

การคัดเลือกและการผลิตไลเพสของจุลินทรีย์ชอบร้อนชนิดไลโฟไลติกจากบ่อน้ำพุร้อนในภาคเหนือ
ของประเทศไทย



นางสาวสุชมาล กิตติวิสาร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

SELECTION AND LIPASE PRODUCTION OF LIPOLYTIC THERMOPHILIC MICROORGANISMS FROM HOT SPRINGS IN NORTHERN THAILAND

Miss Sukumarn Kittivisarn



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกและการผลิตไลเปสของจุลินทรีย์ชอบร้อน
ชนิดไลโปไฟล์ติกจากบ่อน้ำพุร้อนในภาคเหนือของประเทศไทย

โดย นางสาวสุชมาล กิตติวิสาร

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์ ธิษัมพร ยงวณิชย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้มหาวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์)
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล)
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ ธิษัมพร ยงวณิชย์)
..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชมกฤษ กลินวงษ์)
..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เฝ้า)
..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร.สุริษา สุวรรณรังษี)

สุขุมาล กิตติวิสาร : การคัดเลือกและการผลิตไลเปสของจุลินทรีย์ที่ชอบร้อนชนิดไลโพลิติกจากบ่อน้ำพุร้อนในภาคเหนือของประเทศไทย (SELECTION AND LIPASE PRODUCTION OF LIPOLYTIC THERMOPHILIC MICROORGANISMS FROM HOT SPRINGS IN NORTHERN THAILAND) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณ์านุกูล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: รศ. ทิฆัมพร ยงวณิชย์, 89 หน้า.

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ไลโพลิติกชอบร้อนจากบ่อน้ำพุร้อนทางภาคเหนือของประเทศไทยเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการย่อยน้ำมันและไขมัน จากการเก็บตัวอย่างตะกอนดิน 31 ตัวอย่างและตัวอย่างน้ำ 13 ตัวอย่างจากบ่อน้ำพุร้อนทางภาคเหนือ เมื่อนำมาคัดแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งไตรบิวไทรีนและโรดามีน บี ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ไลโพลิติกชอบร้อนได้ทั้งสิ้น 23 ไอโซเลต พบว่าเป็นแบคทีเรียทั้งหมด เมื่อนำมาวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้พารา-ไนโตรฟีนิลลอรเตเป็นสารตั้งต้น พบว่าไอโซเลต DK3-2 และ ไอโซเลต DK3-3 จากบ่อน้ำพุร้อนดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ ประเทศไทย มีค่ากิจกรรมจำเพาะของไลเปสมากที่สุดเป็น 2.34 ± 0.05 และ 2.15 ± 0.02 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกไอโซเลต DK3-2 และ DK3-3 เมื่อทำการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสในอาหารที่ชกน้าที่มีน้ำมันปาล์มเป็นส่วนประกอบ พบว่าทั้งสองไอโซเลตสามารถผลิตไลเปสได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสในอาหารเลี้ยงเชื้อ 7.0 เป็น เวลา 24 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมจำเพาะของไลเปสเท่ากับ 3.59 ± 0.06 และ 3.49 ± 0.05 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ เมื่อทำการศึกษาแหล่งคาร์บอนเหนียวนำในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไลเปสของแบคทีเรียไอโซเลต DK3-2 และ DK3-3 โดยการแทนที่น้ำมันปาล์มด้วยน้ำมันชนิดต่างๆ พบว่าสามารถผลิตไลเปสได้ดีที่สุดเมื่อน้ำมันรำข้าวเป็นสารเหนียวนำ แสดงว่าสามารถช่วยให้เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์ได้มากขึ้น มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 6.16 ± 0.02 และ 5.86 ± 0.09 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ จากนั้นศึกษาลักษณะสมบัติของไลเปสที่ได้ พบว่ามีภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่าง 7.0 และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ที่ความเป็นกรดต่าง 8.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อทำการส่งวิเคราะห์ลำดับเบสแล้วนำผลที่ได้มาเทียบกับ 16S rDNA ของแบคทีเรียในฐานข้อมูล GenBank database พบว่าแบคทีเรียไลโพลิติกทั้งสอง DK3-2 และ DK3-3 คือ *Pseudomonas boreopolis*

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5372556123 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS:

SUKUMARN KITTIVISARN: SELECTION AND LIPASE PRODUCTION OF LIPOLYTIC THERMOPHILIC MICROORGANISMS FROM HOT SPRINGS IN NORTHERN THAILAND. ADVISOR: ASSOC. PROF. WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. TIKAMPORN YONGVANICH, 89 pp.

The purpose of this research was to isolate the lipolytic thermophilic microorganisms from the hot springs in the northern regions of Thailand for the industrial applications of oils and fats. From the screening of lipolytic microorganisms from the samples of 31 sediment and 13 water by using tributyrin and rhodamine B agar at 45 °C, 23 isolates were obtained and all were found to be bacteria. When the assay of lipase activity was conducted using 4-nitrophenyl laurate as a substrate, it was found that 2 isolates namely, DK3-2 and DK3-3 from Doisaket hot spring, Chiangmai province, Thailand showed the maximal specific activities at 2.34 ± 0.05 and 2.15 ± 0.02 Unit/mg protein respectively. Therefore, these bacteria were selected to further investigate the optimal conditions for lipase production using palm oil as the inducer. The results showed that DK3-2 and DK3-3 produced high lipases at 45 °C, pH 7.0 in 24 hours with the specific activities of 3.59 ± 0.06 and 3.49 ± 0.05 Unit/mg protein respectively. When both DK3-2 and DK3-3 were cultured in the media containing different carbon sources as inducers, it was found that in the presence of rice bran oil, the maximal specific lipase activity of 6.16 ± 0.02 and 5.86 ± 0.09 Unit/mg protein respectively were obtained. When the enzymes were characterized, the results revealed that the optimal conditions for lipase activities were at 80 °C and pH 7.0. The obtained lipases were stable at 65 °C and pH 8.0 for 30 minutes of incubation time. The comparative results of bacterial 16S rDNA gene with the GenBank database identified both of the lipolytic bacteria, DK3-2 and DK3-3 as *Pseudomonas boreopolis*.

Field of Study: Biotechnology

Student's Signature

Academic Year: 2014

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยการสนับสนุน และความอนุเคราะห์อย่างดียิ่งจากรองศาสตราจารย์ ดร. วรวิมล จุฬาลักษณ์นากุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น ตลอดจนความช่วยเหลือต่างๆที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ทิฆัมพร ยงวณิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ทั้งความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำรวมถึงข้อคิดต่างๆในระหว่างการทำงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ต่อศักดิ์ สีลานันท์ ที่ให้ความกรุณาเป็นประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ และรองศาสตราจารย์ ดร. จันทรพีญ์ จันทรเจ้า ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชมพูนุช กลิ่นวงษ์ และดร. สุริษา สุวรรณรังษี ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมให้คำแนะนำ รวมทั้งข้อคิดเห็น ที่มีส่วนสำคัญในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์นี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ หน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ ที่เชื้อเพื่อสถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกต่อการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ พี่ๆน้องๆ และเพื่อนๆ ในหน่วยปฏิบัติการวิจัยทุกๆท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ คำปรึกษา ในทุกด้านมาโดยตลอด จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่เคียงข้างเป็นแรงผลักดันสำคัญ เป็นกำลังใจในทุกๆด้านชีวิตของข้าพเจ้า

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญรูปภาพ	ฎ
สารบัญตาราง.....	ฏ
บทที่ 1.....	1
บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
ขั้นตอนการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2.....	4
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 เอนไซม์ไลเปส	4
2.2 ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเปส.....	5
2.3 แหล่งของไลเปส	6
2.4 การจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ตามอุณหภูมิ	6
2.5 จุลินทรีย์ไลโปไลติกของบร๊อน	8
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของ.....	9
2.7 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้ไลเปสที่ร้อนในอุตสาหกรรม	10
2.7.1 อุตสาหกรรมอาหาร.....	11

2.7.2	อุตสาหกรรมบำบัดน้ำเสีย.....	11
2.7.3	อุตสาหกรรมผงซักฟอกและสารทำความสะอาด.....	11
2.7.4	อุตสาหกรรมอื่นๆ.....	11
2.8	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	13
บทที่ 3.....		
	วิธีดำเนินการวิจัย.....	14
	วัตถุประสงค์.....	14
	สารเคมี.....	15
	วิธีดำเนินการวิจัย.....	16
3.1	การเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์ชอบรื้อนจากบ่อน้ำพุร้อนทางภาคเหนือของประเทศไทย.....	16
3.2	การคัดเลือกจุลินทรีย์ชอบรื้อนที่มีความสามารถผลิตไลเปสได้.....	18
3.2.1	การคัดเลือกจุลินทรีย์ชอบรื้อนและทดสอบความสามารถในการผลิตไลเปสเบื้องต้น.....	18
3.2.2	ทดสอบและคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตไลเปส.....	18
3.3	การจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ชอบรื้อนที่มีความสามารถผลิตไลเปส.....	19
3.3.1	การตัดแยกแบคทีเรียชอบรื้อน.....	19
3.3.2	การตัดแยกยีสต์ ราชอบรื้อน.....	19
3.4	การเปรียบเทียบความสามารถการเร่งปฏิกิริยาจากไลเปสของจุลินทรีย์ชอบรื้อนที่คัดเลือกได้.....	19
3.4.1	การเลี้ยงเชื้อเพื่อชักนำให้ผลิตเอนไซม์ไลเปส.....	19
3.4.2	การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Total activity).....	20
3.4.3	การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Total protein).....	21
3.4.4	การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ (Specific activity).....	21

3.5 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเพสจากจุลินทรีย์.....	21
3.5.1 การศึกษาคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพสและความสามารถในการทน ร้อนของจุลินทรีย์	21
3.5.2 การศึกษาความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเพสของจุลินทรีย์... ..	22
3.5.3 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเพสของจุลินทรีย์	22
3.5.4 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ต่อความสามารถในการ ผลิตเอนไซม์ไลเพส.....	23
3.6 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนเหนี่ยวนำในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ไล เพสของจุลินทรีย์	23
3.7 การบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ชอบร้อน 10 สายพันธุ์ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเพส ได้สูงที่สุดที่คัดแยกได้จากบ่อน้ำพุร้อนทางภาคเหนือของประเทศไทย ด้วยการ วิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA	24
3.8 การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ไลเพสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชอบร้อนที่คัดเลือก ..	25
3.8.1 การศึกษาภาวะความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเพส	25
3.8.2 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ไลเพสต่อค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ	26
3.8.3 การศึกษาคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเพส	26
3.8.4 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ไลเพสต่ออุณหภูมิต่างๆ	26
บทที่ 4.....	27
ผลการทดลองและอภิปรายผล	27
4.1 การเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์ชอบร้อนจากบ่อน้ำพุร้อนทางภาคเหนือของประเทศไทย.....	27
4.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ชอบร้อนที่สามารถผลิตไลเพส	34
4.2.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ชอบร้อนและทดสอบความสามารถในการผลิตไลเพส เบื้องต้น	34
4.2.2 การทดสอบและคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตไลเพส	38

4.3 ชนิดของจุลินทรีย์ไลโฟไลติกของบร็อนที่คัดแยกได้	43
4.4 การเปรียบเทียบความสามารถของการเร่งปฏิกิริยาจากไลเพสของจุลินทรีย์บร็อนที่คัดเลือก	46
4.5 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเพสจากจุลินทรีย์	48
4.5.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพสและความสามารถในการทนร้อนของ จุลินทรีย์	48
4.5.2 การศึกษาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเพสของจุลินทรีย์ ...	55
4.5.3 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเพสของจุลินทรีย์	56
4.5.4 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ต่อความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเพส	57
4.6 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนเหนี่ยวนำในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ไลเพสของจุลินทรีย์	59
4.7 ปังชี้ชนิดของจุลินทรีย์บร็อน 10 สายพันธุ์ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเพสได้สูงที่สุดที่คัดแยกได้จากบ่อน้ำพุร้อนทางภาคเหนือของประเทศไทย ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA	61
4.8 การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ไลเพสที่ผลิตจากจุลินทรีย์บร็อนที่คัดเลือก ..	63
4.8.1 การศึกษาภาวะความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเพส	63
4.8.2 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ไลเพสต่อค่าความเป็นกรดต่างต่างๆ	64
4.8.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเพส	65
4.8.4 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ไลเพสต่ออุณหภูมิต่างๆ	66
บทที่ 5	68
สรุปผลการวิจัย	68
รายการอ้างอิง	69
ภาคผนวก	75

ภาคผนวก ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	76
1. เชื้อแบคทีเรีย	76
1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง (NA; nutrient agar)	76
1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (NB; nutrient broth)	76
2. เชื้อยีสต์และรา	77
3. อาหารไตรบิวไทรีน (tributylin)	77
4. อาหารโรดามีน บี (Rhodamine B)	78
ภาคผนวก ข วิธีการเตรียมสารเคมี	79
1. สารสำหรับตรวจวัดค่ากิจกรรมของไลเปส	79
1.1 ปริมาณของสารและเอนไซม์ ในปฏิกิริยา	79
1.2 บัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ	79
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน	81
ภาคผนวก ง การคำนวณ	87
1. การคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (total activity)	87
2. การคำนวณปริมาณโปรตีน (total protein)	88
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	89

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ 2.1 แสดงการเกิดปฏิกิริยาของไลเปส (Gandhi และคณะ, 2000).....	5
ภาพที่ 2.2 แสดงผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์	7
ภาพที่ 4.1 บริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างจากบ่อน้ำพุร้อนทางภาคเหนือของประเทศไทย	27
ภาพที่ 4.2 ภาพ ก แสดงจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถผลิตเอสเทอร์เรสจึงไม่เกิดโซนใส ภาพ ข แสดง จุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตเอสเทอร์เรสจึงเกิดโซนใส	34
ภาพที่ 4.3 ภาพ ก แสดงจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถผลิตไลเปสจึงไม่เกิดการเรืองแสงสีส้มภายใต้รังสี อัลตราไวโอเล็ต ภาพ ข แสดงจุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตไลเปสจึงเกิดการเรืองแสงสีส้ม ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต	39
ภาพที่ 4.4 แสดงลักษณะของแบคทีเรียชอบร้อน 23 ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากบ่อน้ำพุร้อน.....	45
ภาพที่ 4.5 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะจากแบคทีเรีย 23 ไอโซเลตหลังจากเลี้ยง ในอาหารเหลวสำหรับผลิตไลเปสที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	47
ภาพที่ 4.6 แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสและความสามารถในการทนร้อน.....	54
ภาพที่ 4.7 แสดงค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต	55
ภาพที่ 4.8 แสดงเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต DK3-2 และ DK3-3....	56
ภาพที่ 4.9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ต่อความสามารถในการผลิต เอนไซม์ ไลเปสจาก (ก) DK3-2 (ข) DK3-3	58
ภาพที่ 4.10 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจำเพาะของแบคทีเรียไอโซเลต DK3-2 และ DK3-3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของน้ำมันแตกต่างกัน.....	60
ภาพที่ 4.11 แสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 1600 กิโลเบสของ 16S rDNA เลขที่ 3 คือ DK3-2, เลขที่ 4 คือ DK3-3, เลขที่ 6 คือ VP6-3, เลขที่ 7 คือ SK2-3, เลขที่ 9 คือ JS3-4, เลขที่ 10 คือ BP2-1, เลขที่ 11 คือ SK2-1, เลขที่ 12 คือ DK2-4, เลขที่ 13 คือ VP4-1 และ เลขที่ 14 คือ VP6-1.....	62
ภาพที่ 4.12 แสดงค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ LipDK3- 2.....	63
ภาพที่ 4.13 แสดงค่าความเสถียรของเอนไซม์ไลเปส LipDK3-2 ที่ค่าความเป็นกรดต่างต่างๆ.....	65

ภาพที่ 4.14 แสดงอนุภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ LipDK3-2 66

ภาพที่ 4.15 แสดงค่าความเสถียรของไลเปส LipDK3-2 ที่อนุภูมิต่างๆ 67



สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสจากจุลินทรีย์ลิโฟไลติกชอบร้อน.....	9
ตารางที่ 2.2 แสดงค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสจากจุลินทรีย์	10
ตารางที่ 2.3 แสดงจุลินทรีย์ชอบร้อนที่มีการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม (Kikani และคณะ, 2010).....	12
ตารางที่ 2.4 แสดงการประยุกต์ใช้ไลเปสในอุตสาหกรรม (Anderson และคณะ, 1998)	12
ตารางที่ 3.1 แสดงรายละเอียดการเก็บตัวอย่างจากบ่อน้ำพุร้อนทางภาคเหนือของประเทศไทย	17
ตารางที่ 3.2 ภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส	25
ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูลตัวอย่างจากบ่อน้ำพุร้อนทางภาคเหนือของประเทศไทย	28
ตารางที่ 4.2 แสดงจุลินทรีย์ชอบร้อนและขนาดไซนัสบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งไตรบิวไทริน	35
ตารางที่ 3.3 แสดงผลการทดสอบความสามารถในการเรืองแสงของจุลินทรีย์ลิโฟไลติกชอบร้อนที่คัดแยกได้บนอาหารโรดามีน บี.....	39
ตารางที่ 4.4 แสดงลักษณะรูปร่าง เส้นผ่านศูนย์กลาง ระดับความหนูน ผิวหน้า ขอบและสีของโคโลนีของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้.....	44
ตารางที่ 4.5 แสดงองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมัน 14 ชนิด	61
ตารางที่ 4.6 แสดงสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้	62

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมล้วนมีความต้องการตัวเร่งชีวภาพหรือไบโอคะตะลิสต์ (biocatalysts) ในการผลิต เนื่องจากมีความจำเพาะต่อปฏิกิริยา มีความสะอาด ปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิต และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ในอุตสาหกรรมโดยทั่วไปนิยมใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic microorganisms) ประมาณ 30-45 องศาเซลเซียส มาเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แต่การใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเหล่านี้ยังมีข้อจำกัดต้องใช้ในภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม เนื่องจากเอนไซม์จะไม่ทนต่ออุณหภูมิสูง มีค่ากิจกรรมที่ดีในอุณหภูมิที่จำกัดและค่าความเป็นกรดต่างในช่วงแคบ หากนำไปใช้ในกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมที่มีอุณหภูมิสูงจะส่งผลให้เอนไซม์เสียสภาพได้ง่าย ต้องลดอุณหภูมิการผลิตลงซึ่งจะเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิตเป็นอย่างมาก (Deive และคณะ, 2013) ดังนั้นจึงมีความสนใจค้นหาจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีและสามารถผลิตเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง (thermophilic microorganisms) ประมาณ 45-122 องศาเซลเซียส เนื่องจากเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชอบร้อนดังกล่าว จะมีสมบัติทนความร้อนได้สูง มีความเสถียรต่อความร้อนจึงทำให้การเร่งปฏิกิริยามีอัตราสูงขึ้น ทนต่อการเสียสภาพของโปรตีนที่อุณหภูมิสูง มีความคงตัวต่อตัวทำละลายอินทรีย์ในการผลิต และสามารถใช้อุณหภูมิสูงในการผลิตทำให้ช่วยลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Deive และคณะ, 2009) จุลินทรีย์ชอบร้อนจะมีความสามารถเจริญได้ในบริเวณต่างๆ ได้แก่ บ่อน้ำพุร้อน ปากปล่องภูเขาไฟ ใต้ทะเลลึกหรือใต้มหาสมุทรที่มีความดันของน้ำสูง รวมถึงบริเวณที่มีสภาพความเป็นกรดต่างสูง (Akanbi และคณะ, 2010)

จุลินทรีย์ชนิดลิโพลติกมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ย่อยน้ำมันและไขมันได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือเอนไซม์ไลเปส (Lipase) ซึ่งจัดเป็นเอนไซม์ประเภท Triacylglycerol acylhydrolases มีรหัส EC 3.1.1.3 ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ในการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ (ester bonds) ของโมเลกุลน้ำมันและไขมัน (triacylglycerol) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีสายโซ่คาร์บอนของกรดไขมันที่ยาว จนได้ผลผลิตเป็นไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ กรดไขมันอิสระ และกลีเซอรอล โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเกิดที่บริเวณผิวสัมผัสระหว่างชั้นของน้ำและสับเตรท (oil-

water interface) (Nguyen และคณะ, 2010) และยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ (synthesis reaction) คือปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันและเอสเทอร์อซิเคชัน ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่เกิดจากโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์หรือหมู่คาร์บอกซิลกับหมู่ไฮดรอกซิล เกิดผลิตภัณฑ์เป็นแอลคิลเอสเทอร์ (alkyl ester) (Narwal และ Gupta, 2013) ไลเพสพบได้ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ได้แก่ พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยเฉพาะไลเพสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์เป็นที่น่าสนใจอย่างกว้างขวางเนื่องจากจุลินทรีย์สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว มีความเสถียร (stability) มากกว่าไลเพสที่ได้จากพืชและสัตว์ สามารถผลิตได้ในปริมาณมากโดยใช้ต้นทุนในการผลิตที่ต่ำ การเก็บเกี่ยวไม่ซับซ้อน มีสมบัติตรงตามต้องการ (Kumar และคณะ, 2012)

เอนไซม์ไลเพสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชอบร้อนจึงมีบทบาทที่สำคัญในการนำมาพัฒนา ปรับปรุงการผลิตในอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมันปนเปื้อน ต้องมีการให้ความร้อน (อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสขึ้นไป) เพื่อให้ให้อัตราการแตกตัวของไขมันเพิ่มมากขึ้น ความเหนียวหนืดของไขมันจะลดลง และไขมันจะอยู่ในรูปอิมัลชัน ง่ายต่อการย่อยสลาย (Sharma และคณะ, 2013) อุตสาหกรรมน้ำมันและไขมัน มีความต้องการใช้เอนไซม์ไลเพสที่สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงในการนำไปย่อยสลายไขมันจากสัตว์ซึ่งมีจุดหลอมเหลวสูง อุตสาหกรรมเครื่องหนัง ในกระบวนการผลิตจะมีการนำไขมันส่วนที่เหลือที่ติดอยู่บริเวณหนังและขนออก หากใช้วิธีการทางเคมีจะมีประสิทธิภาพต่ำ จึงมีการนำเอนไซม์ไลเพสมาประยุกต์ใช้กำจัดไขมันออกจากหนังสัตว์ อุตสาหกรรมอาหาร ใช้ปรุงแต่งกลิ่นเฉพาะในการผลิตเนย และใช้ย่อยไขมันส่วนเกินในการผลิตนม (Hamid และคณะ, 2003)

จากรายงานวิจัยพบจุลินทรีย์ชอบร้อนที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเพส ได้แก่ *Bacillus* sp. (Nawani และคณะ, 2006) *Bacillus pumilus* RK31 (Kumar และคณะ, 2012) *Bacillus coagulans* BTS-3 (Kumar และคณะ, 2005) *Geobacillus* sp. (Mehta และคณะ, 2012) *Pseudomonas* sp. ZBC1 (Xing และคณะ, 2013)

งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะคัดเลือกจุลินทรีย์ลิโพลิติกชอบร้อนเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเพสจากบ่อน้ำพุร้อนทางภาคเหนือของประเทศไทย และศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพสจากจุลินทรีย์ลิโพลิติกชอบร้อนที่คัดเลือกได้ เช่น เวลา อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดต่าง รวมถึงสมบัติการทำงานของเอนไซม์ไลเพสเบื้องต้น เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ไลโปไลติกชอบร้อนจากบ่อน้ำพุร้อนทางภาคเหนือของประเทศไทย นำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการย่อยไขมันและน้ำมันได้

ขั้นตอนการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างจุลินทรีย์ชอบร้อนจากบ่อน้ำพุร้อนทางภาคเหนือของประเทศไทย
2. การคัดเลือกจุลินทรีย์ชอบร้อนที่มีความสามารถผลิตไลเปสได้
3. การจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ชอบร้อนที่มีความสามารถผลิตไลเปส
4. การเปรียบเทียบความสามารถการเร่งปฏิกิริยาจากไลเปสของจุลินทรีย์ชอบร้อนที่คัดเลือกได้
5. การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์
6. การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนเนี่ยวนำในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์
7. บ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ชอบร้อน 10 สายพันธุ์ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดที่คัดแยกได้จากบ่อน้ำพุร้อนทางภาคเหนือของประเทศไทย ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA
8. การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชอบร้อนที่คัดเลือก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

พบจุลินทรีย์ไลโปไลติกชอบร้อนที่สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของน้ำมันและไขมันที่อุณหภูมิสูงได้ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่อ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปส (Lipase; EC3.1.1.3) เป็นเอนไซม์จัดอยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) ที่มีความสามารถในการเร่งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) หรือการสลายพันธะเอสเทอร์ของไตรกลีเซอไรด์ให้กลายเป็น กรดไขมัน และกลีเซอรอล โดยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเกิดที่บริเวณผิวสัมผัสระหว่างชั้นของน้ำและน้ำมัน (oil-water interface) (Li และ Zhang, 2005) ไลเปสมีชื่อเรียกตามระบบ international Union of Biochemistry คือ กลีเซอรอล เอสเทอร์ไฮโดรเลส (glycerol ester hydrolase) หรือ ไตรเอซิลกลี เซอรอลไฮโดรเลส (Triacyl glycerol hydrolase) คณะกรรมาธิการเอนไซม์นานาชาติ (International Enzyme Commission; EC) ได้กำหนดการจัดจำแนกเอนไซม์ออกเป็นกลุ่มต่างๆ (classification) ตามชนิดและปฏิกิริยาที่เอนไซม์นั้นเร่ง โดยกำหนดเป็นรหัสประจำตัวเอนไซม์ (code number) รหัสดังกล่าวประกอบด้วยตัวเลข 4 ชุด แต่ละชุดจะแยกจากกันโดยเครื่องหมายจุด ตัวเลขชุดแรกหมายถึงกลุ่ม (class) ของเอนไซม์ที่ถูกจัดไว้ ซึ่งมีทั้งหมด 6 กลุ่ม ตัวเลขชุดที่สองและสาม จะบอกถึงชนิดของปฏิกิริยาที่ถูกเร่ง ตัวเลขชุดที่สี่จะทำหน้าที่ช่วยแยกเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาคล้ายกันออกจากกัน ซึ่งไลเปสจะมีรหัสประจำตัวเอนไซม์ที่สามารถบ่งบอกถึงปฏิกิริยาได้ดังนี้

E.C.3.-.-.- Hydrolase.

E.C.3.1.-.- Acting on ester bonds.

E.C.3.1.1.- Carboxylic ester hydrolases.

E.C.3.1.1.3 Triglycerol lipase

2.2 ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของไลเปส

Gandhi และคณะ (2000) ได้แบ่งการทำงานของไลเปสเป็นสองกลุ่ม กลุ่มที่หนึ่งคือ การย่อยสลายเอสเทอร์ และกลุ่มที่สองการสังเคราะห์เอสเทอร์ ซึ่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ชนิด ได้แก่ esterification, acidolysis, transesterification และ alcoholysis ทั้งสี่ปฏิกิริยาหลังนี้ได้จัดไว้ในกลุ่มที่มีชื่อว่า transesterification ซึ่งการเกิดปฏิกิริยาดังแสดงในภาพ (ภาพที่ 2.1)

1. Hydrolysis

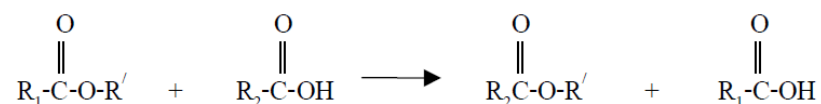


2. Synthesis



3. Transesterification

3.1 Acidolysis



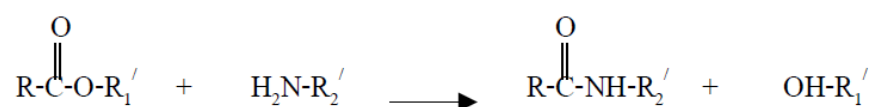
3.2 Alcoholysis



3.3 Interesterification



3.4 Aminolysis



ภาพที่ 2.1 แสดงการเกิดปฏิกิริยาของไลเปส (Gandhi และคณะ, 2000)

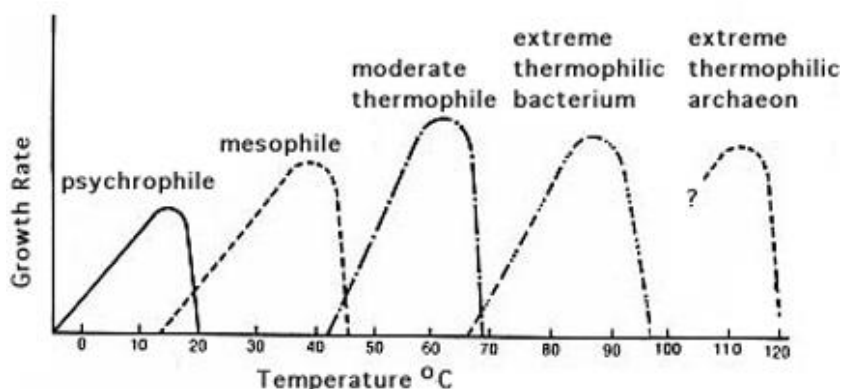
เอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ได้ นอกจากจะมีไลเปสแล้วยังมีอีกชนิดหนึ่งที่สามารถย่อยสลายเอสเทอร์ได้ คือ เอสเทอร์เรส (esterase) ซึ่งหมายถึงเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายคาร์บอกซิลิก แอซิด เอสเทอร์ (carboxylic acid ester) ได้ทุกชนิด ดังนั้นเอสเทอร์เรสจึงรวมไปถึงเปปติเดส (peptidase) เช่น ทริปซิน (trypsin) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) และปาเปน (papain) แต่ไลเปสจะมีความแตกต่างจากเอสเทอร์เรสที่ไลเปสจะทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่อยู่ในสภาพไม่ละลาย (insoluble หรือ heterogeneous substrate) ส่วนเอสเทอร์เรสจะทำปฏิกิริยากับ สารตั้งต้นที่อยู่ในสภาพเป็นสารละลาย (Shahani และคณะ, 1976)

2.3 แหล่งของไลเปส

เอนไซม์ไลเปสพบได้ในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไลเปสจากจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา มีข้อดีกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์ เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้เจริญได้อย่างรวดเร็ว และสามารถปรับภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ได้ เอนไซม์ที่ได้มีความเสถียร (stability) (Kumar และคณะ, 2012) ไลเปสที่พบในจุลินทรีย์แต่ละชนิดให้ไลเปสที่มีสมบัติแตกต่างกัน จุลินทรีย์บางชนิดจะผลิต alkaline lipase เช่น *Pseudomonas fluorescens* AK102 (Kojima และคณะ, 1994) บางชนิดผลิต neutral lipase เช่น *Aspergillus aculeatus* (Arai และคณะ, 2002) และบางชนิดผลิต thermostable lipase เช่น *Bacillus sp.* (Nawani และ Kaur, 2000) จากการที่จุลินทรีย์สามารถผลิตไลเปสที่มีสมบัติแตกต่างกันนี้ จึงทำให้สามารถเลือกไลเปสมาใช้ประโยชน์ให้มีความเหมาะสมกับอุตสาหกรรมต่างๆ

2.4 การจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ตามอุณหภูมิ

จุลินทรีย์มีความต้องการอุณหภูมิเพื่อการเจริญเติบโตแตกต่างกัน อุณหภูมิที่จุลินทรีย์เจริญได้จะอยู่ระหว่างอุณหภูมิสูงสุด (maximum temperature) และอุณหภูมิต่ำสุด (minimum temperature) ซึ่งถ้าอุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่านี้ จุลินทรีย์จะไม่เจริญเติบโต จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตแตกต่างกัน จึงสามารถแบ่งจุลินทรีย์ออกเป็น 3 กลุ่ม (ภาพที่ 2.1) ดังนี้ (นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2547)



ภาพที่ 2.2 แสดงผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์

1. ไสโครไฟล์ (psychrophile) เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่ 0 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 15 องศาเซลเซียส และไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส เช่นกลุ่มจุลินทรีย์ที่เจริญเติบโตได้ทะเลลึก

2. มีโซไฟล์ (mesophile) เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลางระหว่าง 25-40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (Pathogens) จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ซึ่งบางชนิดเป็นสาเหตุของการเน่าเสียของอาหาร โดยเป็นชนิดที่สร้างสปอร์เพื่อให้สามารถทนทานต่อความร้อนได้

3. เทอร์โมไฟล์ (thermophile) เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงตั้งแต่ 45 องศาเซลเซียสขึ้นไป ซึ่งจะแบ่งย่อยได้อีกสามกลุ่มคือ

3.1 จุลินทรีย์ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerant)

เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่ทำให้อัตราการเจริญสูงสุดของจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้จะอยู่ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50-60 องศาเซลเซียส ซึ่งมีจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ได้แก่ *B.licheniformis*, *B.subtilis*, *B. Lactobacillus bulgaricus*, *Mycobacterium sp.* (Lynn และคณะ, 2002) โดยแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีบทบาทสำคัญในการทำอาหารที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์

3.2 จุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูงปานกลาง (moderate thermophile)

แบคทีเรียกลุ่มนี้จะเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิปานกลางถึงอุณหภูมิสูง โดยจะมีอัตราการเจริญสูงสุดที่อุณหภูมิสูงกว่า 50-60 องศาเซลเซียส

3.3 จุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูง (extreme thermophiles)

เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ในที่ที่มีอุณหภูมิสูงเท่านั้น โดยไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50-60 องศาเซลเซียส Brock (1986) ได้รายงานว่ามีจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิน้ำเดือดล้วนเป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ในกลุ่ม อาร์เคียแบคทีเรีย (archaebacteria) ซึ่งการที่แบคทีเรียนี้สามารถดำรงชีวิตในภาที่มีอุณหภูมิสูงได้นั้น เนื่องจากโครงสร้างของไขมันที่ผนังเซลล์ ซึ่งประกอบด้วย กรดไขมันประเภทอิ่มตัว (saturated fatty acid) กรดไขมันที่มีกิ่งก้านสาขา และกรดไขมันสายยาวในสัดส่วนที่สูง โดยการขนส่งสารต่างๆ ผ่านเข้าออกเซลล์จะต้องให้ผนังเซลล์อยู่ในภาวะกึ่งของเหลว (semifluid state) โดยภาวะกึ่งของเหลวของผนังเซลล์นี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อม และลักษณะทางเคมีของไขมัน ผนังเซลล์ที่ประกอบไปด้วยไขมันอิ่มตัวสายยาว และกรดไขมันที่มีกิ่งก้านสาขาในสัดส่วนที่สูงจะมีภาวะเหลวที่อุณหภูมิสูงเท่านั้น และเมื่อพิจารณาความแตกต่างทางธรรมชาติของโปรตีนและเอนไซม์พบว่า สมบัติหลายข้อของโปรตีนและเอนไซม์ของจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูง เช่น น้ำหนักโมเลกุล องค์ประกอบหน่วยย่อย (subunit composition) และผลของสารแอลโลสเตอริก (allosteric effector) ที่มาจับคล้ายคลึงกับจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูงปานกลาง แต่กลับมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง จึงเป็นผลมาจากลำดับของกรด อะมิโนในสายเปปไทด์ ซึ่งจะมีผลต่อโครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) และโครงสร้างจตุรภูมิ (quaternary structure) ทำให้โมเลกุลของโปรตีนมีความแข็งแรง และมีความยืดหยุ่นต่ำภายใต้อุณหภูมิปานกลาง แต่สามารถทำงานได้ดีและมีเสถียรภาพที่อุณหภูมิสูง

2.5 จุลินทรีย์ลิโพลิติกชอบร้อน

จุลินทรีย์ลิโพลิติกชอบร้อน คือจุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตไลเปสได้ดีที่อุณหภูมิสูงตั้งแต่ 45 องศาเซลเซียสเป็นต้นไป จะสามารถเจริญได้ในที่ต่างๆ เช่น บ่อน้ำพุร้อน ใต้ทะเลลึกหรือใต้สมุทรที่มีความดันของน้ำสูง และบริเวณที่มีสภาพความเป็นกรดต่างสูง (Akanbi และคณะ, 2010) และเนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้มีความสามารถในการเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง จึงทำให้เอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์เหล่านี้ทนความร้อนได้ดีและมีความเสถียร ทนต่อการเสียดสภาพของโปรตีนที่อุณหภูมิสูง และเมื่อนำไปใช้ในการผลิตที่อุณหภูมิสูงทำให้ช่วยลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นอีกด้วย (Deive และคณะ, 2009)

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของ

อุณหภูมิและความเป็นกรดต่างมีผลทั้งต่อการทำงานของ และความเสถียรของเอนไซม์ โดยไลเพสที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะทำงานที่อุณหภูมิและความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมแตกต่างกัน (ตารางที่ 2.1) และ (ตารางที่ 2.2) ซึ่งจากสมบัติเหล่านี้สามารถคัดเลือกเอนไซม์ไลเพสที่เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของงานแต่ละชนิดได้ (Hirata และคณะ, 1990)

ตารางที่ 2.1 แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเพสจากจุลินทรีย์ลิโพลิติกชอบร้อน

Bacteria	Optimal Temperature (°C)	References
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> EF2	50	Gilbert <i>et al.</i> , 1991
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	50-55	Sztajer <i>et al.</i> , 1991
<i>Pseudomonas cepacia</i>	55-60	Sugihara <i>et al.</i> , 1992
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MB 5001	55	Chartrain <i>et al.</i> , 1993
<i>Bacillus</i> sp.	60	Sugihara <i>et al.</i> , 1991
<i>Bacillus thermocatenuatus</i>	60-70	Schmidt-Dannert, 1994
<i>Bacillus</i> sp.	70	Handelsman and Shoham, 1994
<i>Bacillus</i> sp. 398	65	Kim <i>et al.</i> , 1994
<i>Bacillus</i> sp. A30-1(ATCC 53841)	60	Wong <i>et al.</i> , 1995
<i>Bacillus</i> sp. IHI-91	60	Becker <i>et al.</i> , 1997
<i>Bacillus stearotherophilus</i> L1	60-65	Kim <i>et al.</i> , 1998
<i>Bacillus</i> sp. THL027	70	Dharmsthiti and Luchai, 1999
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> LP009	50	Dharmsthiti <i>et al.</i> , 1998
<i>Streptomyces rimosus</i>	50-60	Abramic <i>et al.</i> , 1999

ตารางที่ 2.2 แสดงค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงาน และค่าความคงตัวของไลเปสจากจุลินทรีย์

Bacteria	pH optimal	pH stability	References
<i>Pseudomonas</i> sp. KWI-56	5.5-7.0	-	Iizumi <i>et al.</i> , 1990
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	8.0	7.0-11.5	Sztajer <i>et al.</i> , 1991
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8.5	-	Gilbert <i>et al.</i> , 1991
<i>Pseudomonas putida</i> 3SK	8.0-9.0	4.0-10.0	Lee and Rhee, 1993
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MB 5001	8.0	-	Chartrain <i>et al.</i> , 1993
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Strain 2D	8.5	-	Makhzoum <i>et al.</i> , 1996
<i>Pseudomonas fragi</i> CRDA 037	8.75 (exolipase)	-	Schuepp <i>et al.</i> , 1997
	9.0 (endolipase)	-	
<i>Vibrio</i> sp. TA 43	8.0	-	วิภูมิ แก้วทอง 2539
<i>Bacillus</i> sp.	5.6-7.2	5.0-11.5	Sugihara <i>et al.</i> , 1991
<i>Bacillus subtilis</i> 168	10.0	9.5-12	Lestuisse <i>et al.</i> , 1993
<i>Bacillus</i> sp.	7.2	-	Handelsman and Shoham, 1994
<i>Bacillus thermocatenulatus</i>	8.0	4.0-11.0	Schmidt-Dannert, 1994
<i>Bacillus</i> sp. 398	8.5	-	Kim <i>et al.</i> , 1994
<i>Bacillus</i> sp. A30-1 (ATCC 53841)	9.5	-	Wang <i>et al.</i> , 1995
<i>Bacillus</i> sp. IHI-91	7.2	-	Becker <i>et al.</i> , 1997
<i>Bacillus</i> sp. RS-12	8.0	-	Sidhu <i>et al.</i> , 1998

WUJALALUNGRUJN UNIVERSITY

2.7 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้ไลเปสทนร้อนในอุตสาหกรรม

เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์มีการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง (ตารางที่ 2.3) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับไขมันต่างๆ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการย่อยสลายไขมัน (Masse และคณะ, 2001) และพบว่าในอุตสาหกรรมที่ต้องใช้อุณหภูมิสูงมีความต้องการไลเปสจากจุลินทรีย์ลิโพลิติกมาใช้ในอุตสาหกรรมด้วยเช่นกัน (ตารางที่ 2.4)

2.7.1 อุตสาหกรรมอาหาร

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่นในอุตสาหกรรมนม นำมาใช้ในการไฮโดรไลซ์ไขมันนม ผลตกถิ่นและรสชาติเฉพาะเช่น ในอุตสาหกรรมการผลิตชีส ใช้ในปฏิกิริยาไลโปไลซิสไขมันเนยและครีม กรดไขมันอิสระใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กลิ่นต่างๆ เช่น กลิ่นของเอสเทอร์ (Schmid และ Verger, 1998)

2.7.2 อุตสาหกรรมบำบัดน้ำเสีย

ไลเปสมีประโยชน์ในการช่วยย่อยกำจัดไขมันที่ปนเปื้อนมาในขยะ และยังช่วยบำบัดน้ำเสียหรือน้ำตามธรรมชาติที่มีการปนเปื้อนของไขมัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งไขมันปนเปื้อนเหล่านี้ต้องใช้ความร้อนสูงเพื่อให้อัตราการแตกตัวของไขมันเพิ่มมากขึ้น ความเหนียวหนืดของไขมันจะลดลง จำทำให้ไขมันอยู่ในรูปของอิมัลชัน ง่ายต่อการย่อยสลาย (Sharma และคณะ, 2002)

2.7.3 อุตสาหกรรมผงซักฟอกและสารทำความสะอาด

ไลเปสถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสารซักล้างทำความสะอาด โดยเป็นองค์ประกอบในผงซักฟอก อาจใช้ร่วมกับเอนไซม์โปรตีเอส (proteases) เพื่อใช้ขจัดคราบไขมัน นอกจากนี้ไลเปสยังมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์สารลดแรงตึงผิว (surfactant) สำหรับผลิตภัณฑ์สบู่ และยาสระผม (Schmid และ Verger, 1998)

2.7.4 อุตสาหกรรมอื่นๆ

ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล ใช้ในกระบวนการฟอกหนังสัตว์ ใช้เป็นส่วนประกอบในน้ำมันหล่อลื่น และอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ (Schmid และ Verger, 1998)

ตารางที่ 2.3 แสดงจุลินทรีย์ชอบร้อนที่มีการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม (Kikani และคณะ, 2010)

Source organism	Enzyme	Temp _{opt}	pH _{opt}	Reference
Industrially important enzymes from thermophilic bacteria and archae				
Thermophilic bacterium TSSB-6	α -amylase	80°C (50°-100°C)	8.0 (6.0-9.0)	[38]
<i>B. subtilis</i> JS-2004	α -amylase	70°C	8.0	[59]
Thermophilic bacterium TSSB-4	Alkaline Cellulase	70°C (50°C-80°C)	8.0 (6.0-9.0)	[39]
<i>Anoxybacillus flavithermus</i> EHP1	Cellulase	75°C (65°C-75°C)	7.5 (7.0-9.0)	[60]
Thermophilic bacterium HS-08	Serine Protease	65°C (60°C-70°C)	7.5 (7.0-9.0)	[61]
<i>B. thermoleovorans</i> CCR11	Lipase	60°C	9.0-10.0	[62]
<i>Pyrococcus furiosus</i>	Xylanase	100°C	6.0	[63]
Industrially important enzymes from thermophilic actinomycetes				
<i>T. fusca</i> NTU22	α -amylase	60°C	7.0	[64]
<i>Streptomyces</i> transformant T3-1	Cellulase	50°C	6.5	[65]
<i>Thermoactinomyces</i> sp. HS682	Protease	70°C	11-0	[66]
<i>Streptomyces rimosus</i> R6-554W	Lipase	50°C	9.0-10.0 (4.0-10.0)	[67]
<i>Thermomonospora fusca</i>	Xylanase	60°C (60°C-80°C)	7.0 (6.0-8.0)	[68]

ตารางที่ 2.4 แสดงการประยุกต์ใช้ไลเปสในอุตสาหกรรม (Anderson และคณะ, 1998)

Industry	Effect	Product
Dairy	Hydrolysis of milk fat	Flavour agents
	Cheese ripening	Cheese
	Modification of butter fat	Butter
Bakery	Flavour improvement and Shelf life prolongation	Bakery products
	Improved aroma	Beverages
Beverage	Improved aroma	Beverages
Food dressing	Quality improvement	Mayonnaise, dressing and whipped toppings
Health food	Transesterification	Health foods
Meat and fish	Flavor development and fat removal	Meat and fish products
Fat and oils	Transesterification	Cocoa butter, margarine
	Hydrolysis	Fatty acids, glycerol, mon- and diglycerides
Chemical	Enantioselectivity	Chiral building blocks and chemicals

ตารางที่ 2.4 (ต่อ)

Pharmaceutical	Transesterification	Specialty lipids
	Hydrolysis	Digestive aids
Cosmetics	Synthesis	Emulsifier, moisturizing agents
Leather	Hydrolysis	Leather products
Paper	Hydrolysis	Paper products
Cleaning	Hydrolysis	Removal of cleaning agents, e.g. surfactants

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Wang และคณะ (1995) ได้ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลเปสทนร้อนได้จากบ่อน้ำพุร้อน เมื่อนำมาศึกษาลักษณะสมบัติพบว่า เป็น *Bacillus sp.* จากนั้นนำไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์มาศึกษา พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 60 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 9.5 หลังจากปฏิกิริยาที่ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ไลเปสยังคงมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ไลเปสยังมีความเสถียรต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ alkaline protease, ไลเปสมีค่า isoelectric point เท่ากับ 5.15 และน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 65000 ดาลตัน

Xing และคณะ (2013) ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ชอบร้อนที่สามารถผลิตไลเปสได้จากตัวอย่างดินที่มีน้ำมันปนเปื้อน พบ 3 ไอโซเลตที่มีความสามารถผลิตไลเปสได้ดีที่สุด นำไปบ่งชี้ชนิดด้วยวิธี 16S rDNA พบว่าเป็น *Pseudomonas sp.* ZBC1 นำไลเปสที่นำมาศึกษา พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของไลเปสคือ 80 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 7.0

Rabbani และคณะ (2013) ทำการคัดแยกแบคทีเรียชอบร้อนที่สามารถผลิตไลเปสได้จากบ่อน้ำพุร้อนในประเทศอิหร่าน พบ 6 ไอโซเลตที่มีความสามารถผลิตไลเปสบนอาหารโรดามีน บี นำไอโซเลตที่แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดไปบ่งชี้ชนิดด้วยวิธี 16S rDNA พบว่าเป็น *Bacillus pumilus* นำไลเปสที่นำมาศึกษา พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของไลเปสคือ 65 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 8.5

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

กระบอกฉีดยา (Syringe, 3 ml and 5 ml)	(Nipro, Thailand)
กล้องจุลทรรศน์ (microscope)	
รุ่น CH30RF200	(Olympus, Japan)
เข็มฉีดยา (hypodermic needle, 18Gx1 1.2x40 mm)	(Nipro, Thailand)
เครื่องกวนสารให้ความร้อนแบบแท่งแม่เหล็ก (hotplate stirrer)	
รุ่น PC-420	(Corning, USA)
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (shaking incubator)	
รุ่น KS 3000 ic control	(IKA, Malaysia)
เครื่องเขย่าผสมสาร (vortex mixer)	
รุ่น KMC-1300V	(Vision Scientific, Korea)
เครื่องควบคุมอุณหภูมิน้ำ (water bath)	(Mettler, Germany)
เครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง (digital balance)	
รุ่น HR-200	(PNP Scale and Instrument, Thailand)
เครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง (digital balance)	
รุ่น PA413	(Meritech, Thailand)
เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge)	
รุ่น Hettich Mikro 20	(MedTechTrade AG, Switzerland)
เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge)	
รุ่น Hettich Universal 32	(DJB Labcare Limited, England)
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Epoch Microplate Spectrophotometer)	(BioTek, USA)
เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH meter)	
รุ่น PL-700PC	(Gondo Electronic, Taiwan)

ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow)	
รุ่น Clean model: BC	(Lab Services, Thailand)
ตู้บ่มเชื้อ (incubator)	(Major Science, USA)
ตู้อบลมร้อน (hot air oven)	(Mettler, Germany)
ตัวกรองไนลอน (syringe filter nylon)	
13mm, size 0.22 μm	(National Scientific, USA)
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave)	
รุ่น NANA-102760	(Daihan Scientific, Korea)
หลอดรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV lamp)	(Sylvania, Japan)

สารเคมี

กัมอะราบิก (gum arabic)	(Ajax Finechem, Australia)
กรดซิตริก (citric acid)	(Ajax Finechem, Australia)
กรดไฮโดรคลอริก (HCl)	(Labscan, Thailand)
ชุดสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรีย (bacterial DNA kit)	(Omega, USA)
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	(Ajax Finechem, Australia)
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	(Ajax Finechem, Australia)
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	(Univar, Australia)
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	(QRëC, New Zealand)
ไตรโซเดียมซิเตรตไดไฮเดรต ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	(Loba Chemie, India)
ไตรบิวไทรีน (tributyrin)	(Fluka, Switzerland)
นิสเตติน (nystatin)	(บริษัทที โอ ฟาร์มา จำกัด, ประเทศไทย)
เนื้อสกัด (beef extract)	(Himedia, India)
น้ำมันข้าวโพด (corn oil)	(บริษัทโกลเด้น ดรีอป จำกัด, ประเทศไทย)
น้ำมันคาโนลา (canola oil)	(บริษัทล้ำสูง จำกัด, ประเทศไทย)
น้ำมันงา (sesame oil)	(บริษัทเคอร์รี่ แอนด์ สไปร์ จำกัด, ประเทศไทย)
น้ำมันดอกทานตะวัน (sunflower oil)	(บริษัทธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด, ประเทศไทย)
น้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil)	(บริษัทน้ำมันพืชไทย จำกัด, ประเทศไทย)
น้ำมันปาล์ม (palm oil)	(บริษัทโอลีน จำกัด, ประเทศไทย)
น้ำมันมะกอก (olive oil)	(Strategic Catering, Thailand)

น้ำมันมะพร้าว (coconut oil)	(บริษัทน้ำมันมะพร้าวไทย จำกัด, ประเทศไทย)
น้ำมันเมล็ดชา (camellia oil)	(บริษัทลำสูง จำกัด, ประเทศไทย)
น้ำมันเมล็ดฝ้าย (cotton seed oil)	(บริษัทอุตสาหกรรมวิวัฒน์ จำกัด, ประเทศไทย)
น้ำมันรำข้าว (rice barn oil)	(บริษัทอมรไชย จำกัด, ประเทศไทย)
แบคโต-ทริปโตน (bacto-tryptone)	(BD, USA)
เปปโตน (peptone)	(Scharlau, Spain)
พารา-ไนโตรฟีนอล (<i>p</i> -nitrophenol, <i>p</i> NP)	(Fluka, Switzerland)
พารา-ไนโตรฟีนิลลอเรต (<i>p</i> -nitrophenyl laurate: C ₁₂ , <i>p</i> NPL)	(Sigma, USA)
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH ₂ PO ₄)	(Merck, Germany)
โรดามีน บี (Rhodamine B)	(Ajax Finechem, Australia)
วุ้นผง (agar)	(วุ้นบริสุทธิ์, ประเทศไทย)
สารแบรดฟอร์ด (Bradford's reagent)	(Biorad, USA)
สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)	(Himedia, India)
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	(Himedia, India)
สเตรปโตมัยซิน (streptomycin)	(M&H manufacturing, Thailand)
เอทานอล 99.9 เปอร์เซ็นต์ (absolute ethanol)	(Merck, Germany)

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์ชอบร้อนจากบ่อน้ำพุร้อนทางภาคเหนือของประเทศไทย

เก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินจากบริเวณปากบ่อน้ำพุร้อนที่มีความลึกไม่เกิน 10 เซนติเมตร ในบริเวณที่ต่างกัน ตัวอย่างน้ำและตะกอนดินที่เลือกเก็บจะต้องมีอุณหภูมิที่สูงกว่า 45 องศาเซลเซียส ทำการวัดอุณหภูมิเริ่มต้นของตัวอย่างที่เก็บด้วยเทอร์โมมิเตอร์ จากนั้นทิ้งไว้ให้หายร้อนและนำตัวอย่างมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยกระดาษวัดค่าความเป็นกรดต่าง (Universal indicator) แล้วนำมาเทียบแถบสีที่ปรากฏข้างกล่องเพื่ออ่านค่า โดยตัวอย่างบ่อน้ำพุร้อนที่เก็บตัวอย่างทั้งหมดมีดังนี้

ตารางที่ 3.1 แสดงรายละเอียดการเก็บตัวอย่างจากบ่อน้ำพุร้อนทางภาคเหนือของประเทศไทย

ลำดับ	วัน / เดือน / ปี	แหล่งตัวอย่าง
1	9 – 12 สิงหาคม 2556	บ่อน้ำพุร้อนสันกำแพง ตำบลบ้านสหกรณ์ อำเภอแม่ออน จ. เชียงใหม่
2	9 – 12 สิงหาคม 2556	บ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ้อน ตำบลแจ้ซ้อน อำเภอเมืองปาน จ. ลำปาง
3	11-14 กรกฎาคม 2557	บ่อน้ำพุร้อนเทพพนม ตั้งอยู่ในเขตอุทยานแห่งชาติ ออบหลวง เขตป่าแม่แจ่ม ตำบลท่าผา อำเภอแม่แจ่ม จ. เชียงใหม่
4	11-14 กรกฎาคม 2557	บ่อน้ำพุร้อนทุ่งเทวี ตั้งอยู่ที่บ้านโป่งเทวี ตำบลบ้านโป่ง อำเภอเวียงป่าเป้า จ. เชียงราย
5	11-14 กรกฎาคม 2557	บ่อน้ำพุร้อนดอยสะเก็ด ตั้งอยู่ที่บ้านโป่งกุ่ม ตำบลป่าเมียง อำเภอดอยสะเก็ด จ. เชียงใหม่
6	11-14 กรกฎาคม 2557	บ่อน้ำพุร้อนเวียงป่าเป้า ตั้งอยู่ที่บ้านโป่งป่าตอง หมู่ 14 ตำบลแม่เจดีย์ใหม่ อำเภอเวียงป่าเป้า จ. เชียงราย
7	11-14 กรกฎาคม 2557	บ่อน้ำพุร้อนแม่อุ้มลองหลวง ตั้งอยู่ที่บ้านแม่อุ้มลองน้อย ในเขตพื้นที่ของสวนป่าสาละวิน ตำบลแม่สะเรียง อำเภอแม่สะเรียง จังหวัดแม่ฮ่องสอน

เก็บตัวอย่างใส่หลอดเก็บตัวอย่าง (screw cap tubes) ที่ใหม่และสะอาดปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปิดฝาให้สนิท เพื่อรักษาคุณภาพตัวอย่างและนำมาใช้ทันที

3.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ชอบร้อนที่มีความสามารถผลิตไลเปสได้

3.2.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ชอบร้อนและทดสอบความสามารถในการผลิตไลเปสเบื้องต้น

นำตัวอย่างน้ำและตะกอนดินที่เก็บจากปากบ่อน้ำพุร้อนแต่ละตัวอย่าง ดูดส่วนที่เป็นของเหลว 100 ไมโครลิตร เกลี่ยโดยวิธีการ spread ให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งที่ผสมไตรบิวไทริน (tributylin) 10 กรัมต่อลิตร ลงบนอาหารสูตรพื้นฐาน (Samad และคณะ, 1989) (ภาคผนวก ก) จากนั้นนำกลับมาบ่มที่ห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-7 วัน จากนั้นเลือกโคโลนีที่สามารถสร้างโซนใสซึ่งแสดงว่ามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เอสเทอเรส (esterase) มาเชยด้วยวิธีการ cross streak ลงบนอาหารไตรบิวไทรินที่เตรียมใหม่อีกครั้ง เลือกโคโลนีที่สร้างโซนใสอีก ทำซ้ำอีกสามครั้งเพื่อเป็นการยืนยันผล หรือจนกว่าเชื้อที่ได้จะเป็นโคโลนีเดี่ยวและบริสุทธิ์ (pure culture) ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสหักลบกับเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของจุลินทรีย์เพื่อเปรียบเทียบความสามารถเบื้องต้นในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

3.2.2 ทดสอบและคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตไลเปส

นำจุลินทรีย์ที่คัดเลือกมาทดสอบความสามารถในการผลิตไลเปสเชิงคุณภาพ โดยนำโคโลนีเดี่ยวมาเชยด้วยวิธีการ cross streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งสูตรพื้นฐานที่ผสมโรดามีน บี (Rhodamine B) 0.001 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) และน้ำมันปาล์ม 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตรที่เตรียมในสารละลายกัมอะราบิก 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Schmidt-Dannert และคณะ, 1994) (ภาคผนวก ก) นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-7 วัน สังเกตการเจริญและคัดเลือกโคโลนีที่สามารถเรืองแสงสีส้มภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) ที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร ตั้งชื่อจุลินทรีย์ด้วยตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ 2 ตัว ตามแหล่งที่มา

3.3 การจัดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ชอบร้อนที่มีความสามารถผลิตไลเปส

3.3.1 การคัดแยกแบคทีเรียชอบร้อน

นำโคโลนีเดี่ยวที่สามารถเรืองแสงสีส้ม มาจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียทดสอบโดยการเขี่ยโคโลนีเดี่ยว (cross streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง (nutrient agar; NA) ที่ผสมสาร ปฏิชีวนะ นิสเตติน (nystatin) ความเข้มข้น 10,000 ยูนิตต่อลิตร (ภาคผนวก ก) เพื่อยับยั้งการเจริญของยีสและรา นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อบนอาหาร หากเชื่อมีการเจริญแสดงว่าเป็นแบคทีเรียชอบร้อน นำเชื้อที่ได้มาศึกษารูปร่างและโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscope)

3.3.2 การคัดแยกยีสต์ ราชอบร้อน

ยีสต์และราชอบร้อน ทำการทดสอบโดยนำโคโลนีเดี่ยวที่เรืองแสงสีส้ม มาเขี่ย (cross streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง (yeast malt agar; YMA) ที่ผสมสารปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซิน (streptomycin) ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ก) เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อบนอาหาร หากเชื่อมีการเจริญแสดงว่าเป็น ยีสต์หรือรา จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาศึกษารูปร่างและโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (microscope) เพื่อแบ่งแยกเชื้อยีสต์หรือราตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา

3.4 การเปรียบเทียบความสามารถการเร่งปฏิกิริยาจากไลเปสของจุลินทรีย์ชอบร้อนที่คัดเลือกได้

3.4.1 การเลี้ยงเชื้อเพื่อชักนำให้ผลิตเอนไซม์ไลเปส

ทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากข้อ 3.2.2 โดยนำโคโลนีเดี่ยวมาถ่ายลงในอาหารเหลว (nutrient broth; NA) (ภาคผนวก ก) สำหรับแบคทีเรียและ (yeast malt broth; YMB) (ภาคผนวก ก) สำหรับยีสต์และรา ปริมาตร 25 มิลลิลิตรที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้ำเชื้อที่ได้ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรลงในอาหารเหลว (lipase production medium; LPM) (ภาคผนวก ก) ที่ผสมน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร (v/v) เพื่อชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ไลเปส ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่

ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับแบคทีเรีย เวลา 72 ชั่วโมงสำหรับยีสต์ และเวลา 120 ชั่วโมงสำหรับรา โดยทุกชุดการทดลองจะทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ นำมาหาค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าความคลาดเคลื่อน จากนั้นเก็บตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที (ดัดแปลงจากวิธีการของ Hamid และคณะ, 2003) ทำการเก็บส่วนใสที่ได้จากการปั่นที่อยู่ด้านบน เพื่อนำมาวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

3.4.2 การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Total activity)

ทำการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยใช้วิธีการวัดดัดแปลงมาจากวิธีของ Marini และคณะ (2012) โดยใช้พารา-ไนโตรฟีนิลลอเรต (*p*-nitrophenyl laurate: C_{12} , *p*NPL) เป็นสารตั้งต้น ที่ละลายในเอทานอล 99.9 เปอร์เซ็นต์ ปฏิกริยาประกอบด้วยสารละลายตั้งต้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ค่าความเป็นกรดต่าง 7 ปริมาตร 650 ไมโครลิตร และสารละลายที่มีเอนไซม์ไลเปสส่วนใสในข้อ 3.4.1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดทดลองจะได้ปริมาตรปฏิกริยารวม 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยทุกชุดการทดลองจะทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ นำมาหาค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าความคลาดเคลื่อน ทำการเปรียบเทียบปริมาณพารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol, *p*NP) ที่เกิดขึ้นจากปฏิกริยานำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่สร้างจากการใช้สารละลายพารา-ไนโตรฟีนอลความเข้มข้นตั้งแต่ 0-20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ค) โดยเอนไซม์ไลเปสจะเร่งปฏิกริยาไฮโดรไลซิสและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของพารา-ไนโตรฟีนิลลอเรต ที่ใช้เป็นสารตั้งต้นให้เป็นพาราไนโตรฟีนอลหรือผลิตภัณฑ์

กำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (U; Unit) มีค่าเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนพารา-ไนโตรฟีนิลลอเรต เป็นพารา-ไนโตรฟีนอล ปริมาณ 1 ไมโครโมลต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Total protein)

นำสารละลายที่มีเอนไซม์ไลเพสส่วนใสจากข้อ 3.4.1 มาวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธีของ แบริดฟอร์ด (Bradford's method) โดยปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายแบริดฟอร์ดรีเอเจนต์ (Bradford reagent) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และสารละลายตัวอย่างในข้อ 3.4.1 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันใส่ลงในไมโครเพลท บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร โดยทุกชุดการทดลองจะทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำนำมาหาค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าความคลาดเคลื่อน แล้วนำไปเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนทั้งหมดในสารละลายตัวอย่างกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐานจากซีรัมของลูกวัว (bovine serum albumin, BSA) ที่มีปริมาณโปรตีน 0-25 ไมโครกรัม (Bradford, 1976) (ภาคผนวก ค)

3.4.4 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ (Specific activity)

ทำการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะของเอนไซม์ไลเพส โดยนำค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพสทั้งหมดหารด้วยปริมาณของโปรตีนทั้งหมด (ภาคผนวก ง)

3.5 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเพสจากจุลินทรีย์

3.5.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพสและความสามารถในการทนร้อนของจุลินทรีย์

ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ 10 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเพสสูงที่สุดจากจุลินทรีย์ทั้งหมดที่คัดแยกได้ มาทำการศึกษาความสามารถในการทนร้อนของแต่ละสายพันธุ์โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ไลเพสตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.1 โดยแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงตั้งแต่ 45, 50, 55, 60, 65, 70 ตามลำดับหรือมากกว่าอุณหภูมิข้างต้นจนกว่าจุลินทรีย์ใกล้จะตายและไม่สามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเพส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับแบคทีเรีย เวลา 72 ชั่วโมงสำหรับยีสต์ และเวลา 120 ชั่วโมงสำหรับรา จากนั้นเก็บตัวอย่างเชื้อที่ได้มาทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพสตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.2 วัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.3 และคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ

3.5.2 การศึกษาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์

ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุดจากข้อ 3.5.1 มา 2 สายพันธุ์และเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกมาทำการทดลองต่อไป ทำการศึกษาภาวะความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ไลเปสตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.1 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่แปรผันค่าความเป็นกรดต่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ไลเปสตั้งแต่ 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9 ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสำหรับแบคทีเรีย เวลา 72 ชั่วโมงสำหรับยีสต์ และเวลา 120 ชั่วโมงสำหรับรา จากนั้นเก็บตัวอย่างเชื้อที่ได้มาทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.2 วัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.3 และคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ

3.5.3 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์

เนื่องจากการทดลองในข้อ 3.4.1 ใช้เวลาในการเลี้ยงเชื้อและเก็บตัวอย่างเพียงจุดเดียว ซึ่งยังไม่สามารถบอกถึงช่วงเวลาที่ดีที่สุดที่จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดในช่วงใด จึงศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.1 โดยใช้อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดต่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ดีที่สุดตามการศึกษาข้างต้นในการทดลองข้อ 3.5.2 และ 3.5.3 ทำการเก็บตัวอย่างเป็นช่วงเวลาที่ถี่มากขึ้นเป็นทุกๆ 6 ชั่วโมง คือชั่วโมงที่ 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72 จากนั้นเก็บตัวอย่างเชื้อที่ได้มาทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.2 วัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.3 และคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ

3.5.4 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ต่อความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

ทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุด 2 สายพันธุ์ นำภาวะที่ดีที่สุดมาใช้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อทำการเปรียบเทียบกันระหว่าง 2 สายพันธุ์ โดยทำตามวิธีการทดลองที่ 3.4.1-3.4.3 โดยเลี้ยงในภาวะที่ดีที่สุดที่สามารถผลิตไลเปสได้สูงจากการทดลองข้างต้น คือ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดต่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ไลเปส และเวลาโดยจะเก็บตัวอย่างถี่มากขึ้นจากเดิมเป็นทุก 3 ชั่วโมง คือชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง คือชั่วโมงที่ 30, 36, 42, 48 และทุก 12 ชั่วโมงคือชั่วโมงที่ 60 และ 72 เก็บผลติดต่อกันตลอดระยะเวลา 72 ชั่วโมงหรือจนกว่าเชื้อจะเริ่มเข้าสู่ระยะการตาย (death phase) นำไปวัดการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยวิธีวัดค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นเก็บตัวอย่างเชื้อที่ได้มาทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.2 วัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.3 และคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ

3.6 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนเหนี่ยวนำในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์

นำเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด 2 สายพันธุ์ มาทำการเลี้ยงเชื้อโดยนำโคโลนีเดี่ยวมาถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว NA สำหรับแบคทีเรีย และ YMB สำหรับยีสต์และรา ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ดีที่สุดของแต่ละสายพันธุ์ตามผลการทดลองในข้อ 3.5.1 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาที่ที่ดีที่สุดของแต่ละสายพันธุ์ตามผลการทดลองที่ 3.5.3 จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อที่ได้ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรลงในอาหารเหลว Lipase production medium เพื่อชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ไลเปส ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยแทนที่น้ำมันปาล์มที่ผสมในอาหาร 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร (v/v) ด้วยน้ำมันชนิดต่างๆ จำนวนทั้งหมด 11 ชนิด ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันเมล็ดฝ้าย น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันคาโนลา น้ำมันงา น้ำมันข้าวโพด น้ำมันมะกอก น้ำมันมะพร้าว น้ำมันรำข้าว น้ำมันสบู่ดำ น้ำมันคามิเลีย (ดัดแปลงจากวิธีการของ Bora และ Kalita, 2007) บ่มที่อุณหภูมิที่ดีที่สุดของแต่ละสายพันธุ์ตามผลการทดลองที่ 3.5.1 ค่าความเป็นกรดต่างในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีที่สุดของแต่ละสายพันธุ์ตามผลการทดลองข้อ 3.5.2 บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เลือกเก็บตัวอย่างที่เวลาที่ที่ดีที่สุดของแต่ละ

ละลายพันธุ์ที่สามารถผลิตไลเพสได้สูงสุดตามผลการทดลองข้อ 3.5.3 จากนั้นเก็บตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำสารละลายไลเพสส่วนใสที่ได้มาวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพสในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส วัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.3 และคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ

3.7 การบ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ชอบร้อน 10 สายพันธุ์ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเพสได้สูงที่สุดที่ตัดแยกได้จากบ่อน้ำพุร้อนทางภาคเหนือของประเทศไทย ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ ยีน 16S rDNA

นำโคลนเดี่ยวของจุลินทรีย์ชอบร้อนที่คัดเลือกได้ มาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณ 16S rDNA fragment ตามวิธีของ Virunanon (2008) โดยใช้ Bacterial DNA Kit (Omega Bio-Tek, USA) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่ถูกตัดในตำแหน่ง 27F (forward) 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' และ 1492R (reverse) 5'-ACCTTGTTACGACTT-3' (Gillan และคณะ, 1998) เพื่อนำไปใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (Polymerase Chain Reaction; PCR) ซึ่งในปฏิกิริยาใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำซ้ำอีก 30 รอบที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาทีและรอบสุดท้ายทำการเพิ่มเวลาต่อไปอีก 10 นาที (ตารางที่ 3.2) ตรวจสอบตัวอย่างที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน (PCR product) ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis) (ภาคผนวก ข) เพื่อตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาด 1600 bp โดยเทียบกับ 1kb DNA marker (Vivantis, Malaysia) บนอะกาโรส เจลที่มีความเข้มข้น 0.8% ในสารละลาย 1X TAE ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 45 นาทีจนได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความบริสุทธิ์ จากนั้นทำการส่งวิเคราะห์หาลำดับเบสที่บริษัท แปะซิฟิกไซน์ ประเทศไทย แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับ 16S rDNA ของแบคทีเรียในฐานข้อมูล GenBank database ผ่านเว็บไซต์ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> โดยใช้โปรแกรม BLAST version 2.2.5

ตารางที่ 3.2 ภาวะที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)
1. Initial denaturation	94	5
Amplification (ขั้นตอนที่ 2-5 ทำซ้ำ 30 รอบ)		
2. Denaturation	94	1
3. Annealing	55	1
4. Extension	72	2
5. Final extension	72	10

3.8 การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชอบร้อนที่คัดเลือก

3.8.1 การศึกษาภาวะความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

นำเอนไซม์หยาบ (crude lipase) จากจุลินทรีย์ชอบร้อนที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดมาทำการบ่มกับพารา-ไนโตรฟีนอลเรตโนบัฟเฟอร์ (buffer) ชนิดต่างๆ ดังต่อไปนี้

ค่าความเป็นกรดต่างที่ 5-6 ใช้ 0.1 M Citrate acid-sodium citrate buffer

ค่าความเป็นกรดต่างที่ 7-8 ใช้ 0.1 M Sodium Phosphate buffer และ

ค่าความเป็นกรดต่างที่ 9-10 ใช้ 0.1 M Glycine/NaOH (ธนธร วิทิตสานต์, 2553)

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ทำการเปรียบเทียบปริมาณพารา-ไนโตรฟีนอลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยากับกราฟมาตรฐานของแต่ละชนิดบัฟเฟอร์ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส วัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.3 และคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ

3.8.2 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสต่อค่าความเป็นกรดต่างๆ

นำเอนไซม์ไลเปสบ่มในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่างกัันดังนี้คือ 5, 6, 7, 8, 9, 10 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาบ่มกับพารา-ไนโตรฟินิล ลอเรตที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบปริมาณพารา-ไนโตรฟินอลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยากับกราฟมาตรฐานจากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่คงเหลือในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

3.8.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

นำเอนไซม์หยาบ (crude lipase) จากจุลินทรีย์ชอบร้อนที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดมาทำการบ่มกับพารา-ไนโตรฟินิลลอเรตในบัฟเฟอร์ที่มีค่าเหมาะสมที่สุดที่ได้จากผลการทดลองข้อ 3.8.1 ที่อุณหภูมิต่างกันดังนี้คือ 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 และ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (Francisco และคณะ, 2012) จากนั้นนำมาเปรียบเทียบปริมาณพารา-ไนโตรฟินอลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยากับกราฟมาตรฐานและนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส วัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.3 และคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ

3.8.4 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสต่ออุณหภูมิต่างๆ

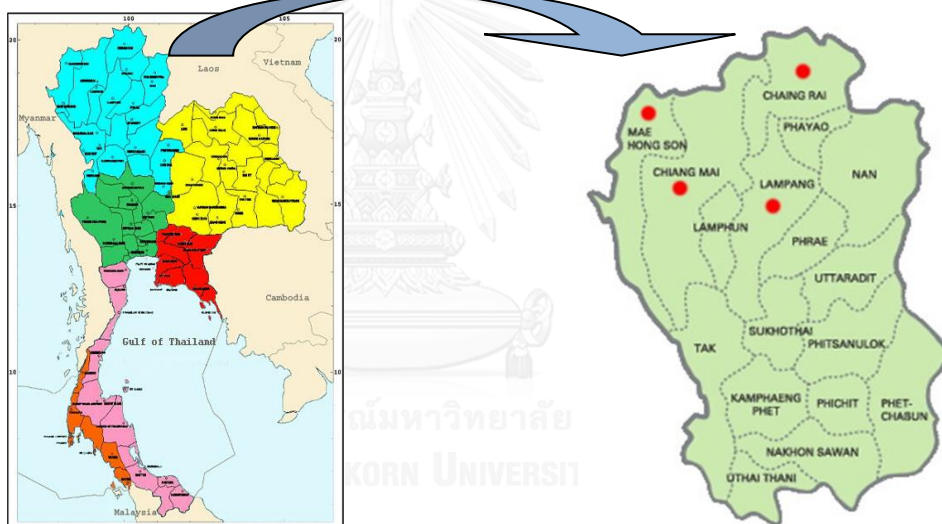
นำเอนไซม์ไลเปสมาบ่มที่อุณหภูมิต่างกันดังนี้คือ 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 และ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำเอนไซม์ไลเปสมาบ่มกับพารา-ไนโตรฟินิลลอเรตในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่างและอุณหภูมิที่ดีที่สุดที่ได้จากผลการทดลองข้อ 3.8.1 และ 3.8.3 เป็นเวลา 30 นาที เปรียบเทียบปริมาณพารา-ไนโตรฟินอลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยากับกราฟมาตรฐานจากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่คงเหลือในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์ชอบร้อนจากบ่อน้ำพุร้อนทางภาคเหนือของประเทศไทย

การเลือกเก็บตัวอย่างจากบ่อน้ำพุร้อนทางภาคเหนือในประเทศไทยมีจำนวนทั้งสิ้น 4 จังหวัด คือ เชียงใหม่ เชียงราย แม่ฮ่องสอน และลำปาง (ภาพที่ 4.1) เนื่องจากจังหวัดเหล่านี้เป็นแหล่งศูนย์รวมของบ่อน้ำพุร้อนอยู่เป็นจำนวนมาก



ภาพที่ 4.1 บริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างจากบ่อน้ำพุร้อนทางภาคเหนือของประเทศไทย

การเก็บตัวอย่างในบริเวณต่างๆของบ่อน้ำพุร้อนทางภาคเหนือของประเทศไทย จะได้ตัวอย่างแต่ละชนิดแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสถานที่และบริเวณที่เลือกเก็บ โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำและตะกอนดินบริเวณปากบ่อน้ำพุร้อนที่มีความลึกไม่เกิน 10 เซนติเมตร ในบริเวณที่ต่างกัน ตัวอย่างน้ำและตะกอนดินที่เลือกเก็บจะต้องมีอุณหภูมิที่สูงกว่า 45 องศาเซลเซียสเป็นต้นไป ทำการวัดอุณหภูมิเริ่มต้นของตัวอย่าง จากนั้นทิ้งไว้ให้หายร้อนและนำตัวอย่างมาวัดค่าความเป็นกรดต่าง โดยตัวอย่างจากบ่อน้ำพุร้อนมีข้อมูลทั้งหมดดังแสดงในตาราง (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 แสดงข้อมูลตัวอย่างจากบ่อน้ำพุร้อนทางภาคเหนือของประเทศไทย

ช่วงที่ 1

วันที่เก็บตัวอย่าง 9 – 12 สิงหาคม 2556

แหล่งตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	อุณหภูมิของแหล่งเก็บ ตัวอย่าง (องศาเซลเซียส)	pH ของแหล่ง เก็บตัวอย่าง
บ่อน้ำพุร้อนสันกำแพง			
จ. เชียงใหม่			
1. ตะกอนดินทรายบริเวณรอบปาก บ่อน้ำพุร้อนบ่อใหญ่ที่ใช้ปั๊ม ไฟฟ้าฉีดขึ้น	SK1	52	9
2. ตะกอนดินทรายบริเวณรอบปาก บ่อน้ำพุร้อนบ่อใหญ่ที่ใช้ปั๊ม ไฟฟ้าฉีดขึ้น	SK2	60	9
3. ตะกอนดินทรายบริเวณลำธาร ใหญ่	SK3	50	9
4. ตะกอนดินทรายบริเวณลำธาร น้ำนิ่ง	SK4	45	8
5. ตะกอนดินทรายบริเวณลำธาร น้ำไหล	SK5	45	8
6. ตะกอนดินทรายบริเวณปากทาง แยกของลำธาร	SK6	46	9
7. ตะกอนดินทรายบริเวณลำธาร เล็ก	SK7	51	9
8. ตัวอย่างน้ำจากบ่อต้มไขบ่อใหญ่	SK8	75	9
9. ตัวอย่างน้ำจากบ่อต้มไขบ่อเล็ก	SK9	75	9
10. ตัวอย่างน้ำจากลำธาร	SK10	65	9

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ช่วงที่ 1

วันที่เก็บตัวอย่าง 9 – 12 สิงหาคม 2556

แหล่งตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	อุณหภูมิของแหล่งเก็บ ตัวอย่าง (องศาเซลเซียส)	pH ของแหล่ง เก็บตัวอย่าง
บ่อน้ำพุร้อนแจ้ซ็อน จ.ลำปาง			
1. ตะกอนดินทรายบริเวณลำธาร	JS1	52	7
2. ตะกอนดินทรายบริเวณปากบ่อน้ำพุร้อนบ่อใหญ่	JS2	70	7
3. ตะกอนดินทรายบริเวณธารน้ำไหล	JS3	65	7
4. ตะกอนดินทรายบนตะไคร่น้ำบริเวณซอกธารน้ำไหล	JS4	53	7
5. ตะกอนดินทรายบริเวณลำธาร	JS5	63	7
6. ตะกอนดินทรายบริเวณปากบ่อต้มไข่บ่อใหญ่	JS6	72	7
7. ตะกอนดินปนหินทรายบริเวณลำธาร	JS7	55	7
8. ตะกอนดินปนหินทรายบริเวณปากบ่อต้มไข่บ่อเล็ก	JS8	67	7
9. ตัวอย่างน้ำจากบ่อต้มไข่บ่อใหญ่	JS9	75	7
10. ตัวอย่างน้ำจากบ่อต้มไข่บ่อเล็ก	JS10	68	7

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ช่วงที่ 2

วันที่เก็บตัวอย่าง 11-14 กรกฎาคม 2557

แหล่งตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	อุณหภูมิของแหล่งเก็บ ตัวอย่าง (องศาเซลเซียส)	pH ของแหล่ง เก็บตัวอย่าง
บ่อน้ำพุร้อนเทพพนม			
จ. เชียงใหม่			
1. ตะกอนดินทรายบริเวณรอบปาก บ่อน้ำพุร้อนตำแหน่งที่ 1 (บ่อใหญ่ที่สุด มีบ่อเดียว)	TP1	65	8
2. ตะกอนดินทรายบริเวณรอบปาก บ่อน้ำพุร้อนตำแหน่งที่ 2	TP2	64	8
3. ตะกอนดินทรายบริเวณรอบปาก บ่อน้ำพุร้อนตำแหน่งที่ 3	TP3	60	7
4. ตัวอย่างน้ำจากบ่อน้ำพุร้อนซึ่ง เป็นบ่อที่ใช้ต้มไข่ตำแหน่งที่ 1 (บ่อใหญ่ที่สุด มีบ่อเดียว)	TP4	69	7
5. ตัวอย่างน้ำจากบ่อน้ำพุร้อนซึ่ง เป็นบ่อที่ใช้ต้มไข่ตำแหน่งที่ 2	TP5	69	7

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ช่วงที่ 2

วันที่เก็บตัวอย่าง 11-14 กรกฎาคม 2557

แหล่งตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	อุณหภูมิของแหล่งเก็บ ตัวอย่าง (องศาเซลเซียส)	pH ของแหล่ง เก็บตัวอย่าง
บ่อน้ำพุร้อนทุ่งเทวี			
จ. เชียงราย			
1. ตะกอนดินทรายบริเวณรอบปาก บ่อน้ำพุร้อนตำแหน่งที่ 1 (บ่อใหญ่ที่สุด มีบ่อเดียวมีการก่อ ปูนล้อมรอบ)	BP1	57	7
2. ตะกอนดินทรายบริเวณรอบปาก บ่อน้ำพุร้อนตำแหน่งที่ 2	BP2	57	7
3. ตัวอย่างน้ำจากบ่อน้ำพุร้อน (บ่อใหญ่ที่สุด มีบ่อเดียวมีการก่อ ปูนล้อมรอบ)	BP3	57	7
บ่อน้ำพุร้อนดอยสะเก็ด			
จ. เชียงใหม่			
1. ตะกอนดินทรายบริเวณบ่อต้มไข่ (มีการก่อปูนล้อมรอบ)	DK1	73	7
2. ตะกอนดินทรายบริเวณลำธาร ตำแหน่งที่ 1	DK2	54	7
3. ตะกอนดินทรายบริเวณลำธาร ตำแหน่งที่ 2	DK3	54	7
4. ตัวอย่างน้ำจากบ่อต้มไข่ (มีการก่อปูนล้อมรอบ)	DK4	80	7

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ช่วงที่ 2

วันที่เก็บตัวอย่าง 11-14 กรกฎาคม 2557

แหล่งตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	อุณหภูมิของแหล่งเก็บ ตัวอย่าง (องศาเซลเซียส)	pH ของแหล่ง เก็บตัวอย่าง
บ่อน้ำพุร้อนเวียงป่าเป้า			
จ. เชียงราย			
1. ตะกอนดินทรายปนตะไคร่น้ำ บริเวณรอบปากบ่อน้ำพุร้อนชนิด ไกเซอร์ (Geyser) บ่อที่ 1 ตำแหน่งที่ 1	VP1	60	7
2. ตะกอนดินทรายปนตะไคร่น้ำ บริเวณรอบปากบ่อน้ำพุร้อนแบบ ไกเซอร์ บ่อที่ 1 ตำแหน่งที่ 2	VP2	60	7
3. ตะกอนดินทรายบริเวณรอบ ปากบ่อน้ำพุร้อน บ่อที่ 2 ตำแหน่งที่ 1	VP3	60	7
4. ตะกอนดินทรายบริเวณรอบปาก บ่อน้ำพุร้อน บ่อที่ 2 ตำแหน่งที่ 2	VP4 VP5	60 65	7 7
5. ตัวอย่างน้ำจากบ่อน้ำพุร้อนชนิด ไกเซอร์ บ่อที่ 1	VP6	65	7
6. ตะกอนดินทรายปนตะไคร่น้ำ บริเวณรอบปากบ่อน้ำพุร้อน บ่อที่ 2 ตำแหน่งที่ 3	VP7	65	7
7. ตัวอย่างน้ำจากบ่อน้ำพุร้อนชนิด ไกเซอร์ บ่อที่ 2 ตำแหน่งที่ 2			

