20.00	10.25	7.62
34	FAI1-8	15.50	10.70	6.33
35	FAI2-1	13.50	12.00	10.92
36	FAI2-2	16.40	13.60	11.48
37	FAI2-3	11.70	12.00	20.25
38	KAB10-1	18.00	13.30	14.39
39	KAB10-2	17.00	11.40	11.28
40	KAB10-3	28.00	10.50	8.42
41	KAB10-5	23.60	15.30	15.87
42	NAN11-1	20.60	14.60	21.95
43	NAN11-2	25.60	18.75	21.27
44	PA4-1	23.00	15.20	3.11
45	PA4-2	22.00	16.70	6.36
46	PA4-3	19.55	17.00	0.91
47	PRA1-1	17.00	14.00	1.95
48	PRA1-2	15.60	16.50	5.33
49	PRA1-3	17.00	11.00	19.34
50	PRA1-4	19.50	10.20	3.53
51	CHA9-1	12.50	12.00	2.94
52	CHA9-2	20.30	12.50	10.59
53	CHA9-4	21.60	13.60	9.95

ตารางที่ 4-1 (ต่อ)

ลำดับ	รหัสไอโซเลต	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)		กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
		Lipase test medium	Tributyrin agar	
54	CHA9-5	17.00	11.00	5.76
55	CHA9-6	17.30	13.60	0.64
56	CHA9-7	13.00	14.00	18.60

* รหัสไอโซเลตตั้งตามแหล่งที่พบไอโซเลต ตามด้วยครั้งที่พบเชื้อ และลำดับเชื้อ เช่น HCU 1-1 HCU คือ ชื่อแหล่งที่พบเชื้อ เลข 1 ตัวแรก คือ เชื้อที่พบในครั้งแรกของการคัดเลือก เลข 1 ตัวที่สอง คือ เชื้อสายพันธุ์ที่หนึ่ง

** MUM ย่อมาจาก Mumaroy, HCU ย่อมาจาก Huachiew Chalermprakiet University, RIM ย่อมาจาก Rimrua, FAI ย่อมาจาก Faikum, KAB ย่อมาจาก Krabin Buri, NAN ย่อมาจาก Nan, PA ย่อมาจาก Pasri, PRA ย่อมาจาก Prachin Buri, CHA ย่อมาจาก Chai Nat

4.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5

นำแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกแล้วมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยทำการศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเชื้อ ในส่วนของแหล่งคาร์บอนทำการศึกษาโดยใช้ตัวอย่างของเสียจากกระบวนการกลั่นน้ำมันจากโรงงานผลิตน้ำมันพืช 3 แห่ง และศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ค่าความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) สำหรับแหล่งไนโตรเจนทำการศึกษาโดยใช้เพปโตน ทริปโตน ซอยโตน ไกลซีน สารสกัดจากยีสต์ ยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสซียมไนเตรต และโซเดียมไนเตรต โดยศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ค่าความเข้มข้น 0.2-1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) อุณหภูมิทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส และสภาวะความเป็นกรด-ด่างทำการศึกษาที่พีเอช 7, 8, 9 และ 10 ทั้งนี้ในการทดลองจะมีการทำ 3 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง และนำเอาผลการทดลองดังกล่าวมาวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ One-Way ANOVA นอกจากนี้ในทุกขั้นตอนของการศึกษาจะทำการวัดปริมาณโปรตีน และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ผลจากการทดลองพบว่าแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุด เมื่อมีการใช้น้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 1 ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน (216.35±0.09 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) และมีการใช้เพปโตนที่ความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน (258.29±0.09 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) สำหรับอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส คือ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (277.02±0.25 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) และพีเอช 7 (260.58±0.25 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-2 ถึง 4-7

ตารางที่ 4-2 ผลของตัวอย่างของเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5

ตัวอย่างของเสีย [2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)]	ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)[b]
ชุดควบคุม[a]	0.67±0.05	113.10±0.29	168.28±0.02 (E)	100.00±0.02
น้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 1	0.68±0.08	146.13±0.03	215.29±0.09 (A)	127.94±0.02
PFAD[c] จากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 1	0.69±0.13	140.37±0.03	203.80±0.11 (B)	121.11±0.02
น้ำล้างจากกระบวนการผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 2	0.58±0.12	108.07±0.03	185.64±0.14 (C)	110.31±0.02
CSAO[c] จากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 2	0.56±0.15	98.48±0.08	175.41±0.16 (D)	104.24±0.02
น้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 3	0.63±0.06	119.52±0.03	188.59±0.38 (C)	112.07±0.02
Acid oil จากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 3	0.54±0.07	93.29±0.27	172.48±0.43 (D)	102.50±0.02

± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) อักษร A, B, C, D และ E: แทนข้อมูลทางสถิติในกรณีที่มีการใช้ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Tukey HSD[a] post hoc test (α = 0.05)

[a] ชุดควบคุม คือ อาหารเพาะเชื้อ basal medium ที่ไม่มีการเติมน้ำมัน

[b] กิจกรรมสัมพัทธ์คำนวณโดยการใช้ชุดควบคุมเป็นค่าอ้างอิงที่ 100 เปอร์เซ็นต์

[c] PFAD คือ palm fatty acid distillates และ CSAO คือ crude soybean acid oil

ตารางที่ 4-3 ผลของความเข้มข้นของน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 1 ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5

น้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 1 (เปอร์เซ็นต์/ปริมาตรต่อปริมาตร)	**ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)**	**กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)**	**กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)**	**กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)[b]**
ชุดควบคุม[a]	0.67±0.05	113.10±0.29	168.28±0.02 (D)	100.00±0.02
1	0.76±0.06	154.34±0.33	202.75±0.36 (B)	120.48±0.02
2	0.67±0.08	145.13±0.03	216.35±0.09 (A)	128.57±0.02
3	0.65±0.11	137.46±0.18	210.55±0.26 (A)	125.12±0.02
4	0.58±0.04	115.13±0.32	198.49±0.33 (B)	117.95±0.02
5	0.75±0.03	138.71±0.19	185.24±0.18 (C)	110.08±0.02

± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) อักษร A, B, C และ D : แทนข้อมูลทางสถิติ ในกรณีที่มีการใช้ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Tukey HSD[a] post hoc test (α = 0.05)

[a] ชุดควบคุม คือ อาหารเพาะเชื้อ basal medium ที่ไม่มีการเติมน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 1

[b] กิจกรรมสัมพัทธ์คำนวณโดยการใช้ชุดควบคุมเป็นค่าอ้างอิงที่ 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4-4 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5

แหล่งไนโตรเจน (0.5% น้ำหนักต่อปริมาตร)	ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)[b]
ชุดควบคุม[a]	0.68±0.08	146.13±0.03	215.29±0.09 (B)	100.00±0.02
เพปโตน	0.58±0.18	135.13±0.03	232.29±0.09 (A)	107.90±0.02
ซอยโตน	0.40±0.53	90.25±0.38	225.57±0.33 (A)	104.77±0.08
ไกลซีน	0.54±0.04	107.09±0.52	197.38±0.18 (C)	91.68±0.10
ทริปโตน	0.68±0.03	143.37±0.10	210.85±0.24 (B)	97.94±0.22
สารสกัดจากยีสต์	0.65±0.08	129.13±0.03	198.29±0.09 (C)	92.10±0.28
ยูเรีย	0.71±0.08	142.55±0.08	199.68±0.08 (C)	92.75±0.18
โพแทสเซียมไนเตรต	0.57±0.04	100.88±0.16	175.44±0.39 (E)	81.49±0.05
โซเดียมไนเตรต	0.76±0.01	139.41±0.20	183.22±0.40 (D)	85.10±0.04

± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) อักษร A, B, C, D และ E : แทนข้อมูลทางสถิติ ในกรณีที่มีการใช้ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Tukey HSD[a] post hoc test (α = 0.05)

[a] ชุดควบคุม คือ อาหารเพาะเชื้อ basal medium ที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน

[b] กิจกรรมสัมพัทธ์คำนวณโดยการใช้ชุดควบคุมเป็นค่าอ้างอิงที่ 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4-4 (ต่อ)

แหล่งไนโตรเจน (0.5% น้ำหนักต่อปริมาตร)	ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)[b]
แอมโมเนียมไนเตรต	0.57±0.03	105.88±0.16	185.44±0.39 (D)	86.13±0.22
แอมโมเนียมซัลเฟต	0.43±0.01	75.41±0.20	173.22±0.40 (E)	80.46±0.14

± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) อักษร A, B, C, D และ E : แทนข้อมูลทางสถิติ ในกรณีที่มีการใช้ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Tukey HSD[a] post hoc test (α = 0.05)

[a] ชุดควบคุม คือ อาหารเพาะเชื้อ basal medium ที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน

[b] กิจกรรมสัมพัทธ์คำนวณโดยการใช้ชุดควบคุมเป็นค่าอ้างอิงที่ 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4-5 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5

เพปโตน (เปอร์เซ็นต์/ น้ำหนักต่อปริมาตร)	ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)[b]
ชุดควบคุม[a]	0.67±0.10	144.15±0.33	214.13±0.09 (E)	100.00±0.08
0.2	0.59±0.12	130.15±0.34	220.23±0.28 (D)	102.85±0.19
0.4	0.49±0.05	111.07±0.49	226.81±0.24 (C)	105.92±0.04
0.6	0.56±0.18	145.13±0.03	258.29±0.09 (A)	120.62±0.32
0.8	0.45±0.02	108.70±0.50	240.27±0.42 (B)	112.21±0.12
1.0	0.72±0.01	156.78±0.41	218.46±0.35 (D)	102.02±0.48

± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) อักษร A, B, C, D และ E : แทนข้อมูลทางสถิติ ในกรณีที่มีการใช้ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Tukey HSD[a] post hoc test (α = 0.05)

[a] ชุดควบคุม คือ อาหารเพาะเชื้อ basal medium ที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน

[b] กิจกรรมสัมพัทธ์คำนวณโดยการใช้ชุดควบคุมเป็นค่าอ้างอิงที่ 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4-6 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเชื้อที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5

ความเป็นกรด-ด่าง	ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)[b]
ชุดควบคุม[a]	0.56±0.18	145.13±0.03	258.29±0.09 (A)	100.00±0.05
7	0.59±0.28	154.43±0.01	260.58±0.25 (A)	100.89±0.12
8	0.48±0.01	120.47±0.97	249.82±0.46 (B)	96.72±0.32
9	0.66±0.07	146.21±0.51	220.82±0.46 (C)	85.49±0.72
10	0.76±0.04	150.21±0.51	198.82±0.46 (D)	76.98±0.32

± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) อักษร A, B, C และ D : แทนข้อมูลทางสถิติ ในกรณีที่มีการใช้ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Tukey HSD[a] post hoc test (α = 0.05)

[a] ชุดควบคุม คือ อาหารเพาะเชื้อ basal medium ที่ไม่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง

[b] กิจกรรมสัมพัทธ์คำนวณโดยการใช้ชุดควบคุมเป็นค่าอ้างอิงที่ 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4-7 ผลของอุณหภูมิในการบ่มเชื้อที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)
35	0.69±0.78	182.13±0.11	263.18±0.05 (B)
40	0.59±0.48	157.41±0.06	266.44±0.17 (B)
45	0.65±0.17	180.25±0.21	277.02±0.25 (A)
50	0.74±0.32	191.19±0.34	258.18±0.88 (C)
55	0.64±0.09	159.23±0.10	249.69±0.29 (D)
60	0.48±0.18	111.06±0.08	231.36±0.54 (E)

± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) อักษร A, B, C, D และ E : แทนข้อมูลทางสถิติ ในกรณีที่มีการใช้ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Tukey HSD[a] post hoc test (α = 0.05)

4.4 การศึกษาคุณสมบัติเฉพาะของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5

เอนไซม์ไลเปสที่มีประสิทธิภาพสูงซึ่งผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือกในสภาวะอาหารเพาะเชื้อที่เหมาะสมจะถูกนำมาศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ โดยในการทดลองจะมีการทำ 3 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง และนำเอาผลการทดลองดังกล่าวมาวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ One-Way ANOVA นอกจากนี้ในทุกขั้นตอนของการศึกษาจะทำการวัดปริมาณโปรตีน และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ผลจากการทดลองพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส คือ พีเอช 10 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์มีเสถียรภาพต่อความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิในช่วงกว้างระหว่างพีเอช 8-10 และอุณหภูมิ 40-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-8 และ 4-9 นอกจากนี้ยังพบว่าการทำงานเอนไซม์สูงขึ้นเมื่อมี $CaCl_2$, $LiCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$ สารลดแรงตึงผิว และสารอิมัลซิฟายเออร์ โดยกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสไม่ถูกกระตุ้นเมื่อมีตัวยับยั้ง β-mercaptoethanol, DTT และ PMSF (ตารางที่ 4-10) จากการศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส พบว่าเอนไซม์มีเสถียรภาพต่อเฮกเซนและเมทานอลสูงที่สุด (ตารางที่ 4-11) สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสในการทำงานและเสถียรภาพในสภาวะที่มีสารซักล้างชนิดผงและชนิดเหลวทั้ง 6 ชนิด ที่ความเข้มข้นของสารซักล้าง 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเอนไซม์ไลเปสในเปาซิลเวอร์นาโนมีค่ากิจกรรมเอนไซม์และเสถียรภาพของเอนไซม์สูงที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 4-12 และในการศึกษาผลความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสต่อสับสเตรต พบว่าเอนไซม์ไลเปสมีความจำเพาะต่อน้ำมันมะกอก tripalmitin และ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP) ดังแสดงในตารางที่ 4-13

RAJAMANGALA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY RATTANAKOSIN

ตารางที่ 4-8 ผลของความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5

บัฟเฟอร์	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)	
		กิจกรรมของเอนไซม์	เสถียรภาพของเอนไซม์
โซเดียมอะซิเตท	4	43.47±0.08	45.21±0.24
โซเดียมอะซิเตท	5	50.98±0.04	53.41±0.02
โซเดียมอะซิเตท	6	62.54±0.06	65.32±0.11
ซิเตรท-ฟอสเฟต	6	59.30±0.12	66.36±0.05
ซิเตรท-ฟอสเฟต	7	73.11±0.10	79.55±0.14
ฟอสเฟต	7	75.65±0.01	81.72±0.13
ฟอสเฟต	8	82.18±0.17	89.10±0.09
ทริส-ไฮโดรคลอไรด์	8	88.32±0.20	93.36±0.06
ทริส-ไฮโดรคลอไรด์	9	95.55±0.09	98.34±0.07
ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์	9	97.87±0.14	100.14±0.02
ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์	10	100.04±0.02	97.10±0.01

