บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

ในปัจจุบันมีการนำไลเปสมาใช้ประโยชน์เพิ่มมากขึ้นในอุตสาหกรรมประเภทต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ผงซักฟอก ยา และใช้ในการบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น ข้อจำกัดอย่างหนึ่งของเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรม คือเอนไซม์ไม่ทนต่ออุณหภูมิสูง ดังนั้นในกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรมที่มีอุณหภูมิสูงจะเป็นผลให้เอนไซม์เสียสภาพ ต้องลดอุณหภูมิของกระบวนการผลิตลง ซึ่งเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตอย่างมาก เพราะฉะนั้นการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ จะช่วยลดต้นทุนการหล่อเย็น ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การใช้อุณหภูมิสูงในการผลิตจะช่วยลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นและลดความหนืดของน้ำหมัก ไลเปสทนร้อนพบได้จากจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในที่ที่มีอุณหภูมิสูง ดังนั้นแบคทีเรียทนร้อนน่าจะเป็นแหล่งที่ดีในการผลิตไลเปสทนร้อน จุดมุ่งหมายของงานวิจัยนี้เพื่อคัดแยกแบคทีเรียทนร้อนที่ผลิตไลเปสได้ เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ศึกษาขั้นต่อไปเพื่อพัฒนาเข้าสู่อุตสาหกรรมซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อประเทศในอนาคต

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. การศึกษาเกี่ยวกับการคัดแยกและจำแนกจุลินทรีย์ที่สร้างไลเปส

Wang และคณะ (1995) ได้ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างไลเปสทนร้อนได้จากน้ำพุร้อน เมื่อนำมาศึกษาลักษณะสมบัติพบว่าเป็น *Bacillus* sp. จากนั้นนำไลเปสที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นมาศึกษา พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 60 องศาเซลเซียส, ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 9.5 , หลังจากบ่มที่ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ไลเปสยังคงมีแอคติวิตี 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ไลเปสยังมีความเสถียรต่อไฮโดรเจนเปอรอกไซด์ และ alkaline protease , ไลเปสมีค่า isoelectric point เท่ากับ 5.15 และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 65,000 ดาลตัน

Soo และคณะ (1998) คัดแยกแบคทีเรียผลิตไลเปสที่มีความสามารถย่อยสลายเอสเทอร์ที่มีโครงสร้างบริเวณแอลกอฮอล์เกะกะ (bulky ester) ซึ่งเป็นสับสเตรทที่ย่อยสลายยากมาก โดย

ใช้ *t*-butyl octanoate (TBO) เป็นตัวแทนของสับสเตรท คัดแยกได้ 279 สายพันธุ์จากตัวอย่างดิน 350 แหล่ง และพบว่าสายพันธุ์ YY62 มีแอคติวิตีสูงสุด จึงนำมาจำแนกชนิดพบว่าเป็น *Burkholderia* sp. จากลักษณะสมบัติทางชีวเคมีและลำดับยีน 16 SrRNA เป็นแบคทีเรียรูปแท่งแกรมลบ สามารถเคลื่อนที่ได้ สามารถย่อย TBO ได้มากกว่าไลเปสทางการค้า 100 เท่า

Haba และคณะ (2000) คัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตไลเปส โดยใช้น้ำมันที่ผ่านการทอดแล้วเป็นสับสเตรท ได้เชื้อแบคทีเรียและยีสต์ 47 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Rhodococcus* sp. และ *Candida* sp. เชื้อที่สามารถผลิตไลเปสได้สูงสุดคือ *Pseudomonas* sp. 3AT (2,748 หน่วยต่อลิตร) และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 11 (1,703.8 หน่วยต่อลิตร)

Takeshi และคณะ (2001) ได้คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไลเปสจากดินที่ Siberian tunda มีลักษณะเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่าง coccoid rod สามารถเจริญที่ 4 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส สามารถจำแนกได้เป็น psychrotrophic จีนัส *Acinetobacter* โดยใช้วิธีหาลำดับยีน 16 SrRNA เชื้อนี้สามารถผลิตไลเปสในระหว่างการเจริญที่ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งเหมาะที่จะนำไปใช้บำบัดของเสียที่เป็นพวกไขมันในสภาวะที่หนาวเย็น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 20 องศาเซลเซียส