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

ช่วงที่ 2

วันที่เก็บตัวอย่าง 11-14 กรกฎาคม 2557

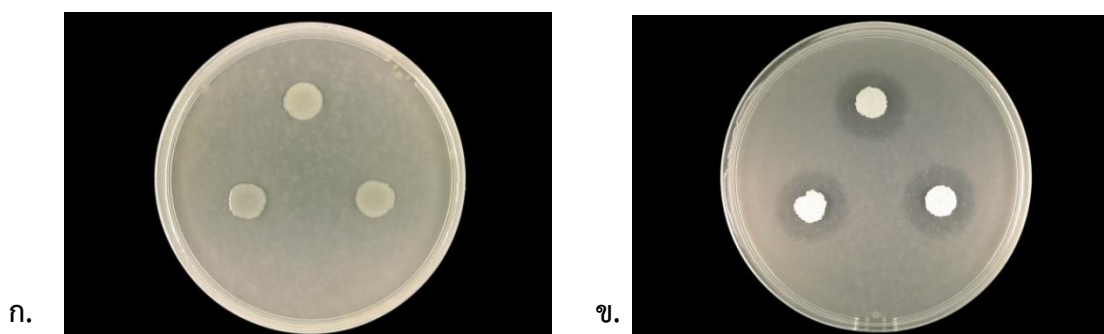
แหล่งตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	อุณหภูมิของแหล่งเก็บ ตัวอย่าง (องศาเซลเซียส)	pH ของแหล่ง เก็บตัวอย่าง
บ่อน้ำพุร้อนแม่อุ้มลวงหลวง			
จ.แม่ฮ่องสอน			
1. ตะกอนดินทรายบริเวณลำธาร ตำแหน่งที่ 1	AL1	70	7
2. ตะกอนดินทรายปนตะไคร่น้ำ บริเวณลำธาร ตำแหน่งที่ 2	AL2	70	7
3. ตะกอนดินทรายปนตะไคร่น้ำ บริเวณลำธาร ตำแหน่งที่ 3	AL3	70	7
4. ตะกอนดินทรายบริเวณลำธาร ตำแหน่งที่ 4	AL4	70	7
5. ตัวอย่างน้ำจากลำธาร	AL5	76	7

4.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ชอบร้อนที่สามารถผลิตไลเปส

4.2.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ชอบร้อนและทดสอบความสามารถในการผลิตไลเปสเบื้องต้น

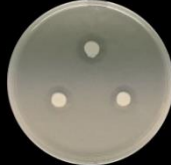
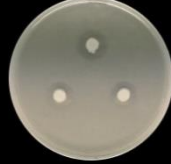


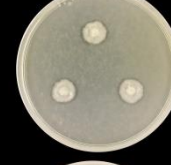
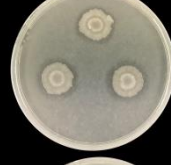
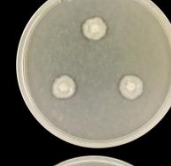

การคัดเลือกจุลินทรีย์ชอบร้อนเบื้องต้น นำตัวอย่างตะกอนดิน 31 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำ 13 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 44 ตัวอย่างจากการเก็บตัวอย่างข้างต้น นำมาเกลี่ย (spread) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งที่ผสมไตรบิวไทริน บ่มที่ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นเลือกโคโลนีที่สามารถสร้างโซนใสซึ่งแสดงว่ามีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เอสเทอร์เรส (ภาพที่ 4.2) มาเชื่อมด้วยวิธีการ cross streak ลงบนอาหารไตรบิวไทรินที่เตรียมใหม่อีกครั้ง ทำเช่นนี้จนกว่าจะได้เชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวและบริสุทธิ์ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสหักลบกับเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของจุลินทรีย์เพื่อเปรียบเทียบความสามารถเบื้องต้นในการผลิตไลเปส พบว่าสามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ชอบร้อนในเบื้องต้นได้ทั้งสิ้น 23 ไอโซเลต และมีขนาดโซนใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งที่ผสมไตรบิวไทรินที่แตกต่างกันดังแสดงในตาราง (ตารางที่ 4.2)

จากการพิจารณาแหล่งเก็บตัวอย่าง จะเห็นได้ว่าสามารถพบจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เอสเทอร์เรสได้จากชนิดตัวอย่างที่เป็นตะกอนดิน และตะกอนดินทรายปนตะไคร่น้ำ อาจเนื่องมาจากดินเป็นแหล่งสะสมและยึดเกาะของเชื้อจุลินทรีย์ที่ดี โดยจุลินทรีย์จะมีการใช้พลังงานจากอินทรีย์วัตถุที่อยู่ในดินเพื่อการดำรงชีพ (Tao และคณะ, 2011) ดังนั้นตัวอย่างที่เป็นชนิดตะกอนดินจึงเป็นแหล่งสะสมของเชื้อจุลินทรีย์และแหล่งพลังงานได้ดีกว่าตัวอย่างชนิดน้ำจากธรรมชาติ จึงทำให้มีโอกาสพบเชื้อจุลินทรีย์ได้สูง






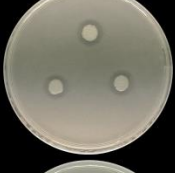




ภาพที่ 4.2 ภาพ ก แสดงจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถผลิตเอสเทอร์เรสจึงไม่เกิดโซนใส ภาพ ข แสดงจุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตเอสเทอร์เรสจึงเกิดโซนใส








ตารางที่ 4.2 แสดงจุลินทรีย์ชอบร้อนและขนาดโซนไฮบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งไตรบิวไทริน

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ขนาดโซนไฮที่การเจริญ 45 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง	รูปจุลินทรีย์บนอาหารที่ ผสมไตรบิวไทริน
1	SK2-1	2.33	
2	SK2-3	2.45	
3	SK3-1	2.21	
4	JS2-1	2.23	
5	JS3-1	2.21	
6	JS3-2	2.25	
7	JS3-3	2.21	
8	JS3-4	2.26	

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ขนาดโชนใส่ที่การเจริญ 45 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง	รูปจุลินทรีย์บนอาหารที่ ผสมไตรบิวไทรีน
9	JS3-5	2.22	
10	JS4-1	2.33	
11	JS5-1	2.22	
12	JS6-1	2.21	
13	AL1-1	2.45	
14	BP2-1	2.27	
15	DK2-1	2.32	
16	DK2-2	2.31	

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

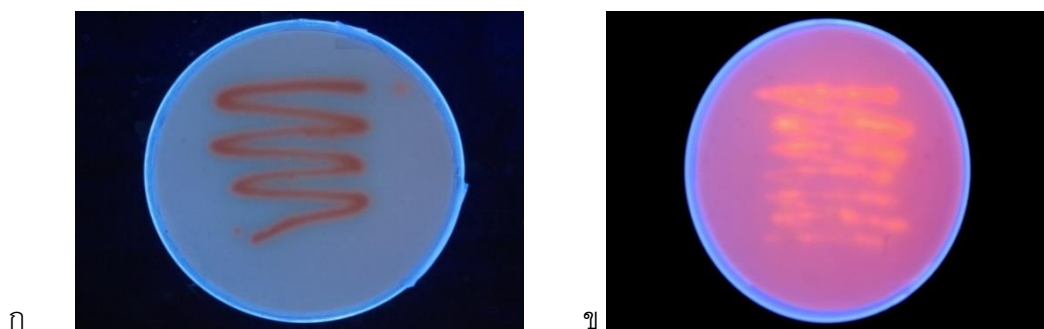
ลำดับ	รหัสเชื้อ	ขนาดโซนใสที่การเจริญ 45 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง	รูปจุลินทรีย์บนอาหารที่ ผสมไตรบิวไทรีน
17	DK2-4	2.30	
18	DK3-2	2.49	
19	DK3-3	2.48	
20	VP1-1	2.22	
21	VP4-1	2.51	
22	VP6-1	2.32	
23	VP6-3	2.30	

การคัดเลือกจุลินทรีย์ชอบร้อนที่สามารถผลิตไลเปสได้เบื้องต้นโดยใช้ไตรบิวไทรินเป็นสารตั้งต้น ด้วยวิธีการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสหักลบกับเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของจุลินทรีย์ เพื่อสังเกตโซนใสนำมาเปรียบเทียบความสามารถเบื้องต้นในการผลิตไลเปส แต่เนื่องจากไตรบิวไทรินเป็นสารตั้งต้นประเภทคาร์บอนสายสั้น (มีจำนวนคาร์บอนอะตอมน้อยกว่า 10) จึงยังไม่เหมาะสมที่จะนำมาตรวจสอบทรูไลเปส (true lipase) เนื่องจากสารตั้งต้นประเภทคาร์บอนสายสั้นก็สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เอสเทอเรสได้ด้วยเช่นกัน แต่ทรูไลเปสจำเป็นต้องใช้สารตั้งต้นประเภทคาร์บอนสายยาว (มีจำนวนคาร์บอนอะตอมมากกว่า 10) ในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เช่น ไตรโอเลอิน (triolein) (Kumar และคณะ, 2012)

ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะคัดเลือกจุลินทรีย์ชนิดลิโพลติกชอบร้อนที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้อย่างแท้จริง ซึ่งไลเปสจัดเป็นเอนไซม์ชนิดลิโพลติก เป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ของไขมันได้ โดยเอนไซม์กลุ่มนี้จะแบ่งตามชนิดปฏิกิริยาที่เอนไซม์เร่ง ประกอบด้วย 2 กลุ่มใหญ่ คือ 1 คาร์บอกซิลเอสเทอเรส (carboxylesterases) 2 ทรูไลเปส ซึ่งทั้งสองกลุ่มนี้มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ด้วยน้ำ แต่เอนไซม์ทั้งสองกลุ่มนี้ยังมีความแตกต่างกันที่ความจำเพาะของสารตั้งต้นที่เข้าทำปฏิกิริยา (Bornscheuer, 2002) ดังกล่าวข้างต้น ดังนั้นการใช้ไตรบิวไทรินเป็นสารตั้งต้นจึงสามารถบอกได้เพียงเบื้องต้นว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มีโอกาสที่จะสามารถผลิตไลเปสได้ด้วย


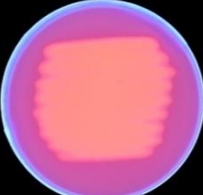


4.2.2 การทดสอบและคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตไลเปส

นำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ 23 ไอโซเลตจากอาหารไตรบิวไทรินข้างต้น มาเชื่อมด้วยวิธีการ cross streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งสูตรพื้นฐานที่ผสมโรดามิน บี และมีน้ำมันปาล์มเป็นส่วนประกอบ หากเชื้อจุลินทรีย์มีความสามารถในการผลิตไลเปสได้ โคโลนีของจุลินทรีย์จะเรืองแสงสีส้ม ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร (ภาพที่ 4.3) จากผลการทดลองพบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 23 ไอโซเลตมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ (ตารางที่ 4.3)

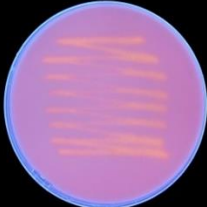
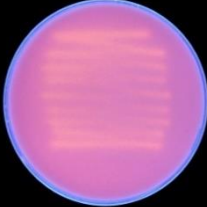



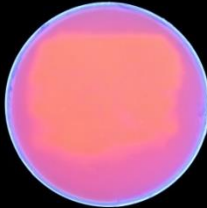
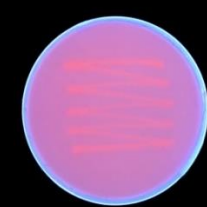


ภาพที่ 4.3 ภาพ ก แสดงจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถผลิตไลเปสจึงไม่เกิดการเรืองแสงสีส้มภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต ภาพ ข แสดงจุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตไลเปสจึงเกิดการเรืองแสงสีส้มภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ต


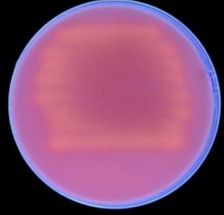
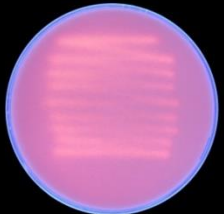



ตารางที่ 3.3 แสดงผลการทดสอบความสามารถในการเรืองแสงของจุลินทรีย์ลิโพลิติกชอบร้อนที่คัดแยกได้บนอาหารโรดามีน บี

ลำดับ	ไอโซเลต	จุลินทรีย์บนอาหารโรดามีน บี	ผลการเรืองแสงบนอาหารโรดามีน บี
1	SK2-1		+
2	SK2-3		+
3	SK3-1		+
4	JS2-1		+

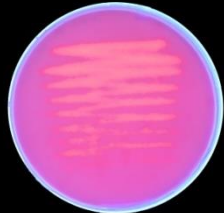
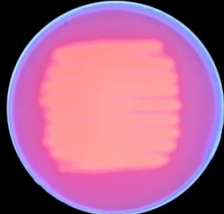




ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลต	จุลินทรีย์บนอาหาร โรดามีน บี	ผลการเรืองแสงบน อาหารโรดามีน บี
5	JS3-1		+
6	JS3-2		+
7	JS3-3		+
8	JS3-4		+
9	JS3-5		+
10	JS4-1		+
11	JS5-1		+

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลต	จุลินทรีย์บนอาหาร โรดามีน บี	ผลการเรืองแสงบน อาหารโรดามีน บี
12	JS6-1		+
13	AL1-1		+
14	BP2-1		+
15	DK2-1		+
16	DK2-2		+
17	DK2-4		+

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ลำดับ	ไอโซเลต	จุลินทรีย์บนอาหาร โรดามีน บี	ผลการเรืองแสงบน อาหารโรดามีน บี
18	DK3-2		+
19	DK3-3		+
20	VP1-1		+
21	VP4-1		+
22	VP6-1		+
23	VP6-3		+

จากงานวิจัยนี้ใช้น้ำมันปาล์มมาเป็นสารตั้งต้นในส่วนประกอบของอาหารคัดเลือกจุลินทรีย์ชอบร้อนที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสเนื่องจากน้ำมันปาล์มมีส่วนประกอบที่เป็นกรดไขมันที่มีคาร์บอนสายยาวเป็นองค์ประกอบอยู่เป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังเป็นกรดไขมันชนิดอิ่มตัวและชนิดไม่อิ่มตัวอยู่ในสัดส่วนที่สมดุลกัน สำหรับกรดไขมันชนิดอิ่มตัวจะมีพันธะระหว่างคาร์บอนอะตอมในโมเลกุลเป็นพันธะเดี่ยว คือกรดปาล์มมิก (palmitic acid) ประมาณ 44 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่กรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวจะมีพันธะคู่ระหว่างคาร์บอนอะตอมในโมเลกุล 1 พันธะ หรือมากกว่า คือ กรดโอเลอิก (oleic acid) ประมาณ 39 เปอร์เซ็นต์ (May และ Nesaretnam, 2014) จึงเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

นอกจากการเลือกใช้สารตั้งต้นให้เหมาะสมกับการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสแล้ว ยังมีการใช้สีเข้ามาช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการพิจารณาเชิงคุณภาพในความสามารถของการเกิดปฏิกิริยาของไลเปสได้ดียิ่งขึ้น ในงานวิจัยนี้ใช้สี โรดามิน บี ซึ่งเป็นสีย้อมที่มีสมบัติสามารถเรืองแสงได้ (fluorescence dye) ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตที่มีความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร สีโรดามิน บี เมื่อนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งสูตรพื้นฐาน พบว่าไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และยังคงมีความเสถียรเมื่อมีสภาวะความเป็นกรดต่างในอาหารเปลี่ยนแปลง

4.3 ชนิดของจุลินทรีย์ลิโพลิติกชอบร้อนที่คัดแยกได้

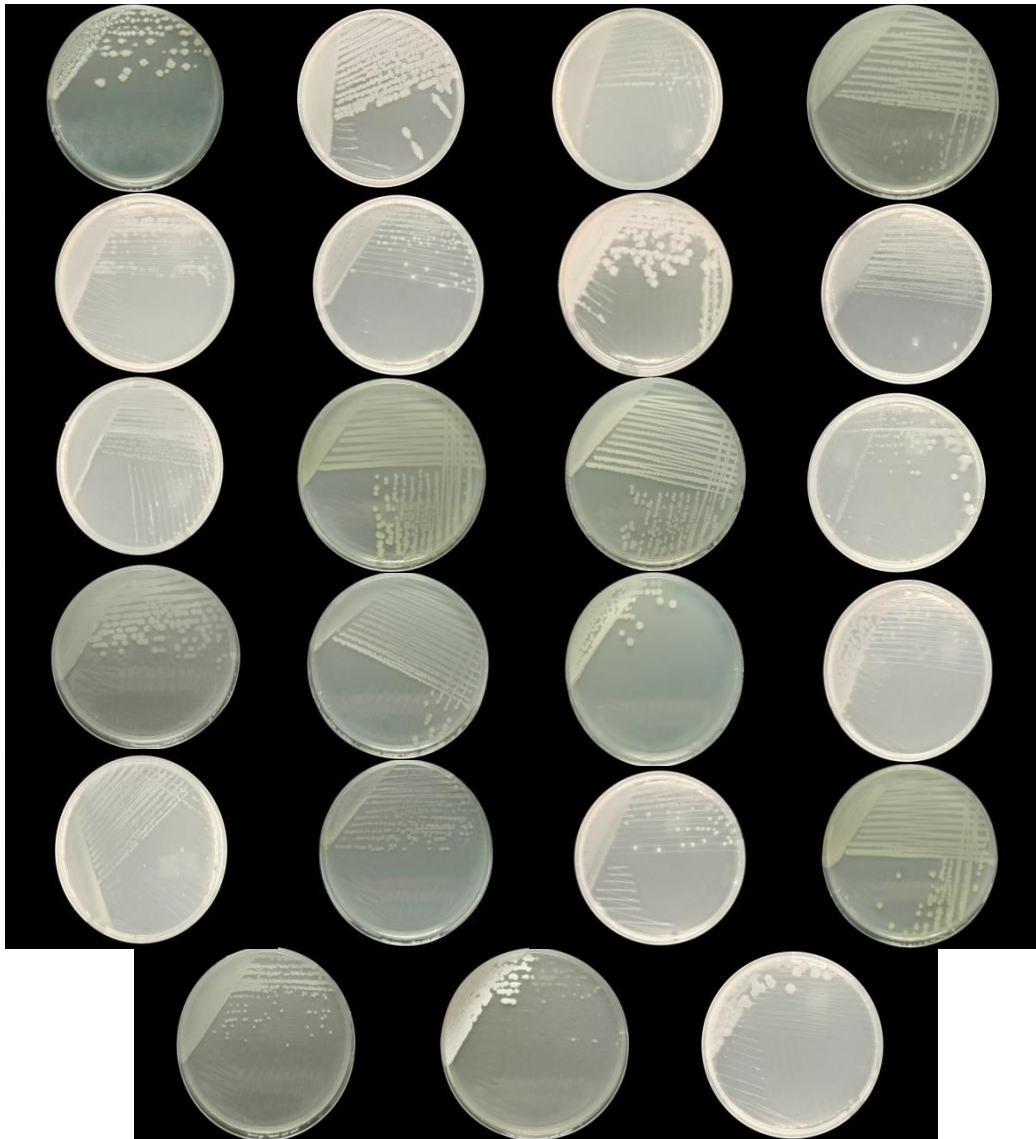
นำจุลินทรีย์ลิโพลิติกชอบร้อนที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสทั้ง 23 ไอโซเลตที่ได้ข้างต้นมาทดสอบชนิดของจุลินทรีย์ โดยเชื้อโคโคไนด์เดี่ยวของเชื้อที่คัดเลือกลงในอาหารทั้งสองชนิด คือ แบคทีเรียทดสอบโดยนำโคโคไนด์เดี่ยวของแต่ละไอโซเลตมาเชื้อ (cross streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง NA ที่ผสมสารปฏิชีวนะนิสเตตินความเข้มข้น 10,000 ยูนิตต่อลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของยีสต์และรา ส่วนยีสต์และราทดสอบโดยนำโคโคไนด์เดี่ยวของแต่ละไอโซเลตมาเชื้อ (cross streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง YMA ที่ผสมสารปฏิชีวนะสเตรปโตมัยซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย จากการทดสอบพบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 23 ไอโซเลตขึ้นบนอาหาร NA ที่ผสมนิสเตตินแต่ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหาร YMA ที่ผสมสเตรปโตมัยซินเลย ซึ่งปมไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แสดงว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ทั้งหมดเป็นแบคทีเรีย จากนั้นนำจุลินทรีย์ที่ได้มาศึกษาลักษณะรูปร่างทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังแสดงในตาราง (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 แสดงลักษณะรูปร่าง เส้นผ่านศูนย์กลาง ระดับความนูน ผิวหน้า ขอบและสีของโคโลนี ของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้

ไอโซเลต	ลักษณะพื้นฐานวิทยา					
	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง(cm)	รูปร่าง	ระดับ ความนูน	ลักษณะ ผิวหน้า	ขอบ	สี
SK2-1	0.27	กลม	แบนราบ	เรียบ	หยัก	ขาวครีม
SK2-3	0.15	กลม	นูน	เรียบ	เรียบ	ขาวขุ่น
SK3-1	0.36	ไม่แน่นอน	นูน	เรียบ	หยัก	ขาวครีม
JS2-1	0.18	กลม	แบนราบ	เรียบ	เรียบ	ขาวขุ่น
JS3-1	0.17	กลม	แบนราบ	เรียบ	เรียบ	ขาวขุ่น
JS3-2	0.33	กลม	แบนราบ	เรียบ	เรียบ	ขาวขุ่น
JS3-3	0.19	กลม	แบนราบ	เรียบ	เรียบ	ขาวขุ่น
JS3-4	0.20	กลม	แบนราบ	เรียบ	หยัก	ขาวขุ่น
JS3-5	0.32	ไม่แน่นอน	แบนราบ	เรียบ	หยัก	ขาวขุ่น
JS4-1	0.36	ไม่แน่นอน	แบนราบ	เรียบ	หยัก	ขาวขุ่น
JS5-1	0.18	กลม	แบนราบ	เรียบ	เรียบ	ขาวขุ่น
JS6-1	0.29	ไม่แน่นอน	แบนราบ	เรียบ	หยัก	ขาวครีม
AL1-1	0.28	ไม่แน่นอน	แบนราบ	ขรุขระ	หยัก	ครีม
BP2-1	0.12	กลม	นูน	เรียบ	เรียบ	ครีม
DK2-1	0.15	รี	แบนราบ	เรียบ	เรียบ	ใส
DK2-2	0.23	กลม	แบนราบ	เรียบ	เรียบ	ครีม
DK2-4	0.16	กลม	แบนราบ	เรียบ	เรียบ	ครีม
DK3-2	0.25	กลม	นูน	เรียบ	เรียบ	เหลือง
DK3-3	0.23	กลม	นูน	เรียบ	เรียบ	เหลือง
VP1-1	0.28	กลม	นูน	เรียบ	เรียบ	ครีม
VP4-1	0.16	กลม	แบนราบ	เรียบ	เรียบ	ใส

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

ไอโซเลต	ลักษณะพื้นฐานวิทยา					
	เส้นผ่านศูนย์กลาง (cm)	รูปร่าง	ระดับความหนูน	ลักษณะผิวหน้า	ขอบ	สี
VP6-1	0.24	กลม	แบนราบ	เรียบ	เรียบ	ครีม
VP6-3	0.27	กลม	แบนราบ	เรียบ	เรียบ	ขาวขุ่น



ภาพที่ 4.4 แสดงลักษณะของแบคทีเรียขอบร้อน 23 ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากบ่อน้ำพุร้อน

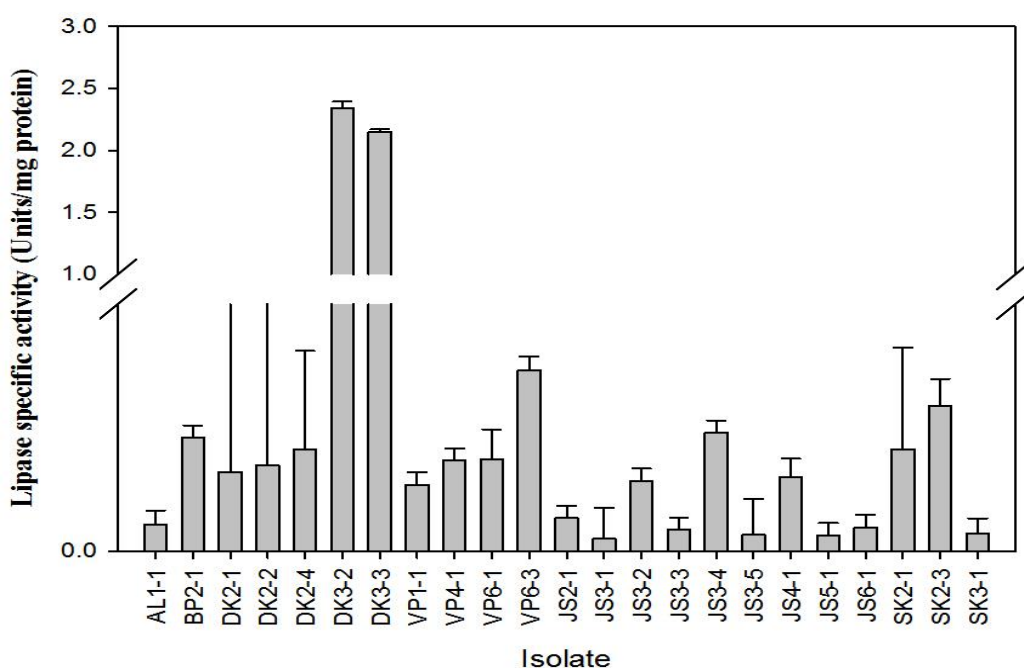
4.4 การเปรียบเทียบความสามารถของการเร่งปฏิกิริยาจากไลเปสของจุลินทรีย์ชอบร้อนที่คัดเลือก

การเปรียบเทียบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสจากการปลดปล่อยกรดไขมันออกจากสารตั้งต้น มีวิธีการตรวจสอบได้หลายวิธี เช่น วิธีการตรวจสอบโดยใช้สีคือ โรดามีน บี ดังกล่าวข้างต้นโดยพิจารณาจากบริเวณที่จุลินทรีย์ปล่อยเอนไซม์ไลเปสออกมาย่อยไตรกลีเซอไรด์จากน้ำมันปาล์ม ทำการสังเกตการเรืองแสงสีส้มเมื่อนำไปส่องผ่านภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตที่มีความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร ซึ่งวิธีดังกล่าวนี้จะสามารถตรวจสอบได้เพียงเชิงคุณภาพของไลเปสเท่านั้น จึงมีการนำมาประยุกต์ใช้เพื่อให้สามารถตรวจสอบในเชิงปริมาณได้ด้วยเช่นกัน งานวิจัยของ ธนธร (2553) ใช้วิธีสเปกโตรโฟโตมิทรีมาใช้ในการวัดการทำงานของ ไลเปสเชิงปริมาณ เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว โดยวิธีนี้จะมีการเลือกใช้พารา-ไนโตรฟีนิล เอสเทอร์ (*p*-nitrophenyl ester) เป็นสารตั้งต้น ซึ่งเป็นกรดไขมันสายยาวและมีจำนวนคาร์บอนแตกต่างกันตามความเหมาะสมของเอนไซม์ เช่น พารา-ไนโตรฟีนิล บิวทิเรต (C_4), พารา-ไนโตรฟีนิล ลอเรต (C_{12}), พารา-ไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเตรท (C_{16}) (Winayanuwattikun และคณะ, 2013) จากนั้นนำมาตรวจสอบผลด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรของพารา-ไนโตรฟีนอลที่เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยปกติเอสเทอร์ที่เป็นคาร์บอนสายสั้นจะมีสมบัติในการละลายน้ำได้หากเลือกคาร์บอนสายสั้นจะเป็นการวัดการทำงานของเอสเทอร์มากกว่า ดังนั้นการเลือกสารตั้งต้นจึงนิยมเลือกสารตั้งต้นที่มีคาร์บอนอะตอมสูง ซึ่งจะสามารถวัดการทำงานของไลเปสได้อย่างแท้จริง ในงานวิจัยนี้ใช้พารา-ไนโตรฟีนิล ลอเรต (C_{12}) เป็นสารตั้งต้นเนื่องจากมีขั้นตอนในการวัดที่ง่าย และมีต้นทุนต่ำกว่าการใช้พารา-ไนโตรฟีนิล ปาล์มมิเตรท (C_{16})

การตรวจวัดความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจากไลเปสของแบคทีเรียลิโพลีติกชอบร้อนโดยนำจุลินทรีย์ 23 ไอโซเลตที่คัดเลือกได้ มาเลี้ยงในอาหารเหลว LPM ที่ผสมน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร เพื่อชักนำให้เกิดการผลิตไลเปส บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างมาทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้พารา-ไนโตรฟีนิล ลอเรตเป็นสารตั้งต้น โดยทุกชุดการทดลองจะทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ นำมาหาค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าความคลาดเคลื่อนนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน ตรวจสอบปริมาณโปรตีน (ภาคผนวก ค) และนำมาคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ (ภาคผนวก ง)

จากการทดลองพบว่าทั้ง 23 ไอโซเลตพบว่า มีเพียง 2 ไอโซเลตที่แสดงความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้สูงที่สุดสองอันดับแรกตามลำดับคือ แบคทีเรียไอโซเลต DK3-2 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะเท่ากับ 2.34 ± 0.05 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และแบคทีเรียไอโซ

เลต DK3-3 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะเท่ากับ 2.15 ± 0.02 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ ส่วนลำดับที่ 3 คือ VP6-3 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะเท่ากับ 0.15 ± 0.01 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ลำดับที่ 4 คือ SK2-3 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะเท่ากับ 0.12 ± 0.02 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ลำดับที่ 5 คือ JS3-4 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะเท่ากับ 0.10 ± 0.01 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ลำดับที่ 6 คือ BP2-1 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะเท่ากับ 0.09 ± 0.01 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ลำดับที่ 7 และ 8 คือ SK2-1 และ DK2-4 ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะเท่ากันเท่ากับ 0.08 ± 0.08 และ 0.08 ± 0.07 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ ลำดับที่ 9 และ 10 คือ VP6-1 และ VP4-1 ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะเท่ากันเท่ากับ 0.07 ± 0.02 และ 0.07 ± 0.01 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ ดังแสดงในภาพ (ภาพที่ 4.5)



ภาพที่ 4.5 แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะจากแบคทีเรีย 23 ไอโซเลตหลังจากเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับผลิตไลเปสที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Akanbi และคณะ (2010) ได้รายงานการผลิตไลเปสจาก *Bacillus sp.* ที่คัดแยกได้จากบ่อน้ำพุร้อนในประเทศมาเลเซีย มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ 2.51 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ภายหลังจากการเลี้ยงในอาหารที่ชักนำให้เกิดการผลิตไลเปส ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

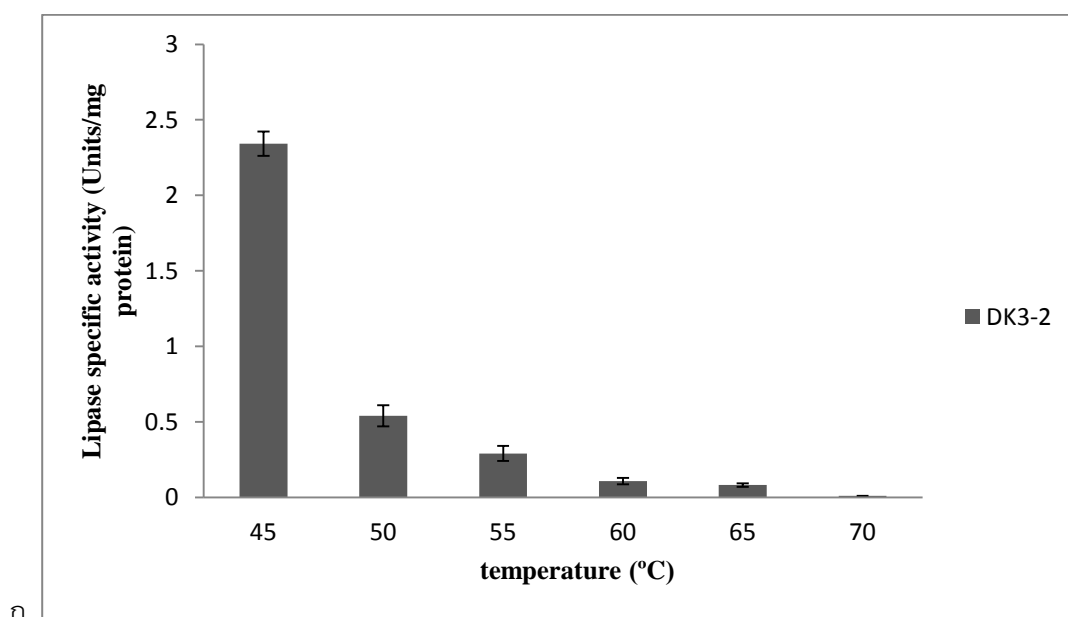
4.5 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเพสจากจุลินทรีย์

4.5.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพสและความสามารถในการทนร้อนของจุลินทรีย์

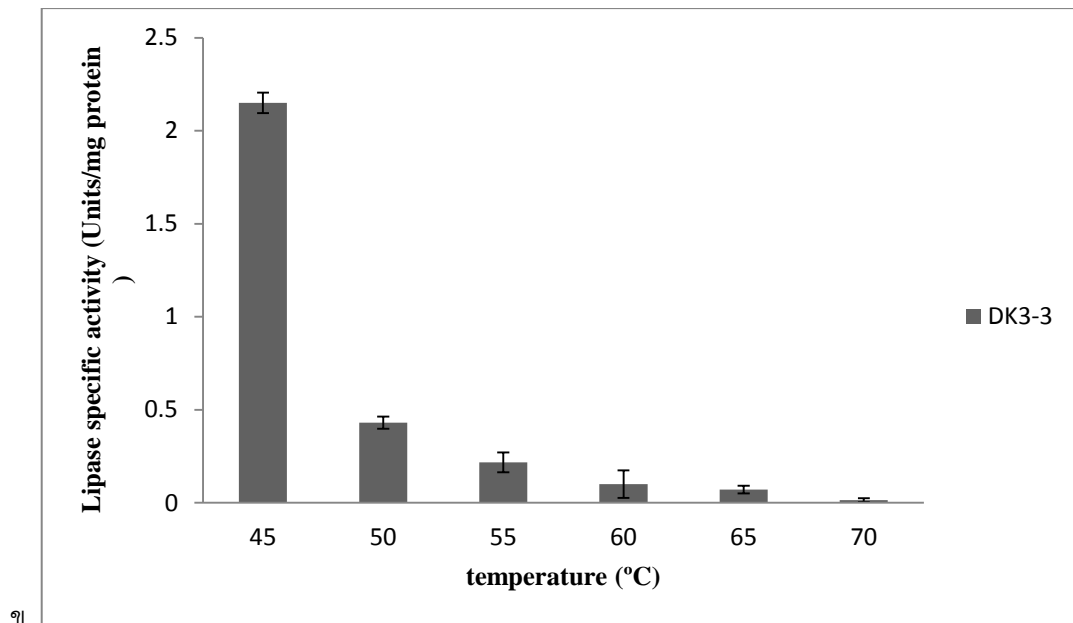
ทำการคัดเลือกแบคทีเรียลิโพลติกซอบร็อน 10 ไอโซเลตที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเพสได้สูงที่สุดจากแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยกได้จากการทดลองข้างต้น มาทำการศึกษาความสามารถในการทนร้อนของแต่ละไอโซเลตโดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร LPM เพื่อชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ไลเพส โดยแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงตั้งแต่ 45, 50, 55, 60, 65, 70 ตามลำดับหรือมากกว่าอุณหภูมิข้างต้นจนกว่าจุลินทรีย์ใกล้จะตายและไม่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเพสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างเชื้อที่ได้มาทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพส วัดปริมาณโปรตีน และคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ โดยทุกชุดการทดลองจะทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

จากการทดลองพบว่า 10 ไอโซเลตที่คัดเลือกจากไอโซเลตที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพสจำเพาะสูงสุด 10 อันดับแรกคือ (1) DK3-2 แสดงความสามารถผลิต ไลเพสได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพสจำเพาะ 2.34 ± 0.08 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน สามารถทนร้อนได้ในช่วง 60-65 องศาเซลเซียส (2) DK3-3 แสดงความสามารถในการผลิตไลเพสได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพสจำเพาะ 2.15 ± 0.06 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน สามารถทนร้อนได้ในช่วง 60-65 องศาเซลเซียส (3) VP6-3 แสดงความสามารถในการผลิตไลเพสได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพสจำเพาะ 0.15 ± 0.04 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน สามารถทนร้อนได้ถึง 65 องศาเซลเซียส (4) SK2-3 แสดงความสามารถในการผลิตไลเพสได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพสจำเพาะ 0.14 ± 0.04 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน สามารถทนร้อนได้ถึง 70 องศาเซลเซียส (5) JS3-4 แสดงความสามารถในการผลิตไลเพสได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพสจำเพาะ 0.11 ± 0.02 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน สามารถทนร้อนได้ถึง 70 องศาเซลเซียส (6) BP2-1 แสดงความสามารถในการผลิตไลเพสได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพสจำเพาะ 0.23 ± 0.03 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน สามารถทนร้อนได้ในช่วง 65-70 องศาเซลเซียส (7) SK2-1 แสดงความสามารถในการผลิตไลเพสได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพสจำเพาะ 0.20 ± 0.07 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน สามารถทนร้อนได้ถึง 65 องศาเซลเซียส (8) DK2-4 แสดงความสามารถในการผลิตไลเพสได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพสจำเพาะ 0.15 ± 0.03 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน สามารถทนร้อนได้ถึง 70 องศา

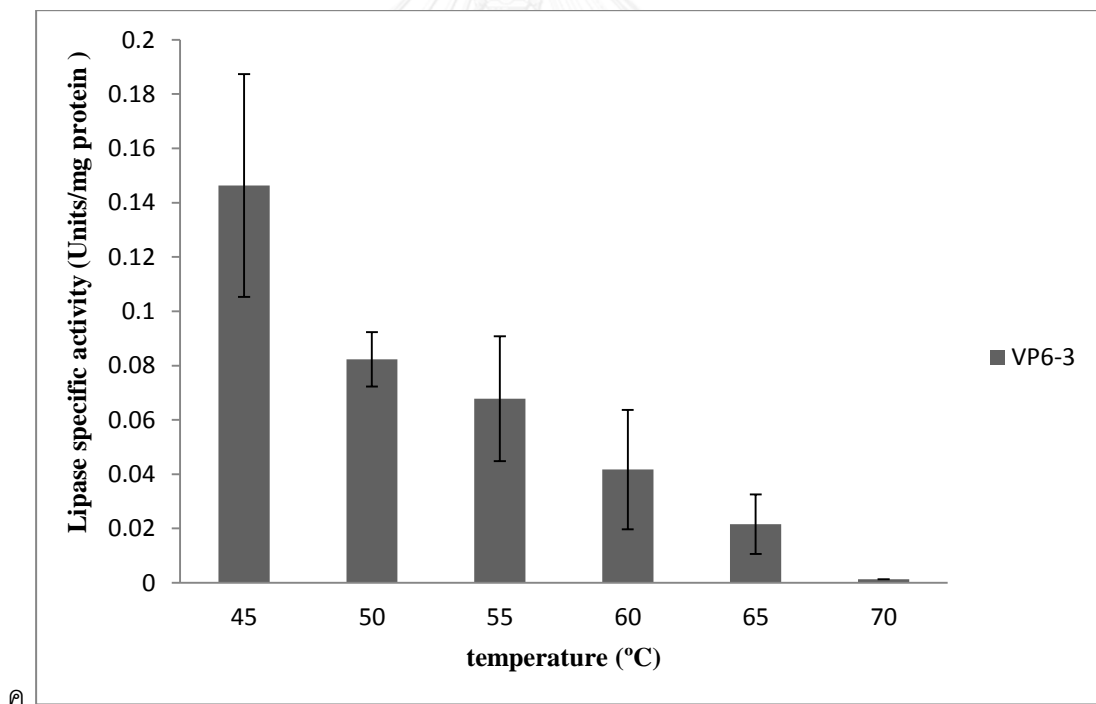
เซลเซียส (9) VP4-1 แสดงความสามารถในการผลิตไลเปสได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะ 0.10 ± 0.02 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน สามารถทนร้อนได้ถึง 70 องศาเซลเซียส และ(10) VP6-1 แสดงความสามารถในการผลิตไลเปสได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะ 0.08 ± 0.02 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน สามารถทนร้อนได้ถึง 65 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพ (ภาพที่ 4.6)



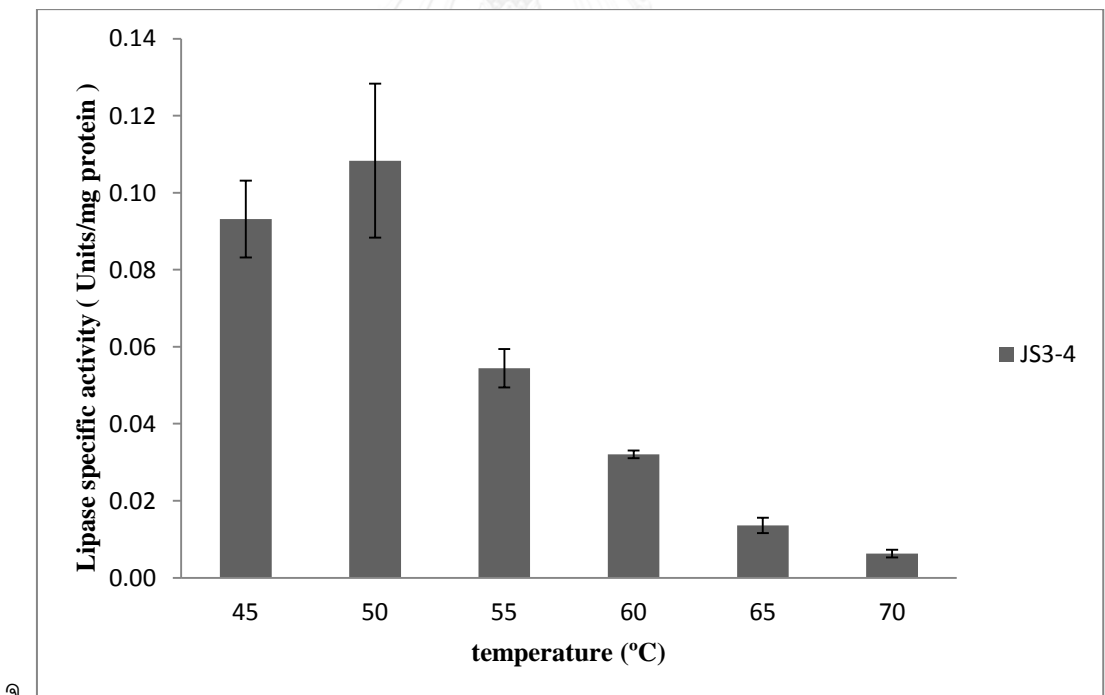
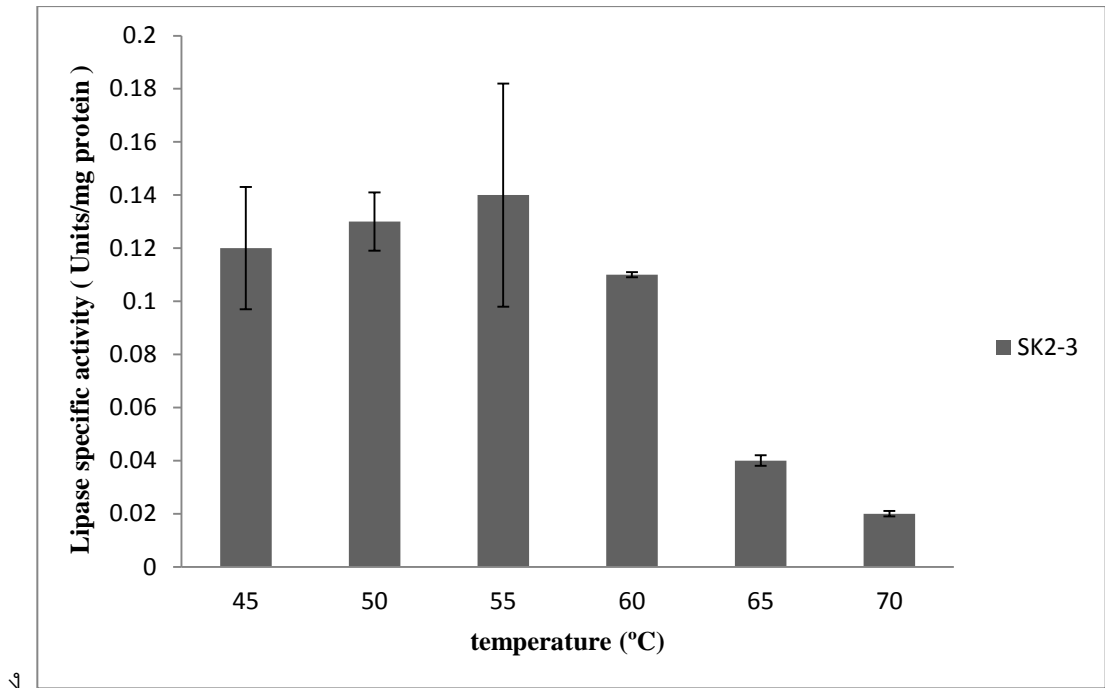
ก

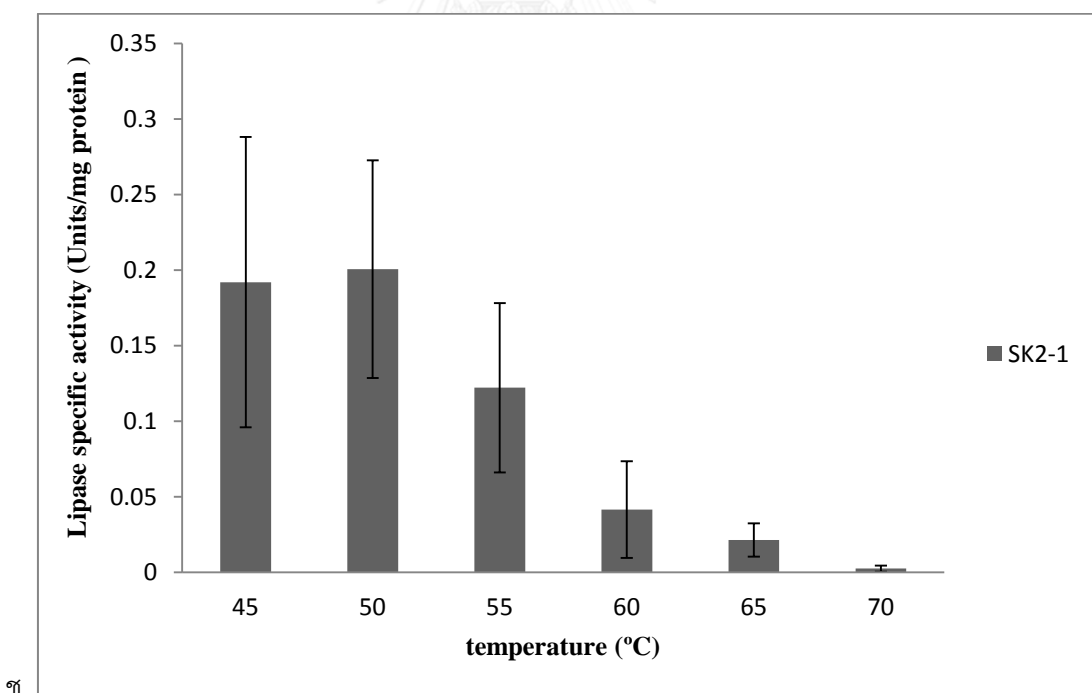
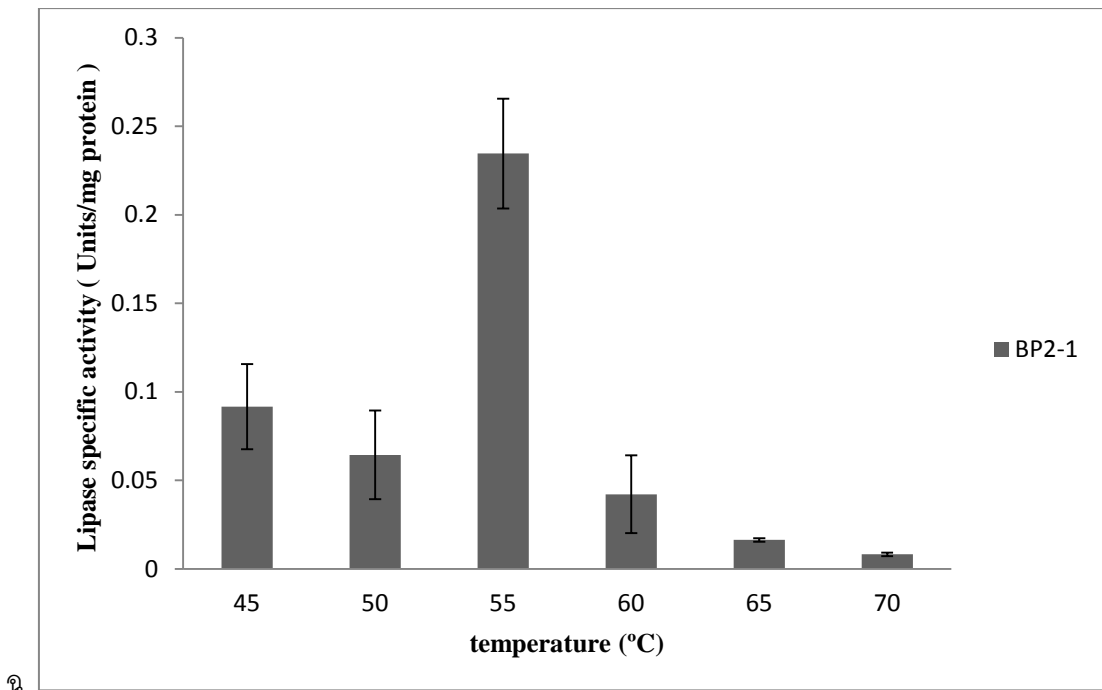


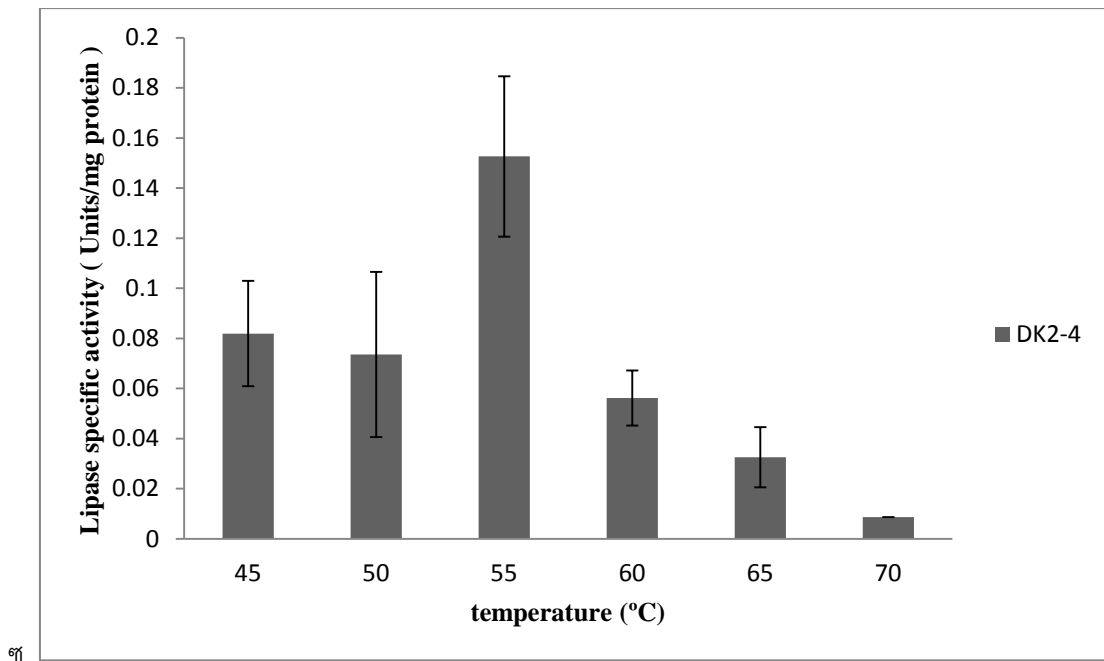
9



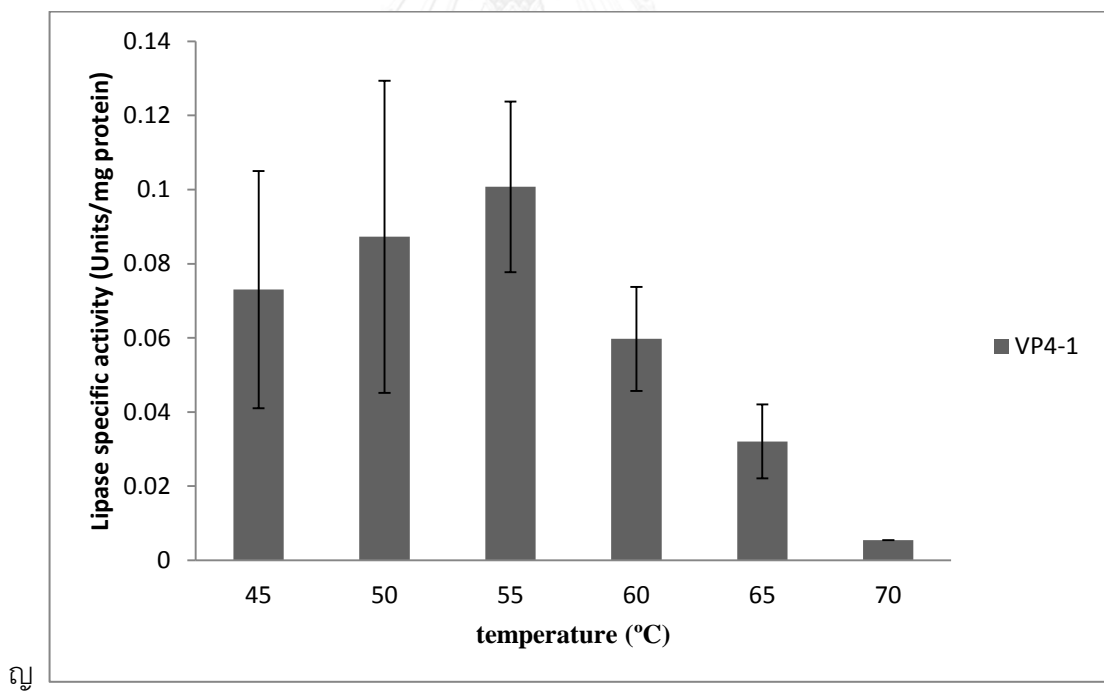
9



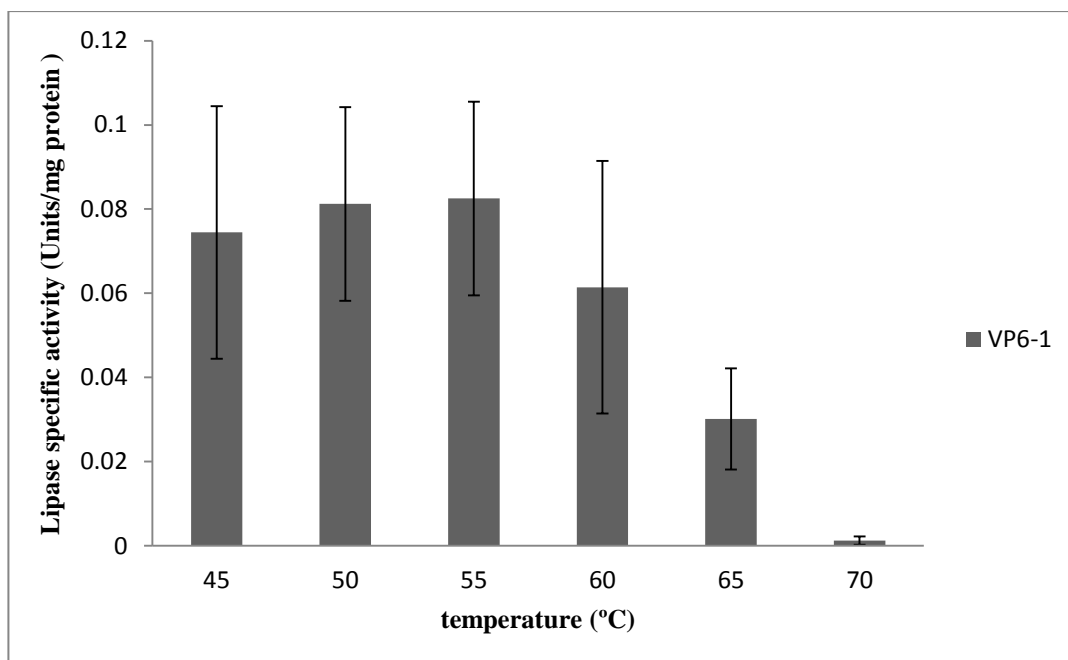




၅၅



၅၆



ภ

ภาพที่ 4.6 แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสและความสามารถในการทนร้อนของแบคทีเรีย 10 ไอโซเลตที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดจากแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยกได้