ตารางที่ 4-9 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)	
	กิจกรรมของเอนไซม์	เสถียรภาพของเอนไซม์
40	69.22±0.08	100.24±0.02
45	74.68±0.07	95.11±0.02
50	88.32±0.04	89.30±0.07
55	91.20±0.12	81.44±0.09
60	100.17±0.15	70.45±0.12

ตารางที่ 4-10 ผลของสารเคมีที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5

สารเคมี	**กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)**[b]
ชุดควบคุม[a]	100.00±0.06
ไอออนโลหะ (ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์)	
$AlCl_3$	74.11±0.34
$BaCl_2$	68.25±0.49
$CaCl_2$	154.48±0.15
$CoCl_2$	88.55±0.13
$CsCl_2$	108.25±0.36
$CuSO_4$	114.23±0.23
KCl	101.14±0.18
$LiCl_2$	148.45±0.35
$MgCl_2$	158.12±0.02
$MnCl_2$	115.42±0.35
$ZnCl_2$	108.30±0.28
สารลดแรงตึงผิว (ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์)	
Glycerol	128.35±0.15
Tween 20	112.45±0.13
Tween 80	132.33±0.19
Triton X-100	129.12±0.18
SDS	137.15±0.16
Sodium cholate	114.10±0.51
สารอิมัลซิฟายเออร์ (ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์)	
Gum arabic	135.14±0.17
Gelatin	121.56±0.24

ตารางที่ 4-10 (ต่อ)

สารเคมี	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)[b]
สารยับยั้ง (ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์)	
β-mercaptoethanol	54.33±0.21
EDTA	108.32±0.32
DTT	26.14±0.14
PMSF	65.73±0.31
Oxidizing agents (ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์)	
Hydrogen peroxide	101.13±0.28
Sodium hypochlorite	98.21±0.22

[a] ชุดควบคุม คือ สารผสมที่ไม่มีการเติมสารเคมีต่าง ๆ

[b] กิจกรรมสัมพัทธ์คำนวณโดยการใช้ชุดควบคุมเป็นค่าอ้างอิงที่ 100 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองมีการทำซ้ำ 3 ซ้ำ

ตารางที่ 4-11 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5

ตัวทำละลายอินทรีย์	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
ประเภทไม่ละลายน้ำ (ไม่มีขั้ว)	
เฮกเซน	100.00±0.09
เอทิลอะซีเตท	88.15±0.42
คลอโรฟอร์ม	95.44±0.15
ประเภทละลายน้ำ (มีขั้ว)	
ไอโซโพรพานอล	78.35±0.23
เอทานอล	92.15±0.33
เมทานอล	100.00±0.02
อะซีโตน	69.21±0.04

ตารางที่ 4-12 ผลของสารซักล้างที่มีผลต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5

สารซักล้าง	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)			
	กิจกรรมของเอนไซม์	เสถียรภาพของเอนไซม์		
		อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		
		30	40	50
เอสเอ 8 พรีเมี่ยม	95.11±0.17	97.14±0.21	92.20±0.11	85.01±0.02
บรีสเพาเวอร์เทอร์โบ	92.08±0.14	89.71±0.02	84.33±0.08	78.40±0.07
เปาซิลเวอร์นาโน	100.00±0.12	100.00±0.09	100.00±0.01	100.00±0.02
ไฮยีน	84.22±0.19	71.27±0.04	65.00±0.07	58.31±0.13
ไฟน์ไลน์	90.10±0.08	88.51±0.44	81.36±0.19	74.65±0.08
บรีสเอกเซล ชนิดน้ำ	88.21±0.04	79.10±0.29	77.34±0.06	70.98±0.39

ตารางที่ 4-13 ผลของความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 ต่อสับสเตรต

สับสเตรต	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
น้ำมันพืช	
น้ำมันมะกอก	100.00±0.02
น้ำมันมะพร้าว	86.25±0.49
น้ำมันปาล์ม	98.78±0.15
น้ำมันถั่วเหลือง	88.95±0.13
น้ำมันดอกทานตะวัน	94.75±0.16
น้ำมันงา	91.23±0.23
น้ำมันละหุ่ง	85.54±0.17
กลุ่มไตรกลีเซอรอล (triglycerols)	
Tributyrin (C4)	89.75±0.05
Trilaurin (C12)	96.35±0.13
Tripalmitin (C16)	100.00±0.14
Triolein (C18)	92.14±0.18

ตารางที่ 4-13 (ต่อ)

สับสเตรต	**กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)**
กลุ่มพารา-ไนโตรฟีนิลเอสเทอร์ (*p*-nitrophenylesters)	
p-nitrophenyl caprate (C10) (*p*NPCA)	88.17±0.10
p-nitrophenyl laurate (C12) (*p*NPL)	95.56±0.14
p-nitrophenyl palmitate (C16) (*p*NPP)	100.00±0.04

4.5 การศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 ในการขจัดไขมันบนผ้าฝ้าย

4.5.1 ผลของการซักล้างในสภาวะความเป็นด่างที่พีเอชต่าง ๆ ที่มีต่อการขจัดน้ำมันมะกอกบนผ้าฝ้าย

จากการทดลองพบว่าสูตรซักล้างสูตรที่ 4 ที่ประกอบไปด้วยบัฟเฟอร์ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 10 เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 และสารซักล้างทางการค้า ยี่ห้อเปาซิลเวอร์นาโน ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) มีผลทำให้การซักล้างมีประสิทธิภาพสูงสุด โดยปริมาณน้ำมันมะกอกที่ถูกขจัดออกจากผ้าฝ้ายสูงที่สุด คือ 92.55 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4-14

ตารางที่ 4-14 ผลของการซักล้างในสภาวะความเป็นด่างที่พีเอชต่าง ๆ ที่มีต่อการขจัดน้ำมันมะกอกบนผ้าฝ้าย โดยสูตรการซักล้างทั้งหมด 4 สูตร จากการใช้เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5

พีเอช	**เปอร์เซ็นต์การขจัดน้ำมันมะกอกออกจากผ้าฝ้าย**			
	สูตรที่ 1	**สูตรที่ 2**	**สูตรที่ 3**	**สูตรที่ 4**
	B	**B+L**	**B+D**	**B+D+L**
8	12.50	62.83	73.40	82.98
9	12.50	78.45	80.96	89.88
10	12.50	84.78	85.89	92.55

หมายเหตุ: B คือ บัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8,
บัฟเฟอร์ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9
บัฟเฟอร์ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 10
L คือ เอนไซม์ไลเปส (100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
D คือ สารซักล้าง ยี่ห้อเปาซิลเวอร์นาโน ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

4.5.2 ผลของการซักล้างในสภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ ที่มีต่อการขจัดน้ำมันมะกอกบนผ้าฝ้าย

จากการทดลองพบว่าสูตรซักล้างสูตรที่ 4 ที่ประกอบไปด้วยบัฟเฟอร์ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 10 เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 และสารซักล้างทางการค้า ยี่ห้อเปาซิลเวอร์นาโน ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีผลทำให้การซักล้างมีประสิทธิภาพสูงสุด โดยปริมาณน้ำมันมะกอกที่ถูกขจัดออกจากผ้าฝ้ายสูงที่สุด คือ 94.05 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4-15

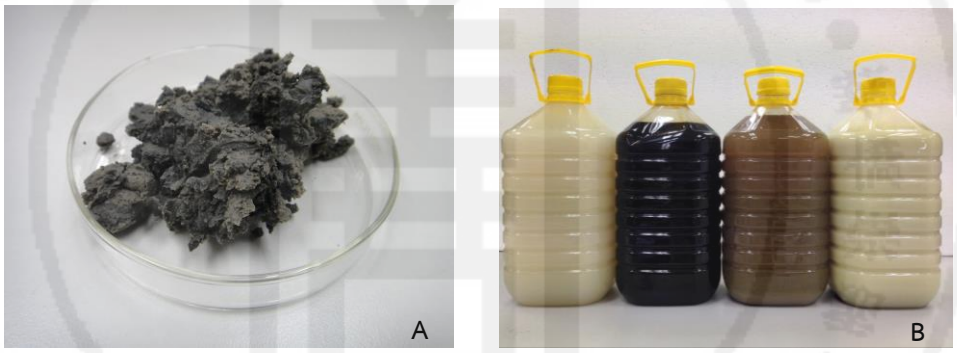
ตารางที่ 4-15 ผลของการซักล้างในสภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ ที่มีต่อการขจัดน้ำมันมะกอกบนผ้าฝ้าย โดยสูตรการซักล้างทั้งหมด 4 สูตร จากการใช้เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เปอร์เซ็นต์การขจัดน้ำมันมะกอกออกจากผ้าฝ้าย			
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3	สูตรที่ 4
	B	B+L	B+D	B+D+L
30	12.50	83.58	86.09	94.05
40	12.50	79.51	81.04	86.02
50	12.50	72.18	75.51	81.54

หมายเหตุ: B คือ บัฟเฟอร์ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 10
L คือ เอนไซม์ไลเปส (100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
D คือ สารซักล้าง ยี่ห้อเปาซิลเวอร์นาโน ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

4.6 การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างน้ำเสียและน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตน้ำมันพืช

จากการคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างน้ำในบริเวณต่าง ๆ จำนวน 9 แห่ง คือ น้ำเสียบริเวณถังดักไขมันหลังอาคารโภชนาการ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จำนวน 3 แห่ง น้ำเสียบริเวณร้านอาหารนอกมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จำนวน 3 แห่ง รวมทั้งตะกอนและน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตน้ำมันพืชในเขตจังหวัดสมุทรปราการ จำนวน 3 แห่ง (ภาพที่ 4-3) บนอาหาร lipase test medium (Tween 80 agar) โดยใช้เทคนิค Spread plate พบแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจำนวน 85 ไอโซเลต (ตารางที่ 4-16) ซึ่งสังเกตจากตะกอนขุ่นขาวรอบ ๆ โคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร lipase test medium (Tween 80 agar) (ภาพที่ 4-4)

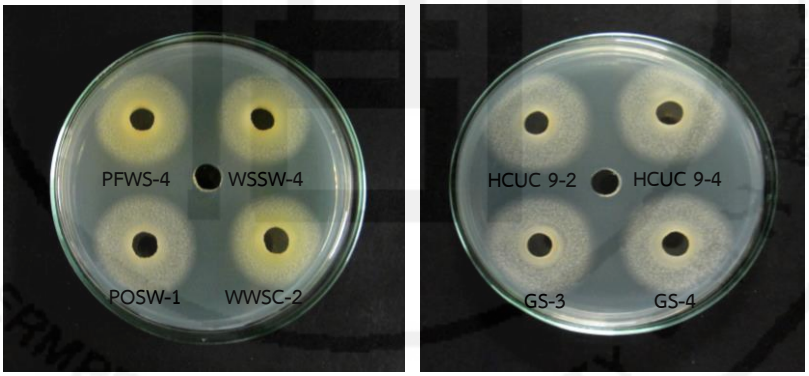


ภาพที่ 4-3 ตัวอย่างตะกอนจากบ่อบำบัดน้ำเสีย (A) และน้ำเสียจากกระบวนการผลิตน้ำมันพืชและน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตน้ำมันพืช (B)

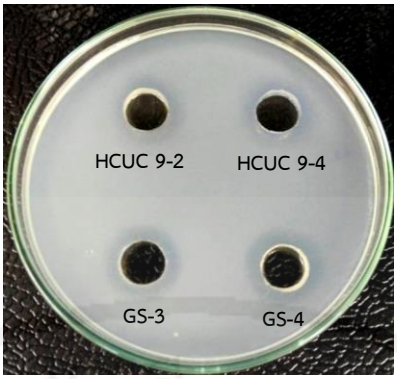
ภาพที่ 4-4 ลักษณะของตะกอนขุ่นขาวรอบ ๆ โคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร lipase test medium (Tween 80 agar) ที่คัดแยกได้จากน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมัน

4.7 การคัดเลือกแบคทีเรียจากตัวอย่างน้ำเสียและน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตน้ำมันพืชที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสบนอาหารเพาะเชื้อ lipase test medium (Tween 80) โดยวิธี Agar well diffusion โดยสังเกตจากการสร้างตะกอนขุ่นขาว พบว่าไอโซเลต POSW-1 มีการสร้างโซนตะกอนขุ่นขาวกว้างที่สุด คือ 35.00 มิลลิเมตร ลำดับรองลงมา คือ ไอโซเลต WWSC-2 มีขนาด 34.50 มิลลิเมตร ไอโซเลต PFWS-4 และ WSSW-4 มีขนาด 32.50 มิลลิเมตร ไอโซเลต GS-4 มีขนาด 30.10 มิลลิเมตร และไอโซเลต HCUC11-10 ขนาด 28.80 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4-5 และตารางที่ 4-16 สำหรับการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสบนอาหารเพาะเชื้อ tributyrin agar โดยวิธี Agar well diffusion โดยสังเกตจากโซนใส พบว่าไอโซเลต POSW-1 มีการสร้างโซนใสกว้างที่สุด คือ 20.50 มิลลิเมตร ลำดับรองลงมา คือ ไอโซเลต WWSC-2 มีขนาด 19.30 มิลลิเมตร ไอโซเลต PFWS-4 และ WSSW-4 มีขนาด 18.85 มิลลิเมตร ไอโซเลต GS-4 มีขนาด 18.40 มิลลิเมตร และไอโซเลต HCUC11-10 ขนาด 18.25 มิลลิเมตร ตามลำดับ ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4-6 และตารางที่ 4-16



ภาพที่ 4-5 ลักษณะตะกอนขุ่นขาวที่เกิดขึ้นในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยคัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียด้วยวิธี Agar well diffusion บนอาหาร lipase test medium (Tween 80 agar)



