บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เอนไซม์ไลเปสมีชื่อเรียกตามระบบ International Union of Biochemistry ว่า "glycerol ester hydrolase" (EC 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลส์โมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ได้กรดไขมันและกลีเซอรอล พบว่าไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์อาจเป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาได้ โดยไลเปสจะย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันโมเลกุลยาว กับกลีเซอรอลโดยไลเปสจะทำปฏิกิริยาดังกล่าวได้เมื่อไตรกลีเซอไรด์อยู่ในสภาพ oil – water interface (Macrae, 1983)

ปฏิกิริยาของไลเปส (Macrae, 1983)

Triglyceride

⇅

Diglyceride + free fatty acid

⇅

Monoglyceride + free fatty acid

⇅

glycerol + free fatty acid

แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่พบได้ในพืชพวกข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ข้าวไรน์ ฝ้าย ถั่วเหลืองและละหุ่ง (Arnold และคณะ, 1975) ส่วนในสัตว์จะพบในตับอ่อน (pancreatic lipase) และในน้ำนม (milk lipase) (Shahani, 1975) ไลเปสสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด แต่ละชนิดให้ไลเปสที่มีคุณสมบัติต่างกัน จุลินทรีย์บางพวกจะผลิต alkaline lipase เช่น *Bacillus subtilis* 168 (Lesuisse และคณะ, 1993) บางพวกจะผลิต neutral lipase เช่น *Aspergillus oryzae* (Toida และคณะ, 1995) และบางพวกผลิต thermostable lipase เช่น *Bacillus* sp. (Sugihara

และคณะ, 1991) จากการที่จุลินทรีย์สามารถผลิตไลเปสที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน ทำให้สามารถเลือกไลเปสมาใช้ประโยชน์ให้เหมาะสมกับอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้มากมาย (Yamane, 1987)

อย่างไรก็ตามไลเปสจากจุลินทรีย์มีข้อดีเหนือกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์ เพราะจุลินทรีย์เจริญได้รวดเร็วและเลี้ยงง่ายกว่าสัตว์ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตได้รวดเร็วโดยวิธีปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์ และสามารถปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ได้ง่ายกว่าพืชและสัตว์ (ทนง ภัครัชพันธ์, 2522)

ประโยชน์และความสำคัญของไลเปสในด้านอุตสาหกรรม

มีการนำไลเปสไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด ในอุตสาหกรรมอาหารใช้เป็นตัวสร้างกลิ่นรส (flavor) ของผลิตภัณฑ์เนยแข็งพวกที่มีการบ่ม (ripening) เช่น Italian cheese, Blue cheese และ Rogueforti cheese (Arnold และคณะ, 1975) มีการเติมไลเปสลงไปเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเช่น การทำเค้กและช็อคโกแล็ต เป็นต้น ใช้สำหรับการปรับปรุงไขมันและน้ำมัน นอกจากนี้ไลเปสยังช่วยขจัดเศษไขมันที่ไม่ต้องการออกจากวัตถุดิบก่อนนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์หนังด้วย (Posorske, 1984) ไลเปสยังถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก ยา เครื่องสำอาง การผลิต aliphatic fatty acid และการกำจัดน้ำเสียจากแหล่งชุมชน (Macrae, 1983)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงการนำไลเปสจากจุลินทรีย์ไปใช้ในอุตสาหกรรม

อุตสาหกรรม	ปฏิกิริยา	ผลิตภัณฑ์
นม	ไฮโดรไลซิสของไขมันนม บ่มเนยแข็ง ปรับปรุงไขมันในเนยเหลว	สารแต่งกลิ่น เนยแข็ง เนยเหลว
เค้กและขนมอบ	ปรับปรุงกลิ่นและรสชาติ	ขนมอบ
เครื่องดื่ม	เพิ่มอายุเครื่องดื่ม	เครื่องดื่ม
น้ำสลัด	พัฒนากลิ่น ปรับปรุงคุณภาพ	น้ำสลัดมายองเนส, ขนมที่ตีให้ฟู
อาหารสุขภาพ	ทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน	อาหารสุขภาพ
เนื้อสัตว์และปลา	ปรับปรุงกลิ่นและแยกไขมันออก	ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และปลา
ไขมันและน้ำมัน	ทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน ไฮโดรไลซิส	เนยเทียม,ไขมันจากเมล็ดโกโก้, กรดไขมันและกลีเซอรอล
สารเคมี	การสังเคราะห์	สารเคมี
เวชภัณฑ์	ทรานเอสเทอร์ฟิเคชัน ไฮโดรไลซิส	ไขมันที่จำเพาะบางชนิด, ยาช่วยในการย่อย
เครื่องสำอาง	การสังเคราะห์	อิมัลซิฟายเออร์,สารให้ความชุ่มชื้น
เครื่องหนัง	ไฮโดรไลซิส	เครื่องหนัง
กระดาษ	ไฮโดรไลซิส	กระดาษที่เปื้อนน้ำมัน
ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด	ไฮโดรไลซิส	สารลดแรงตึงผิวในผลิตภัณฑ์ทำ ความสะอาด