ก : ไอโซเลต DK3-2 ข : ไอโซเลต DK3-3 ค : ไอโซเลต VP6-3 ง : ไอโซเลต SK2-3

จ : ไอโซเลต JS3-4 ฉ : ไอโซเลต BP2-1 ช : ไอโซเลต SK2-1 ซ : ไอโซเลต DK2-4

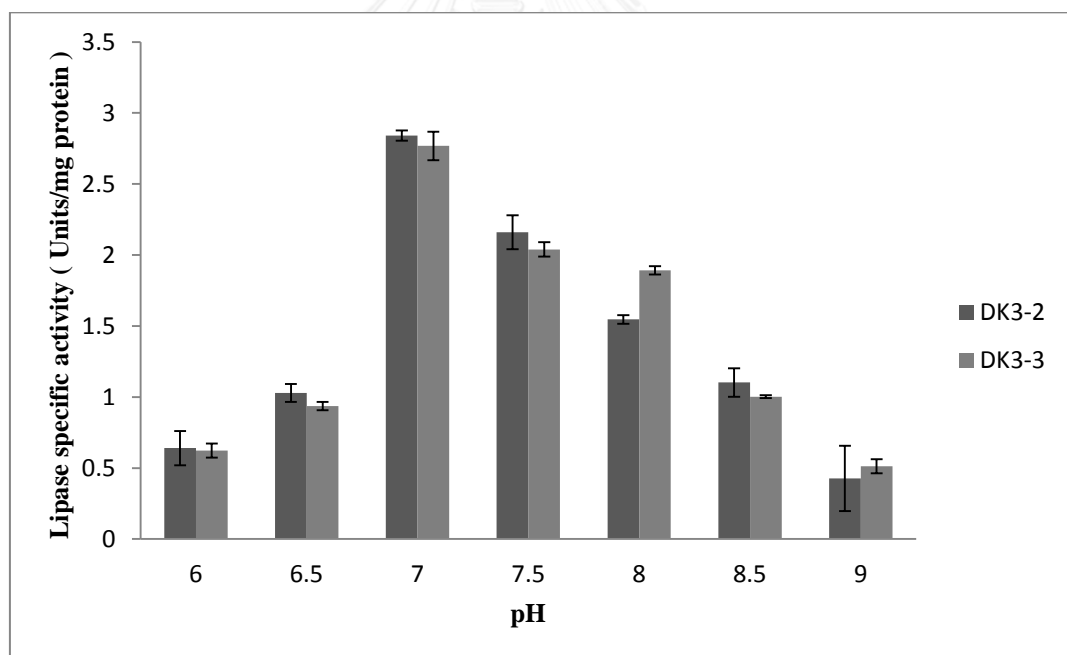
ญ : ไอโซเลต VP4-1 ภ : ไอโซเลต VP6-1

โดย Kanwar และคณะ (2006) ได้ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสของ *Bacillus coagulans* MTCC-6375 พบว่ามีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 45 องศาเซลเซียส Mehta และคณะ (2012) ได้ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสของ *Geobacillus* sp. พบว่ามีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 60 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ 0.57 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ Kumar และคณะ (2005) ได้รายงานอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสของ *Bacillus coagulans* BTS-3 พบว่ามีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 55 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ 8.5 จะมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ 1.16 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและสามารถทนร้อนได้ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 60-65 องศาเซลเซียส

จากผลการเปรียบเทียบความสามารถการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจากไลเปสของแบคทีเรียที่คัดเลือก จึงทำการคัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลต DK3-2 และ DK3-3 มาทำการศึกษาต่อในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากทั้งสองไอโซเลตมีความสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ดีที่สุดสองอันดับแรกที่อุณหภูมิสูง

4.5.2 การศึกษาความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุดสองอันดับแรกที่อุณหภูมิสูง คือ DK3-2 และ DK3-3 ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสได้ดีที่สุดที่ 45 องศาเซลเซียสทั้งสองไอโซเลตมาทำการศึกษาต่อไป ทำการศึกษาภาวะความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียในอาหาร LPM เพื่อชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่แปรผันค่าความเป็นกรดต่างในอาหาร LPM ตั้งแต่ 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9 ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างเชื้อที่ได้มาทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส วัดปริมาณโปรตีน และคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะโดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ พบว่า ไอโซเลต DK3-2 และ DK3-3 มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรดต่างที่ 7 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะ 2.84 ± 0.04 และ 2.77 ± 0.10 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ ดังแสดงในภาพ (ภาพที่ 4.7)

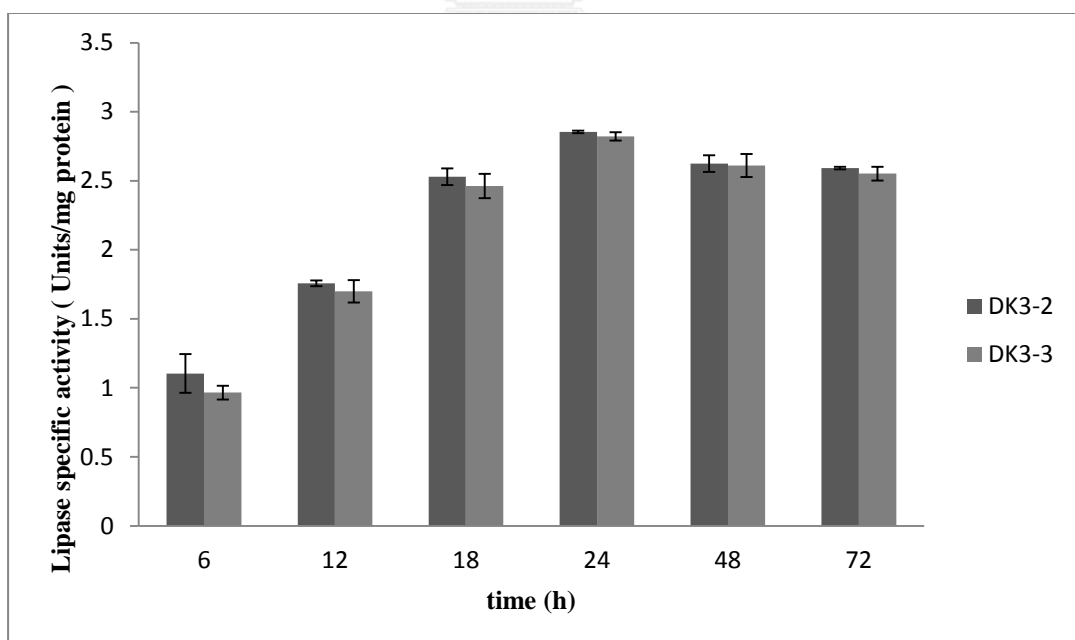


ภาพที่ 4.7 แสดงค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากแบคทีเรียไอโซเลต DK3-2 และ DK3-3

Kim และคณะ (1998) ได้ศึกษาค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสของ *Bacillus stearothermophilus* L1 พบว่ามีค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมเท่ากับ เช่นเดียวกับกับ *Rhodotorula glutinis* (Papaparaskevas และคณะ, 1992)

4.5.3 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์

นำแบคทีเรียไฮโซเลต DK3-2 และ DK3-3 มาทำการศึกษาต่อ เนื่องจากในการทดลองที่ผ่านมาใช้เวลาในการเลี้ยงเชื้อและเก็บตัวอย่างเพียงจุดเดียวมาโดยตลอด จึงยังไม่สามารถบอกถึงช่วงเวลาที่ดีที่สุดที่จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดในช่วงใด จึงทำการศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้อุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดต่าง 7 ในอาหาร LPM เพื่อชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ไลเปส เนื่องจากเป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่เชื้อมีความสามารถในการเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปส ทำการเก็บตัวอย่างเป็นช่วงเวลาที่ถี่มากขึ้นเป็นทุก 6 ชั่วโมง คือชั่วโมงที่ 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72 จากนั้นเก็บตัวอย่างเชื้อที่ได้มาทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส วัดปริมาณโปรตีน และคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำจากการทดลองพบว่า ทั้งแบคทีเรียไฮโซเลต DK3-2 และ DK3-3 มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุดที่ 24 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะ 2.85 ± 0.01 และ 2.82 ± 0.03 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ ดังแสดงในภาพ (ภาพที่ 4.8)

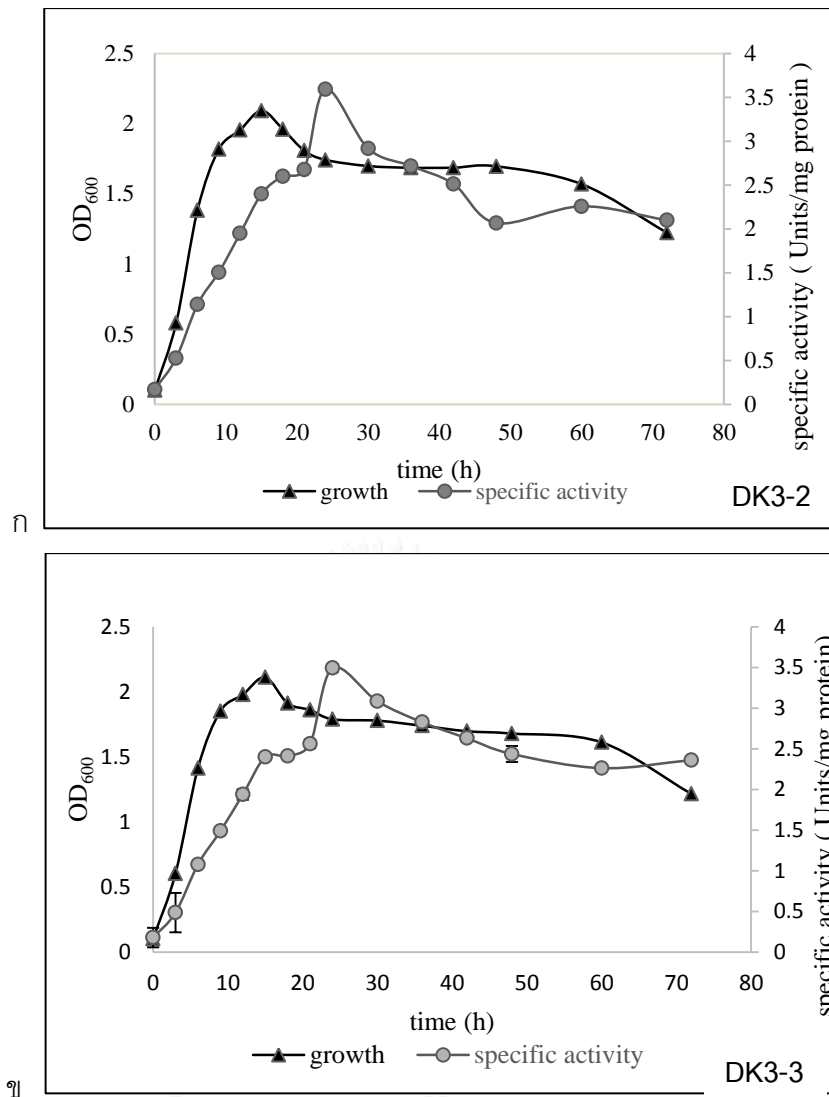


ภาพที่ 4.8 แสดงเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากแบคทีเรียไฮโซเลต DK3-2 และ DK3-3

Mohan และคณะ (2008) ได้ศึกษาเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus sp.* พบว่าเวลาที่เหมาะสมคือ 24 ชั่วโมง ส่วน Mehta และคณะ (2012) รายงานว่าเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Geobacillus sp.* พบที่เวลา 72 ชั่วโมง

4.5.4 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ต่อความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

นำแบคทีเรียไอโซเลต DK3-2 และ DK3-3 มาเลี้ยงที่ภาวะที่ดีที่สุด คือทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้ อุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดต่าง 7 ในอาหาร LPM เพื่อชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยภาวะเหล่านี้เป็นภาวะที่ดีที่สุดที่สามารถผลิตไลเปสได้สูงจากการทดลองข้างต้น โดยที่เวลาจะทำการเก็บตัวอย่างถี่มากขึ้นจากเดิมเป็นทุก 3 ชั่วโมง คือชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง คือชั่วโมงที่ 30, 36, 42, 48 และทุก 12 ชั่วโมงคือ ชั่วโมงที่ 60 และ 72 เก็บผลติดต่อกันตลอดระยะเวลา 72 ชั่วโมงหรือจนกว่าเชื้อจะเริ่มเข้าสู่ระยะการตาย (death phase) นำไปวัดการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยวิธีวัดค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นเก็บตัวอย่างเชื้อที่ได้มาทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส วัดปริมาณโปรตีน และคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ จากการทดลองพบว่าความสัมพันธ์การเจริญและความสามารถในการผลิตไลเปสของทั้งแบคทีเรียไอโซเลต DK3-2 และ DK3-3 มีความสามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ 15 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงปลายการเจริญแบบทวีคูณ (exponential phase) แต่จะสามารถผลิตเอนไซม์ ไลเปสได้สูงที่สุดที่ 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่เริ่มเข้าสู่ช่วงคงที่ของการเจริญ (stationary phase) มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะเท่ากับ 3.59 ± 0.06 และ 3.49 ± 0.05 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ ดังแสดงในภาพ (ภาพที่ 4.9)



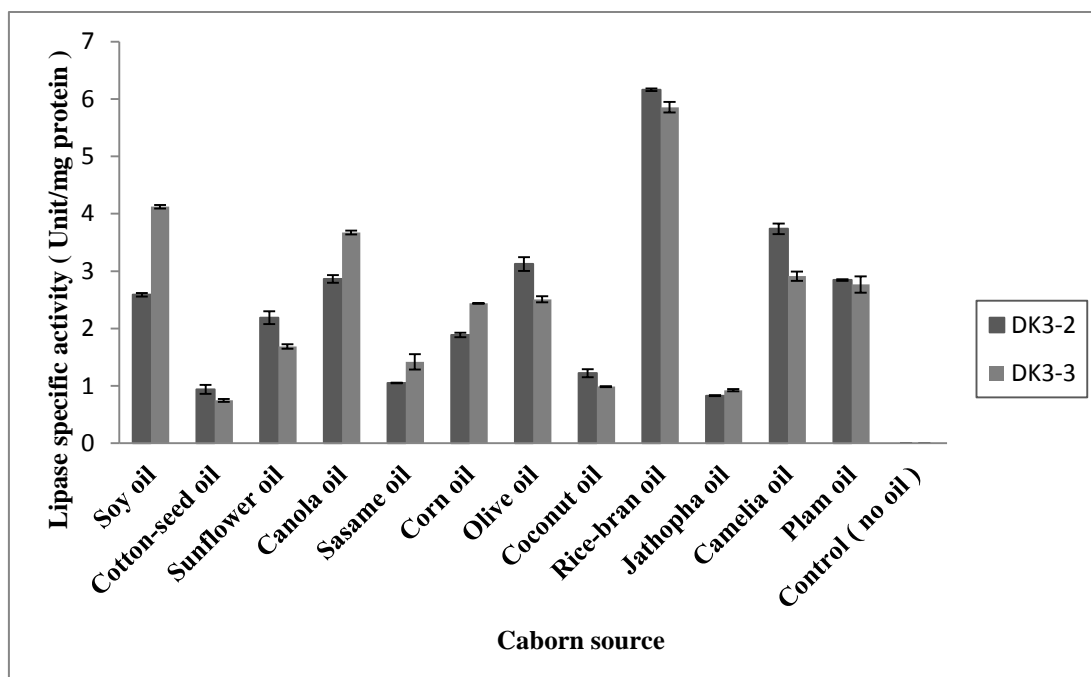
ภาพที่ 4.9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ต่อความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก (ก) DK3-2 (ข) DK3-3

ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee และคณะ (1999) ได้คัดแยกจุลินทรีย์จากบ่อน้ำพุร้อนประเทศอินโดนีเซีย มาศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญต่อความสามารถในการผลิตไลเปสของ *Bacillus thermoleovorans* ID-1 พบว่ามีอัตราการเจริญจำเพาะที่ 2.5 ชั่วโมง และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดที่ 520 ยูนิตต่อลิตร ซึ่งอยู่ในช่วงปลายการเจริญแบบทวีคูณและจะมีค่าลดลงเรื่อยๆหลังจากนั้น

4.6 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนเหนียวนำในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์

นำแบคทีเรียไอโซเลต DK3-2 และ DK3-3 มาทำการศึกษานิตของแหล่งคาร์บอนเหนียวนำในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสม โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร NA เป็นเวลา 1 วันเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดค่าที่ 7 ในอาหาร โดยภาวะเหล่านี้เป็นภาวะที่ดีที่สุดที่สามารถผลิตไลเปสได้สูงจากการทดลองข้างต้น จากนั้นถ่ายกล้ำเชื้อลงในอาหารเหลว LPM เพื่อชักนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยแทนที่น้ำมันปาล์มที่ผสมในอาหาร 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรต่อปริมาตร (v/v) ด้วยน้ำมันชนิดต่างๆจำนวนทั้งหมด 11 ชนิด ได้แก่ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันเมล็ดฝ้าย น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันคาโนลา น้ำมันงา น้ำมันข้าวโพด น้ำมันมะกอก น้ำมันมะพร้าว น้ำมันรำข้าว น้ำมันสบู่ดำ น้ำมันดอกคามิเลีย นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดค่าที่ 7 ในอาหาร และเก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 24 จากนั้นทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส วัดปริมาณโปรตีน และคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียไอโซเลต DK3-2 และ DK3-3 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุดเมื่อมีน้ำมันรำข้าวเป็นสารเหนียวนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ไลเปส ซึ่งช่วยให้เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์ได้มากขึ้น มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจำเพาะเท่ากับ 6.16 ± 0.02 และ 5.86 ± 0.09 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ น้ำมันถั่วเหลือง (DK3-2 และ DK3-3 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจำเพาะเท่ากับ 2.59 ± 0.03 และ 4.12 ± 0.03 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ) น้ำมันเมล็ดฝ้าย (DK3-2 และ DK3-3 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจำเพาะเท่ากับ 0.94 ± 0.08 และ 0.75 ± 0.02 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ) น้ำมันดอกทานตะวัน (DK3-2 และ DK3-3 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจำเพาะเท่ากับ 2.19 ± 0.11 และ 1.69 ± 0.04 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ) น้ำมันคาโนลา (DK3-2 และ DK3-3 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจำเพาะเท่ากับ 2.86 ± 0.07 และ 3.67 ± 0.03 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ) น้ำมันงา (DK3-2 และ DK3-3 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจำเพาะเท่ากับ 1.05 ± 0.01 และ 1.42 ± 0.14 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ) น้ำมันข้าวโพด (DK3-2 และ DK3-3 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจำเพาะเท่ากับ 1.89 ± 0.04 และ 2.44 ± 0.00 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ) น้ำมันมะกอก (DK3-2 และ DK3-3 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจำเพาะเท่ากับ 3.13 ± 0.12 และ 2.51 ± 0.05 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ) น้ำมันมะพร้าว (DK3-2 และ DK3-3 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจำเพาะเท่ากับ 1.22 ± 0.07 และ 0.99 ± 0.01 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ) น้ำมันสบู่ดำ (DK3-2 และ DK3-3 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจำเพาะเท่ากับ 0.83 ± 0.01 และ 0.93 ± 0.02 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ) น้ำมันดอกคามิเลีย (DK3-2 และ DK3-3 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจำเพาะเท่ากับ

3.74±0.09 และ 2.91±0.08 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ) น้ำมันปาล์ม (DK3-2 และ DK3-3 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจำเพาะเท่ากับ 2.85±0.02 และ 2.77±0.14 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ) ดังแสดงในภาพ (ภาพที่ 4.10)



ภาพที่ 4.10 แสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจำเพาะของแบคทีเรียไอโซเลต DK3-2 และ DK3-3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของน้ำมันแตกต่างกัน

จากข้อมูลข้างต้นเมื่อนำค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะทำการเปรียบเทียบกับองค์ประกอบของกรดไขมันอิสระที่อยู่ในน้ำมันชนิดต่างๆ จากงานวิจัยของ (Winayanuwattikun และคณะ, 2008) (ตารางที่ 4.5) พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณของกรดโอเลอิกในน้ำมันแต่ละชนิด จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าน้ำมันรำข้าว น้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลืองและน้ำมันคาโนลาที่มีส่วนประกอบของกรดโอเลอิกสูง ซึ่งกรดโอเลอิกจะมีอิทธิพลต่อการผลิตไลเปสและเจริญเติบโตของแบคทีเรีย DK3-2 และ DK3-3 คือน้ำมันดังกล่าวที่มีกรดโอเลอิกสูงจะเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียผลิตไลเปสออกมาได้สูง และส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะสูงด้วย จึงสามารถย่อยน้ำมันที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่แบคทีเรียนำไปใช้ประโยชน์ได้ในปริมาณมาก แบคทีเรียจึงสามารถนำแหล่งคาร์บอนที่ได้นี้ไปใช้ประโยชน์ในการเจริญและส่งผลให้มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะสูงตามไปด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gupta และคณะ (2004) ได้ทำการทดลองหาอิทธิพลของน้ำมันต่อการผลิตไลเปสของแบคทีเรียไอโซเลต SJ-15 พบว่าน้ำมันถั่วเหลืองที่มีองค์ประกอบของกรดโอเลอิกสูง สามารถเหนี่ยวนำให้แบคทีเรียผลิตไลเปส

สูงขึ้นตามด้วย ซึ่งในบริเวณผนังเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันแตกต่างกันไป

ตารางที่ 4.5 แสดงองค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำมัน 14 ชนิด

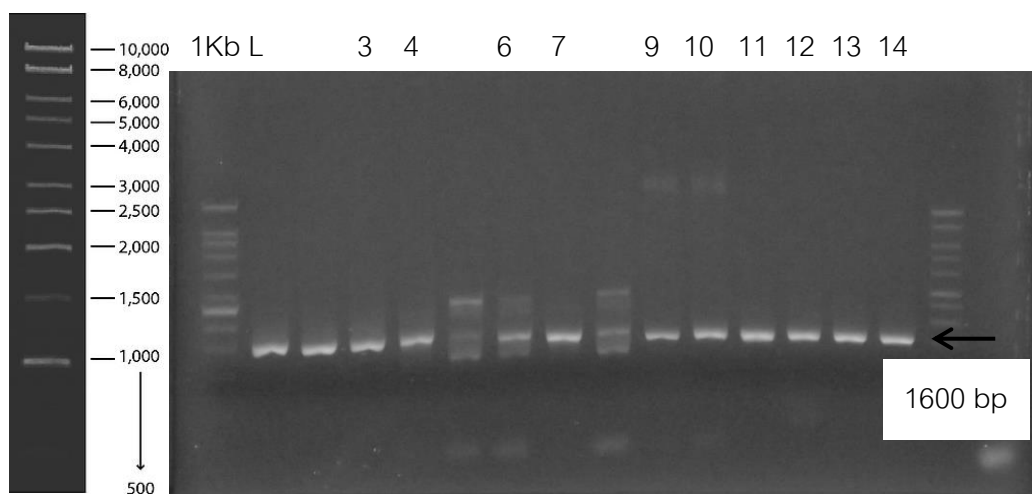
Oil / Free fatty acid (เปอร์เซ็นต์)	Lauric acid (12:0)	Myristic acid (14:0)	Palmitic acid (16:0)	Stearic acid (18:0)	Arachidic acid (20:0)	Behenic acid (22:0)	Palmitoleic acid (16:1)	Oleic acid (18:1)	Linoleic acid (18:2)	Linolenic acid (18:3)
น้ำมันเมล็ดฝ้าย	0	0	24.4	2.2	0	0	0.4	17.2	55	0.3
น้ำมันปาล์ม	0.59	0.96	38.67	3.32	0.23	0.02	0.11	45.45	10.87	0.2
น้ำมันงา	0	0	9.28	4.77	0.47	0.14	0.03	35.49	49.54	0.31
น้ำมันสบู่ดำ	0	0.38	16	8	0	0	1	42	33	0.8
น้ำมันข้าวโพด	0	0.02	13.17	2.46	0.37	0.13	0.11	35.19	47.97	0.61
น้ำมันมะกอก	0.03	0.02	11.37	2.58	0.21	0.01	0.63	80.46	4.17	0.56
น้ำมันรำข้าว	0.01	0.41	20.01	1.7	0.57	0.18	0.09	41.7	34.26	1.1
น้ำมันถั่วเหลือง	0.01	0.04	10.7	3.02	0.11	0.19	0.02	24.02	56.58	5.35
น้ำมันมะพร้าว	64.44	20.45	7.71	1.73	0.04	0	0.09	4.61	0.96	0
น้ำมันคาโนลา	0.06	0.07	4.65	1.64	0.93	0.26	0.13	65.93	21.16	5.16
น้ำมันเมล็ดทานตะวัน	0	0.08	6.59	3.14	0.15	0.43	0.09	22.43	66.2	0.92
น้ำมันดอกคำฝอย	0.02	0.11	6.44	2.2	0.2	0.15	0.06	14.13	76.57	0.15

(Winayanuwattikun และคณะ, 2008)

4.7 บ่งชี้ชนิดของจุลินทรีย์ชอบร้อน 10 สายพันธุ์ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดที่คัดแยกได้จากบ่อน้ำพุร้อนทางภาคเหนือของประเทศไทย ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

นำโคลนนี้เดี่ยวของแบคทีเรีย DK3-2 และ DK3-3 มาสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณ 16S rDNA fragment ตามวิธีของ Virunanon (2008) โดยใช้ Bacterial DNA Kit (Omega Bio-Tek, USA) เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ที่ถูกตัดในตำแหน่ง 27F (forward) 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' และ 1492R (reverse) 5'-ACCTTGTTACGACTT-3' (Gillan และคณะ, 1998) เพื่อนำไปใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน จากการตรวจสอบตัวอย่างที่ได้จากการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบตัวอย่างชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่มีขนาด 1600 คู่เบส ในเลนที่ 3, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13 และ 14 คือไอโซเลต DK3-2, DK3-3, VP6-3, SK2-3, JS3-4, BP2-1, SK2-1, DK2-4, VP4-1 และ VP6-1 ตามลำดับ ซึ่งเป็น 10 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการผลิตไลเปสได้สูงที่สุด 10 อันดับแรกจากการทดลองข้อ 4 ดังแสดงในภาพ (ภาพที่ 4.11)



ภาพที่ 4.11 แสดงชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาด 1600 กิโลเบสของ 16S rDNA เลขที่ 3 คือ DK3-2, เลขที่ 4 คือ DK3-3, เลขที่ 6 คือ VP6-3, เลขที่ 7 คือ SK2-3, เลขที่ 9 คือ JS3-4, เลขที่ 10 คือ BP2-1, เลขที่ 11 คือ SK2-1, เลขที่ 12 คือ DK2-4, เลขที่ 13 คือ VP4-1 และ เลขที่ 14 คือ VP6-1

จากนั้นทำการส่งชิ้นส่วน 16S rDNA ที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับเบสที่บริษัท แปซิฟิกไซน์ ประเทศไทย แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับ 16S rDNA ของแบคทีเรียในฐานข้อมูล GenBank database พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ดังตารางที่ 4.5

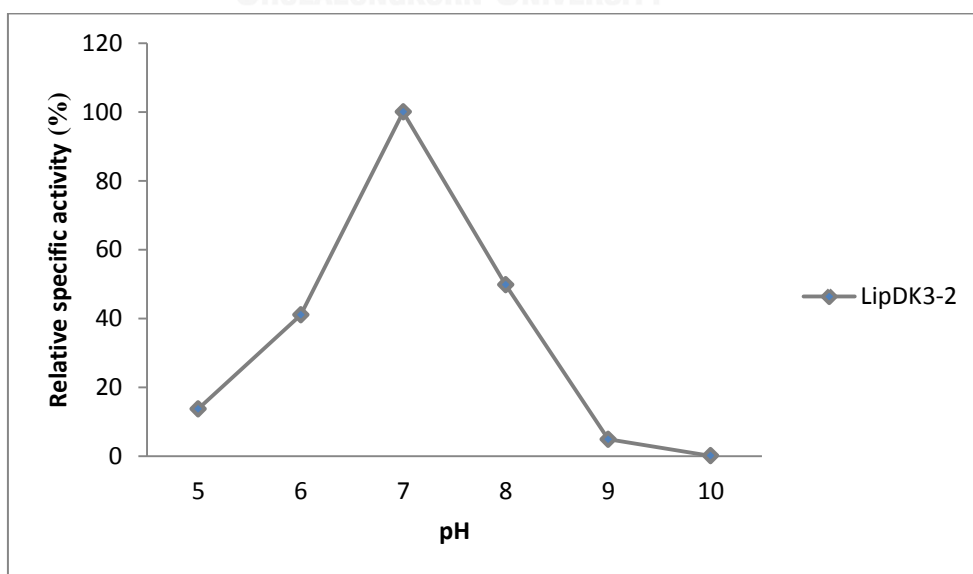
ตารางที่ 4.6 แสดงสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

รหัสชื่อ	Accession number	%ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ / สายพันธุ์
DK3-2	AJ864722.1	97% / <i>Pseudomonas boreopolis</i>
DK3-3	AB246809.1	96% / <i>Pseudomonas boreopolis</i>
VP6-3	KJ920926.1	97% / <i>Bacillus aerophilus</i>
SK2-3	HQ336645.1	98% / <i>Bacillus licheniformis</i>
JS3-4	KJ526848.1	95% / <i>Bacillus licheniformis</i>
BP2-1	HE804786.1	96% / <i>Bacillus licheniformis</i>
SK2-1	KF933672.1	99% / <i>Bacillus pumilus</i>
DK2-4	KC212003.1	96% / <i>Bacillus pumilus</i>
VP4-1	JN092822.1	97% / <i>Bacillus safensis</i>
VP6-1	JF775416.1	96% / <i>Bacillus subtilis</i>

4.8 การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ไลเพสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ชอบร้อนที่คัดเลือก

4.8.1 การศึกษาภาวะความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเพส

นำเอนไซม์หยาบจากแบคทีเรีย DK3-2 (LipDK3-2) มาทำการบ่มกับพารา-ไนโตรฟีนิลอะโรเรต ในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆที่มีค่าความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 5-10 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร ทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพส วัดปริมาณโปรตีน และคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากการทดลองเมื่อทดสอบค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเพส พบว่าค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมเท่ากับ 7 ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพสจำเพาะสูงที่สุด และทำการเทียบเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเพสจำเพาะจะลดลงเหลือ 49.84 ± 0.01 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการบ่มปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 และจะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพสจำเพาะ 41.05 ± 0.01 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพสจำเพาะจะลดลงอีกมีค่า 13.74 ± 0.18 เปอร์เซ็นต์เมื่อบ่มปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5 และจะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพสจำเพาะเหลือเพียง 4.95 ± 0.01 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มปฏิกิริยาที่ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 9 และจะไม่สามารถตรวจสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเพสจำเพาะได้เมื่อบ่มปฏิกิริยาที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 10 ดังแสดงในภาพ (ภาพที่ 4.12)

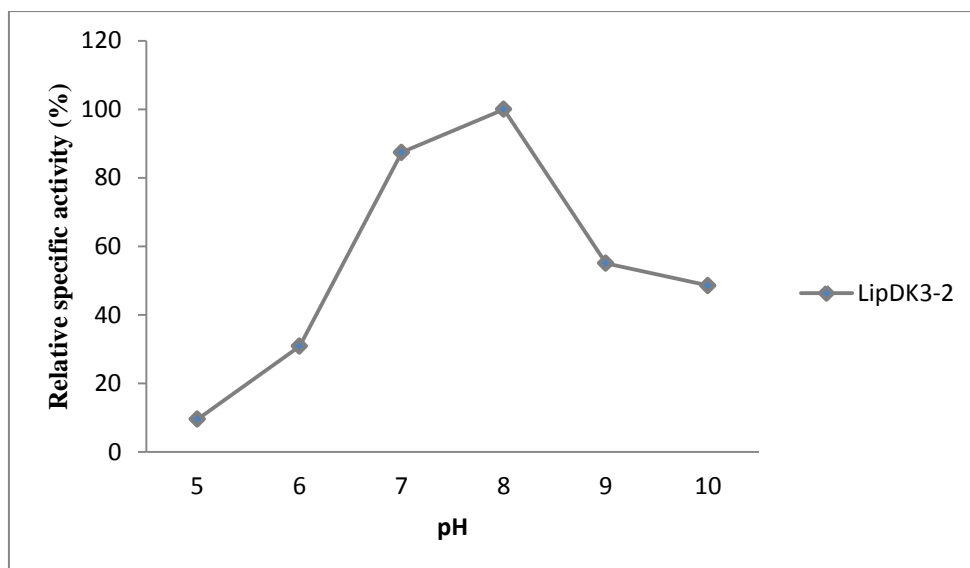


ภาพที่ 4.12 แสดงค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ LipDK3-2

สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Xing และคณะ (2013) พบว่ามีค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของ *Pseudomonas sp.* ZBC1 เท่ากับ 7 และจะลดลงเหลือ 82.5 เปอร์เซ็นต์เมื่อทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.5 Dosanjh และคณะ (2002) ทำการศึกษาค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสจาก *Bacillus sp.* พบว่ามีค่าความเป็นกรดต่างที่ดีที่สุดเท่ากับ 8 และมีความเสถียรที่ช่วงค่าความเป็นกรดต่าง 7.0-10.0

4.8.2 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสต่อค่าความเป็นกรดต่างต่างๆ

นำเอนไซม์ไลเปส LipDK3-2 มาบ่มในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่างต่างกันตั้งแต่ 5-10 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาบ่มกับพารา-ไนโตรฟีนีลรอเรตที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร ทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส วัดปริมาณโปรตีน และคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ การทดลองทำ 3 ซ้ำ จากการทดลองพบว่าไลเปส LipDK3-2 มีความคงตัวได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและทำการเทียบให้เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ โดยจะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะลดลงเหลือ 87.41 ± 0.08 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7 และจะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะเหลือ 55.05 ± 0.55 และ 48.55 ± 0.18 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อบ่มที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 9 และ 10 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะจะลดลงอีกเหลือ 30.84 ± 0.10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6 และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะจะลดลงเหลือเพียง 9.54 ± 0.12 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปบ่มที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 5 ดังแสดงในภาพ (ภาพที่ 4.13)



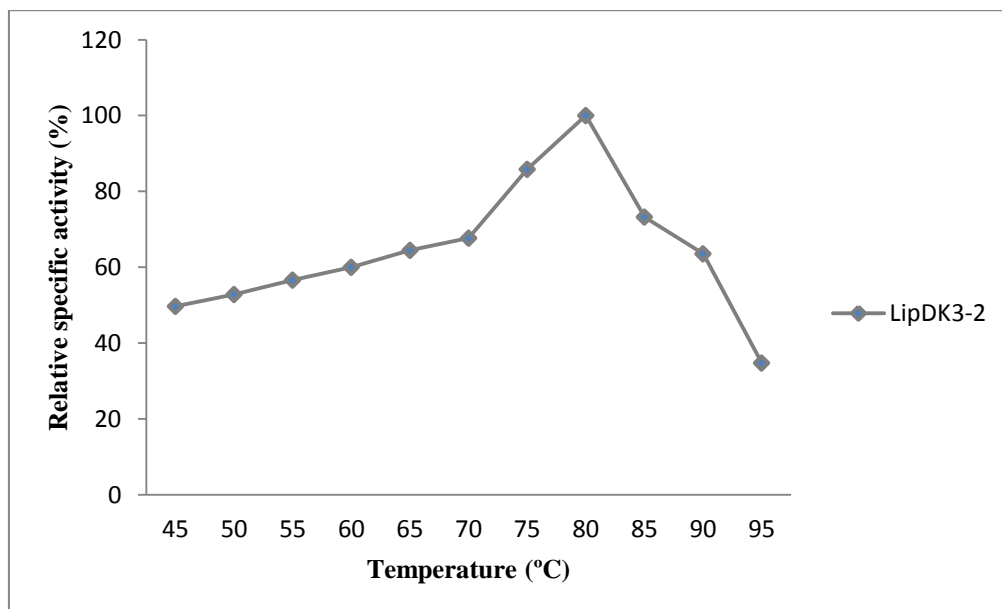
ภาพที่ 4.13 แสดงค่าความเสถียรของเอนไซม์ไลเปส LipDK3-2 ที่ค่าความเป็นกรดต่างต่างๆ

สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Xing และคณะ (2013) พบว่าไลเปสจาก *Pseudomonas sp.* ZBC1 มีค่าความเสถียรที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง Kumar และคณะ (2012) ได้ศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเป็นกรดต่างของ *Bacillus pumilus* RK31 พบว่ามีความเสถียรที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6 และค่ามากกว่าหรือน้อยกว่า 6 ค่าความเสถียรจะลดลงตามลำดับ

4.8.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

นำเอนไซม์ไลเปส LipDK3-2 มาทำการบ่มกับพารา-ไนโตรฟีนีลเรตในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่างที่ดีที่สุดคือ 7 เนื่องจากเอนไซม์สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้สูงที่สุดจากการทดลองข้างต้น ที่อุณหภูมิต่างกันตั้งแต่ 45-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส วัดปริมาณโปรตีน และคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากการทดลองพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปส LipDK3-2 มากที่สุดคือ 80 องศาเซลเซียส จะมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะสูงที่สุดและทำการเทียบเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจำเพาะจะลดลงเหลือ 84.17 ± 0.11 และ 73.21 ± 0.16 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิ 75 และ 85 องศาเซลเซียสตามลำดับ และค่า

กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะจะลดลงเหลือเพียง 34.71 ± 0.07 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพ (ภาพที่ 4.14)



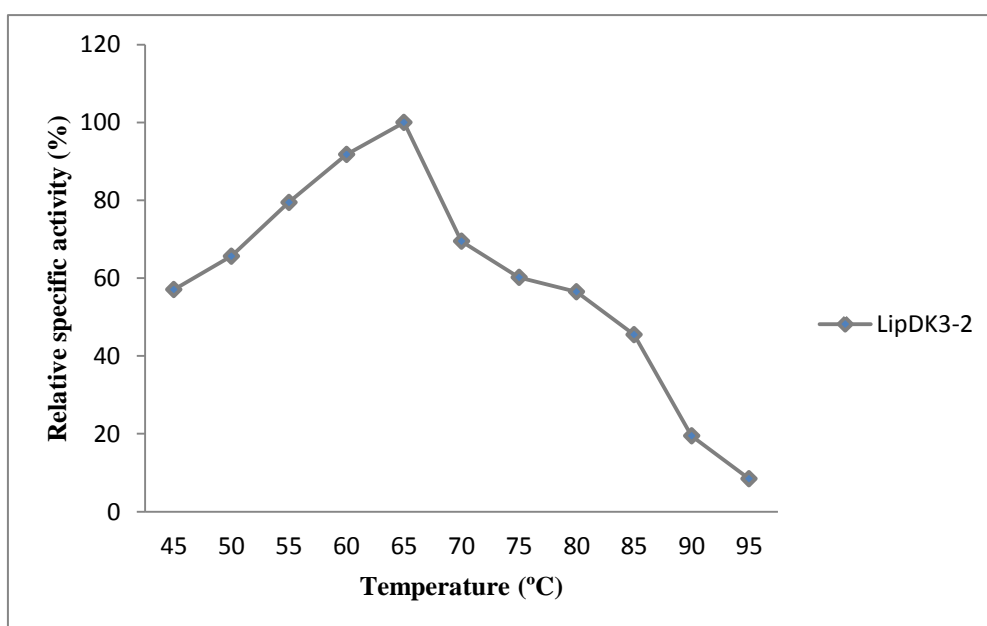
ภาพที่ 4.14 แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ LipDK3-2

สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Xing และคณะ (2013) พบว่าไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. ZBC1 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่ 80 องศาเซลเซียส แต่เอนไซม์ไลเปสจาก DK3-2 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสูงกว่า *Pseudomonas mendocina* M-37 จากการรายงานของ Dahiya และคณะ (2010) พบว่ามีอุณหภูมิที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยาที่ 50 องศาเซลเซียส รายงานของ Kumar และคณะ (2005) พบว่าใน *Bacillus* sp. ต่างสายพันธุ์จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมของการเกิดปฏิกิริยามากกว่า 55 องศาเซลเซียสขึ้นไป

4.8.4 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสต่ออุณหภูมิต่างๆ

นำเอนไซม์ไลเปส LipDK3-2 มาบ่มที่อุณหภูมิที่ต่างกันตั้งแต่ 45-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำเอนไซม์ไลเปสมาบ่มกับพารา-ไนโตรฟีนอลเรตในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 7 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้สูงที่สุด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส วัดปริมาณโปรตีน

และคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากการทดลองพบว่าไลเปส LipDK3-2 สามารถคงตัวได้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีและทำการเทียบเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะจะลดลงเหลือ 69.50 ± 0.03 , 56.50 ± 0.02 , 45.48 ± 0.04 และ 19.49 ± 0.01 เปอร์เซ็นต์ เมื่อต้มไลเปสที่อุณหภูมิ 70, 80, 85 และ 90 องศาเซลเซียส และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะจะลดลงเหลือเพียง 8.47 ± 0.03 เปอร์เซ็นต์ เมื่อต้มไลเปสที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพ (ภาพที่ 4.15)



ภาพที่ 4.15 แสดงค่าความเสถียรของไลเปส LipDK3-2 ที่อุณหภูมิต่างๆ

สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Litthauer และคณะ (2002) พบว่าไลเปสจาก *Pseudomonas luteola* มีความเสถียรได้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และพบว่า DK3-2 มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงกว่า *Burkholderia cepacia* ATCC25416 เนื่องจาก Wang และคณะ (2009) รายงานว่ามีความเสถียรเพียง 60 องศาเซลเซียส

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

การคัดเลือกจุลินทรีย์จากตัวอย่างตะกอนดิน 31 ตัวอย่างและตัวอย่างน้ำ 13 ตัวอย่างที่เก็บจากบ่อน้ำพุร้อนทางภาคเหนือของประเทศไทย จำนวนทั้งสิ้น 44 ตัวอย่าง สามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ชอบร้อนที่สามารถผลิตเอสเทอร์เรสได้ทั้งสิ้น 23 ไอโซเลต โดยพบว่าทั้ง 23 ไอโซเลตมีความสามารถผลิตไลเปสได้ ทำการจดจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ลิโพลติกชอบร้อนพบว่าทั้ง 23 ไอโซเลตเป็นแบคทีเรียทั้งหมด เมื่อนำแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยกได้มาเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตไลเปสพบว่าแบคทีเรียไอโซเลต DK3-2 และ DK3-3 มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้สูงที่สุดสองอันดับแรกมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะ 2.34 ± 0.05 และ 2.15 ± 0.02 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ จึงเลือกทั้งสองไอโซเลตมาทำการศึกษาเปรียบเทียบกัน

จากการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปส พบว่า DK3-2 และ DK3-3 สามารถผลิตไลเปสได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสและสามารถทนร้อนได้ถึงช่วง 60-65 องศาเซลเซียส มีค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสในอาหารเลี้ยงเชื้อ 7.0 ที่เวลา 24 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจำเพาะเท่ากับ 3.59 ± 0.06 และ 3.49 ± 0.05 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ ทำการศึกษาแหล่งคาร์บอนเหนี่ยวนำในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตไลเปสของแบคทีเรียไอโซเลต DK3-2 และ DK3-3 โดยการแทนที่น้ำมันปาล์มด้วยน้ำมันชนิดต่างๆ พบว่าสามารถผลิตไลเปสได้ดีที่สุดเมื่อมีน้ำมันรำข้าวเป็นสารเหนี่ยวนำซึ่งมีกรดโอเลอิกสูงเป็นส่วนประกอบทำให้เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์ได้มากขึ้น มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 6.16 ± 0.02 และ 5.86 ± 0.09 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ เมื่อทำการส่งวิเคราะห์หาลำดับเบสแล้วนำผลที่ได้มาเทียบกับ 16S rDNA ของแบคทีเรียในฐานข้อมูล GenBank database พบว่าทั้ง DK3-2 และ DK3-3 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณยีน 16S rDNA คล้ายคลึงกัน 97 และ 96 เปอร์เซ็นต์มีเลข Accession number AJ864722.1 และ AB246809.1 ตามลำดับคล้ายกับ *Pseudomonas boreopolis*

เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas boreopolis* มีภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่าง 7.0 โดยมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที และที่ความเป็นกรดต่าง 8.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

รายการอ้างอิง

Uncategorized References

- Akanbi, T. O., Kamaruzaman, A. L., Abu Bakar, F., Sheikh, A., Radu, S., and Abdul, M. 2010. Highly thermostable extracellular lipase-producing *Bacillus* strain isolated from a Malaysian hot spring and identified using 16S rRNA gene sequencing. *International Food Research Journal*. 17(1): 45-53.
- Anderson, E. M., Larsson, K. M., and Kirk, O. 1998. One biocatalyst-many applications: the use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation*. 16(3): 181-204.
- Arai, H., Koizumi, H., Aoki, J., and Inoue, K. 2002. Platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH). *Journal of biochemistry*. 131(5): 635-640.
- Bora, L., and Kalita, M. 2007. Production and optimization of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. LBN 4. *The Internet Journal of Microbiology*. 4(1).
- Bornscheuer, U. T. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS microbiology reviews*. 26(1): 73-81.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72(1): 248-254.
- Brock, T. D., and Brock, T. D. (1986). *Thermophiles: general, molecular, and applied microbiology*. Wiley New York.
- Dahiya, P., Arora, P., Chaudhury, A., Chand, S., and Dilbaghi, N. 2010. Characterization of an extracellular alkaline lipase from *Pseudomonas mendocina* M-37. *Journal of basic microbiology*. 50(5): 420-426.

- Deive, F. J., Álvarez, M. S., Morán, P., Sanromán, M. Á., and Longo, M. A. 2012. A process for extracellular thermostable lipase production by a novel *Bacillus thermoamylovorans* strain. *Bioprocess and biosystems engineering*. 35(6): 931-941.
- Deive, F. J., Álvarez, M. S., Sanromán, M. A., and Longo, M. A. 2013. North Western Spain hot springs are a source of lipolytic enzyme-producing thermophilic microorganisms. *Bioprocess and biosystems engineering*. 36(2): 239-250.
- Deive, F. J., Angeles Sanromán, M., and Longo, M. A. 2009. Evaluation of a novel *Bacillus* strain from a north-western Spain hot spring as a source of extracellular thermostable lipase. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 84(10): 1509-1515.
- Dosanjh, N. S., and Kaur, J. 2002. Biochemical Analysis of a Native and Proteolytic Fragment of a High-Molecular-Weight Thermostable Lipase from a Mesophilic *Bacillus* sp. *Protein expression and purification*. 24(1): 71-75.
- Gandhi, N. N., Patil, N. S., Sawant, S. B., Joshi, J. B., Wangikar, P. P., and Mukesh, D. 2000. Lipase-catalyzed esterification. *Catalysis Reviews*. 42(4): 439-480.
- Gillan, D. C., Speksnijder, A. G., Zwart, G., and De Ridder, C. 1998. Genetic Diversity of the Biofilm Covering *Montacuta ferruginosa* (Mollusca, Bivalvia) as Evaluated by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis and Cloning of PCR-Amplified Gene Fragments Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(9): 3464-3472.
- Gupta, R., Saroop, J., and Jain, S. 2004. Effect of cultural and assay conditions on cell bound lipase from a bacterial isolate SJ-15. *Asian J Microbiol Biotechnol Environ Sci*. 6: 151-154.
- Hamid, N. S. A., Zen, H. B., Tein, O. B., Halifah, Y. M., Saari, N., and Bakar, F. A. 2003. Screening and identification of extracellular lipase-producing thermophilic bacteria from a Malaysian hot spring. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19(9): 961-968.

- Kanwar, S., Ghazi, I., Chimni, S., Joshi, G., Rao, G., Kaushal, R., Gupta, R., and Punj, V. 2006. Purification and properties of a novel extra-cellular thermotolerant metalloproteinase of *Bacillus coagulans* MTCC-6375 isolate. *Protein expression and purification*. 46(2): 421-428.
- Kikani, B., Shukla, R., and Singh, S. 2010. Biocatalytic potential of thermophilic bacteria and actinomycetes. *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*. 2: 1000-1007.
- Kim, H.-K., Park, S.-Y., Lee, J.-K., and Oh, T.-K. 1998. Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 62(1): 66-71.
- Kojima, Y., Yokoe, M., and Mase, T. 1994. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* AK102. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 58(9): 1564-1568.
- Kumar, D., Kumar, L., Nagar, S., Raina, C., Parshad, R., and Gupta, V. K. 2012. Screening, isolation and production of lipase/esterase producing *Bacillus* sp. strain DVL2 and its potential evaluation in esterification and resolution reactions. *Arch Appl Sci Res*. 4: 1763-1770.
- Kumar, R., Sharma, A., Kumar, A., and Singh, D. 2012. Lipase from *Bacillus pumilus* RK31: production, purification and some properties. *World Appl Sci J*. 16(7): 940-948.
- Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S. S., and Gupta, R. 2005. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression and Purification*. 41(1): 38-44.
- Lee, D. W., Koh, Y. S., Kim, K. J., Kim, B. C., Choi, H. J., Kim, D. S., Suhartono, M. T., and Pyun, Y. R. 1999. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiology Letters*. 179(2): 393-400.
- Li, H., and Zhang, X. 2005. Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1. *Protein expression and purification*. 42(1): 153-159.

- Litthauer, D., Ginster, A., and van Eeden Skein, E. 2002. *Pseudomonas luteola* lipase: a new member of the 320-residue *Pseudomonas* lipase family. *Enzyme and microbial technology*. 30(2): 209-215.
- Lynn, D. J., Singer, G. A., and Hickey, D. A. 2002. Synonymous codon usage is subject to selection in thermophilic bacteria. *Nucleic acids research*. 30(19): 4272-4277.
- Marini, A., Imelio, N., Marini, S., Romanini, D., and Farruggia, B. 2012. Extraction of lipase from *Aspergillus niger* by insoluble complex formation with anionic and cationic polyelectrolytes. *Process Biochemistry*. 47(12): 2234-2239.
- Masse, L., Kennedy, K., and Chou, S. 2001. Testing of alkaline and enzymatic hydrolysis pretreatments for fat particles in slaughterhouse wastewater. *Bioresource Technology*. 77(2): 145-155.
- May, C. Y., and Nesaretnam, K. 2014. Research advancements in palm oil nutrition. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 116(10): 1301-1315.
- Mehta, A., Kumar, R., and Gupta, R. 2012. Isolation of lipase producing thermophilic bacteria: optimization of production and reaction conditions for lipase from *Geobacillus* sp. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*. 59(4): 435-450.
- Mohan, T. S., Palavesam, A., and Immanuel, G. 2008. Isolation and characterization of lipase-producing *Bacillus* strains from oil mill waste. *African journal of Biotechnology*. 7(15).
- Narwal, S. K., and Gupta, R. 2013. Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase. *Biotechnology letters*. 35(4): 479-490.
- Nawani, N., and Kaur, J. 2000. Purification, characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33. *Molecular and cellular biochemistry*. 206(1-2): 91-96.
- Nawani, N., Khurana, J., and Kaur, J. 2006. A thermostable lipolytic enzyme from a thermophilic *Bacillus* sp.: purification and characterization. *Molecular and cellular biochemistry*. 290(1-2): 17-22.

- Nguyen, L. N., Dao, T. T., Živković, T., Fehrholz, M., Schäfer, W., and Salomon, S. 2010. Enzymatic properties and expression patterns of five extracellular lipases of *Fusarium graminearum* in vitro. *Enzyme and microbial technology*. 46(6): 479-486.
- Papaparaskevas, D., Christakopoulos, P., Kekos, D., and Macris, B. J. 1992. Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*. *Biotechnology Letters*. 14(5): 397-402.
- Rabbani, M., Bagherinejad, M. R., Sadeghi, H. M., Shariat, Z. S., Etemadifar, Z., Moazen, F., Rahbari, M., Mafakher, L., and Zaghian, S. 2013. Isolation and characterization of novel thermophilic lipase-secreting bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44(4): 1113-1119.
- Samad, M. Y. A., Razak, C., Salleh, A. B., Zin Wan Yunus, W., Ampon, K., and Basri, M. 1989. A plate assay for primary screening of lipase activity. *Journal of microbiological methods*. 9(1): 51-56.
- Schmid, R. D., and Verger, R. 1998. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie International Edition*. 37(12): 1608-1633.
- Sharma, R., Soni, S., Vohra, R., Gupta, L., and Gupta, J. 2002. Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RJSJ-1. *Process Biochemistry*. 37(10): 1075-1084.
- Tao, W., Lee, M., Wu, J., Kim, N., and Lee, S.-W. 2011. Isolation and characterization of a family VII esterase derived from alluvial soil metagenomic library. *J Microbiol*. 49(2): 178-185.
- Virunanon, C., Chantaropamai, S., Denduangbaripant, J., and Chulalaksananukul, W. 2008. Solventogenic-cellulolytic clostridia from 4-step-screening process in agricultural waste and cow intestinal tract. *Anaerobe*. 14(2): 109-117.
- Wang, X., Yu, X., and Xu, Y. 2009. Homologous expression, purification and characterization of a novel high-alkaline and thermal stable lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. *Enzyme and microbial technology*. 45(2): 94-102.

- Wang, Y., Srivastava, K. C., Shen, G.-J., and Wang, H. Y. 1995. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus*, strain A30-1 (ATCC 53841). *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 79(5): 433-438.
- Winayanuwattikun, P., Kaewpiboon, C., Piriyananon, K., Chulalaksananukul, W., Yongvanich, T., and Svasti, J. 2013. Immobilized lipase from potential lipolytic microbes for catalyzing biodiesel production using palm oil as feedstock. *African Journal of Biotechnology*. 10(9): 1666-1673.
- Winayanuwattikun, P., Kaewpiboon, C., Piriyananon, K., Tantong, S., Thakernkarakit, W., Chulalaksananukul, W., and Yongvanich, T. 2008. Potential plant oil feedstock for lipase-catalyzed biodiesel production in Thailand. *Biomass and Bioenergy*. 32(12): 1279-1286.
- Xing, C., You-guang, P., Chen-xi, Z., Zhi-lin, R., Ming-xing, J., Yan, C., and Bu-chang, Z. 2013. Screening of thermophilic neutral lipase-producing *Pseudomonas* sp. ZBC1 and improving its enzymatic activity. *African Journal of Biotechnology*. 12(9): 949-957.
- ธนธร วิทิตสานต์ .2553. การสังเคราะห์ซูการ์แฟตตีแอซิดเอสเทอร์และเมทิลเอสเทอร์ด้วยไลเพส จากยีสต์ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย(มหาบัณฑิตวิทยานิพนธ์ปริญญา) ., จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, คณะวิทยาศาสตร์ .



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. เชื้อแบคทีเรีย

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง (NA; nutrient agar)

เนื้อสกัด (beef extract)	3	กรัม
เปปโตเน (peptone)	5	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ โดย ความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (NB; nutrient broth)

เนื้อสกัด (beef extract)	3	กรัม
เปปโตเน (peptone)	5	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ โดย ความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับการผลิตไลเฟส

แบคโต-ทริปโตเน (Bacto-tryptone)	10	กรัม
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	3	กรัม
เนื้อสกัด (Beef extract)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH ₂ PO ₄)	7	กรัม
น้ำกลั่น	800	กรัม
น้ำมันปาล์ม	1	%(v/v)

ปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ โดย ความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. เชื้อยีสต์และรา

อาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง (YM; Yeast malt extract)

ยีสต์สกัด (Yeast extract)	3	กรัม
มอลต์สกัด (malt extract)	5	กรัม
เปปโตน (peptone)	5	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	10	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ โดย ความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารไตรบิวไทริน (tributylin)

ทริบโตน (tryptone)	10	กรัม
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	3	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม
ไตรบิวไทริน	5	มิลลิลิตร
กรัมอะราบิก (gum arabic)	5	กรัม

นำกรัมอะราบิกและไตรบิวไทรินผสมลงในน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร นำไป sonitcation เป็น เวลา 45 นาทีก่อนนำมารวมกับส่วนประกอบที่เหลือ จากนั้นปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรสุดท้าย เป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ โดยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารโรดามีน บี (Rhodamine B)

ทริปโตน (tryptone)	10	กรัม
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	3	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม
เนื้อสกัด (Beef extract)	5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	7	กรัม
น้ำกลั่น	800	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม

10%(v/v) Palm oil emulsion เตรียมใน

10%(w/v) Gum Arabic solution

โรดามีน บี (Rhodamine B) 0.001%(w/v)

ปรับ pH เป็น 7.0 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ โดยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
วิธีการเตรียมสารเคมี

1. สารสำหรับตรวจวัดค่ากิจกรรมของไลเปส

1.1 ปริมาณของสารและเอนไซม์ ในปฏิกิริยา

25 มิลลิโมลาร์ พารา-ไนโตรฟีนิลลอเรต (*p*-nitrophenyl laurate: C₁₂, pNPL)

50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH7 650 มิลลิลิตร

เอนไซม์ไลเปส 250 มิลลิลิตร

1.2 บัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ

1.2.1 50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 5 1 ลิตร

50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมซิเตรท (Na₃(C₆H₅O₇)) 410 มิลลิลิตร

50 มิลลิโมลาร์ กรดซิตริก (C₆H₈O₇) 590 มิลลิลิตร

1.2.2 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6 1 ลิตร

50 มิลลิโมลาร์ มอนอโซเดียมฟอสเฟต (NaH₂PO₄) 880 มิลลิลิตร

50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตะไฮเดรต (Na₂HPO₄·7H₂O) 120 มิลลิลิตร

1.2.3 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 1 ลิตร

50 มิลลิโมลาร์ มอนอโซเดียมฟอสเฟต (NaH₂PO₄) 424 มิลลิลิตร

50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตะไฮเดรต (Na₂HPO₄·7H₂O) 578 มิลลิลิตร

1.2.4 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 1 ลิตร

50 มิลลิโมลาร์ ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH₂PO₄·H₂O) 68 มิลลิลิตร

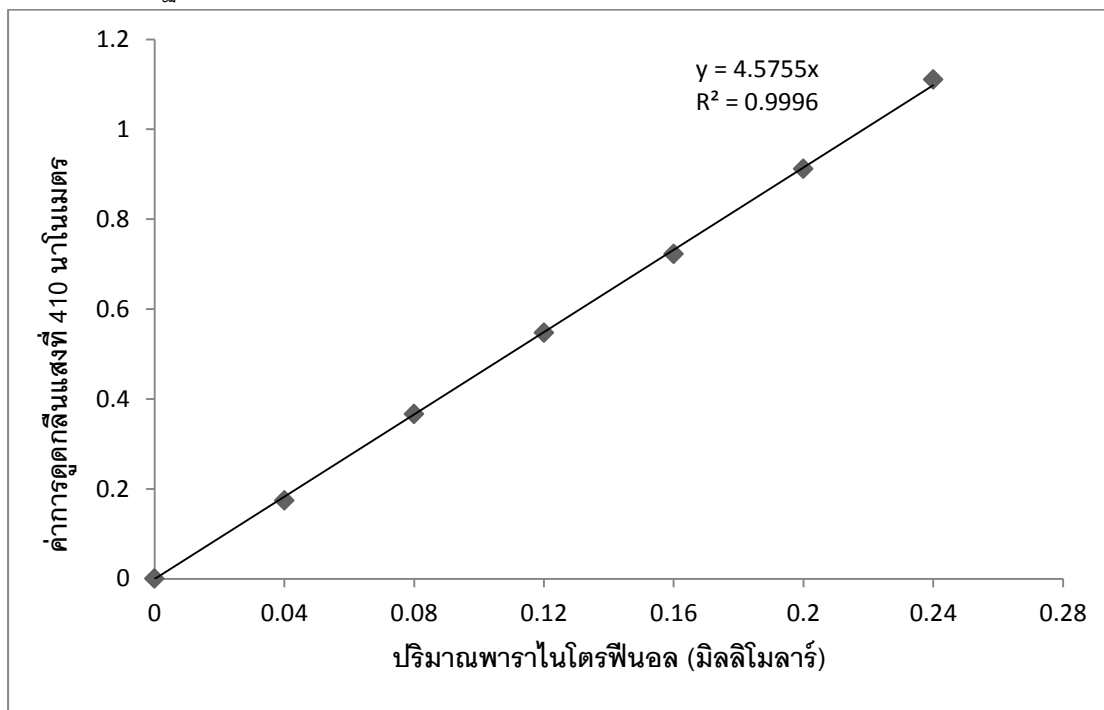
50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตะไฮเดรต (Na₂HPO₄·7H₂O) 932 มิลลิลิตร

1.2.5 50 มิลลิโมลาร์ ไกลซีนบัฟเฟอร์ pH9 1 ลิตร

50 มิลลิโมลาร์ ไกลซีน ($C_2H_5NO_2$)	625	มิลลิลิตร
50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	352	มิลลิลิตร
1.2.6 50 มิลลิโมลาร์ ไกลซีนบัฟเฟอร์ pH 10	1	ลิตร
50 มิลลิโมลาร์ ไกลซีน ($C_2H_5NO_2$)	628	มิลลิลิตร
50 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	352	มิลลิลิตร
2. สารละลายพาราไนโตรฟินอลสำหรับกราฟมาตรฐาน		
พาราไนโตรฟินอล (<i>p</i> -nitrophenol, <i>p</i> NP)	0.2	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1	มิลลิลิตร
3. สารละลายโบวีนซีรัมอัลบูมินสำหรับตรวจวัดปริมาณโปรตีนใช้ทำกราฟมาตรฐาน		
โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA)	2	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น (distilled water)	1	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของสารละลายพาราไนโตรฟินอลสำหรับใช้คำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส



ภาพที่ ค-1 กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอล ปริมาณ 0-0.30 มิลลิโมลาร์

วิธีสร้างกราฟมาตรฐานของสารละลายพาราไนโตรฟินอล

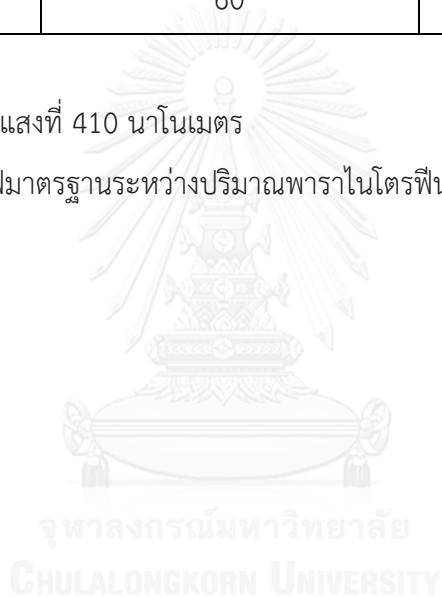
1. เตรียมสารละลายพาราไนโตรฟินอล 10 มิลลิโมลาร์ โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย
2. ปิเปตสารละลายพาราไนโตรฟินอล จากข้อ 1 น้ำกลั่น และ 50 มิลลิโมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

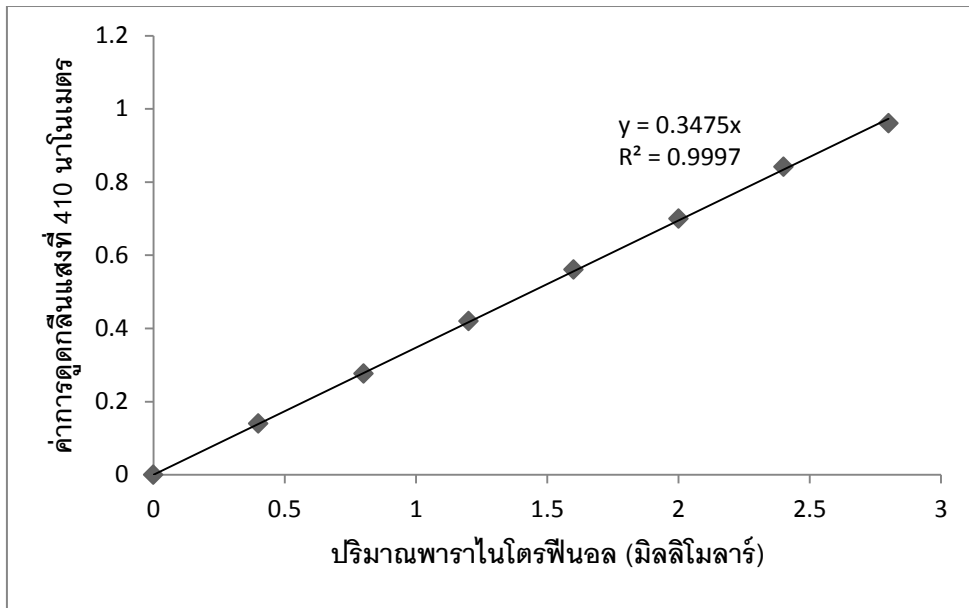
ความเป็นกรดต่าง 7.0 ลงในหลุม microplate ดังตารางด้านล่าง

ตารางที่ ค-1 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอล 0-0.24 มิลลิโมลลาร์

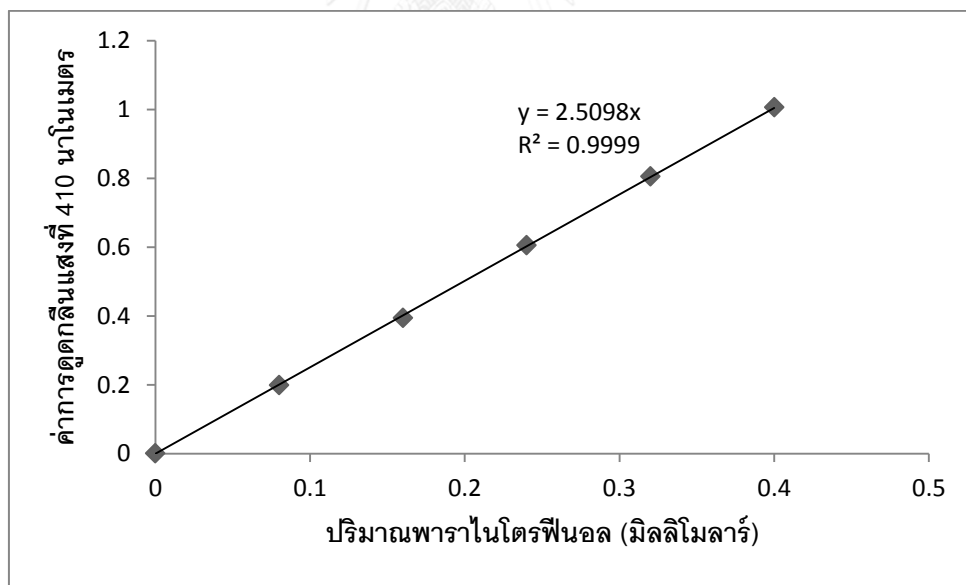
พาราไนโตรฟินอล (มิลลิโมลลาร์)	สารละลายพาราไนโตรฟินอล (ไมโครลิตร)	50 มิลลิโมลลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 (ไมโครลิตร)
0.04	10	490
0.08	20	480
0.12	30	470
0.16	40	460
0.20	50	450
0.24	60	440

3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร
4. นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณพาราไนโตรฟินอลและค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร

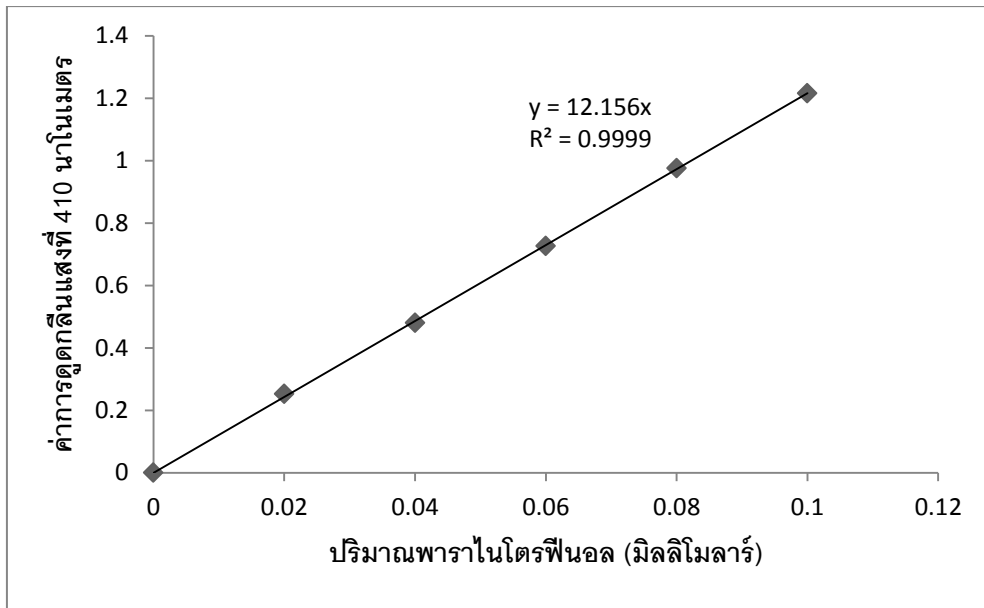




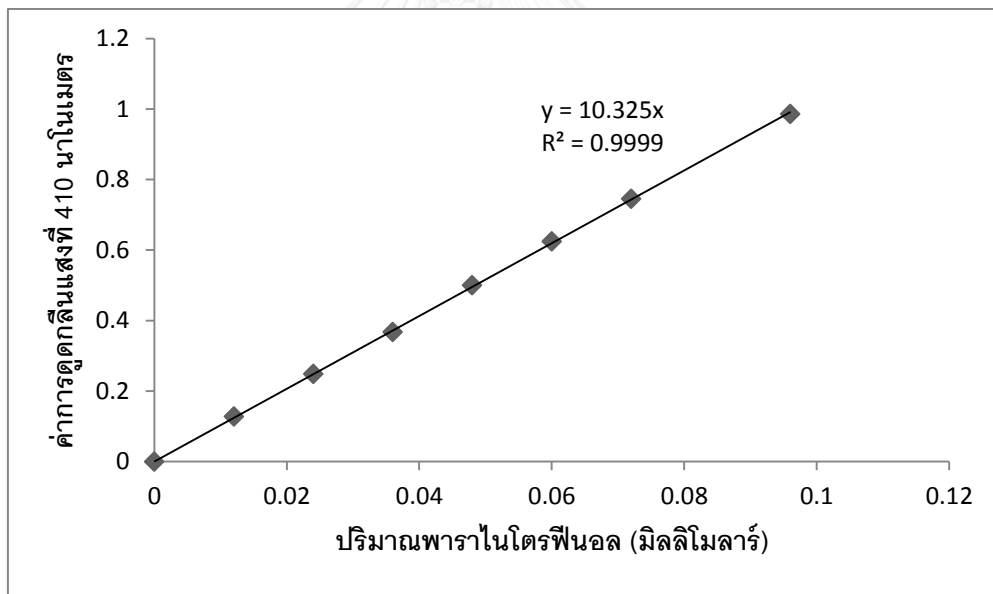
ภาพที่ ค-2 กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอลในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 5.0



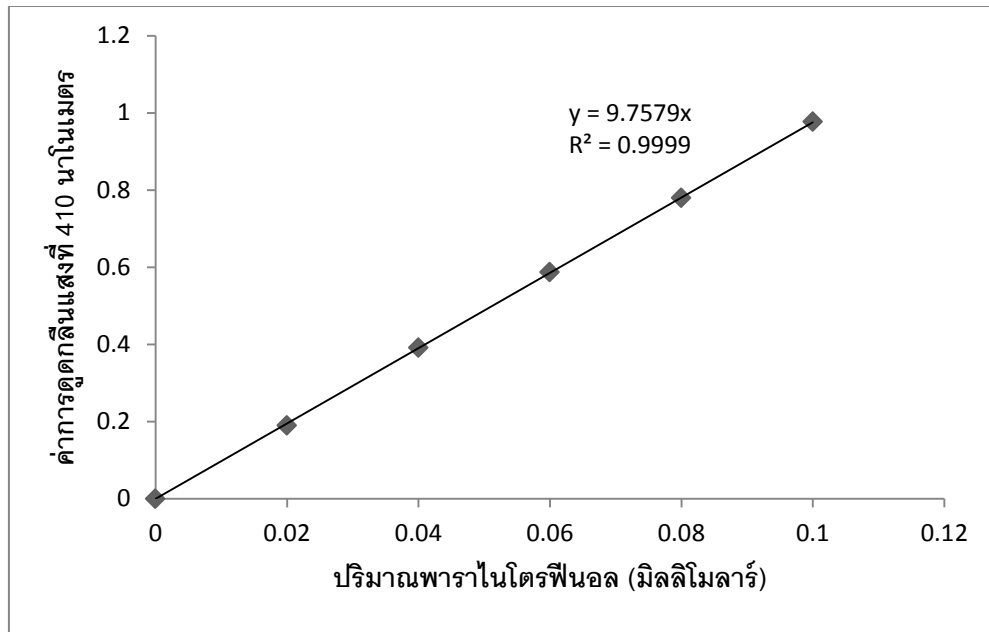
ภาพที่ ค-3 กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอลในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 6.0



ภาพที่ ค-4 กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอลในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 8.0

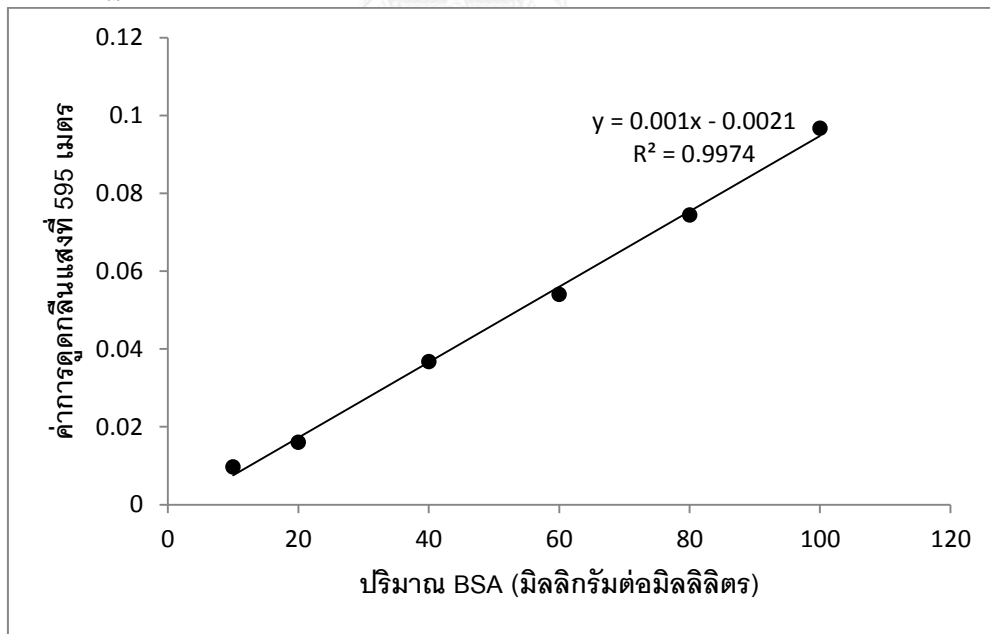


ภาพที่ ค-5 กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอลในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 9.0



ภาพที่ ค-6 กราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟินอลในบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดต่าง 10.0

2. กราฟมาตรฐานของ BSA สำหรับใช้คำนวณปริมาณโปรตีน



ภาพที่ ค-7 กราฟมาตรฐาน BSA ที่ปริมาณโปรตีน 0-25 ไมโครกรัม

วิธีสร้างกราฟมาตรฐานของโปรตีนสารละลาย BSA

- เตรียมสารละลายมาตรฐาน Bovine Serum Albumin 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ น้ำกลั่น เป็นตัวทำละลาย
- ปิเปตสารละลายมาตรฐาน BSA ลงใน tube ตามตารางด้านล่าง

ตารางที่ ค-2 ปริมาณสารที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐานของ BSA 0-25 ไมโครกรัม

ปริมาณ BSA (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของ สารละลาย BSA	สารละลาย BSA (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)
25	2mg/ml	10	790
20	2mg/ml	10	990
15	2mg/ml	6	794
10	20 μ g/ml	500	500
5	10 μ g/ml	500	500
2.5	5 μ g/ml	500	500
0	-	-	1000

- เติมสารละลายมาตรฐาน BSA ลงใน microplate well 5 ไมโครลิตร
- เติมสารละลาย Bradford reagent 250 ไมโครลิตร
- บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที
- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร
- นำข้อมูลที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร และปริมาณโปรตีน มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ภาคผนวก ง การคำนวณ

1. การคำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเพส (total activity)

จากกราฟมาตรฐานของสารละลายพาราไนโตรฟินอล จะได้สมการเส้นตรง $Y = ax + c$

Y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร

X คือ ปริมาณพาราไนโตรฟินอล (มิลลิโมลาร์)

A คือ ค่าความชันของสมการ

1.1 จากการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร ซึ่งคือค่า y ในสมการ สามารถหาปริมาณพาราไนโตรฟินอลได้ โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรที่ได้จากการวัดแทนลงในสมการ และย้ายข้างสมการเพื่อหาปริมาณพาราไนโตรฟินอล (แกน X) จะได้ค่าปริมาณพาราไนโตรฟินอลในหน่วย มิลลิโมลาร์

1.2 ทำการเปลี่ยนปริมาณพาราไนโตรฟินอลในหน่วยมิลลิโมลาร์ เป็นหน่วยไมโครโมลในปริมาตรที่ทำการปฏิกิริยา 1 มิลลิลิตร

1.3 หาปริมาณพาราไนโตรฟินอลที่ถูกปลดปล่อยออกมาเมื่อใช้เอนไซม์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยเอาปริมาตรเอนไซม์ 1 มิลลิลิตรหารด้วยปริมาตรเอนไซม์ที่ใช้จริงในปฏิกิริยา คือ 1 มิลลิลิตร / 0.25 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปคูณกับค่าปริมาณพาราไนโตรฟินอล ในข้อ 2

1.4 หาปริมาณพาราไนโตรฟินอลที่ถูกปลดปล่อยออกมาใน 1 นาที โดยนำปริมาณพาราไนโตรฟินอลเมื่อใช้เอนไซม์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาหารด้วยเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาจะได้หน่วยสุดท้ายเป็น ไมโครโมล / 1 มิลลิลิตร/นาที หรือยูนิตต่อมิลลิลิตร

1 ยูนิตในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ไลเพส คือ 1 ไมโครโมลของพาราไนโตรฟินอลที่ถูกปล่อยออกมาจากการไฮโดรไลซิสพาราไนโตรฟินอลลอเรตโดยใช้เอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ภายใต้อุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส

2. การคำนวณปริมาณโปรตีน (total protein)

จากกราฟมาตรฐานของBSA

จะได้สมการเส้นตรง $Y = ax + c$

Y คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร

X คือ ปริมาณ BSA (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

A คือ ค่าความชันของสมการ

2.1 จากการวัดปริมาณโปรตีน โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ซึ่งคือค่า y ในสมการ สามารถหาปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในแอนไซม์ โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตรที่ได้จากการวัดแทนลงในสมการ และย้ายข้างสมการเพื่อหาปริมาณโปรตีน (แกนX) จะได้ค่าปริมาณโปรตีนในหน่วย มิลลิกรัม/มิลลิลิตร



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว สุชুমล กิตติวิสาร เกิดวันที่ 3 กันยายน 2529 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในปีการศึกษา 2552 จากนั้นเข้าศึกษาระดับปริญญาโท วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553 และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2557 ได้เผยแพร่ผลงานวิจัยบางส่วนใน การประชุมวิชาการด้านเทคโนโลยีชีวภาพระดับนานาชาติ ในงาน The International Bioscience Conference and the 5th Joint International PSU-UNS Bioscience Conference 2014 (IBSC 2014) ที่โรงแรมภูเก็ตแกรนด์รีสอร์ท & สปา จังหวัดภูเก็ต จัด โดยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ระหว่างวันที่ 29-30 กันยายน 2557 ในหัวข้อเรื่อง Screening of lipase-producing thermophilic bacteria from hot springs in northern Thailand