ภาพที่ 4-6 ลักษณะโซนใสที่เกิดขึ้นในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำเสียด้วยวิธี Agar well diffusion บนอาหาร tributyrin agar

จากนั้นทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี photometric assay พบว่าไอโซเลต POSW-1 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด เท่ากับ 216.55 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ ไอโซเลต WWSC-2 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส เท่ากับ 204.10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ไอโซเลต PFWS-4 และ WSSW-4 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส เท่ากับ 191.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ไอโซเลต GS-4 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส เท่ากับ 189.07 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และไอโซเลต HCUC11-10 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส เท่ากับ 188.56 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้ในการคัดเลือกไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุด พบว่าคือ ไอโซเลต POSW-1 (ตารางที่ 4-16)

ตารางที่ 4-16 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างน้ำเสียและน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตน้ำมันพืช

ลำดับ	รหัสไอโซเลต	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)		กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
		Lipase test medium	Tributyrin agar	
1	HCUC5-1	27.60	16.00	180.20
2	HCUC5-2	25.00	15.00	163.00
3	HCUC5-3	24.00	14.00	118.06
4	HCUC5-4	17.00	13.00	160.03
5	HCUC9-1	16.60	16.00	115.56
6	HCUC9-2	19.50	15.50	110.10
7	HCUC9-3	23.00	14.20	94.81
8	HCUC9-4	26.00	12.00	82.75
9	HCUC9-5	25.00	13.40	90.05
10	HCUC11-1	24.50	16.00	114.31
11	HCUC11-2	18.00	14.00	110.14
12	HCUC11-3	16.50	12.60	92.00
13	HCUC11-4	16.00	15.00	96.10
14	HCUC11-5	14.50	13.00	93.25
15	HCUC11-6	18.00	14.00	118.64
16	HCUC11-7	19.40	14.50	116.15
17	HCUC11-8	18.20	16.30	129.50
18	HCUC11-9	17.40	17.20	130.25
19	HCUC11-10	28.80	18.25	188.56
20	LTW-1	25.40	11.20	79.42
21	LTW-2	21.00	10.50	106.35
22	LTW-3	16.10	14.00	124.26
23	PPW-1	16.50	17.00	135.54
24	PPW-2	19.00	16.40	152.33
25	SPW-1	21.00	12.00	74.70
26	SPW-2	27.00	13.50	65.98

ตารางที่ 4-16 (ต่อ)

ลำดับ	รหัสไอโซเลต	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)		กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
		Lipase test medium	Tributyrin agar	
27	GS-1	22.40	15.50	169.88
28	GS-2	26.00	14.00	177.50
29	GS-3	28.00	15.50	182.10
30	GS-4	30.10	18.40	189.07
31	UWS-1	14.50	13.00	50.64
32	UWS-2	16.30	11.50	44.25
33	UWS-3	27.50	15.25	178.40
34	UDS-1	27.00	16.00	165.53
35	UDS-2	23.50	13.00	160.92
36	UWW-1	26.40	13.50	30.54
37	UWW-2	21.70	12.00	45.35
38	UWW-3	28.00	11.50	54.15
39	UCP-1	17.00	15.40	74.18
40	UCP-2	18.50	15.00	68.00
41	AOST-1	24.40	15.30	85.80
42	AOST-1	21.50	14.00	70.15
43	POST-1	23.60	17.00	50.27
44	POST-2	22.00	17.50	46.00
45	POST-3	24.30	16.70	36.38
46	POST-4	19.55	15.20	55.95
47	ROST-1	18.00	13.00	64.25
48	ROST-2	16.40	15.50	75.13
49	SBOST-1	17.50	13.00	119.54
50	SBOST-2	19.50	11.50	103.85
51	SBOST-3	17.50	14.00	102.24
52	SBOST-4	19.30	12.50	90.25
53	SBOST-5	20.60	13.40	89.15
54	STST-1	27.00	17.00	105.76
55	WWST-1	17.50	16.50	150.64
56	WWST-2	16.00	15.00	168.65

ตารางที่ 4-16 (ต่อ)

ลำดับ	รหัสไอโซเลต	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (มิลลิเมตร)		กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
		Lipase test medium	Tributyrin agar	
57	AOWW-1	11.00	14.50	112.34
58	AOWW-2	16.00	13.00	114.62
59	POWW-1	11.50	16.00	105.90
60	ROWW-1	20.10	15.50	171.00
61	ROWW-2	25.70	18.00	160.64
62	SBOWW-2	24.30	16.50	114.40
63	STWW-1	22.00	12.50	67.42
64	STWW-2	25.50	15.60	56.23
65	WWWW-1	23.50	18.00	110.90
66	WWWW-2	26.20	17.00	109.48
67	WWSC-1	28.70	16.80	160.20
68	WWSC-2	34.50	19.30	204.10
69	WWSC-3	26.50	16.40	161.28
70	WWSC-4	28.00	17.50	178.42
71	PFWS-1	23.50	16.50	165.87
72	PFWS-2	20.00	16.10	168.95
73	PFWS-3	25.40	16.55	171.27
74	PFWS-4	32.50	18.85	190.89
75	POSW-1	35.00	20.50	216.55
76	ROSW-1	27.55	16.00	165.91
77	ROSW-2	25.00	16.50	161.15
78	ROSW-3	25.60	17.50	159.45
79	ROSW-4	27.40	17.80	169.64
80	ROSW-5	19.50	15.00	158.50
81	WSSW-1	26.50	17.00	188.94
82	WSSW-2	25.30	15.50	170.59
83	WSSW-3	27.60	16.00	179.95
84	WSSW-4	32.50	18.85	190.86
85	WSSW-5	27.80	17.50	165.64

* รหัสไอโซเลตตั้งตามแหล่งที่พบไอโซเลต ตามด้วยครั้งที่พบเชื้อ และลำดับเชื้อ เช่น HCUC 5-1 HCU คือ ชื่อแหล่งที่พบเชื้อ เลข 1 ตัวแรก คือ เชื้อที่พบในครั้งแรกของการคัดเลือก เลข 1 ตัวที่สอง คือ เชื้อสายพันธุ์ที่หนึ่ง

** HCUC ย่อมาจาก Huachiew Chalermprakiet University Canteen, LTW ย่อมาจาก Lotus water, PPW ย่อมาจาก Pa Pad water และ SPW ย่อมาจาก Samutprakarn water

** GS ย่อมาจาก Gas station, U ย่อมาจาก Unison, WS ย่อมาจาก Wet sediment, DS ย่อมาจาก Dry sediment, WW ย่อมาจาก Waste water, CP ย่อมาจาก Canteen pond และ ST ย่อมาจาก Slope tank

** WW ย่อมาจาก Wash water, SC ย่อมาจาก Soil crude, PFWS ย่อมาจาก Palm fatty acid distillate and wastewater sump, SW ย่อมาจาก Sludge from the wastewater treatment system

4.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1

นำแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกแล้วมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยทำการศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง และค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเชื้อ ในส่วนของแหล่งคาร์บอนทำการศึกษาโดยใช้ตัวอย่างของเสียจากกระบวนการกลั่นน้ำมันจากโรงงานผลิตน้ำมันพืช 3 แห่ง และศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ค่าความเข้มข้น 1-5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) สำหรับแหล่งไนโตรเจนทำการศึกษาโดยใช้เพปโตน ทริปโตน ซอยโตน ไกลซีน สารสกัดจากยีสต์ ยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสซียมไนเตรต และโซเดียมไนเตรต โดยศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ค่าความเข้มข้น 0.2-1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) อุณหภูมิทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส และสภาวะความเป็นกรด-ด่างทำการศึกษาที่พีเอช 7, 8, 9 และ 10 ทั้งนี้ในการทดลองจะมีการทำ 3 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง และนำเอาผลการทดลองดังกล่าวมาวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ One-Way ANOVA นอกจากนี้ในทุกขั้นตอนของการศึกษาจะทำการวัดปริมาณโปรตีน และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ผลจากการทดลองพบว่าแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดเมื่อมีการใช้น้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 1 ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน (235.15±0.25 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) และมีการใช้เพปโตนที่ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน (255.01±0.24 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) สำหรับอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส คือ อุณหภูมิห้อง 35 องศาเซลเซียส (267.18±0.05 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) และพีเอช 7 (259.08±0.10 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) ตามลำดับดังแสดงในตารางที่ 4-17 ถึง 4-22

ตารางที่ 4-17 ผลของตัวอย่างของเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1

ตัวอย่างของเสีย [2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)]	ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)[b]
ชุดควบคุม[a]	0.59±0.05	93.85±0.29	159.45±0.02 (E)	100.00±0.02
น้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 1	0.70±0.08	165.10±0.03	235.55±0.25 (A)	147.73±0.05
PFAD[c] จากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 1	0.69±0.03	145.25±0.04	209.88±0.08 (B)	131.63±0.01
น้ำล้างจากกระบวนการผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 2	0.56±0.12	98.07±0.03	175.64±0.14 (C)	110.15±0.12
CSAO[c] จากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 2	0.59±0.15	97.48±0.08	165.10±0.26 (D)	103.54±0.08
น้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 3	0.55±0.06	94.52±0.13	171.59±0.18 (C)	107.61±0.05
Acid oil จากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 3	0.59±0.07	95.40±0.27	161.08±0.13 (D)	101.02±0.09

± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) อักษร A, B, C, D และ E: แทนข้อมูลทางสถิติในกรณีที่มีการใช้ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญจากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Tukey HSD[a] post hoc test (α = 0.05)

[a] ชุดควบคุม คือ อาหารเพาะเชื้อ basal medium ที่ไม่มีการเติมน้ำมัน

[b] กิจกรรมสัมพัทธ์คำนวณโดยการใช้ชุดควบคุมเป็นค่าอ้างอิงที่ 100 เปอร์เซ็นต์

[c] PFAD คือ palm fatty acid distillates และ CSAO คือ crude soybean acid oil

ตารางที่ 4-18 ผลของความเข้มข้นของน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 1 ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1

น้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 1 (เปอร์เซ็นต์/ปริมาตรต่อปริมาตร)	**ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)**	**กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)**	**กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)**	**กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)[b]**
ชุดควบคุม[a]	0.70±0.05	112.50±0.29	160.18±0.08 (D)	100.00±0.02
1	0.73±0.06	144.50±0.12	197.15±0.06 (B)	123.08±0.15
2	0.70±0.08	165.10±0.03	235.15±0.25 (A)	146.80±0.12
3	0.69±0.11	159.16±0.18	230.44±0.16 (A)	143.86±0.25
4	0.58±0.04	113.30±0.22	195.19±0.20 (B)	121.86±0.07
5	0.75±0.03	140.50±0.09	187.14±0.08 (C)	116.83±0.02

± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) อักษร A, B, C และ D : แทนข้อมูลทางสถิติ ในกรณีที่มีการใช้ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Tukey HSD[a] post hoc test (α = 0.05)

[a] ชุดควบคุม คือ อาหารเพาะเชื้อ basal medium ที่ไม่มีการเติมน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 1

[b] กิจกรรมสัมพัทธ์คำนวณโดยการใช้ชุดควบคุมเป็นค่าอ้างอิงที่ 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4-19 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1

แหล่งไนโตรเจน (0.5% น้ำหนักต่อปริมาตร)	ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)[b]
ชุดควบคุม[a]	0.71±0.08	166.50±0.03	234.59±0.02 (B)	100.00±0.02
เพปโตน	0.69±0.08	170.13±0.03	246.29±0.01 (A)	104.99±0.02
ซอยโตน	0.70±0.03	168.35±0.08	240.47±0.03 (A)	102.51±0.18
ไกลซีน	0.54±0.06	109.01±0.12	201.20±0.08 (C)	85.77±0.10
ทริปโตน	0.70±0.06	160.17±0.10	228.15±0.14 (B)	97.25±0.12
สารสกัดจากยีสต์	0.71±0.09	162.73±0.13	229.29±0.19 (B)	97.74±0.08
ยูเรีย	0.54±0.01	107.55±0.15	199.05±0.07 (C)	84.85±0.18
โพแทสเซียมไนเตรต	0.59±0.02	109.58±0.02	185.40±0.29 (D)	79.03±0.02
โซเดียมไนเตรต	0.55±0.01	100.28±0.06	182.02±0.20 (D)	77.59±0.14

± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) อักษร A, B, C และ D : แทนข้อมูลทางสถิติ ในกรณีที่มีการใช้ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Tukey HSD[a] post hoc test (α = 0.05)

[a] ชุดควบคุม คือ อาหารเพาะเชื้อ basal medium ที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน

[b] กิจกรรมสัมพัทธ์คำนวณโดยการใช้ชุดควบคุมเป็นค่าอ้างอิงที่ 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4-19 (ต่อ)

แหล่งไนโตรเจน (0.5% น้ำหนักต่อปริมาตร)	ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)[b]
แอมโมเนียมไนเตรต	0.59±0.03	108.95±0.12	184.30±0.39 (D)	78.56±0.22
แอมโมเนียมซัลเฟต	0.59±0.01	107.99±0.20	183.00±0.40 (D)	78.01±0.14

± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) อักษร A, B, C และ D : แทนข้อมูลทางสถิติ ในกรณีที่มีการใช้ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Tukey HSD[a] post hoc test (α = 0.05)

[a] ชุดควบคุม คือ อาหารเพาะเชื้อ basal medium ที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน

[b] กิจกรรมสัมพัทธ์คำนวณโดยการใช้ชุดควบคุมเป็นค่าอ้างอิงที่ 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4-20 ผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1

เพปโตน (% น้ำหนักต่อปริมาตร)	ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)[b]
ชุดควบคุม[a]	0.71±0.08	167.50±0.03	235.10±0.02 (C)	100.00±0.02
0.2	0.70±0.02	165.25±0.14	236.03±0.18 (C)	100.40±0.09
0.4	0.69±0.01	176.09±0.20	255.01±0.24 (A)	108.47±0.14
0.6	0.68±0.18	165.03±0.15	242.29±0.09 (B)	103.06±0.12
0.8	0.69±0.02	158.20±0.02	229.27±0.22 (D)	97.52±0.02
1.0	0.70±0.11	154.28±0.14	220.46±0.05 (E)	93.77±0.48

± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) อักษร A, B, C, D และ E : แทนข้อมูลทางสถิติ ในกรณีที่มีการใช้ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Tukey HSD[a] post hoc test (α = 0.05)

[a] ชุดควบคุม คือ อาหารเพาะเชื้อ basal medium ที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน

[b] กิจกรรมสัมพัทธ์คำนวณโดยการใช้ชุดควบคุมเป็นค่าอ้างอิงที่ 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4-21 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเชื้อที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1

ความเป็นกรด-ด่าง	ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)[b]
ชุดควบคุม[a]	0.69±0.01	176.59±0.20	255.85±0.14 (A)	100.00±0.01
7	0.59±0.12	153.03±0.01	259.08±0.10 (A)	101.26±0.18
8	0.48±0.01	119.47±0.97	248.02±0.01 (B)	96.94±0.22
9	0.66±0.07	146.21±0.51	220.16±0.06 (C)	86.05±0.04
10	0.76±0.04	149.11±0.40	196.20±0.03 (D)	76.69±0.12

± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) อักษร A, B, C และ D : แทนข้อมูลทางสถิติ ในกรณีที่มีการใช้ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Tukey HSD[a] post hoc test (α = 0.05)

[a] ชุดควบคุม คือ อาหารเพาะเชื้อ basal medium ที่ไม่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง

[b] กิจกรรมสัมพัทธ์คำนวณโดยการใช้ชุดควบคุมเป็นค่าอ้างอิงที่ 100 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4-22 ผลของอุณหภูมิในการบ่มเชื้อที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)
35	0.69±0.78	184.83±0.20	267.18±0.05 (A)
40	0.59±0.28	153.85±0.02	260.44±0.17 (B)
45	0.58±0.04	149.25±0.11	257.02±0.25 (B)
50	0.58±0.32	142.29±0.24	245.18±0.88 (C)
55	0.60±0.09	143.63±0.05	239.09±0.29 (D)
60	0.59±0.18	136.16±0.45	230.36±0.54 (E)

± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ) อักษร A, B, C, D และ E : แทนข้อมูลทางสถิติ ในกรณีที่มีการใช้ตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Tukey HSD[a] post hoc test (α = 0.05)

4.9 การศึกษาคุณสมบัติเฉพาะของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1

เอนไซม์ไลเปสที่มีประสิทธิภาพสูงซึ่งผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือกในสภาวะอาหารเพาะเชื้อที่เหมาะสมจะถูกนำมาศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ โดยในการทดลองจะมีการทำ 3 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง และนำเอาผลการทดลองดังกล่าวมาวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน และหาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการวิเคราะห์สถิติโดยใช้ One-Way ANOVA นอกจากนี้ในทุกขั้นตอนของการศึกษาจะทำการวัดปริมาณโปรตีน และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ผลจากการทดลองพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส คือ พีเอช 10 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์มีเสถียรภาพต่อความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิในช่วงกว้างระหว่างพีเอช 8-10 และอุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-23 และ 4-24 นอกจากนี้ยังพบว่าการทำงานเอนไซม์สูงขึ้นเมื่อมี $CaCl_2$, $MnCl_2$, $MgCl_2$, KCl, $ZnCl_2$ สารลดแรงตึงผิว และสารอิมัลซิฟายเออร์ โดยกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสไม่ถูกกระตุ้นเมื่อมีตัวยับยั้ง β-mercaptoethanol, DTT และ PMSF (ตารางที่ 4-25) จากการศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส พบว่าเอนไซม์มีเสถียรภาพต่อเฮกเซนและเมทานอลสูงที่สุด (ตารางที่ 4-26) สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสในการทำงานและเสถียรภาพในสภาวะที่มีสารซักล้างชนิดผงและชนิดเหลวทั้ง 6 ชนิด ที่ความเข้มข้นของสารซักล้าง 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเอนไซม์ไลเปสในเปาซิลเวอร์นาโนมีค่ากิจกรรมเอนไซม์และเสถียรภาพของเอนไซม์สูงที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 4-27 และในการศึกษาผลความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสต่อสับสเตรต พบว่าเอนไซม์ไลเปสมีความจำเพาะต่อน้ำมันมะกอก tripalmitin และ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP) ดังแสดงในตารางที่ 4-28

ตารางที่ 4-23 ผลของความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1

บัฟเฟอร์	ค่าความเป็นกรด-ด่าง	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)	
		กิจกรรมของเอนไซม์	เสถียรภาพของเอนไซม์
โซเดียมอะซิเตท	4	40.15±0.08	43.20±0.18
โซเดียมอะซิเตท	5	47.48±0.04	50.25±0.12
โซเดียมอะซิเตท	6	52.10±0.02	62.36±0.01
ซิเตรท-ฟอสเฟต	6	57.20±0.08	68.38±0.25
ซิเตรท-ฟอสเฟต	7	70.18±0.04	79.44±0.34
ฟอสเฟต	7	76.35±0.11	82.22±0.13
ฟอสเฟต	8	84.12±0.16	90.19±0.09
ทริส-ไฮโดรคลอไรด์	8	89.27±0.09	92.24±0.06
ทริส-ไฮโดรคลอไรด์	9	96.15±0.09	99.54±0.11
ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์	9	98.55±0.24	100.04±0.01
ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์	10	100.02±0.22	97.50±0.10

ตารางที่ 4-24 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)	
	กิจกรรมของเอนไซม์	เสถียรภาพของเอนไซม์
40	95.12±0.04	100.04±0.15
45	98.18±0.05	99.10±0.08
50	100.02±0.14	98.00±0.04
55	89.05±0.10	81.35±0.19
60	80.17±0.15	75.25±0.20

ตารางที่ 4-25 ผลของสารเคมีที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1

สารเคมี	**กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)**[b]
ชุดควบคุม[a]	100.00±0.02
ไอออนโลหะ (ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์)	
$AlCl_3$	84.52±0.14
$BaCl_2$	88.15±0.09
$CaCl_2$	155.30±0.05
$CoCl_2$	78.45±0.03
$CsCl_2$	98.15±0.15
$CuSO_4$	99.13±0.13
KCl	125.15±0.08
$LiCl_2$	108.00±0.25
$MgCl_2$	134.22±0.18
$MnCl_2$	140.30±0.05
$ZnCl_2$	118.10±0.25
สารลดแรงตึงผิว (ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์)	
Glycerol	126.15±0.05
Tween 20	125.25±0.10
Tween 80	132.13±0.28
Triton X-100	137.02±0.08
SDS	139.15±0.16
Sodium cholate	120.10±0.40
สารอิมัลซิฟายเออร์ (ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์)	
Gum arabic	128.14±0.07
Gelatin	129.35±0.04

ตารางที่ 4-25 (ต่อ)

สารเคมี	**กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)**[b]
สารยับยั้ง (ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์)	
β-mercaptoethanol	45.23±0.11
EDTA	116.12±0.02
DTT	35.04±0.24
PMSF	55.46±0.15
Oxidizing agents (ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์)	
Hydrogen peroxide	106.10±0.18
Sodium hypochlorite	97.28±0.40

[a] ชุดควบคุม คือ สารผสมที่ไม่มีการเติมสารเคมีต่าง ๆ

[b] กิจกรรมสัมพัทธ์คำนวณโดยการใช้ชุดควบคุมเป็นค่าอ้างอิงที่ 100 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองมีการทำซ้ำ 3 ซ้ำ

ตารางที่ 4-26 ผลของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1

ตัวทำละลายอินทรีย์	**กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)**
ประเภทไม่ละลายน้ำ (ไม่มีขั้ว)	
เฮกเซน	100.00±0.02
เอทิลอะซีเตท	98.05±0.12
คลอโรฟอร์ม	85.14±0.08
ประเภทละลายน้ำ (มีขั้ว)	
ไอโซโพรพานอล	88.25±0.03
เอทานอล	95.15±0.05
เมทานอล	100.00±0.08
อะซีโตน	79.01±0.15

ตารางที่ 4-27 ผลของสารซักล้างที่มีผลต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1

สารซักล้าง	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)			
	กิจกรรมของเอนไซม์	เสถียรภาพของเอนไซม์		
		อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		
		30	40	50
เอสเอ 8 พรีเมี่ยม	90.01±0.14	87.24±0.01	82.20±0.55	75.01±0.02
บรีสเพาเวอร์เทอร์โบ	96.08±0.10	92.65±0.12	87.33±0.28	77.40±0.08
เปาซิลเวอร์นาโน	100.00±0.02	100.00±0.15	100.00±0.24	100.00±0.08
ไฮยีน	88.12±0.29	80.20±0.20	75.60±0.07	68.45±0.03
ไฟน์ไลน์	95.20±0.18	90.40±0.34	88.16±0.19	85.25±0.08
บรีสเอกเซล ชนิดน้ำ	89.01±0.08	85.10±0.17	80.34±0.06	78.18±0.19

ตารางที่ 4-28 ผลของความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1 ต่อสับสเตรต

สับสเตรต	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
น้ำมันพืช	
น้ำมันมะกอก	100.00±0.02
น้ำมันมะพร้าว	86.04±0.19
น้ำมันปาล์ม	98.27±0.11
น้ำมันถั่วเหลือง	93.45±0.23
น้ำมันดอกทานตะวัน	90.75±0.12
น้ำมันงา	88.25±0.24
น้ำมันละหุ่ง	85.14±0.10
น้ำมันรำข้าว	95.28±0.03

ตารางที่ 4-28 (ต่อ)

สับสเตรต	กิจกรรมสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
กลุ่มไตรกลีเซอรอล (triglycerols)	
Tributyrin (C4)	85.19±0.01
Trilaurin (C12)	98.12±0.03
Tripalmitin (C16)	100.00±0.14
Triolein (C18)	90.08±0.04
กลุ่มพารา-ไนโตรฟีนิลเอสเทอร์ (*p*-nitrophenylesters)	
p-nitrophenyl caprate (C10) (*p*NPCA)	89.27±0.13
p-nitrophenyl laurate (C12) (*p*NPL)	96.16±0.45
p-nitrophenyl palmitate (C16) (*p*NPP)	100.00±0.04

4.10 การศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1 ในการขจัดไขมันบนผ้าฝ้าย

4.10.1 ผลของการซักล้างในสภาวะความเป็นด่างที่พีเอชต่าง ๆ ที่มีต่อการขจัดน้ำมันมะกอกบนผ้าฝ้าย

จากการทดลองพบว่าสูตรซักล้างสูตรที่ 4 ที่ประกอบไปด้วยบัฟเฟอร์ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 10 เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1 และสารซักล้างทางการค้า ยี่ห้อเปาซิลเวอร์นาโน ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่สภาวะอุณหภูมิห้อง (27-30 องศาเซลเซียส) มีผลทำให้การซักล้างมีประสิทธิภาพสูงสุด โดยปริมาณน้ำมันมะกอกที่ถูกขจัดออกจากผ้าฝ้ายสูงที่สุด คือ 98.55 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4-29

ตารางที่ 4-29 ผลของการซักล้างในสภาวะความเป็นด่างที่พีเอชต่าง ๆ ที่มีต่อการขจัดน้ำมันมะกอกบนผ้าฝ้าย โดยสูตรการซักล้างทั้งหมด 4 สูตร จากการใช้เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1

พีเอช	เปอร์เซ็นต์การขจัดน้ำมันมะกอกออกจากผ้าฝ้าย			
	สูตรที่ 1 B	สูตรที่ 2 B+L	สูตรที่ 3 B+D	สูตรที่ 4 B+D+L
8	12.50	75.02	74.10	88.45
9	12.50	80.15	80.40	92.60
10	12.50	88.56	85.25	98.55

หมายเหตุ: B คือ บัฟเฟอร์ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8,
บัฟเฟอร์ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9
บัฟเฟอร์ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 10
L คือ เอนไซม์ไลเปส (100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
D คือ สารซักล้าง ยี่ห้อเปาซิลเวอร์นาโน ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

4.10.2 ผลของการซักล้างในสภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ ที่มีต่อการขจัดน้ำมันมะกอกบนผ้าฝ้าย

จากการทดลองพบว่าสูตรซักล้างสูตรที่ 4 ที่ประกอบไปด้วยบัฟเฟอร์ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 10 เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1 และสารซักล้างทางการค้า ยี่ห้อเปาซิลเวอร์นาโน ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีผลทำให้การซักล้างมีประสิทธิภาพสูงสุด โดยปริมาณน้ำมันมะกอกที่ถูกขจัดออกจากผ้าฝ้ายสูงที่สุด คือ 98.45 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 4-30

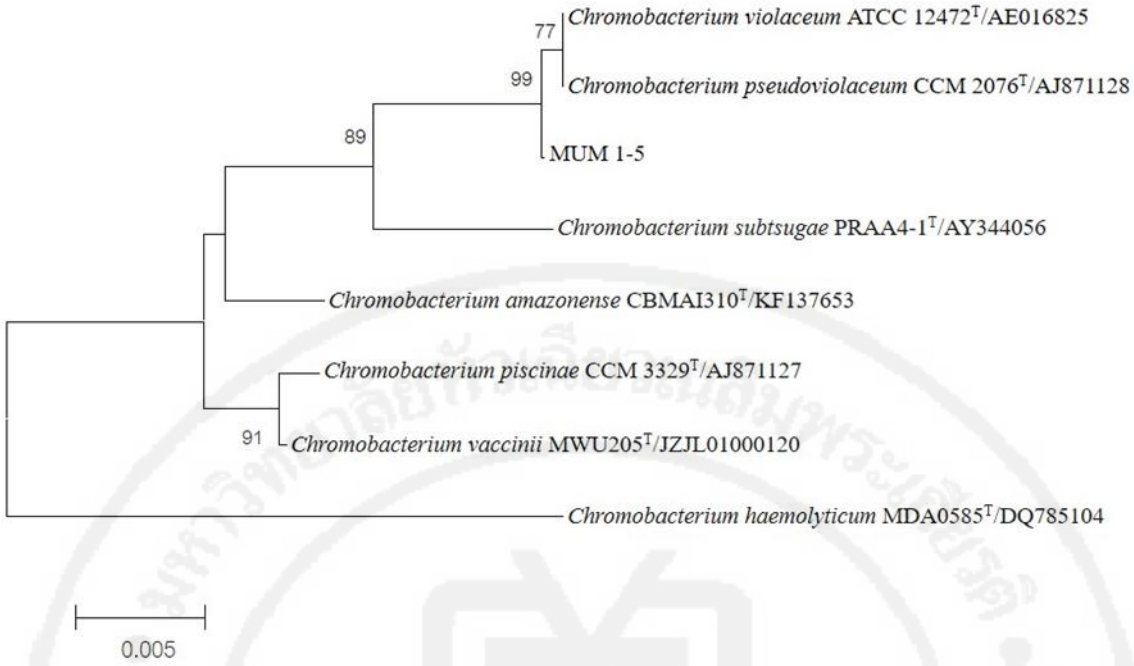
ตารางที่ 4-30 ผลของการซักล้างในสภาวะอุณหภูมิต่าง ๆ ที่มีต่อการขจัดน้ำมันมะกอกบนผ้าฝ้าย โดยสูตรการซักล้างทั้งหมด 4 สูตร จากการใช้เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เปอร์เซ็นต์การขจัดน้ำมันมะกอกออกจากผ้าฝ้าย			
	สูตรที่ 1 B	สูตรที่ 2 B+L	สูตรที่ 3 B+D	สูตรที่ 4 B+D+L
30	12.50	88.22	86.20	98.45
40	12.50	83.25	82.56	90.02
50	12.50	77.25	75.12	85.36

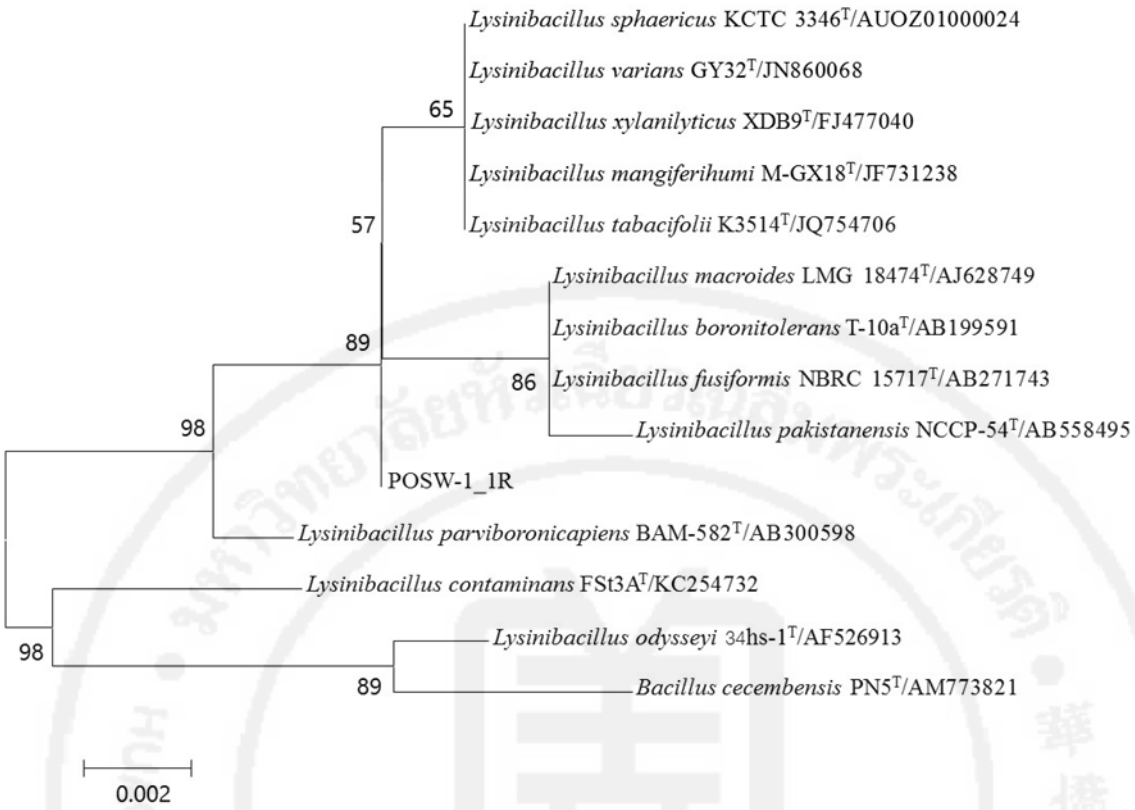
หมายเหตุ: B คือ บัฟเฟอร์ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 10
L คือ เอนไซม์ไลเปส (100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
D คือ สารซักล้าง ยี่ห้อเปาซิลเวอร์นาโน ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

4.11 การระบุชนิดแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16s rRNA และสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

จากการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16s rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 และ POSW-1 โดยเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16s rRNA กับฐานข้อมูล National Center for Biotechnology Information (NCBI) (เว็บไซต์ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 มีความคล้ายคลึงกับ *Chromobacterium violaceum* ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1 มีความคล้ายคลึงกับ *Lysinibacillus* sp. ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ และจากการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดยวิธี Neighbor-Joining method (79) พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ *Chromobacterium* sp. และแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1 ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกับ *Lysinibacillus* sp. แสดงดังภาพที่ 4-7 และ 4-8 ตามลำดับ



ภาพที่ 4-7 แผนภูมิวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 สเกล 0.005 แทน evolution distance ของจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนไปต่อนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่ง ตัวเลขที่จุดตัด (node) ของแผนภูมิแสดงความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างแผนภูมิด้วย Bootstrap test โดยวิธี Neighbor-Joining method



ภาพที่ 4-8 แผนภูมิวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1 สเกล 0.002 แทน evolution distance ของจำนวนนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนไปต่อนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่ง ตัวเลขที่จุดตัด (node) ของแผนภูมิแสดงความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้างแผนภูมิด้วย Bootstrap test โดยวิธี Neighbor-Joining method

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างดิน จำนวน 10 แห่ง คือ ดินบริเวณถังดักไขมันหลังอาคารโภชนาการ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จำนวน 2 แห่ง และดินที่ปนเปื้อนน้ำมันบริเวณร้านอาหารจากแหล่งต่าง ๆ ในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล จำนวน 8 แห่ง และตัวอย่างน้ำเสีย จำนวน 9 แห่ง คือ น้ำเสียบริเวณถังดักไขมันหลังอาคารโภชนาการ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จำนวน 3 แห่ง น้ำเสียบริเวณร้านอาหารนอกมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จำนวน 3 แห่ง และน้ำเสียจากระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงานผลิตน้ำมันพืชในเขตกรุงเทพมหานครและปริมณฑล จำนวน 3 แห่ง พบแบคทีเรีย จำนวน 141 ไอโซเลต ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ ซึ่งจากการคัดเลือกไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุด บนอาหารเพาะเชื้อ lipase test medium (Tween 80) และ tributyrin agar (42, 50) โดยวิธี Agar well diffusion และการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี photometric assay (85) พบว่า ไอโซเลต MUM1-5 และ POSW-1 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุด

ดังนั้นจึงทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 และ POSW-1 ผลจากการทดลองพบว่า แบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุด เมื่อมีการใช้น้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 1 ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน (216.35±0.09 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) และมีการใช้เพปโตนที่ความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน (258.29±0.09 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) สำหรับอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส คือ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (277.02±0.25 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) และพีเอช 7 (260.58±0.25 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) สำหรับแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุด เมื่อมีการใช้น้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชแห่งที่ 1 ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งคาร์บอน (235.15±0.25 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) และมีการใช้เพปโตนที่ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน (255.01±0.24 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) สำหรับอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส คือ อุณหภูมิห้อง 35 องศาเซลเซียส (267.18±0.05 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) และพีเอช 7 (259.08±0.10 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) ตามลำดับ

ในการนำตัวอย่างของเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืชมาเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า แบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 และ POSW-1 สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อชักนำการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ D'Annibale et al. (51) ซึ่งศึกษาการใช้ของเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันมะกอก เพื่อใช้เป็นสับสเตรตสำหรับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยพบว่าจุลินทรีย์ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในของเสียจากกระบวนการสกัดน้ำมันมะกอก และสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ โดย *C. cylindracea* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดของแหล่งไนโตรเจน และการเพิ่มน้ำมันมะกอกลงในอาหารดังกล่าวมีผลในการชักนำการผลิตเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น โดย *C. cylindracea* ผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุดถึง 9.23 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อมีการเติมแอมโมเนียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2.4 กรัมต่อลิตร และน้ำมันมะกอก ความเข้มข้น 3.0 กรัมต่อลิตร รวมทั้ง Abdelmoez et al. (19) รายงานการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *C. rugosa* ATCC 14830 โดยการใช้ของเสียทางอุตสาหกรรม จำนวน 2 แหล่ง คือ ของเสียจากกระบวนการกลั่นน้ำมันและ ของเสียจากกระบวนผลิตสารเคมีอุตสาหกรรมที่ผลิตจากไขมันและน้ำมันจากพืชน้ำมัน (อุตสาหกรรมโอลิโอเคมี) ซึ่งผลจากการศึกษาพบว่า *C. rugosa* ATCC 14830 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงถึง 7 และ7.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ของเสียจากกระบวนการกลั่นน้ำมันและของเสียจากอุตสาหกรรมโอลิโอเคมีเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการผสมของเสียทางอุตสาหกรรมทั้ง 2 แหล่ง และน้ำมันมะกอกเข้าด้วยกัน เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนจะส่งผลให้ *C. rugosa* ATCC 14830 ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงถึง 10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสนั้นมีความสำคัญ เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้ไนโตรเจนแตกต่างกัน บางสายพันธุ์สามารถใช้ไนโตรเจนในรูปของสารอนินทรีย์ได้ ขณะที่บางสายพันธุ์สามารถใช้ไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ได้ดี ดังนั้นในการผลิตไลเปสให้ได้ปริมาณสูงสุด จึงต้องเลือกใช้ไนโตรเจนให้เหมาะสมกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 และ POSW-1 ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุดเมื่อเติมเพปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งแตกต่างกับงานวิจัยของ Brozzoli *et al*. (21) โดยได้รายงานว่าการเพิ่มกลูโคส มอลต์สกัด และแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น เพปโตนและสารสกัดจากยีสต์ ไม่สามารถชักนำหรือไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ อย่างไรก็ตามในปี ค.ศ. 1990 Iizumi et al. (33) ศึกษาการผลิตไลเปสที่ทนอุณหภูมิสูงจาก *Pseudomonas* sp. KW1-56 โดยใช้อาหารเพาะเชื้อที่ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนที่เป็นเพปโตน ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และสารสกัดจากยีสต์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าสามารถชักนำการผลิตเอนไซม์ไขเปสของ *Pseudomonas* sp. KW1-56 ได้สูง

แบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 และ POSW-1 ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุดที่พีเอช 7 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Rhati et al. (59) พบว่าในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Burkhlderia cepacia* ในอาหารเพาะเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ นั้นแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่พีเอช 7 และ 10 แต่พบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่พีเอช 7 มากกว่า พีเอช 10 สำหรับการศึกษาสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย พบว่าความเป็นกรด-ด่างมีผลโดยตรงต่ออัตราการเจริญและระบบเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ โดยอัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะค่อย ๆ ลดลงเมื่อความเป็นกรด-ด่างสูงหรือต่ำกว่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม แต่โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์ส่วนมากจะเจริญได้ดีที่สุดที่ความเป็นกรด-ด่างในระดับกลาง ๆ (neutralophile) หรือพีเอชประมาณ 7 (55) ดังนั้นการที่จะให้เชื้อมีอัตราการเจริญได้สูงและคงที่จำเป็นต้องมีการควบคุมความเป็นกรด-ด่างของอาหารเพาะเชื้อให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 และ POSW-1 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิห้อง 45 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งต่างจากงานวิจัยของ Janssen et al. (10) ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ Wai 28A 45 ที่ชอบอุณหภูมิสูง ในสภาวะที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยพบว่าต้องทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีไขมันอิ่มตัว จึงจะผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณสูง

จากการศึกษาคุณสมบัติเฉพาะของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส คือ พีเอช 10 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์มีเสถียรภาพต่อความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิในช่วงกว้างระหว่างพีเอช 8-10 และอุณหภูมิ 40-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการทำงานเอนไซม์สูงขึ้นเมื่อมี $CaCl_2$, $LiCl_2$, $MgCl_2$, $MnCl_2$ สารลดแรงตึงผิว และสารอิมัลซิฟายเออร์ โดยกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสไม่ถูกกระตุ้นเมื่อมีตัวยับยั้ง β-mercaptoethanol, DTT และ PMSF จากการศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส พบว่าเอนไซม์มีเสถียรภาพต่อเฮกเซนและเมทานอลสูงที่สุด สำหรับการทดสอบกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสในสภาวะที่มีสารซักล้างชนิดผงและชนิดเหลวทั้ง 6 ชนิด ที่ความเข้มข้นของสารซักล้าง 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเอนไซม์ไลเปสในเปาซิลเวอร์นาโนมีค่ากิจกรรมเอนไซม์และเสถียรภาพของเอนไซม์สูงที่สุด และในการศึกษาผลความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสต่อสับสเตรต พบว่าเอนไซม์ไลเปสมีความจำเพาะต่อน้ำมันมะกอก tripalmitin และ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP)

สำหรับการศึกษาคุณสมบัติเฉพาะของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต POSW-1 พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส คือ พีเอช 10 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์มีเสถียรภาพต่อความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิในช่วงกว้างระหว่างพีเอช 8-10 และอุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการทำงานเอนไซม์สูงขึ้นเมื่อมี $CaCl_2$, $MnCl_2$, $MgCl_2$, KCl, $ZnCl_2$ สารลดแรงตึงผิว และสารอิมัลซิฟายเออร์ โดยกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสไม่ถูกกระตุ้นเมื่อมีตัวยับยั้ง β-mercaptoethanol, DTT และ PMSF จากการศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส พบว่าเอนไซม์มีเสถียรภาพต่อเฮกเซนและเมทานอลสูงที่สุด สำหรับการทดสอบกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสในสภาวะที่มีสารซักล้างชนิดผงและชนิดเหลวทั้ง 6 ชนิด ที่ความเข้มข้นของสารซักล้าง 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเอนไซม์ไลเปสในเปาซิลเวอร์นาโนมีค่ากิจกรรมเอนไซม์และเสถียรภาพของเอนไซม์สูงที่สุด และในการศึกษาผลความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสต่อสับสเตรต พบว่าเอนไซม์ไลเปสมีความจำเพาะต่อน้ำมันมะกอก tripalmitin และ *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP)