ที่มา : Godtfredsen (1990)

การทำงานของไลเปสจากจุลินทรีย์

ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ 3 แบบ (Yamane, 1987) คือ

1. Hydrolysis of ester

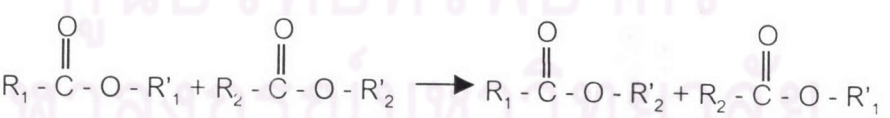
2. Synthesis of ester

3. Transesterification

3.1 Acidolysis

3.2 Alcoholysis

3.3 Ester exchange (interesterification)



3.4 Aminolysis

เอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ได้นอกจากจะมีไลเปสแล้วยังมีอีกชนิดหนึ่งที่สามารถย่อยสลายเอสเทอร์ได้ คือ เอสเทอเรส (esterase) ซึ่งหมายถึงเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายคาร์บอกไซลิค แอซิด เอสเทอร์ (caboxylic acid ester) ได้ทุกชนิด ดังนั้นเอสเทอเรสจะรวมถึงเปปติเดส (peptidase) เช่น ทริปซิน (trysin) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) และปาเปน (papain) แต่ไลเปสมีความแตกต่างจากเอสเทอเรสคือไลเปสจะทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่ อยู่ในสภาพไม่ละลาย (insoluble หรือ heterogeneous subtstrate) ส่วนเอสเทอเรสจะทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่อยู่ในสภาพเป็นสารละลาย (Shahani, 1975)

การสร้างไลเปสของจุลินทรีย์

เมื่อพิจารณาช่วงการเจริญที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสจากจุลินทรีย์ พบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตไลเปสได้สูงสุดในช่วงปลายการเจริญแบบทวีคูณ (exponential phase) เช่น *Pseudomonas aeruginosa* (Stuer และคณะ, 1986) และ *Bacillus subtilis* 168 (Lesuisse และคณะ, 1993) จุลินทรีย์บางชนิดผลิตไลเปสได้สูงสุดเมื่ออยู่ในช่วง stationary phase เช่น *Alcaligenes* sp. 679 (Kokusho และคณะ, 1982) และ *Pseudomonas aeruginosa* EF2 (Gilbert และคณะ, 1991) ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสชนิดขับออกนอกเซลล์ของจุลินทรีย์มักจะพบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในสภาพกึ่งอดอาหาร (semi – starved) จะเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์มาก เนื่องจากเอนไซม์ส่วนมากถูกปล่อยออกมาในช่วงปลายการเจริญแบบทวีคูณ ซึ่งสภาพขณะนั้นสับสเตรทที่สำคัญจะเริ่มขาดแคลนแล้ว (Suzuki และคณะ, 1988)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างไลเปสของจุลินทรีย์

จากรายงานหลายฉบับที่เกี่ยวข้องกับการคัดเลือกเชื้อและหาสภาพที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสแตกต่างกันดังรวบรวมไว้ในตารางที่ 2 ซึ่งทุกสูตรจะประกอบด้วยส่วนสำคัญคือแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและธาตุอาหาร

1. อิทธิพลของแหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ในการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 50-55 เปอร์เซ็นต์ในการสังเคราะห์เซลล์ และจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสต่างกัน สารที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่างๆ เช่น กลูโคส ฟรุกโตส แป้ง เป็นต้น กลูโคสในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยให้เซลล์มีการเจริญเติบโตที่เหมาะสม การสร้างเอนไซม์ของเชื้อก็จะดำเนินไปอย่างปกติ แต่เมื่อมีปริมาณของกลูโคสมากเกินไปจะทำให้เกิด catabolite repression (Doi, 1973) กลูโคสจะกดการทำงานของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ไม่ให้มีการสร้างเอนไซม์ออกมาหรือทำให้สร้างช้าลง (Bernlohr, 1964) เช่น การผลิตไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* NRLL-B3411 จะลดลงทันทีเมื่อเติมกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Heineken และ Conner, 1972) แต่ก็มีเชื้อบางชนิดที่ไม่ถูกยับยั้งการผลิตไลเปสเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น *Pseudomonas* sp. สามารถผลิตไลเปสได้โดยการชักนำของสารจำพวกไตรกลีเซอไรด์ และสารลดแรงตึงผิว และถูกยับยั้งการผลิตไลเปสจากสารจำพวกกรดไขมันสายยาว (long chain fatty acid) เช่น กรดโอเลอิค (Gillbert, และคณะ, 1991) *Candida rugosa* ต้องการกาแลกโตส (Dalmau และคณะ, 2000) ขณะที่ *Chromobacterium viscosum* ต้องการแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม 2 ชนิดคือ แป้งและกากถั่วเหลือง (Yamaguchi และคณะ, 1973)

2. **อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน**

เซลล์จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณ 8-10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดก็แตกต่างกัน บางชนิดต้องการแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ อาจใช้ในรูปกรดอะมิโน โปรตีนหรือยูเรีย โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจน เช่น *Chromobacterium viscosum* ต้องการยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน (Yamaguchi และคณะ, 1973) แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมหมักได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งปกติจะทำให้เกิดสภาวะที่เป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อ NH_4^+ ถูกใช้ไป เพราะจะเกิด SO_4^{2-} ขึ้น ในทางตรงกันข้ามแหล่งไนโตรเจนที่เป็นก๊าซแอมโมเนียและไนเตรตเมื่อถูกเมตาโบไลซ์แล้วจะทำให้เกิดสภาวะที่เป็นด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียที่ใช้แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน เช่น *Alcaligenes* sp. ต้องการโซเดียมไนเตรต (Kokusho และคณะ, 1982), *Candida rugosa* ต้องการแอมโมเนียมซัลเฟต (Gordillo และคณะ, 1998)

วัตถุดิบอื่นๆที่นิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอุตสาหกรรมการหมักได้แก่ น้ำแช่ข้าวโพด, ถั่วเหลือง, กากถั่วเหลือง, เคซีน ไฮโดรไลเซท (casein hydrolysate) และสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)

3. **อิทธิพลของไตรกลีเซอไรด์**

บทบาทของไตรกลีเซอไรด์ที่มีต่อการผลิตไลเปสในจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะแตกต่างกัน Omar และคณะ (1987) พบว่าเชื้อรา *Humicola lanuginosa* จะผลิตไลเปสได้น้อยมากถ้าปราศจากไตรกลีเซอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพราะไตรกลีเซอไรด์จะทำหน้าที่กระตุ้นให้จุลินทรีย์ผลิตไลเปสได้สูงสุดซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Suzuki และคณะ (1988) ซึ่งพบว่าถ้าเติมไตรกลีเซอไรด์ปริมาณเล็กน้อยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้จุลินทรีย์ผลิตไลเปสได้มากกว่าการไม่เติมไตรกลีเซอไรด์เลย แต่ Watanabe และคณะ (1977) รายงานว่าไตรกลีเซอไรด์จะไปยับยั้งการผลิตไลเปสจาก *Psendomonas fragi* จากรายงานดังกล่าวคาดว่าจุลินทรีย์ที่ผลิตไลเปสจะแบ่งได้เป็น 2 พวก พวกแรกเป็นพวกที่ผลิตไลเปสในรูป constitutive lipase ที่ไม่จำเป็นต้องเติมไตรกลีเซอไรด์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อก็สามารถผลิตไลเปสได้สูง อีกพวกหนึ่งผลิตได้ทั้ง constitutive lipase และ inducible lipase แต่ inducible lipase จะมีปริมาณมากกว่ามากจึงจำเป็นต้องมีไตรกลีเซอ

ไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเหนี่ยวนำการผลิตไลเปส อย่างไรก็ตามถ้ามีไตรกลีเซอไรด์ในปริมาณที่มากเกินไปก็จะยับยั้งการผลิตไลเปสได้เช่นกัน (Suzuki และคณะ, 1988) ในตารางที่ 3 แสดงถึงเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่ต้องการไตรกลีเซอไรด์ในการผลิตไลเปส

3. **อิทธิพลของแร่ธาตุ**

นอกจากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนแล้ว แร่ธาตุก็มีความสำคัญเช่นกัน โดยจะพบว่า K_2HPO_4 และ $MgSO_4.7H_2O$ เป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด ทั้งใน *Pseudomonas aeruginosa* EF2 (Gillbert และคณะ, 1991), *Bacillus* sp. strain 398 (Kim และคณะ, 1994), *Aspergillus oryzae* (Toida และคณะ, 1995) และ *Candida rugosa* (Gordillo และคณะ, 1998) ซึ่งจากการทดลองของ Moon และ Parulekar ในปี 1991 พบว่าฟอสเฟตที่ผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์สารพันธุกรรม (DNA, RNA) และโปรตีน การย่อยสลายคาร์โบไฮเดรท การหายใจของเซลล์รวมทั้งควบคุมระดับ ATP ในกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ อีกทั้งยังมีส่วนช่วยในการเพิ่มความเสถียรของ mRNA โดยการยับยั้งการทำงานของ RNase และช่วยให้เอนไซม์ที่สร้างขึ้นถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ได้ดีขึ้น แต่ถ้าเริ่มต้นด้วยปริมาณฟอสเฟตมากเกินไปจะยับยั้งการเจริญและกดดันการสร้างเอนไซม์ ส่วนหน้าที่ของแมกนีเซียมนั้น ในปี 1979 Aisaka และ Terada พบว่าการเติมแมกนีเซียมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีส่วนช่วยในการปลดปล่อยไลเปสที่ติดอยู่กับผนังเซลล์ของ *Geotrichum candidum* ได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากแบคทีเรียบางชนิด

แบคทีเรีย	ชนิดของไลเปส	สูตรอาหาร	ที่มา
Alcaligenes sp.	alkaline lipase	1% $NaNO_3$, 0.5% polyoxyethylene alkylester, 1 mM Fe^{2+}, 1% sodium citrate, 1% fructose, pH 8.3	Kokusho และคณะ, 1982
Pseudomonas nitroreducens	alkaline lipase	2% soybean meal , 2% soluble starch,1.5% K_2HPO_4, 0.1% $(NH_4)_2CO_3$, 0.1% $MgSO_4$.$7H_2O$, 0.5% silicone KB 68-1F, pH 8.3-8.5	Watanabe และคณะ, 1977
Chromobacterium viscosum	neutral lipase	2% soluble starch, 2% soybean meal,1% olive oil, 0.2% K_2HPO_4, 0.1% urea, 0.1% $MgSO_4.7H_2O$, 0.5% $CaCO_3$, pH 7.0	Omar และคณะ, 1987
Bacillus sp.	acidic lipase	3% peptone,1% yeast extract, 0.5% NaCl, 1% olive oil, pH 7.0	Sugihara และคณะ, 1991

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 แสดงความต้องการไตรกลีเซอไรด์ในการผลิตไลเปสจากแบคทีเรียบางชนิด

แบคทีเรีย	การหมัก	แอคติวิตี (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	สภาวะที่เลี้ยง	ที่มา
Staphylococcus aureus	ขวดเขย่า	4.5	น้ำมันมะกอก, 37 องศาเซลเซียส, pH 8.0	Vadehra และ Harmon, 1969
	ขวดเขย่า	17.0	ไตรบูไทริน, 37 องศาเซลเซียส, pH 8.0	Mates และ Sudakewitz, 1973
Chromobacterium viscosium Var. *paralipolyticum*	ถังหมัก 30 ลิตร	10.8	น้ำมันหมู, 40 องศาเซลเซียส, pH 7.0	Abe และคณะ, 1970
Micrococcus caseolyticyus	ขวดเขย่า	15.0	น้ำมันมะกอก, 40 องศาเซลเซียส, pH 9.5	Jonson และ Synge, 1974
Bacillus licheniformis	ขวดเขย่า	6.0	น้ำมันมะกอก, 45 องศาเซลเซียส, pH 8.5	Jonson และ Synge, 1974

ที่มา : Rehm และ Reed (1987)

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

1. อิทธิพลของแคลเซียมไอออน

จากการศึกษาพบว่า ไลเปสจากยีสต์ *Candida deformans* (Muderhwa และ Ratomahenina, 1985), *Humicola lanuginosa* NO.3 (Omar และคณะ, 1987) และ *Pseudomonas aeruginosa* (Stuer และคณะ, 1986) พบว่าถ้ามีการเติมแคลเซียมไอออนลงในปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์จะสามารถช่วยให้ไลเปสทำงานได้ดียิ่งขึ้น Shahani (1975) อธิบายว่ากรดไขมันซึ่งเป็นผลิตผลจากการทำงานของไลเปสจะทำให้ reaction mixture มีความเป็นกรดมากขึ้นทำให้ไลเปสทำงานได้ลดลงแต่แคลเซียมไอออนจะทำปฏิกิริยากับกรดไขมันเกิดเป็นเกลือแคลเซียมในรูปสบู่ (soluble calcium soap) แล้วตกตะกอนทำให้กรดไขมันลดลง ความเป็นกรดด่างของ reaction mixture ไม่เปลี่ยนแปลง ดังนั้นการทำงานของไลเปสจึงเป็นไปอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้ยังพบว่าแคลเซียมไอออนจะทำงานได้ก็ต่อเมื่อสับสเตรทเป็นไตรกลีเซอไรด์พวก higher fatty acid เท่านั้น ถ้าสับสเตรทเป็นไตรกลีเซอไรด์พวก lower fatty acid พบว่าแคลเซียมไอออนจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ สรุปว่าแคลเซียมไอออนจะช่วยให้เอนไซม์ทำงานได้ดีในบางกรณีเท่านั้น

Wang และคณะ (1988) ได้สรุปถึงสมมติฐานความเป็นไปได้ของกลไกการทำงานของแคลเซียมไอออนที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของไลเปสได้ว่ามี 3 ประการ คือ

1) แคลเซียมไอออนช่วยเปลี่ยนรูปร่าง (contormation) ของเอนไซม์ให้ทำงานได้ดีขึ้น

2) แคลเซียมไอออนเพิ่มการดูดซึม (adsorption) ของไลเปสที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมัน

3) แคลเซียมไอออนช่วยขจัดกรดไขมันออกจากพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมัน ทำให้ไลเปสทำงานได้ดีขึ้น

อย่างไรก็ตาม Kohr และคณะ (1986) พบว่าแคลเซียมไอออนจะไปยับยั้งการทำงานของไลเปสจากยีสต์ *Candida rugosa* ขณะที่ Suzuki และคณะ (1986) พบว่าแคลเซียมไอออนไม่มีผลต่อการทำงานของไลเปสจากเชื้อรา *Rhizopus japonius* NR400 Wang และคณะ (1988) พบว่าถ้าตรวจหาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์โดยใช้ไตรบิวไทริน และน้ำมันมะกอกเป็นสับสเตรทโดยไม่มีการเติมอีมัลซิฟายเออร์เลยแต่มีการกวนอย่างแรง พบว่าแคลเซียมไอออนจะไม่มีผลต่อการทำงานของไลเปสในสับสเตรทเหล่านี้เลย ปรากฏการณ์นี้อธิบายได้ว่ากรด

บิวไทริคจากไตรบิวไทริน สามารถละลายน้ำได้อยู่แล้ว และกรดโอเลอิคจากน้ำมันมะกอกจะถูกขจัดออกจากพื้นที่ผิวสัมผัสจากการกวนอย่างแรง จึงไม่ต้องอาศัยแคลเซียมไอออน

2. อิทธิพลของไอออนโลหะ

Lesuisse และคณะ (1993) ได้รายงานว่าการที่ไอออนของโลหะมีอิทธิพลต่อการทำงานของไลเปสนั้น อธิบายได้ว่าอาจจะเนื่องมาจากมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการละลายและความเป็นประจุ (ionized) ของกรดไขมันที่โมเลกุลของเอนไซม์ Zn^{2+},Cu^{2+} และ Mn^{2+} จะไปรบกวนตำแหน่งที่เข้าทำงานของเอนไซม์โดยตรง ซึ่งพบว่าไลเปสจาก *Bacillus subtilis* 168 จะถูกยับยั้งอย่างเห็นได้ชัด ส่วนไลเปสจาก *Rhizopus japonicus* NR 400 เป็นไลเปสที่ทนโลหะหนักได้ทั้ง Co^{2+}, Ni^{2+},Cu^{2+} และ Sn^{2+} (Suzuki และคณะ, 1986) แต่ไลเปสจาก *Candida deformans* ทนต่อ Co^{2+} แต่ถูกยับยั้งโดย Cu^{2+} และ Zn^{2+} (Muderhwa และ Ratamahenina, 1985) อย่างไรก็ตาม Yamaguchi และคณะ (1973) พบว่าไอออนของโลหะบางชนิด สามารถช่วยเพิ่มการทำงานของไลเปสบางชนิดได้ เช่น Mg^{2+}, Mn^{2+}, Na^{2+}, และ Li^{2+} ช่วยเพิ่มการทำงานของไลเปสจาก *Chromobacterium viscosum* ได้

3. อิทธิพลของอุณหภูมิและความเป็นกรดด่าง

อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างมีผลทั้งต่อการทำงาน และความเสถียรของเอนไซม์ โดยไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะทำงานที่อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมแตกต่างกัน (ตารางที่ 4) ซึ่งจากคุณสมบัตินี้สามารถคัดเลือกเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะกับวัตถุประสงค์ของงานแต่ละชนิดได้ (Yamane และคณะ, 1987) จุลินทรีย์บางชนิดผลิตไลเปสได้ดีที่สุดที่ pH อยู่ในช่วงเป็นกลางเช่น *Aspergillus oryzae* (Toida และคณะ, 1995) และ *Humicola lanuginosa* No. 3 (Omar และคณะ, 1987) บางชนิดอยู่ในช่วงเป็นกรดเช่น *Bacillus* sp. (Sugihara และคณะ, 1991) และ *Rhizopus niveus* (Kohno และคณะ, 1994) และบางชนิดอยู่ในช่วงเป็นด่างเช่น *Bacillus subtilis* 168 (Lesuisse และคณะ, 1993) และ *Pseudomonas fluorescens* AK102 (Kojima และคณะ, 1994)

ในทำนองเดียวกันจุลินทรีย์ต่างชนิดกันก็จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่างกัน บางชนิดมีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่อุณหภูมิสูงเช่น *Bacillus* sp. มีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 60 องศาเซลเซียส

(Sugihara และคณะ, 1991) บางชนิดมีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 30 องศาเซลเซียส (Toida และคณะ, 1995)

อุณหภูมิและความเป็นกรดด่าง นอกจากจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แล้ว ยังมีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ด้วย ไลเปสจาก *Humicola lanuginosa* No.3 จะคงตัวอยู่ในช่วง pH 5-9 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่งโมง เอนไซม์ก็ยังมีแอคติวิตีอยู่ (Omar และคณะ, 1987) ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* AK 102 คงตัวอยู่ในช่วงpH 4-10 ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (Kojima และคณะ, 1994) ส่วนไลเปสจาก *Aspergillus oryzae* จะคงตัวอยู่ในช่วง pH 6-9 ที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง และจะคงตัวที่ อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงสภาพความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิที่เหมาะสมของไลเปสจากจุลินทรีย์บางชนิดที่นำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม

บริษัท	เอนไซม์	จุลินทรีย์	ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	อุณหภูมิที่เหมาะสม (องศาเซลเซียส)
Amano Pharmaceutical	Lipase-AP	*Aspergillus* spp.	6.5	37
Amano Pharmaceutical	Lipase-MAP	*Mucor* spp.	7.0	37
Meito Sango	Lipase-MY	*Candida cylindracea*	6.5	37
Nagase	Lipase-Saiken	*Rhizopus* spp.	7.0	40
Rohm and Haas	Lipase B	*Aspergillus niger*	6.0	47.5
Wallerstein	Lipase 3500	*Aspergillus oryzae*	6.25	30
Tanabe Seiyaku	Lipase RH	*Rhizopus delemar*	5.6	45

ที่มา : Seitz (1974)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. Emulsifying agent

มีผลต่อการทำงานของไลเปสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันออกไป โดยพบว่าน้ำดีจากตับอ่อนสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของแอลคาไลน์ไลเปสจาก *Alcaligenes* sp. (Kokusho และคณะ, 1982) ในขณะที่ sodium deoxycholate และ sodium taurocholate จะยับยั้งการทำงานของไลเปสจาก *Streptococcus thermophilus* (De Moraes และ Chandan, 1982) ส่วนไลเปสจาก *Candida rugosa* จะไม่ถูกยับยั้งโดย Neodol 91-6 ซึ่งเป็น nonionic surfactant ที่ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 0.1 เปอร์เซ็นต์ จะยับยั้งการทำงานของไลเปสได้ (Linfield และคณะ, 1984) นอกจากนี้ยังพบว่า detergent บางชนิดเช่น Triton X-100, Lubrol PX และ β-octylglucoside ไม่ทำให้ไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa* เสียแอคติวิตี

5. **สภาพทางกายภาพของสับสเตรท** (oil / water interface)

ไลเปสจะทำงานย่อยสับสเตรทเมื่ออยู่ในรูปอิมัลชัน (oil / water interface) และไลเปสถูกดูดซึมระหว่าง oil-water interface เนื่องจากสภาพสับสเตรทต้องอยู่ในรูปไม่ละลายน้ำ (insoluble water) อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (initial rate) อาจขึ้นอยู่กับจำนวนโมเลกุลที่ถูกดูดซับไว้ใน interface และพื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับสับสเตรท

6. **ความจำเพาะของไลเปสต่อสับสเตรท**

Macrae (1983) แบ่งไลเปสจากจุลินทรีย์ตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้

1) ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ไลเปสพวกนี้จะย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้สมบูรณ์ ดังนั้นจะได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ แต่อาจจะพบไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เป็นสารตัวกลาง (intermediate) ในปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างเช่น ไลเปสจาก *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus*

2) ไลเปสที่จำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ได้ผลิตภัณฑ์คือ กรดไขมัน 1, 2 (2,3) - diglyceride และ 2-monoglycride แต่ผลิตภัณฑ์เหล่านี้ไม่คงตัว ถ้ามีการบ่มไว้นานจะได้ 1, 3 – diglyceride และ 1(3) –monoglyceride ซึ่งจะถูกย่อยสลายสมบูรณ์ได้

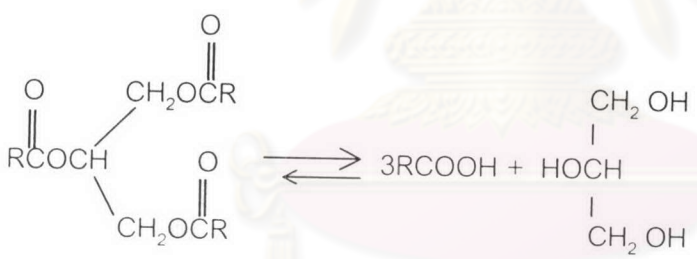
กรดไขมันและกลีเซอรอล ตัวอย่างเช่น ไลเปสจาก *Aspergillus niger, Mucor javanicus* และ *Rhizopus* sp.

3) ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งไลเปสจากจุลินทรีย์ทั่วไปไม่มีคุณสมบัติดังนี้ ยกเว้นไลเปสจากจุลินทรีย์บางชนิดเช่น *Geotrichum candidum* ที่จะย่อยไตรกลีเซอไรด์ที่มี cis double bond ตรงตำแหน่งที่ 9 ได้ดีแต่จะย่อยสลายกรดไขมันที่ไม่มี double bond ตรงตำแหน่งที่ 9 ได้ไม่ดี

Okumura และคณะ (1981) พบว่าไลเปสที่มีความจำเพาะจะมีการ esterify (reverse hydrolysis) ระหว่างที่มีการไฮโดรไลซ์ ขณะที่ไลเปสชนิดที่ไม่มีความจำเพาะจะไม่มีการ esterify ทำให้มีการไฮโดรไลซ์ได้ดีกว่า และเชื่อว่าเพราะเหตุนี้จึงทำให้ไลเปสพวกที่ไม่มีความจำเพาะสามารถย่อยสลายสับสเตรทได้รวดเร็วกว่าพวกที่มีความจำเพาะ

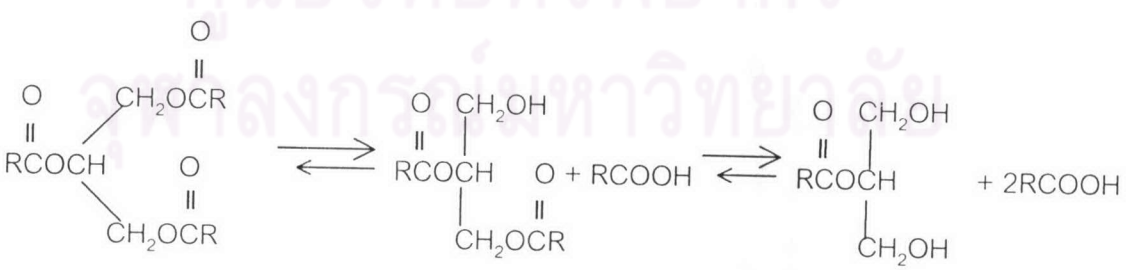
ชนิดของไลเปสตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์

1.1 ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์



Triglyceride Fatty acid Glycerol

1.2 ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์



Triglyceride 1,2(2,3) – diglyceride 2-monoglyceride

รูปที่ 1 แสดงชนิดของไลเปสตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์

ปกติที่อุณหภูมิสูงจะมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และสับเสตรทเร็วขึ้น แต่เอนไซม์มักไม่ทนความร้อนสูงนัก เอนไซม์ที่ประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนหนึ่งควรเป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อนและทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง เพื่อลดต้นทุนในการหล่อเย็นหลังการทำวัตถุดิบให้สุก เอนไซม์ดังกล่าวอาจหาได้จากจุลินทรีย์ชอบร้อน (thermophiles) ที่แยกได้จากธรรมชาติ และปัจจุบันมีการนำจุลินทรีย์เหล่านี้มาใช้ในกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพมากขึ้นเนื่องจากประโยชน์ดังนี้ (Edwards, 1990)

1. ลดอัตราเสี่ยงในการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น
2. ลดต้นทุนการหล่อเย็นในอุตสาหกรรมการหมัก
3. ลดความต้องการพลังงานสำหรับการกวน เนื่องจากความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงด้วยการเพิ่มอุณหภูมิ และทำให้การผสมในถังหมักเข้ากันดี
4. การผลิตสารระเหยง่าย (volatile chemical) ของจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิสูง สามารถกลั่นออกมาที่อุณหภูมิของการเจริญ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 แสดงตัวอย่างและคุณสมบัติของเอนไซม์ที่สำคัญทางการค้าจาก Thermophiles

เอนไซม์	จุลินทรีย์ที่ผลิต	การใช้ประโยชน์
Proteases Thermolysin (neutral protease) Aqualysin I (alkaline protease) Aqualysin II (neutral protease) Caldolysin	 *Bacillus thermoproteolyticus* *Thermus aquaticus* *Thermus aquaticus* *Thermus aquaticus*	อุตสาหกรรมเครื่องหนัง, เบียร์, ขนมอบ, เนย, ผงซักฟอก
Cellulases Cellulases Hemicellulases Cellobiases	 *Clostidium thermocellum* *Clostidium thermocellum* *Thermospora* sp.	สามารถผลิตน้ำตาลจาก cellulose และ hemicellulose ที่พบวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรและการทำกระดาษ
Amylases α-amylases β-amylases	 *Bacillus licheniformis* *Bacillus licheniformis*	อุตสาหกรรมเบียร์
Glucose isomerase	*Bacillus coagulans*	อุตสาหกรรมอาหาร
Alcohol dehydrogenase	*Thermoanaerobium ethanolyticus*	ปฏิกิริยารีดอกซ์ โดยใช้ตัวทำละลายสารอินทรีย์เป็นสับสเตรท
β-Galactosidase	*Thermus aquaticus*	ย่อยสลายแลคโตสให้เป็นกลูโคส และกาแลคโตส

ตารางที่ 5 (ต่อ)

เอนไซม์	จุลินทรีย์ที่ผลิต	การใช้ประโยชน์
Endonucleases *Bst* II *Bcl* I *THE* III *Taq* I	*Bacillus sterothermophilus* *Bacillus caldolyticus* *Thermus thermophilus* *Thermus aquaticus*	ใช้ในการโคลนยีน
Hydrogenases	*Methanobacterium thermoautotrophicum*	ผลิต H_2 ทำให้เกิด NADH และNADPH
Glycerokinase	*Bacillus stearothermophilus*	วิเคราะห์ปริมาณซีรัม ไตรกลีเซอไรด์
Lipases	*Bacillus stearothermophilus*	อุตสาหกรรมผงซักฟอกและอาหาร

ที่มา : Edwards (1990)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปกติที่อุณหภูมิสูงจะมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และวัตถุดิบเร็วขึ้นแต่เอนไซม์มักไม่ทนต่ออุณหภูมิสูง จึงเป็นข้อจำกัดอย่างหนึ่งของเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรม ซึ่งกระบวนการผลิตในที่มีอุณหภูมิสูงจะเป็นผลให้เอนไซม์เสียสภาพ ทำให้ต้องลดอุณหภูมิของกระบวนการผลิตลงซึ่งเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตอย่างมาก (Rod,1992)

ได้มีการค้นหาเอนไซม์ที่มีสมบัติเสถียรต่อความร้อนให้ได้มากขึ้น เอนไซม์ที่เสถียรต่อความร้อนจะทำให้การเร่งปฏิกิริยามีอัตราสูงขึ้นและทนทานต่อการเสียสภาพของโปรตีนที่อุณหภูมิสูง นอกจากนี้การที่สามารถใช้อุณหภูมิสูงในการผลิตจะช่วยลดการปนเปื้อน ลดความหนืดของน้ำหมัก ช่วยลดต้นทุนการหล่อเย็นและพลังงานในการกวน (Rod,1992)

ในปัจจุบันมีการผลิตไลเปสขายในท้องตลาดหลายชนิด ส่วนใหญ่ได้จากจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง และผลิตไลเปสที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานประมาณ 35-40 องศาเซลเซียส เท่านั้น หากเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นไขมันจะย่อยสลายได้ง่ายขึ้น ดังนั้นไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรียทนร้อนที่เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ขึ้นไป น่าจะเป็นเอนไซม์ที่ดีที่ใช้กับไขมันในอุตสาหกรรม

งานวิจัยนี้มุ่งที่จะแสวงหาแบคทีเรียทนร้อนที่ผลิตไลเปสส่งออกนอกเซลล์ในปริมาณมากจากธรรมชาติ คัดเลือกหาสายพันธุ์ที่เหมาะสมและทำการวิเคราะห์เพื่อศึกษาสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์ที่จะประยุกต์ใช้งานต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

คัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสทนร้อน ศึกษาลักษณะสมบัติของแบคทีเรียและตรวจแอคติวิตีรวมทั้งสมบัติบางประการของไลเปสทนร้อนที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้แบคทีเรียทนร้อนที่สร้างไลเปส และทราบลักษณะสมบัติบางประการของไลเปสจากแบคทีเรียทนร้อนที่คัดเลือกไว้เป็นข้อมูลในการศึกษาขั้นต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. แยกแบคทีเรียทนร้อนที่ผลิตไลเปสจากตัวอย่างดินและน้ำ
2. ตรวจแอคติวิตีของไลเปสจากแบคทีเรียที่แยกได้
3. ศึกษารูปร่างลักษณะและสมบัติของแบคทีเรียที่คัดเลือก
4. ทำไลเปสจากแบคทีเรียที่คัดเลือกให้บริสุทธิ์บางส่วน
5. ศึกษาสมบัติบางประการของไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย