

การแยกแยะที่เรื้อยทร้อนและลักษณะสมบัติบางประการของไลเปสทร้อน
ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน



นางสาวพัชรวิภา ใจจักรคำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยา ทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-2144-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISOLATION OF THERMOTOLERANT BACTERIA AND CHARACTERIZATION OF A
PARTIALLY PURIFIED THERMOSTABLE LIPASE

Miss Patcharavipa

Chaijuckam

ศูนย์วิทยทรัพยากร

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2002

ISBN 974-17-2144-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การแยกแยะคดีที่เรียกความร้อนและลักษณะสมบัติบางประการของไลเปสทอน
ร้อนที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

โดย

นางสาวพัชรวิภา ใจจักรคำ

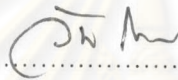
สาขาวิชา

จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา

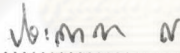
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ ไชยิตานนท์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

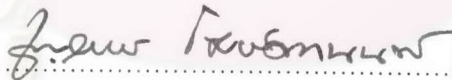


..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์




..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ประกิตต์สิน สีहनนท์)



..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ ไชยิตานนท์)



..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)



..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

พัชรวิภา ใจจักรคำ : การแยกแบคทีเรียทนร้อนและลักษณะสมบัติบางประการของไลเปส
ทนร้อนที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (ISOLATION OF THERMOTOLERANT BACTERIA
AND CHARACTERIZATION OF A PARTIALLY PURIFIED THERMOSTABLE
LIPASE) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ ; 117 หน้า. ISBN 974-17-2144-7.

จากตัวอย่างดิน 8 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำ 1 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บจากแหล่งที่คาดว่าจะมีเชื้อ
แบคทีเรียทนร้อนที่ผลิตไลเปสได้ นำมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน สามารถ
คัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสได้ 20 สายพันธุ์ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ K3 มีแอกติวิตีและแอกติวิตี
จำเพาะของไลเปสมากที่สุดคือ 0.084 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากการจำแนกทางสรีรวิทยา
และชีวเคมีเบื้องต้น ตามวิธีของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology พบว่าเป็น
แบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus stearothermophilus*

งานวิจัยนี้ศึกษาการทำไลเปสจากเชื้อ K3 ให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยคอลัมน์ดีไอเออี ไบโอ-เจล
เอ พบว่ามีแอกติวิตีของไลเปส 2 ชนิด คือไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีไอเออี ไบโอ-เจล เอ
(unbound) และไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีไอเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) มีความบริสุทธิ์
เพิ่มขึ้น 3.56 เท่า และ 2.80 เท่า เหลือแอกติวิตี 53.22 เปอร์เซ็นต์ และ 7.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ
จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรโฟรี
ซิสของไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลาง (unbound) พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 22,000 ดาลตัน

จากการศึกษาสมบัติของไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนพบว่า ไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลาง
(unbound) และไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีไอเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) มีอุณหภูมิที่เหมาะสม
คือ 60 องศาเซลเซียส และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์ทั้งสองชนิดมีความเป็นกรด
ต่างที่เหมาะสมคือ 8.0 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงถึง 70 องศาเซลเซียส มีความเสถียรต่อความ
เป็นกรดต่างในช่วง 7.0-7.5 และเสถียรต่อสภาวะการเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2545.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4372345823 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORD : LIPASE / THERMOTOLERANT/ PARTIALLY PURIFIED

PATCHARAVIPA CHAIJUCKAM : ISOLATION OF THERMOTOLERANT BACTERIA AND CHARACTERIZATION OF A PARTIALLY PURIFIED THERMOSTABLE LIPASE. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. CHARNWIT KOSITANONT, Ph.D. 117 pp. ISBN 974-17-2144-7.

From 8 soil samples and 1 water sample collected from potential sources of having thermophilic lipase producing bacteria, 20 isolates with lipase activity were obtained after incubating at 65 °C in a medium containing tributyrin as a substrate for 2 days. Among these isolates, K3 was the highest lipase producing strain. The enzyme specific activity was 0.084 unit/miligram protein. According to Bergey's Manual Systematic Bacteriology, K3 was identified as *Bacillus stearothermophilus*.

The K3's lipase was partially purified by ion exchange chromatography using DEAE Bio-Gel A. From the column, lipase activity was found in both bound and unbound fractions. After pooled and concentrated, unbound lipase specific activity was increased 3.56 folds and 2.80 folds for the bound lipase. Enzyme recovery yields for the unbound and bound were 53.22 and 7.29 percent respectively. The apparent molecular weight of the partially purified unbound lipase was 22,000 daltons .

The optimal temperatures of the unbound and bound lipase were 60 and 70 °C, respectively. Both of them had the same optimal pH of 8.0. The enzymes were stable up to 70 °C, at pH 7.0-7.5 and can be stored at -20 °C for 14 days.

Department... Microbiology..... Student's signature... *ชัชวาลย์ จันทร์ดี*.....

Field of study... Industrial Microbiology..... Advisor's signature... *Charnwit Kositanont*.....

Academic year... 2002..... Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์ช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากบุคคลหลาย ๆ ฝ่าย จึงขอแสดงความขอบคุณทุกท่านไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ที่ให้ทั้งความรู้ คำแนะนำ ตลอดจนความช่วยเหลือต่างๆ รวมทั้งยังได้สละเวลาในการให้คำปรึกษาและตรวจแก้ไขข้อผิดพลาดตลอดมา ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณประธานกรรมการและคณะกรรมการทุกท่านที่กรุณาตรวจสอบและแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน รวมทั้งเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือทั้งในด้านคำแนะนำ การยืมอุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ และอำนวยความสะดวกในการวิจัย

นอกจากนี้ขอขอบคุณคุณ ทรรศนีย์ ตั้งสกุล และคุณ พายศ อภิญญาวัฒน์ ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและคอยให้กำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ญาติพี่น้อง และขอขอบคุณคุณ ปาริฉัตรกั ใจจักรคำ ที่ได้ให้การสนับสนุนและคอยช่วยเหลือรวมทั้งเป็นกำลังใจในการศึกษามาโดยตลอด จนกระทั่งสำเร็จการศึกษาในครั้งนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ	
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์การวิจัย.....	20
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	20
วิธีดำเนินการวิจัย.....	21
2. ปรัชญาและทฤษฎี	
แนวคิดและทฤษฎี.....	22
เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	22
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	33
เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการวิจัย.....	35
วิธีดำเนินการวิจัย.....	37
4. ผลการวิจัย.....	49
5. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	
สรุปผลการวิจัย.....	81
อภิปรายการวิจัย.....	84
ข้อเสนอแนะ.....	90
รายการอ้างอิง.....	91

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	100
ภาคผนวก ข วิธีเตรียมสารเคมี.....	106
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน.....	114
ภาคผนวก ง วิธีคำนวณ.....	116
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	117



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1. การนำไลเปสจากจุลินทรีย์ไปใช้ในอุตสาหกรรม.....	3
2. สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากจุลินทรีย์บางชนิด.....	9
3. ความต้องการไตรกลีเซอไรด์ในการผลิตไลเปสจากจุลินทรีย์บางชนิด.....	10
4. สภาพความเป็นกรดต่าง และอุณหภูมิที่เหมาะสมของไลเปสจากจุลินทรีย์บางชนิดที่นำมา ใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม.....	14
5. ตัวอย่างและคุณสมบัติของเอนไซม์ที่สำคัญทางการค้าจาก Thermophiles.....	18
6. การแปรผันสภาวะในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก.....	40
7. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ.....	50
8. ลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้.....	51
9. แอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะของแบคทีเรียที่คัดเลือกที่บ่ม 48 ชั่วโมง.....	52
10. ขั้นตอนการทำไลเปสให้บริสุทธิ์บางส่วน.....	61
11. รูปร่างลักษณะและสมบัติของแบคทีเรียที่คัดเลือก.....	77
12. ลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่คัดเลือก.....	78
13. สมบัติบางประการของไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากเชื้อแบคทีเรีย K3.....	83

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
1. ชนิดของไลเปสตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์.....	16
2. กราฟแสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย K3.....	54
3. กราฟแสดงความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย K3.....	55
4. กราฟแสดงเวลาในการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย K3.....	56
5. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและแอกติวิตีของไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย K3 ทุกๆ 6 ชั่วโมง.....	57
6. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นกรดต่างของสารละลายไลเปสและแอกติวิตี ของไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย K3 ทุกๆ 6 ชั่วโมง.....	58
7. การทำไลเปสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ.....	60
8. การทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซิสของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วน.....	63
9. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการทำอีเลคโตรโฟรีซิสบน ไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล.....	65
10. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล กับระยะทางที่โปรตีน เคลื่อนที่บนไซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโตรโฟรีซิส.....	66
11. กราฟแสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปส	68
12. กราฟแสดงความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปส.....	69
13. กราฟแสดงความเสถียรของไลเปสต่ออุณหภูมิ.....	72
14. กราฟแสดงความเสถียรของไลเปสต่อความเป็นกรดต่าง.....	73
15. กราฟแสดงความเสถียรของไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) ต่อสภาวะการเก็บ.....	74
16. กราฟแสดงความเสถียรของไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) ต่อสภาวะการเก็บ.....	75
17. ลักษณะรูปร่าง การติดสีแกรม การติดสีสปอร์และลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย K3.....	80