ในการศึกษาคุณสมบัติเฉพาะของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 และ POSW-1 โดยศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปส พบว่า เมื่อใช้ substrate solution ที่เตรียมจาก glycine-NaOH พีเอช 10 มีผลทำให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงที่สุด และเอนไซม์มีเสถียรภาพต่อความเป็นกรด-ด่างในช่วงกว้างระหว่างพีเอช 8-10 ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับการรายงานของ Cherif et al. (86) โดยพบว่า เอนไซม์ไลเปสจาก *Staphylococcus* sp. สามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 12 และมีเสถียรภาพอยู่ในช่วงพีเอช 9-13 ในการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสพบว่า เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 และ POSW-1 มีเสถียรภาพสูงในช่วงอุณหภูมิ 40-55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Dharmsthiti and Pratuangdejkul (87) โดยพบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Acinetobacter calcoaceticus* LP009 ทำงานได้ดีที่พีเอช 7.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และจากการทดสอบทางเสถียรภาพพบว่าเอนไซม์ไลเปสมีเสถียรภาพในช่วงอุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์

สำหรับไอออนของโลหะพบว่า เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 และ POSW-1 มีกิจกรรมสูงขึ้นเมื่อมี $CaCl_2$ และ$MgCl_2$ ทั้งนี้ไอออนของโลหะจะมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของอัตราการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย และปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ของเอนไซม์ไลเปส รวมทั้งมีผลต่อการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของกิจกรรมเอนไซม์ เช่น Kgardoputo and Ruben (56) ได้รายงานว่า

เอนไซม์ไลเปสจาก *B. thermoleovorans* ถูกยับยั้งด้วยไอออนของเหล็ก (Fe^{2+}) ไอออนของโลหะบางชนิดมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย เช่น ไอออนของแคลเซียม (Ca^{2+}) ไอออนของโซเดียม (Na^{+}) และไอออนของแมกนีเซียม (Mg^{2+}) จัดเป็นไอออนที่เร่งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ไลเปส ส่วนใหญ่ไอออนของแคลเซียมมักจะเป็นไอออนที่เร่งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ โดยไอออนของแคลเซียมจะช่วยในการเปลี่ยนรูปร่างของเอนไซม์ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้น เพิ่มการดูดซึมของเอนไซม์ไลเปสที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมัน และยังช่วยกำจัดกรดไขมันออกจากผิวสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมัน Janssen et al. (10) รายงานถึงกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. ที่ชอบอุณหภูมิสูง เพิ่มขึ้นหลายเท่าในอาหารเพาะเชื้อที่เติมไอออนของแมกนีเซียม ไอออนของเหล็ก และไอออนของแคลเซียม เช่นเดียวกับ Dong et al. (88) ที่ได้กล่าวว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. มีกิจกรรมเพิ่มขึ้นเมื่อเติมไอออนของแคลเซียม แต่ถูกยับยั้งด้วยไอออนของแมงกานีส

ในการศึกษาถึงผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อกิจกรรมและเสถียรภาพของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 และ POSW-1 มีเสถียรภาพต่อเฮกเซนและเมทานอลสูงที่สุด ทั้งนี้ส่วนใหญ่ตัวทำละลายอินทรีย์มักจะลดความยืดหยุ่นในโมเลกุลของเอนไซม์และจะทำให้โมเลกุลของเอนไซม์สูญเสียสภาพธรรมชาติ ซึ่งตัวอย่างของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ไลเปส เช่น เมทานอลจะทำให้เอนไซม์ไลเปสจาก *P. stutzeri* LC2-8 (65), *B. sphaericus* MICC 7542 (71) มีความคงตัวลดลง แม้ว่าโดยส่วนใหญ่ตัวทำละลายอินทรีย์จะทำให้ไลเปสมีความคงตัวลดลง แต่ตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิดก็สามารถเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์ไลเปสได้ เช่น ไอโซออกเทนนั้น พบว่าจะช่วยเพิ่มเสถียรภาพของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จาก *P. aeruginosa* AAU2 (18), *P. aeruginosa* LST-03 (68)

จากการศึกษาถึงผลของสารลดแรงตึงผิว ออกซิไดซ์ซิงเอเจนท์ และสารซักล้างชนิดต่าง ๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 และ POSW-1 พบว่ามีผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้น ซึ่งพบว่าไม่สอดคล้องกับการรายงานของ Nawani et al. (89) ที่ได้กล่าวว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. เมื่อเติม TritonX-100, Tween 20, hydrogen peroxide, sodium hypochlorite มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเพียงเล็กน้อย และจากการศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 และ POSW-1 ในการขจัดน้ำมันมะกอกบนผ้าฝ้าย พบว่ามีค่าเปอร์เซ็นต์การขจัดน้ำมันมะกอกออกจากผ้าฝ้ายสูงที่สุดเท่ากับ 94.05 และ 98.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการซักล้าง คือ ค่าพีเอชเท่ากับ 10 และที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งส่งผลให้เพิ่มประสิทธิภาพในการขจัดน้ำมันมะกอกบนผ้าฝ้ายได้ดีที่สุด

ข้อเสนอแนะ

1. ด้านการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปส

1.1 ทำการศึกษาแหล่งคาร์บอนประเภทอื่น ๆ เช่น น้ำมันที่ผ่านการใช้งานแล้ว ของเสียทางการเกษตร เป็นต้น

1.2 ศึกษาแหล่งคาร์บอนผสม เช่น การนำน้ำมันที่ยังไม่ผ่านการใช้งานผสมกับน้ำมันที่ผ่านการใช้งานแล้ว ของเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันพืช หรือของเสียทางการเกษตร

2. ด้านการศึกษาคุณสมบัติเฉพาะของเอนไซม์

2.1 ทดสอบสารเคมีต่าง ๆ เช่น อิออนของโลหะ เพื่อเป็นการศึกษาสภาวะจำลองความกระด้างของน้ำก่อนนำไปศึกษาต่อในด้านการซักล้าง

2.2 ทดสอบส่วนประกอบของสารซักล้างที่เป็นสารชนิดเดียวกันกับสารซักล้างทางการค้า

2.3 ศึกษาความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสที่มีต่อสับสเตรต เพื่อศึกษาว่าเอนไซม์ไลเปสมีความจำเพาะต่อน้ำมันประเภทใด

3. ด้านการศึกษาประสิทธิภาพในการขจัดน้ำมันบนผ้าฝ้าย

3.1 ในการศึกษาด้านประสิทธิภาพในการขจัดน้ำมันมะกอกบนผ้าฝ้าย ควรมีการใช้น้ำมันที่หลากหลาย และมีความเหมาะสมต่อความนิยมของแต่ละประเทศที่มีการใช้น้ำมัน เช่น ประเทศไทยมีการบริโภคอาหารส่วนใหญ่ที่ใช้น้ำมันพืช และน้ำมันหมู ดังนั้นเป็นที่น่าสนใจที่จะนำน้ำมันพืชและน้ำมันหมูมาทำการศึกษาต่อในด้านประสิทธิภาพในการขจัดน้ำมันบนผ้าฝ้ายที่นอกเหนือจากน้ำมันมะกอก

3.2 ในการศึกษาด้านประสิทธิภาพในการขจัดน้ำมันบนผ้าฝ้าย ควรมีการศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสมต่อการซักล้างในการขจัดน้ำมันบนผ้า

3.3 ทำการสำรวจส่วนประกอบของสารซักเพิ่มขึ้น ทั้งสินค้าที่ผลิตในประเทศไทยและต่างประเทศ เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาสูตรสารซักล้างที่มีการผสมเอนไซม์ไลเปส

4. ด้านการระบุชนิดแบคทีเรีย

4.1 ทำการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียไอโซเลต MUM1-5 และ POSW-1 เพื่อเป็นข้อมูลเชิงเปรียบเทียบกับข้อมูลของแผนภูมิวิวัฒนาการ

4.2 ทำการเพิ่มขยายลำดับเบส เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการสร้างแผนภูมิวิวัฒนาการที่มีความเที่ยงตรงยิ่งขึ้น

บรรณานุกรม

1. Rajan M. Global market for industrial enzymes to reach $2.4 million by 2009 Business Communications Company, Inc. RC-147U Enzymes for Industrial Applications [internet]. 2004 [cited 2013 July 10]. Available from: http://www.bccresearch.com/editors/RC-147U.html

2. Hasan F, Shah AA, Hameed A. 2006. Industrial applications of microbial lipases. Enzyme Microb Tech 2006;39(2):235-51.

3. Sharma R, Chisti Y, Banergee UC. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. Biotechnol Adv 2001;19:627-62.

4. Jensen RG. Section and determination of lipase (acylglycerol hydrolase) activity from various sources. Lipids 1983;18(9):650-57.

5. ณกัญภัทร จินดา และทรัพย์ทวี ฝุ่นทอง. เอนไซม์ไลเปส: การผลิตและคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ. วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย 2549;2:50-62.

6. Gary RK. Hydrolysis of lipase in wastewater. Appl Microb Biotechnol 1971;97:731-44.

7. Schrag JD, Li Y, Wu S, Cygler M. Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*. Nature 1991;351(6329):761-4.

8. ปวีณา อร่ามรัตนา. การผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันดอกทานตะวันดิบโดยใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ; 2548.

9. วุฒิ ดำรงศักดิ์. การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสจากบาซิลลัสเพื่อนำไปใช้ในสารซักล้าง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. กรุงเทพฯ; 2547.

บรรณานุกรม (ต่อ)

10. Janssen PH, Monk CR, Morgan HW. A thermophilic lipolytic *Bacillus* sp. and continuous assay of its *p*-nitrophenyl palmitate esterase activity. FEMS Microbiol Lett 1994;120:195-200.

11. Schmidt-Dannert C, Sztajer H, Stocklein W, Menge U, Schmid RD. Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus.* Biochim Biophys Acta 1994;1214:43-53.

12. Dharmsthiti S, Luchai S. Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027. Fed Eur Mat Soc Microbiol Lett 1999;179:241-6.

13. Joseph B, Shrivastava N, Ramteke PW. 2012. Extracellular cold-active lipase of *Microbacterium luteolum* isolated from Gangotri glacier, western Himalaya: isolation, partial purification and characterization. J Genet Eng Biotechnol 2012;10:137-44.

14. Salihu A, Alam MDZ, Abdulkarim MI, Salleh HM. Lipase production: an insight in the utilization of renewable agricultural residues. Resour Conserv Recy 2012;58:36-44.

15. Cheirsilp B, Louhasakul Y. Industrial wastes as a promising renewable source for production of microbial lipid and direct transesterification of the lipid into biodiesel. Bioresource Technol 2013;142:329-37.

16. Wang Y, Srivastava KC, Shen GJ, Wang HY. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* sp. strain A30-1 (ATCC 53841). J Ferment Bioeng 1995;79:433-8.

17. Lin SF, Chiou CM, Yeh C, Tsai YC. Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. Appl Environ Microbiol 1996;62:1093-5.

บรรณานุกรม (ต่อ)

18. Bose A, Keharia H. Production, characterization and applications of organic solvent tolerant lipase by *Pseudomonas aeruginosa* AAU2. Biocatal Agr Biotechnol 2013;2:255-66.

19. Abdelmoez W, Mostafa NA, Mustafa A. Utilization of oleochemical industry residues as substrates for lipase production for enzymatic sunflower oil hydrolysis. J Clean Prod 2013;59:290-7.

20. Miranda OA, Salgueiro AA, Pimentel MCB, Lima FJL, Melo EHM, Duran N. Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. Bioresour Technol 1999;69:145-7.

21. Brozzoli V, Crognale S, Sampedro I, Federici F, D'Annibale A, Petruccioli M. Assessment of olive-mill wastewater as a growth medium for lipase production by *Candida cylindracea* in bench-top reactor. Bioresour Technol 2009;100:3395-402.

22. Godoy MG, Gutarra MLE, Maciel FM, Felix SP, Bevilaqua JV, Machado OLT, et al. Use of a low-cost methodology for biodetoxification of castor bean waste and lipase production. Enzyme Microb Techno 2009;44:317-22.

23. ศูนย์วิจัยสุขภาพกรุงเทพ. ผงซักฟอก [อินเตอร์เน็ต] . 2556 [เข้าถึงเมื่อ 12 ธ.ค. 2556]. เข้าถึงได้จาก: http://www.bangkokhealth.com/health/article/ผงซักฟอก-1631

24. เสาวนีย์ ธรรมสถิติ. แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพ เซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์. นครปฐม: สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหิดล; 2547.

25. Smibert RM, Krieg NR. Phenotypic characterization, pp. 607-712. In: Gerhardt P, Wood WA, Krieg NR, eds. Methods for General and Molecular Bacteriology. ASM, Washington, D.C.; 1994.

บรรณานุกรม (ต่อ)

26. Sharma R, Soni SK, Vohra RM, Gupta LK, Gupta JK. Purification and characterization of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. Process Biochem 2002;37:1075-84.

27. Perry RH, Green DW. Perry's chemical engineers's handbook. New York: Mc Graw-Hill; 1997.

28. Hames BD, Rickvuood D. Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press; 1990.

29. Jensen RG. Lipolytic enzymes. Prog Chem Fats Other Lipids 1971;11:347-94.

30. Seitz EW. Industrial application of microbial lipase. J Am Oil Chem Soc 1974;51(2):12-6.

31. Kramer GR. Hydrolysis of lipid in wastewater. J Sani Eng Divis 1971;97:731-44.

32. Macrae AR. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fat. J Am Oil Chem Soc 1983;61:1067-71.

33. Iizumi T, Nakamura K, Fukase T. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. Agric Biol Chem 1990;54:1253-8.

34. Gilbert EJ, Cornish A, Jones CW. Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2. J Gen Microbiol 1991;137:2223-9.

35. Pabai F, Kermasha S, Morin A. Interesterification of butter fat by partially purified extracellular lipases from *Pseudomonas putida, Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae*. World J Microbiol Biotechnol 1995;11:669-7.

36. Emtenani S, Asoodeh A, Emtenani S. Molecular cloning of a thermo-alkaliphilic lipase from *Bacillus subtilis* DR8806: expression and biochemical characterization. Process Biochem 2013;48(11):1679-85.

บรรณานุกรม (ต่อ)

37. Li M, Yang LR, Xu G, Wu JP. Screening, purification and characterization of a novel cold-active and organic solvent-tolerant lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* CGMCC 4254. Bioresour Technol 2013;148:114-20.

38. นฤมล จียโชค. เทคโนโลยีชีวภาพของไขมัน. ใน: การประชุมปฏิบัติการภาคฤดูร้อนสาขาชีวเคมี ครั้งที่ 19 วันที่ 2-4 พฤษภาคม 2537. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพฯ; 2537.

39. Bradoo S, Saxena RK, Gupta R. Two acidothermotolerant lipases from new variants of *Bacillus* spp. World J Microbiol Biotechnol 1999;15:97-102.

40. Fadiloglu S, Erkmen O. Effects of carbon and nitrogen sources on lipase production by *Candida rugosa*. Turkish J Eng Env Sci 2002;26:249-54.

41. Sugimori D, Nakamura M, Mihara Y. Microbial degradation of lipid by *Acinetobacter* sp. strain SOD-1. Biosci Biotechnol Biochem 2002;66(7):1579-82.

42. Matsumiya Y, Wakita D, Kimura A, Sanpa S, Kubo M. Isolation and characterization of a lipid-degrading bacterium and its application to lipid-containing wastewater treatment. J Biosci Bioeng 2007;10(4):325-30.

43. Okumura S, Iwai M, Tsujisuka Y. The effect of reverse action on triglyceride hydrolysis by lipase. Agric Biol Chem 1981;45(1):180-9.

44. Yamane T, Ashkin A, Dziedzic JM. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared-laser beams. Nature 1987;330(6150):769-71.

45. พรทิพย์ จันทรมงคล. เอกสารคำสอนวิชาชีววิทยาของมลพิษทางน้ำ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่; 2547.

46. Boze H, Moulin G, Galzy P. Production of microbial biomass, pp. 170-220. In Rehm HJ, Reed G, Puhler A, Stadler P, eds. Biotechnology: Enzyme, Biomass, Food and Feed. 2nd ed., VCH. Verlagsqesellchaft, Germany; 1995.

บรรณานุกรม (ต่อ)

47. Stanbury PF, Whitaker A, Hall SJ. Principles of Fermentation Technology. New York: Elsevier Science Ltd. Progamon; 1995.

48. Sugihara A, Tani T, Tominaga Y. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. J Biochem 1991;109(2):211-6.

49. Papaparaskevas D, Christakopoulos P, Kekos D, Macris BJ. Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*. Biotechnol Lette 1992;14:397-402.

50. Haba E, Bresco O, Ferrer C, Marques A, Busquets M, Manresa A. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. Enzyme Microb Technol 2000;26:40-4.

51. D'Annibale A, Sermanni GG, Federici F, Petruccioli M. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. Bioresour Technol 2006;97:1828-33.

52. พิมพิกา จันทนะ. แบคทีเรียในดินที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้อย่างมีประสิทธิภาพ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ; 2551.

53. จันทนา จินดา. การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากผลปาล์มน้ำมันที่เน่าเสีย. วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย 2552;1:40-55.

54. Cordenons A, Gonzalez R, Kok R, Hellingwerf KJ, Nudel C. Effect of nitrogen sources on the regulation of extracellular lipase production in *Acinetobacter calcoaceticus* strains. Biotechnol Lett 1996;18:633-8.

55. Moat AG, Foster JW. Microbial Physiology. New York: John Wiley and Sons Inc.; 1995.

56. Kgardoputo GB, Ruben EL. Effects of various activators and inhibitors on the lipase activity of fungus of the genus *Geotrichum.* Microbiol 1974;43:814-9.

บรรณานุกรม (ต่อ)

57. Jaeger KE, Reetz TM. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. Trends Biotechnol 1998;16:396-403.

58. Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, Nigam P, Krieger N, Soccol VT. The realm of microbial lipases in biotechnology. Biotechnol Appl Biochem 1999;29:119-31.

59. Rathi P, Saxena RK, Gupta R. Anovel alkaline lipase from *Burkholderia capacia* for detergent formulation. Prosess Biochem 2001;37:187-92.

60. Kurtovic I, Marshall SN, Miller MR, Zhao X. Flavour development in dairy cream using fish digestive lipases from Chinnok salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and New Zealand hoki (*Macruronnus novaezealandiae*). Food Chem 2011;127:1562-8.

61. Hoq MM, Yamane T, Shimizu S, Funada T, Ishida S. Continuous hydrolysis of olive oil by lipase in microporous hydrophobic membrane bioreactor. J Am Oil Chem Soc 1985;62:1016-21.

62. Garcia HS, Yang B, Parkin KL. Contineous reactor for enzymatic glycerolysis of butter oil in the absence of solvent. Food Res Int 1995;28:605-9.

63. Gandhi NN. Application of lipase. J Am Oil Chem Soc 1997;74:621-34.

64. Godfrey T, Reichelt J. Industrial Enzymology: the application of enzyme in industry. England: Macmillan Publishers Ltd; 1983.

65. Cao Y, Zhuang Y, Yao C, Wu B, He B. Purification and characterization of an organic solvent–stable lipase from *Pseudomonas stutzeri* LC2-8 and its application for efficient resolution of (R.S)-1-phenylethanol. Biochem Eng J 2012;64:55-60.

บรรณานุกรม (ต่อ)

66. Masomain M, Rahman NR, Salleh BA, Basri M. A new thermostable and organic solvent-tolerant lipase from *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain HZ. Process Biochem 2013;48(1):169-75.

67. จิราวรรณ มลาไวย์ สายน้ำผึ้ง ฉายาพัฒน์ และ ปราณี พัฒนนิพิธไพศาล. การคัดเลือกไลเปสจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงเพื่อการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 2555;14(2):71-7.

68. Ogino H, Nakagawa S, Shinya K, Muto T, Fujimura N. Purification and characterization of organic solvent-stable lipases from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. J Biosci Bioeng 2000;89(5):451-7.

69. Dheeman DS, Henehan GTM, Frias JM. Purification and properties of *Amycolatopsis mediterrnei* DSM 43304 lipase and its potential in flavor ester synthesis. Bioresour Technol 2011;102:3373-9.

70. Mitsuhashi K, Yamashita M, Hwan YS, Ihara F, Nihira T, Yamada Y. Purification and characterization of a novel extracellular lipase catalyzing hydrolysis of oleyl benzoate from *Acinetobacter* nov. sp. Strain KM109. Biosci Biotechnol Biochem 1999;63:1959-64.

71. Tamilarasan K, Dharmendira KM. Purification and characterization of solvent tolerant lipase from *Bacillus sphaericus* MTCC 7542. Biocatal Agric Biotechnol 2012;1(4):309-13.

72. Wang YJ, Sheu JY, Wang FT, Shaw JF. Lipase catalyzed oil hydrolysis in the absence of added emulsifier. Biotechnol Bioeng 1988;31:628-33.

73. Gupta N. Enzyme function in organic Sovent. Eur J Biochem 1992;203:25-32.

74. พรรณี พุทธศรีจารุ. เอนไซม์ในผลิตภัณฑ์ซักผ้า. เอกสารทางวิชาการกลุ่มงานวัตถุอันตรายประเภทผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดและฆ่าเชื้อโรคที่พื้นผิววัสดุ. กรุงเทพฯ: กองควบคุมวัตถุมีพิษ สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา; 2541.

บรรณานุกรม (ต่อ)

75. รุ่งนภา ศรีสังวาลย์ และ สิรารมย์ ปลื้มสวาสดิ์. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ ไลเปสจากแบคทีเรีย และการประยุกต์ใช้ในสารซักล้าง. โครงงานพิเศษปริญญาตรี สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ. สมุทรปราการ; 2557.

76. Hemachander C, Puvanakrishnan R. Lipase from *Ralstonia pickettii* as an additive in laundry detergent formulations. Process Biochem 2000;35:809-14.

77. Mamta C, Rajinder SC, Vijay KG. Evaluation of a new lipase from *Staphylococcus* sp. for detergent additive capability. Biomed Res Int 2013;2013(10):173-234.

78. Xiao LL, Wen HZ, Ying DW, Yu JD, Hui TZ, Yue W. et al. A high detergent performance, cold-adapted lipase from *Pseudomonas stutzerui* PS59 suitable for detergent formulation. J Mol Catal B: Enzym 2014;102:16-24.

79. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 1987;4:406-25.

80. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution30: 2725-2729. 2013.

81. Sztajer H, Maliszewska I. Production of exogenous lipase by bacterial, fungi and actinomycetes. Enzyme Microb Technol 1998;10:492-6.

82. Know DY, Rhee JS. A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. J Am Oil Chem Soc 1986;63:89-92.

83. Liu R, Jiang X, Mou H, Guan H, Hwang H, Li X. A novel low-temperature resistant alkaline lipase from a soda lake fungus strain *Fusarium solani* N4-2 for detergent formulation. Biochem Eng J 2009;46:265-70.

บรรณานุกรม (ต่อ)

84. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitivity method for the quantitative of microgram quantities of protein utilizing of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248-54.

85. Kordel M, Hofmann B, Schomburg D, Schmid RD. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization and preliminary X-ray diffraction data. J Bacterial 1991; 173:4836-41.

86. Cherif S, Mnif S, Hadrich F, Abdelkafi S, Sayadi S. 2011. A newly high alkaline lipase: an ideal choice for application in detergent formulations. Lipids Health Dis 2011;10:221-8.

87. Dharmsthiti S, Pratuangdejkul J. 1998. Purification and characterization of lipase form psychrophilic *Acinetobacter calcoaceticus* LP009. Microbiol Res 1998; 155(2):95-100.

88. Dong H, Gao S, Han SP, Cao, SG. Purification and characterization of a *Pseudomonas* sp. lipase and its properties in non-aqueous media. Biotechnol Appl Biochem 1999;30:251-6.

89. Nawani N, Dosanjh NS, Kaur, J. A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and esterification studies. Biotechnol Lett 1998;20(10):997-1000.

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมอาหารเพาะเชื้อและสารเคมี

1. Lipase test medium (Tween 80)

เพบโตน (peptone)	10.00 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.00 กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)	0.10 กรัม
ผงวุ้น (agar)	15.00 กรัม
Tween 80	10.00 มิลลิลิตร

นำส่วนประกอบต่าง ๆ ไปละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปต้มจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน โดยสังเกตจากการนำแท่งแก้วจุ่มลงไปแล้วไม่มีเม็ดของผงวุ้นเกาะติดแท่งแก้วขึ้นมา แสดงว่าสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน บรรจุลงในขวดรูปชมพู่และปิดปากขวดด้วยจุกสำลี ปิดทับอีกครั้งด้วยกระดาษ จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

2. Basal medium

เพปโตน	1.00 กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$	0.50 กรัม
โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.50 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.10 กรัม
น้ำมันมะกอก (olive oil)	2.00 มิลลิลิตร

ชั่งส่วนประกอบต่าง ๆ นำไปละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ ปิดปากขวดรูปชมพู่ด้วยจุกสำลี และปิดทับอีกครั้งด้วยกระดาษ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

3. Tributyrin agar

Tributyrin	1.50 มิลลิลิตร
ผงวุ้น (agar)	1.50 กรัม

นำส่วนประกอบต่าง ๆ ไปผสมลงน้ำกลั่น ปริมาตร 98.5 มิลลิลิตร นำไปต้มจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน โดยสังเกตจากการนำแท่งแก้วจุ่มลงไปแล้วไม่มีเม็ดของผงวุ้นเกาะติด แท่งแก้วขึ้นมาแสดงว่าสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน บรรจุลงในขวดรูปชมพู่ และปิดปากขวดด้วยจุกสำลี ปิดทับอีกครั้งด้วยกระดาษ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

4. EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (1 mM EDTA)

ชั่ง EDTA หนัก 0.372 กรัม นำไปละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันใส่ในขวดรูปชมพู่ ปิดปากขวดรูปชมพู่ด้วยจุกสำลี และปิดทับอีกครั้งด้วยกระดาษ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

5. Substrate solution

5.1 การเตรียมสารละลาย A

ชั่ง *p*-NPP หนัก 0.1 กรัม นำไปละลายในไอโซโพรพานอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยการนำไป sonicate จน *p*-NPP ละลายหมด (ควรเตรียมและใช้ทันที)

5.2 การเตรียมสารละลาย B

ชั่งกัมอะราบิคหนัก 0.1 กรัม ใส่ลงใน Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเติม Triton X-100 ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน ทำการเก็บในหลอดทดลอง (ควรเตรียมและใช้ทันที)

6. สารละลาย Hydrogen peroxide ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ (0.01% Hydrogen peroxide)

ปิเปตต์ Hydrogen peroxide ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร นำไปละลายในน้ำ ปริมาตร 99.99 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ ปิดปากขวดรูปชมพู่ด้วยจุกสำลีปิดทับอีกครั้งด้วยกระดาษ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

7. สารละลาย Sodium Dodecyl Sulphate ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ (0.01% Sodium Dodecyl Sulphate)

ปิเปตต์ Sodium Dodecyl Sulphate ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร นำไปละลายในน้ำ ปริมาตร 99.99 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ ปิดปากขวดรูปชมพู่ด้วยจุกสำลีปิดทับอีกครั้งด้วยกระดาษ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

8. สารละลาย Sodium hypochlorite ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ (0.01% Sodium hypochlorite)

ปิเปตต์ Sodium hypochlorite ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร นำไปละลายในน้ำปริมาตร 99.99 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ ปิดปากขวดรูปชมพู่ด้วยจุกสำลีปิดทับอีกครั้งด้วยกระดาษ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

9. สารละลาย Triton X-100 ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ (0.01% Triton X-100)

ปิเปตต์ Triton X-100 ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร นำไปละลายในน้ำ ปริมาตร 99.99 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ ปิดปากขวดรูปชมพู่ด้วยจุกสำลีปิดทับอีกครั้งด้วยกระดาษ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

10. สารละลาย Tween 80 ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ (0.01% Tween 80)

ปิเปตต์ Tween 80 ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร นำไปละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 99.99 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ ปิดปากขวดรูปชมพู่ด้วยจุกสำลีปิดทับอีกครั้งด้วยกระดาษ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

11. สารละลาย Tween 20 ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ (0.01% Tween 20)

ปิเปตต์ Tween 20 ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร นำไปละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 99.99 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ ปิดปากขวดรูปชมพู่ด้วยจุกสำลีปิดทับอีกครั้งด้วยกระดาษ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

12. สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ (0.01% EDTA)

ชั่ง EDTA หนัก 0.041 กรัม นำไปละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ ปิดปากขวดรูปชมพู่ด้วยจุกสำลีปิดทับอีกครั้งด้วยกระดาษ จากนั้นนำไปทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

13. สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8 (50 mM Tris HCl; pH 8)

ชั่ง Tris HCl หนัก 0.30 กรัม นำไปละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ปรับค่า ความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับพีเอช 10.0 ด้วย HCl หรือ NaOH ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้ พีเอชเท่ากับ 10.0 ให้ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ ปิดปากขวดรูปชมพู่ด้วยจุกสำลี ปิดทับอีกครั้งด้วยกระดาษ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

14. สารละลาย glycine ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 9 (50 mM glycine; pH 9)

ชั่ง glycine หนัก 0.18 กรัม นำไปละลายในน้ำ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับพีเอช 11.0 ด้วย HCl หรือ NaOH ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้พีเอชเท่ากับ 11.0 ให้ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ ปิดปากขวดรูปชมพู่ด้วยจุกสำลีปิดทับอีกครั้งด้วยกระดาษ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

15. สารละลาย glycine ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 10 (50 mM glycine; pH 10)

ชั่ง glycine หนัก 0.18 กรัม นำไปละลายในน้ำ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับพีเอช 12.0 ด้วย HCl หรือ NaOH ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้พีเอชเท่ากับ

12.0 ให้ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ ปิดปากขวดรูปชมพู่ด้วยจุกสำลี ปิดทับอีกครั้งด้วยกระดาษ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學

ภาคผนวก ข

การคำนวณปริมาณโปรตีนและกิจกรรมเอนไซม์

1. การคำนวณปริมาณโปรตีน

จากสูตร

$$y = 0.4436x - 0.0011$$

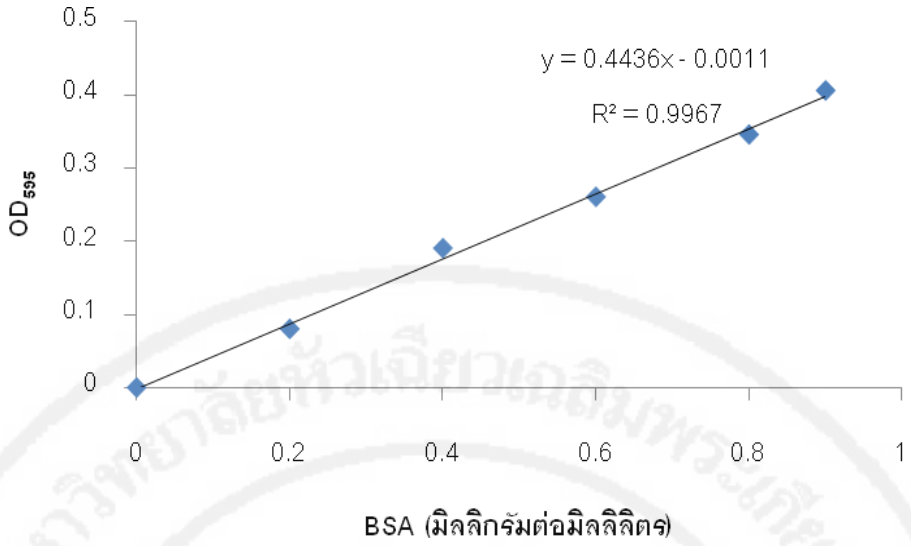
$$X = \frac{y + 0.0011}{0.4436}$$

X = ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

Y = ค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{595}

ตารางที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนมาตรฐาน Bradford

BSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	OD_{595}
0.0	0.000
0.2	0.080
0.4	0.190
0.6	0.260
0.8	0.345
0.9	0.405



ภาพที่ 1 กราฟโปรตีนมาตรฐานของ BSA

2. การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

2.1 การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ (นาโนโมล)

จากสูตร

$$y = 0.0133x + 0.0872$$

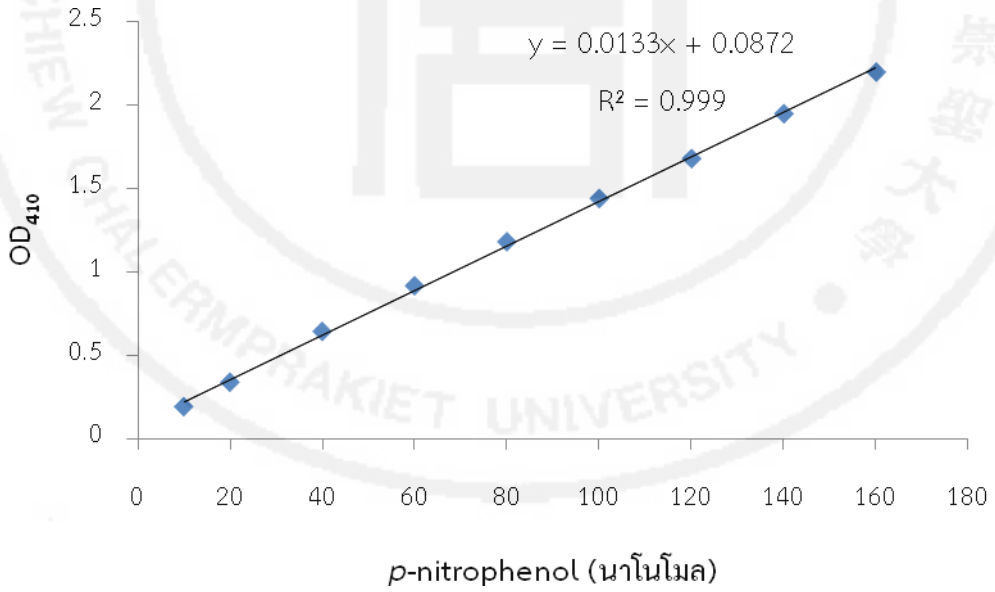
$$X = \frac{y - 0.0872}{0.0133}$$

X = กิจกรรมของเอนไซม์ (นาโนโมล)

Y = ค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{410}

ตารางที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงของ *p*-nitrophenol

p-nitrophenol (นาโนโมล)	OD_{410}
10	0.188
20	0.335
40	0.640
60	0.915
80	1.180
100	1.440
120	1.680
140	1.950
160	2.200



ภาพที่ 2 กราฟเอนไซม์มาตรฐานของ *p*-nitrophenol

2.2 การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต)

จากสูตร

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์} = \frac{X}{\text{เวลาที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยา (นาที)}}$$

2.3 การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

จากสูตร

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์} = \frac{\text{1,000 ไมโครลิตร x กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิต)}}{\text{100 ไมโครลิตร}}$$

ภาคผนวก ค

ขั้นตอนการเตรียมและวิเคราะห์โปรตีน

1. การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

1.1 คำนวณปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ต้องใช้ในการตกตะกอนโปรตีนที่ 80 เปอร์เซ็นต์อิ่มตัว (ตารางที่ 1)

1.2 นำส่วนของส่วนใส (supernatant) จากการเลี้ยงเชื้อใส่ในฟลาสก์ ที่มีแท่งแม่เหล็กกวนสาร จากนั้นวางฟลาสก์ในอ่างน้ำเย็นที่ตั้งอยู่บนแท่นกวนสาร

1.3 ค่อย ๆ เติมแอมโมเนียมซัลเฟตอย่างช้า ๆ พร้อมทั้งกวนเบา ๆ จนกว่าเกลือละลายจนหมด เมื่อเกลือละลายหมดให้กวนต่อเป็นเวลา 30 นาที

1.4 นำสารแขวนลอยตะกอนโปรตีนไปปั่นที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.5 เทส่วนใสทิ้ง และละลายตะกอน (pellet) ด้วยสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เก็บใน microtube

1.6 นำเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกจากสารละลายโปรตีนด้วยวิธี Dialysis

ตารางที่ 1 ปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้เติมในสารละลายโปรตีนเพื่อให้ได้ % saturation ตามต้องการ

	Final concentration									
Starting concentration	**55%**	**60%**	**65%**	**70%**	**75%**	**80%**	**85%**	**90%**	**95%**	**100%**
0%	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
5%	319	357	397	439	481	526	572	621	671	723
10%	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
15%	255	292	331	371	413	456	501	548	596	647
20%	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
25%	191	227	265	304	344	386	429	475	522	571
30%	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
35%	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
40%	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
45%	64	97	132	169	206	245	286	329	373	419
50%	32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
55%		33	66	101	138	175	215	256	298	343
60%			33	67	103	140	179	219	261	305
65%				34	69	105	143	183	224	266
70%					34	70	107	146	186	228
75%						35	72	110	149	190
80%							36	73	112	152
85%								37	75	114
90%									37	76
95%										38

adapted from Protein Purification: Principles and Practice. 1982. R.K. Scopes. 282 pages. Springer-Verlag, New York.

หมายเหตุ: ทำการชั่งแอมโมเนียมซัลเฟตตามการคำนวณเทียบกับตารางมาตรฐานนี้ (หน่วยกรัม) โดยคิดเทียบกับปริมาตรน้ำเลี้ยงเชื้อ (ที่ปั่นแยกเซลล์ออก) ที่ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

2. การนำเกลือออกจากสารละลายโปรตีนด้วยวิธี Dialysis

2.1 ตัดความยาวของ dialysis tubing ให้เหมาะสมกับปริมาตรของตัวอย่างสารละลายโปรตีน

2.2 ต้มถุง dialysis ในน้ำกลั่นเดือด เป็นเวลา 5 นาที เทน้ำทิ้ง จากนั้นจึงเติมสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ลงไป

2.3 ตัดฝา microtube ที่มีสารละลายโปรตีน ปิดคลุมฝาด้วยถุง dialysis และทำการพันทับด้วยพาราฟิล์ม

2.4 เทสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ที่มีแท่งแม่เหล็กกวนสาร

2.5 วาง microtube ในแผ่นโฟมที่เจาะรู และหันด้านฝาให้สัมผัสกับสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

2.6 วางบีกเกอร์ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นตั้งบนแท่นกวนสาร ทำการกวนเบา ๆ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2.7 จากนั้นเปลี่ยน dialysis buffer ทุก ๆ 2 ชั่วโมง เป็นจำนวน 3 ครั้ง

2.8 เก็บตัวอย่างสารละลายโปรตีน (dialyzed protein) ใน microtube ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกส่วนที่เป็นตะกอนออก

2.9 เก็บตัวอย่างสารละลายโปรตีนใน microtube ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2.10 นำตัวอย่างสารละลายโปรตีนมาทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธี Photometric assay (85) และวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ในลำดับต่อไป

3. วัดกิจกรรมเอนไซม์ตามวิธี Photometric assay (85)

ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธี Photometric assay โดยใช้ *p*-nitrophenyl palmitale (*p*-NPP) เป็นสับสเตรต ทำการเตรียมสารละลาย A โดยชั่ง *p*-NPP หนัก 0.062 กรัม ละลายใน isopropanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer จนกว่า *p*-NPP จะละลายหมด จากนั้นเตรียมสารละลาย B โดยละลาย gum arabic ใน Tris-HCl พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และ Triton X-100 ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ทำการวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสได้โดยผสมสารละลาย A ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลาย B ปริมาตร 900 ไมโครลิตร จากนั้นปิเปตต์ออก ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายโปรตีน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่า OD_{410} จากนั้นทำการคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดยที่ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 1 หน่วย (U) มีค่าเท่ากับ *p*–nitrophenol ถูกผลิตออกมาในปริมาณ 1 นาโนโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ได้ทำการวิเคราะห์

ภาคผนวก ง

ประวัติย่อผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อภาษาไทย	นางสาวปิยาภรณ์ สุภัคดำรงกุล
ชื่อภาษาอังกฤษ	Miss Piyaporn Supakdamrongkul
คุณวุฒิ	วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปร.ด. (เภสัชศาสตร์ชีวภาพ) มหาวิทยาลัยมหิดล
ตำแหน่ง	อาจารย์ประจำสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
สถานที่ทำงาน	สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสมุทรปราการ 10540 โทรศัพท์ 02-3126300 ต่อ 1256
ที่อยู่	เลขที่ 14/22 หมู่ 9 หมู่บ้านยุพาทองนิเวศน์ ถนนปู่เจ้าสมิงพราย ตำบลสำโรงกลาง อำเภอพระประแดง จังหวัดสมุทรปราการ 10130 โทรศัพท์ 081-8492561, 086-3742561
อีเมล	junejungko@hotmail.com, junejungko@gmail.com

ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อภาษาไทย	นางสาวจันทร์เพ็ญ วิวัฒน์
ชื่อภาษาอังกฤษ	Miss Chanpen Wiwat
คุณวุฒิ	วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยมหิดล วท.ม. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปร.ด. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยมหิดล
ตำแหน่ง	รองศาสตราจารย์
สถานที่ทำงาน	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400 โทรศัพท์ 02-6448692 โทรสาร 02-6448692

ที่อยู่ เลขที่ 123/34 หมู่บ้านเศรณีปาร์ค ถนนวิภาวดี 60
แขวงตลาดบางเขน เขตหลักสี่ กรุงเทพฯ 10210
โทรศัพท์ 081-9206957
อีเมล pycww@mahidol.ac.th

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ HUACHIEW CHALERMPRAKIET UNIVERSITY 華僑崇聖大學