2. การศึกษาเกี่ยวกับการผลิตไลเปสจากจุลินทรีย์

Ulrich และคณะ (1979) นำโพลีแซคคาไรด์ 21 ชนิดมาทดสอบความสามารถในการเพิ่มการผลิตไลเปสของ *Serratia marcescens* พบว่ามี 5 ชนิดที่มีประสิทธิภาพได้แก่ ไกลโคเจน (glycogen), ไฮยาลูโรเนต (hyaluronate), ลามินาริน (larminarin), แพ็คติน บี (pectin B) และกัมอะราบิค (gum arabic) โพลีแซคคาไรด์เหล่านี้มีลักษณะเป็นร่างแห (network) เนื่องจากโมเลกุลมีการเรียงตัวแบบกิ่ง (branching) หรือขดลวด (helical) ได้มีการตั้งสมมติฐานว่าโพลีแซคคาไรด์จะทำให้ไลเปสซึ่งเป็นตัวยับยั้งการสร้างไลเปสแบบแข่งขันหลุดออกจากบริเวณเร่งหรือไปเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไลเปสที่เป็นตัวยับยั้งแบบแข่งขัน ทำให้ไม่สามารถเกาะบริเวณเร่งได้ การแยกไขมันจากโพลีแซคคาไรด์เหล่านี้ไม่ได้ลดความสามารถในการเพิ่มการผลิตไลเปสเลย เมื่อแปรผันความเข้มข้นของไกลโคเจนพบว่าตำแหน่งที่ไกลโคเจนเข้าทำปฏิกิริยามีปริมาณจำกัด

Ely (1988) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสของ *Rhizopus oligosporus* พบว่าในอาหารที่มีทวีนและซอยบีนมีล (soybean meal) ทำให้การเจริญและการผลิตไลเปสเพิ่มขึ้น สารพวกคาร์โบไฮเดรต, น้ำมันพืช, โปรตีนและกรดอะมิโนไม่ช่วยเพิ่มการผลิตไลเปส เชื้อมีการเจริญดีที่สุดในสภาวะ 35-40 องศาเซลเซียส pH 5.5 บ่มเป็นเวลา 4 วัน ส่วนการผลิตไลเปสมีสภาวะที่เหมาะสมคือ 15 องศาเซลเซียส, pH 6.5 บ่มเป็นเวลา 3 วัน การเขย่าจะเพิ่มการเจริญของเชื้อแต่ลดการผลิตไลเปส

Okeke และ Okolo (1990) ศึกษาสภาวะที่ทำให้ *Acremonium strictum* ผลิตไลเปสได้มาก พบว่าการเลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน มีไซโลส (xylose) 2 เปอร์เซ็นต์ และซอยบีน มีล (soybean meal) 3.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ และเติม 1 เปอร์เซ็นต์ ทวีน 80 ในอาหาร ทำให้สามารถผลิตไลเปสได้มาก

Gilbert และคณะ (1991) ศึกษาการควบคุมสรีรวิทยาในการผลิตไลเปสของแบคทีเรียทนร้อน *Pseudomonas aeruginosa* (EF2) โดยแปรผันสภาวะในการเลี้ยงทั้งแบบ batch, fed-batch และ continuous พบว่าการชักนำการผลิตไลเปสโดยคาร์บอน และ/หรือการจำกัดสารอาหารมีผลต่อการชักนำการผลิตไลเปสน้อยมาก แต่ถูกชักนำได้เป็นอย่างดีด้วย fatty acyl ester เช่น ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) และทวีน (tween) แต่ถูกยับยั้งโดย long chain fatty acid เช่น กรดโอเลอิค สภาวะที่มีแอคติวิตีของไลเปสสูงได้แก่ ช่วง stationary phase ของระบบ batch ที่เลี้ยงในทวีน 80, ระบบ fed-batch ที่จำกัดทวีน 80 และ ระบบ continuous ที่เลี้ยงในสภาวะที่ทำให้อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) ต่ำ

Masanobu และคณะ (1995) ศึกษาการไฮโดรไลซิสของ palm stearin oil โดยไลเปสทนร้อนจาก *Pseudomonas* sp. ใน Draft tube - type reactor ซึ่งเป็น bioreactor ชนิดใหม่ที่ประกอบด้วย draft tube , impeller , baffle และ UF membrane สามารถแยกน้ำ น้ำมันและเอนไซม์อย่างต่อเนื่อง ทำให้การไฮโดรไลซิสมีประสิทธิภาพสูงขึ้น น้ำและน้ำมันจะแยกจากกันโดย baffle และแยกไลเปสออกโดย UF membrane

Majda และคณะ (1998) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจาก *Rhizopus oryzae* พบว่ามีสภาวะดังนี้คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 8.5 เลี้ยงในอาหาร 2 สูตร สูตรเพิ่ม

การผลิตไลเปสและสูตรเพิ่มแอคติวิตี สารที่มีผลยับยั้งแอคติวิตีของไลเปสได้แก่ alkane, acetone, ether และ chloroalkane. แต่เชื้อรา *Rhizopus oryzae* สามารถทนต่อตัวทำละลายได้ดี

Dimitris และคณะ (1999) ศึกษาสมบัติของไลเปสจาก *Rhodotorula glutinis* เลี้ยงใน stirred tank fermenter ขนาด 7 ลิตร โดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ตรวจพบแอคติวิตีของไลเปส 80 เปอร์เซ็นต์ บริเวณผิวเซลล์ ในลักษณะ cell-bound enzyme ซึ่งทำให้เพิ่มความเสถียรต่อความร้อน มีความเสถียรต่ออุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเสถียรต่อตัวทำละลายอินทรีย์ ทำการเตรียมเซลล์โดยผ่านกระบวนการ freeze dry แล้วนำไปใช้ในการสังเคราะห์เอสเทอร์จาก butanol และ heptanol ได้ผลิตภัณฑ์สูงถึง 60-62 เปอร์เซ็นต์ ใน 96 ชั่วโมง เอนไซม์มีความเสถียรมากสามารถนำไปใช้ในระบบ batch ติดต่อกัน 4 ครั้ง ยังคงเหลือแอคติวิตีถึง 90 เปอร์เซ็นต์

3. การศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และลักษณะสมบัติของไลเปสจากจุลินทรีย์

Taro และคณะ (1990) ศึกษาการทำไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. KWI-56 ให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยอะซีโตน และ gel filtration chromatography ไลเปสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีแอคติวิตีทั้งหมด 87,000 หน่วย มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 13.9 เท่า เหลือแอคติวิตี 2.9 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำมาศึกษาสมบัติพบว่า มีน้ำหนักโมเลกุล 33 กิโลดาลตัน มีค่า isoelectric point เท่ากับ 5.0 สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 60 องศาเซลเซียสและ pH 5.5-7.0 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่าง 30 องศาเซลเซียส และ pH 4.0-10.0 ตามลำดับ ถูกยับยั้งแอคติวิตีด้วย Cu^{2+}, Hg^{2+}, Sn^{2+} และ Zn^{2+} แต่มีความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อะซีโตน, เอทานอลและเมทานอล สามารถย่อยน้ำมันปาล์มได้ดีที่สุด

Sugihara และคณะ (1991) ได้ทำไลเปสจาก *Bacillus* sp. ให้บริสุทธิ์ โดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต, DEAE – Sephadex A-50 column chromatography, isoelectric focusing และ SDS – PAGE พบว่าไลเปสนี้เป็น monomeric protein มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 22,000 ดาลตัน และมีค่า isoelectric point เท่ากับ 5.1 เมื่อนำไลเปสมาศึกษาลักษณะสมบัติพบว่าเป็นไลเปสที่ทนร้อนโดยมีอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ 60 องศาเซลเซียส และ pH 5.6 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า acetone 20 – 60

เปอร์เซ็นต์ จะช่วยกระตุ้นการทำงานเนื่องจากเพิ่มการเกิด oil - water interface ทำให้ไลเปสทำงานได้ดีขึ้น แต่ *n* – haxane จะยับยั้งการทำงานของไลเปสเนื่องจากทำให้ไลเปสบางส่วนเสียสภาพ

Emmanuelle และ Alasdair (1992) ได้ศึกษาการทำไลเปส 2 ชนิด ได้แก่ ไลเปส A และไลเปส B จาก *Geotrichum candidum* CMICC 335426 ให้บริสุทธิ์ ไลเปส B มีความจำเพาะต่อการย่อยสลายเอสเทอร์ของกรดไขมันที่มีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 9 (cis-9 fatty acid) โดยใช้ FPLC S Sepharose คอลัมน์ มีแอคติวิตี 80,000 หน่วย และแอคติวิตีจำเพาะ 2,500 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนไลเปส A สามารถย่อยเอสเทอร์ได้หลายชนิด มีแอคติวิตีทั้งหมด 20,000 หน่วย และแอคติวิตีจำเพาะ 1,000 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ลักษณะโครงสร้างของไลเปสทั้ง 2 ชนิดค่อนข้างคล้ายกัน ซึ่งคาดว่าความแตกต่างของความจำเพาะต่อเอสเทอร์ น่าจะเกิดจากการแปรผันทางโครงสร้างเพียงเล็กน้อย

Emmanuel และคณะ (1993) ได้นำไลเปสจาก *Bacillus subtilis* 168 ทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต, ผ่านคอลัมน์ Phenyl-Sepharose และ Hydroxy-apatite ไลเปสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 9.41 เท่า เหลือแอคติวิตี 1.3 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาสมบัติพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 11 กิโลดาลตัน สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 35 องศาเซลเซียส และ pH 10.0 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่างเท่ากับ 40 องศาเซลเซียสและ pH 12.0 เป็นเวลา 30 นาทีตามลำดับ Ca^{2+} ช่วยกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์และมีแอคติวิตีสูงสุดเมื่อสับสเตรทเป็นไตรกลีเซอไรด์ที่มี C_8 acyl group

Yuji และคณะ (1993) ทำไลเปสจาก *Fusarium heterosporum* ซึ่งทนต่อตัวทำละลายมาทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต, ผ่านคอลัมน์ SP-Sephadex C-50, Sephadex G-75 และ Isoelectric focusing ตามลำดับ พบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2,010 เท่า แอคติวิตีเหลืออยู่ 38 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาสมบัติพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 31 กิโลดาลตัน isoelectric point เท่ากับ 7.1 สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 45-50 องศาเซลเซียส และ pH 5.5-6.0 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่างเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ pH 4.0-10.0 เป็นเวลา 4 ชั่วโมงตามลำดับ เอนไซม์มีความเสถียรต่อตัวทำละลายมาก

เช่น DMSO (dimethylsulfoxide), hexane, benzene และ ether ทำปฏิกิริยากับไตรกลีเซอไรด์ที่มี C ขนาด 6-12

Hyung และคณะ (1994) ได้คัดแยก *Bacillus* sp. strain 398 ได้จากดินบริเวณบ่อน้ำพุร้อนประเทศเกาหลี จากนั้นนำไลเปสที่ผลิตได้จากเชื้อนี้มาทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต, ผ่านคอลัมน์ DEAE-Sepharose, Butyl-Toyopearl, Ultrafitration และ DEAE-Sepharose ตามลำดับ ไลเปสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์เหลือแอคติวิตี 30 เปอร์เซ็นต์ มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 10,300 เท่า เมื่อศึกษาสมบัติพบว่า มีน้ำหนักโมเลกุล 50 กิโลดาลตัน สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 60 องศาเซลเซียสและ pH 8.2 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่าง 37 องศาเซลเซียส และ pH 4.0 - 11.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมงตามลำดับ

Claudia และคณะ (1994) ได้คัดแยกเชื้อ thermophilic *Bacillus* sp. มา 15 สายพันธุ์ สามารถผลิตไลเปสได้ 5 สายพันธุ์ ซึ่ง *Bacillus thermocatenulatus* มีแอคติวิตีสูงสุด และได้พิสูจน์พบว่าเป็น inducible enzyme จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยสกัดด้วย hexane, ตกตะกอนด้วยเมทานอลและผ่าน ion exchange chromatography ตามลำดับ ไลเปสที่ได้มีแอคติวิตีทั้งหมด 75 หน่วย มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 67.4 เท่า เหลือแอคติวิตี 11 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาสมบัติพบว่า มีน้ำหนักโมเลกุล 16 กิโลดาลตัน มีความคงตัวสูงเมื่ออยู่ในรูปเอนไซม์ตรึง (immobilized) สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 60-70 องศาเซลเซียสและ pH 7.5-8.0 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่างคือ 30 องศาเซลเซียส และ pH 7.0 เป็นเวลา 16.5 ชั่วโมงตามลำดับ

Raman และคณะ (1998) ศึกษาการทำไลเปสจาก *Aspergillus terreus* ให้บริสุทธิ์ โดยผ่านการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต, ตกตะกอนด้วยอะซีโตนความเข้มข้น 25 และ 35 เปอร์เซ็นต์, ผ่านคอลัมน์ gel filtration และ ion exchange ตามลำดับ ไลเปสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีแอคติวิตีทั้งหมด 902 หน่วย มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 11.9 เท่า เหลือแอคติวิตี 18.04 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาสมบัติพบว่า มีน้ำหนักโมเลกุล 41 กิโลดาลตัน มีอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 50 องศาเซลเซียส และ pH 5.5 ตามลำดับ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่าง 60 องศาเซลเซียส และ pH 4.0 - 10.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ionic detergent จะยับยั้งแอคติวิตีแต่ non-ionic detergent จะช่วยเพิ่มแอคติวิตี Mg^{2+}

และ Ca^{2+} ช่วยเพิ่มแอคติวิตี แต่ Co^{2+}, Cu^{2+}, Ni^{2+} และ Fe^{3+} จะยับยั้งแอคติวิตี การไดอะไลซ์เอนไซม์เป็นเวลา 168 ชั่วโมง, EDTA, 2-mercaptoethanol และ potassium ferrocyanide ไม่มีผลต่อแอคติวิตี สามารถย่อยสลายน้ำมันถั่วลิสงและน้ำมันหมูได้ดี มีความเสถียรต่อตัวทำละลาย (solvent) หลายชนิด เมื่อเอนไซม์ผ่านการ freeze dry แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง สามารถเก็บไว้ได้นานกว่า 6 เดือนโดยไม่มีผลต่อแอคติวิตี

Masahiro และคณะ (1999) ได้ศึกษาการทำไลเปสจาก *Rhizopus chinensis* ให้บริสุทธิ์โดยผ่าน CM-Cellulofine C-500, Ether Toyopearl 650M, SuperQ Toyopearl 650M และ CM - Cellulofine C-500 ตามลำดับ ไลเปสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีแอคติวิตีทั้งหมด 1,720 หน่วย มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 146 เท่า เหลือแอคติวิตี 27.6 เปอร์เซ็นต์ และมีสมบัติดังนี้ มีน้ำหนักโมเลกุล 28.4 กิโลดาลตัน อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 37 องศาเซลเซียสและ pH 5.5 ตามลำดับ สามารถย่อยสลาย fatty acid methyl ester ได้ดี เช่น methyl caprylate, methyl laurate และ methyl palmitate สามารถเร่งปฏิกิริยาทรานเอสเทอริฟิเคชัน (tranesterification) ระหว่างน้ำมันมะกอกและ methyl laurate ใน *n*-hexane ได้

Saovanee และ Sudaporn (1999) ได้พัฒนาอาหาร MGRS เป็นอาหารที่มีราคาถูกเหมาะสำหรับการเจริญและผลิตไลเปสของ *Bacillus* sp. THL027 ซึ่งมีน้ำมันรำข้าวเป็นองค์ประกอบ นำไลเปสมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย ultrafiltration และ gel filtration chromatography ไลเปสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีแอคติวิตีทั้งหมด 82.3 หน่วย มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.6 เท่า การศึกษาสมบัติของไลเปสพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ 70 องศาเซลเซียส และ pH 7.0 มีความไวต่อ Fe^{3+} และ EDTA ซึ่งสามารถยับยั้งแอคติวิตีของไลเปสได้ดี แต่จะถูกกระตุ้นการทำงานโดย Na^{+} และมีน้ำหนักโมเลกุล 69 กิโลดาลตัน

Dong และคณะ (1999) ได้คัดแยก *Bacillus themoleovoran* ID-1 จากน้ำพุร้อนที่อินโดนีเซีย เจริญได้เร็วและมีแอคติวิตีของไลเปสสูงเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส มีอัตราการเจริญจำเพาะ 2.5 ต่อชั่วโมง มีแอคติวิตี 520 หน่วยต่อลิตร สามารถเจริญในไขมันหลายชนิด เช่น น้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลือง ไตรกลีเซอไรด์ (ไตรโอเลอิน, ไตรบูไทริน) และอิมัลซิไฟเออร์ (ทวีน 20, ทวีน 40) นำไลเปสไปทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต, ผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel และ Sephacryl 5-200 ตามลำดับ ไลเปสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วเหลือ

แอคติวิตี 19 เปอร์เซ็นต์ มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 223 เท่า นำไปศึกษาสมบัติพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 34 กิโลดาลตัน สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 70-75 องศาเซลเซียสและ pH 7.5 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แอคติวิตีของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่อเติม Ca^{2+} หรือ Zn^{2+}

Pooja และคณะ (2000) ศึกษาสมบัติของ hyper-thermostable alkaline lipase จาก *Pseudomonas* sp. ที่เป็น mesophilic bacteria พบว่ามีอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 90 องศาเซลเซียส และ pH 11.0 มากกว่า 13 ชั่วโมงตามลำดับ มีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส มากกว่า 13 ชั่วโมง และเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง ที่ pH 8.0-12.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

Yang และคณะ (2000) ศึกษาเกี่ยวกับความสำคัญของ disulfide bridge และ calcium binding site ของไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. strain KWI-56 ในหลอดทดลอง พบว่าเมื่อเปลี่ยน cysteine residue (ตำแหน่งที่ 190 และ 270) ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิด disulfide bonds ให้เป็น serine residue ทำให้แอคติวิตีลดลงจากเดิม 11-27 เท่า แสดงว่า disulfide bonds จำเป็นต่อการพับตัวของไลเปส และการเปลี่ยนกรดอะมิโนบริเวณ Ca^{2+} binding site จาก aspartic acid ไปเป็น alanine ก็มีผลให้แอคติวิตีลดลงเช่นกัน แสดงว่า Ca^{2+} binding site มีความสำคัญต่อแอคติวิตีของไลเปส

4. การศึกษาพันธุวิศวกรรมของไลเปส

Estell และคณะ (1985) ได้บ่งชี้ถึงตำแหน่งภายในของไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. ที่ถูกย่อยโดยโปรตีเอสที่ผสมอยู่ในสารซักล้าง และได้ทำการปรับแต่งพันธุกรรมนั้น รวมถึงการแทนที่และการเติมกรดอะมิโนลงไปในตำแหน่งที่โปรตีเอสเข้าทำปฏิกิริยาหรือตำแหน่งใกล้เคียงซึ่งเป็นการเพิ่มความทนทานต่อการย่อยของโปรตีเอสได้ ซึ่งมีหลายวิธีที่สามารถเพิ่มความสามารถในการทนทานต่อการย่อยของโปรตีเอสได้เช่น (1) ในตำแหน่งของกรดอะมิโนที่ถูกย่อยสลาย (cleavage) โดยโปรตีเอส อาจแทนที่ด้วยกรดอะมิโนซนิดโพรลีน (2) อาจมีการเปลี่ยนแปลงศักย์ไฟฟ้าของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ถูกย่อยให้มีค่าเพิ่มขึ้นโดยการเติมหรือแทนที่ด้วยกรดอะมิโนที่มีประจุเป็นบวกมากกว่า หรือ (3) ทำการตัด (deletion) กรดอะมิโนออกไป 1, 2 หรือ 3 ตำแหน่งตรงส่วนที่มีเกิดการย่อยสลาย

Poulose และคณะ (1990) ได้มีวิธีทดสอบที่บ่งชี้ถึงบริเวณเร่งการทำงานของไลเปส โดยวิธี chemical modification ซึ่งสาร diethyl *p*-nitrophenyl phosphate เป็นสารที่สามารถยับยั้งแอคติวิตีของไลเปสได้ โดยเข้าไปเปลี่ยนกรดอะมิโน serine ในตำแหน่งที่ 126 ให้เป็นกรดอะมิโน alanine ทำให้เกิดเป็น inactive protein ได้ ซึ่งผลจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าไลเปสมี serine อยู่ที่บริเวณเร่งคล้ายๆ กับเอนไซม์ประเภทไฮโดรเลสอื่นๆ และโดยวิธี site-specific mutagenesis ทำให้ทราบเพิ่มเติมอีกว่ามี histidine และ aspartic acid อยู่ที่บริเวณเร่งอีกด้วย เมื่อทำการแทนที่ histidine ทุกตัวที่อยู่ในสายโพลีเปปไทด์ด้วย glutamic acid แล้วตรวจหาแอคติวิตี พบว่าเมื่อแทนที่ histidine ที่ตำแหน่ง 206 ด้วย glutamic acid แล้วจะทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีไป แสดงให้เห็นว่า histidine ที่ตำแหน่ง 206 เป็นส่วนหนึ่งที่อยู่บริเวณเร่ง และด้วยกระบวนการเดียวกันนี้เองทำให้เราทราบอีกว่า aspartic acid ก็เป็นกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณเดียวกัน

Fumio และคณะ (1991) นำไลเปสจาก *Pseudomonas* nov. sp.109 ซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ macrocyclic lactone ในตัวทำละลายอินทรีย์ได้ มาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ gel filtration และ HPLC พบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 497 เท่า เหลือแอคติวิตี 87 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมาศึกษาสมบัติพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 29 กิโลดาลตัน จากนั้นนำยีนที่ถอดรหัสเป็นไลเปสมาศึกษาโดยทำ hybridization กับ 20-nucleotide probe ที่สังเคราะห์ขึ้น เพื่อหาลำดับยีนและสามารถทำนาย 311 amino acid open reading frame, ribosome binding site และ signal peptide ได้ ลำดับของไลเปสยีนคือ Val-Asn-Leu-Ile-Gly-His-Ser-His-Gly-Gly ซึ่งเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved) ของไลเปสและมี homology กับลำดับกรดอะมิโนของ *Pseudomonas fragie* และ *Pseudomonas cepacia* 38-40 เปอร์เซ็นต์

Rhee และคณะ (1991) ทำการโคลนยีนไลเปสทนร้อนจาก *Pseudomonas fluorescens* SIK W1 ใส่ใน *E.coli* JM 83 และทำการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าไลเปสยีนประกอบด้วย 1,347 ลำดับเบส เมื่อเปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนของไลเปสนี้กับแบคทีเรียชนิดอื่นพบว่ามีบริเวณอนุรักษ์สั้นๆ คือ Gly - X - Ser - X – Gly (X แทนกรดอะมิโนใดๆ)

Patricia และคณะ (1997) ได้ศึกษา *Streptomyces cinnamomeus* Tu 89 สามารถผลิตเอสเทอเรสขนาด 30 กิโลดาลตัน และไลเปสขนาด 50 กิโลดาลตัน และโคลนยีน *lip A* ซึ่ง

ถอดรหัสเป็นไลเปสเข้าสู่ *Streptomyces lividans* TK23 ด้วยพลาสมิด PIJ702 จากนั้นได้หาลำดับยีน *lip A* พบว่าถอดรหัสได้เป็นกรดอะมิโน 275 ลำดับ และมีค่า Isoelectric point 5.35 แบ่งเป็น signal peptide 30 ลำดับ และไลเปส 245 ลำดับ ตำแหน่ง conserved catalytic serin residue อยู่ในตำแหน่งที่ 125 ยีน *lip A* สามารถแสดงออกใน *E. coli* ภายใต้การควบคุมของ *lac z* promoter และชักนำด้วย IPTG ไลเปสมีแอคติวิตีสูงสุดกับ triglyceride C_6 และ C_{18} แต่ไม่สามารถย่อยฟอสโฟลิปิด (phospholipid), ทวีน 20 และพารา-ไนโตรฟีนิลเอสเทอร์ (*p*-nitrophenyl ester)

Dharmsthiti และคณะ (1998) ศึกษาเกี่ยวกับสภาวะที่มีผลต่อแอคติวิตีของไลเปสและการโคลนยีนไลเปสของ *Acinetobacter calcoaceticus* LP 009 พบว่าไลเปสมีแอคติวิตีสูงสุดที่ pH 7.0, 50 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเมื่อเติม EDTA ซึ่งแสดงว่าเป็น metalloenzyme และมีแอคติวิตีเพิ่มขึ้นเมื่อเติม Fe^{3+} จากการตัดต่อยีนไลเปสเข้าสู่พลาสมิดแล้วถ่ายเข้าสู่ *Aeromonas sobria* ปรากฏว่ายีนมีการแสดงออกได้ดี ไลเปสที่ได้มีแอคติวิตีสูงและมีความสามารถสูงในการย่อยสลายไขมันในน้ำเสีย โดยลด BOD ในน้ำเสียจาก 414 มิลลิกรัมต่อลิตร จนเหลือ 0 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใน 15 วัน

Hyung และคณะ (1998) ทำการโคลนยีนที่ผลิตไลเปสของ *Bacillus sterothermophilus* L1 เข้าสู่ *E.coli* จากการวิเคราะห์ลำดับเบสพบว่ามี 1,254 ลำดับ ถอดรหัสเป็นโพลีเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 417 ลำดับ ซึ่ง 29 ลำดับเป็น signal sequence และ 388 ลำดับเป็นโปรตีน นำไลเปสที่ผลิตจาก *E.coli* มาทำให้บริสุทธิ์และศึกษาลักษณะสมบัติพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 60-65 องศาเซลเซียส และ pH 9.0-10.0 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิและความเป็นกรดด่าง 50 องศาเซลเซียส และ pH 5.0-11.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ มีน้ำหนักโมเลกุล 43 กิโลดาลตัน

5. การศึกษาเกี่ยวกับการนำไลเปสไปใช้ประโยชน์

Shimada และคณะ (1999) ศึกษาการผลิต methyl ester ซึ่งเป็น biodiesel ที่สำคัญ โดยใช้เอนไซม์ตรึง (immobilized) คัดเลือกไลเปสตรึงจาก *Candida antartica* มาศึกษาพบว่าต้องใช้เมทานอลต่อน้ำอย่างน้อย 3 โมล จึงจะเกิด methyl ester อย่างสมบูรณ์ แต่ไลเปสจะเสีย

สภาพ ดังนั้นต้องเติมเมทานอลแบบ stepwise โดยขั้นแรกทำปฏิกิริยาในเมทานอลต่อน้ำมัน 1 โมล เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ขั้นที่ 2 เติมเมทานอล 1 โมล ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 14 ชั่วโมง ขั้นที่ 3 เติมเมทานอล 1 โมล ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำให้ได้ methyl ester มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์

Rakshit และคณะ (2000) ศึกษาการผลิต EPA และ DHA จากน้ำมันปลาทูน่าโดยใช้เอนไซม์ไลเปสตรึงจาก *Pseudomonas fluorescens* ซึ่ง EPA และ DHA เป็น omega'-3 fatty acid มีบทบาทสำคัญในการป้องกันโรคไขมันในเส้นเลือดสูง โรคหัวใจ และโรคความดันเลือดสูง เป็นต้น นำไลเปสจากเชื้อนี้มาศึกษา 3 กระบวนการที่ทำให้ได้ EPA และ DHA พบว่าปฏิกิริยา hydrolysis ของน้ำมันปลาทูน่าจะได้ DHA 80 เปอร์เซ็นต์, EPA 70 เปอร์เซ็นต์ ปฏิกิริยา esterification ของ free fatty acid ในน้ำมันปลาทูน่า กับ long chain fatty alcohols จะได้ DHA 80 เปอร์เซ็นต์, EPA 70 เปอร์เซ็นต์เช่นกัน ส่วนปฏิกิริยา transesterification ของน้ำมันปลาทูน่ากับเอทานอลพบว่าได้ EPA + DHA รวมกัน 74 เปอร์เซ็นต์

Takaharu และคณะ (2001) ศึกษาการผลิต monoglyceride ซึ่งเป็นอิมัลซิฟายเออร์ที่สำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอางค์ และยา โดยการนำ monoglycerol lipase (MGL) จาก *Psudomonas* sp. LP7315 มาทำให้บริสุทธิ์โดยตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต, ผ่านคอลัมน์ anion exchange chromatography และ electrophoresis ตามลำดับ พบว่ามีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 109 เท่า เหลือแอคติวิตี 12 เปอร์เซ็นต์ มีมวลโมเลกุล 59 กิโลดาลตัน มีความจำเพาะต่อ monoglyceride ไม่ย่อยสลาย di และ triglyceride ซึ่งเป็นผลดีทำให้ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ (by product) MGL สามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ monoglyceride ที่ 65 องศาเซลเซียส ใน solvent free two phase system ซึ่ง fatty acid จะกระจายอยู่ในกลีเซอรอล และจะถึงสมดุลเมื่อปฏิกิริยาดำเนินไป 48 ชั่วโมง

Masaru และคณะ (2001) ศึกษาการสังเคราะห์ methyl ester ซึ่งเป็น biodiesel ที่สำคัญจากน้ำมันพืชและเมทานอล โดยปฏิกิริยา methanolysis มีไลเปสหลายชนิดที่สามารถเร่งปฏิกิริยา methanolysis ใน water - containing system ที่ไม่มีตัวทำละลายอินทรีย์ คัดเลือกไลเปสจาก *Candida rugosa, Pseudomonas cepacia* และ *Pseudomas fluorescens* เนื่องจากมีแอคติวิตีสูง นำมาศึกษาปฏิกิริยา methanolysis, hydrolysis และ esterification พบว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยา methamolysis โดยไลเปสจาก *Candida rugosa* และ *Pseudomonas fluorescens* จะ

ลดลงเมื่อมีปริมาณน้ำต่ำแสดงว่าน้ำป้องกันการเสียสภาพของไลเปสจากเมทานอล แต่ไลเปสจาก *Pseudomonas cepacia* สามารถทนเมทานอลได้ดี อัตราการเกิดปฏิกิริยา methanolysis จะสูงขึ้นเมื่อปริมาณน้ำลดลง ดังนั้นไลเปสจาก *Pseudomonas cepacia* จึงเหมาะที่จะนำไปใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย