การผลิตและลักษณะสมบัติของไลเพสจาก *Candida rugosa* และการประยุกต์ในการบำบัดน้ำเสีย

นางสาวภัทรพรรณ ธนพงศ์

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 2558

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF LIPASE FROM *Candida rugosa* AND APPLICATI

ON IN WASTEWATER TREATMENT

Miss Phattrapan Tanapong

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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 2015
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตและลักษณะสมบัติของไลเพสจาก *Candida rugosa* และการประยุกต์ในการบำบัดน้ำเสีย
โดย	นางสาวภัทรพรรณ ธนพงค์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกทิพย์ ภักดีบำรุง)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชมภูนุช กลิ่นวงษ์)

....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร.เฉลิมชัย เรืองชัยนิคม)

ภัทรพรรณ ธนพงค์ : การผลิตและลักษณะสมบัติของไลเพสจาก *Candida rugosa* และการประยุกต์ในการบำบัดน้ำเสีย (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF LIPASE FROM *Candida rugosa* AND APPLICATION IN WASTEWATER TREATMENT) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล, 65 หน้า.

ในการศึกษาครั้งนี้ได้หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไลเพสจาก *Candida rugosa* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมประกอบด้วย น้ำมันเมล็ดฝ้ายความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร กากน้ำตาลความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร และยีสต์สกัดความเข้มข้น 1.55% เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ให้ค่าแอกทิวิตีของไลเพสสูงที่สุดเท่ากับ 22.74 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยใช้พาราไนโตรฟีนิลบิวทิเรตเป็นสารตั้งต้นในการวัดแอกทิวิตี จากงานวิจัยนี้สามารถพัฒนาการผลิตไลเพสได้มากถึง 7.3 เท่าเมื่อเทียบกับสูตรอาหารดั้งเดิม จากการศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของไลเพสหยาบ แอกทิวิตีที่ได้มีค่าสูงที่สุดที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 และมีความเสถียรของความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 เช่นกัน โดยมีค่าแอกทิวิตีคงเหลือ 89 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเพสเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส และมีความเสถียรของอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส โดยมีค่าแอกทิวิตีคงเหลือ 53 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง เมื่อนำไลเพสหยาบความเข้มข้น 2.5-20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร มาทดสอบประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันปาล์มปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ในน้ำเสียสังเคราะห์ พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สามารถกำจัดน้ำมันได้ถึง 99.17 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและเมื่อนำไลเพสความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร มาทดสอบการย่อยน้ำมันในน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันปาล์ม พบว่าไลเพสสามารถย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้อย่างสมบูรณ์ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง ไลเพสสามารถลดค่าซีโอดีได้ถึง 80.81% เมื่อทำการทดลองเป็นเวลา 14 วัน จากผลการศึกษาในข้างต้นแสดงถึงศักยภาพของไลเพสที่เป็นทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนน้ำมันอย่างเช่นน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันปาล์ม

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ	ลายมือชื่อนิสิต ....
ปีการศึกษา 2558	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก ....

5672045023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEYWORDS: CANDIDA RUGOSA / LIPASE / WASTEWATER

PHATTRAPAN TANAPONG: PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF LIPASE FROM *Candida rugosa* AND APPLICATION IN WASTEWATER TREATMENT. ADVISOR: ASSOC. PROF.WARAWUT CHULALAKSANANUKUL, Ph.D., 65 pp.

In this study, optimization conditions for lipase production from *Candida rugosa* in submerged culture were investigated. It was found that optimal medium consisted of cotton seed oil 3% (w/v), molasses 0.1% (w/v) and yeast extract 1.5% (w/v). After cultivation at 25°C, pH 7.0 for 120 hours, the maximum lipase activity of 22.74 U/ml using *p*-nitrophenyl butyrate as a substrate for lipase assay was obtained. This research could improve lipase production about 7.3 folds higher than original condition. Partial characterization of crude lipase was determined. The enzyme showed the maximum activity at pH 7.0 and the pH stability was pH 7.0 with 89% residual activity. The lipase had an optimal temperature at 40°C and thermal stability was 30°C with 50% residual activity after 24 hours of incubation. Crude lipase at the concentrations of 2.5-20% (v/v) was used to degrade 1 % (w/v) of palm oil in synthetic wastewater. The pretreatment became evident when the wastewater was treated with 7.5% (v/v) lipase. Percent triglyceride removal reached 99.17% within 24 hours at 30°C. The hydrolysis of triglyceride was then tested with a wastewater from palm oil mill. The result showed that palm oil was completely hydrolyzed within 24 hours by using 7.5% (v/v) of crude lipase and COD removal was found to be 80.81% after 14 days. The results obtained indicate that the potential of lipase which is an effective alternative for the treatment of wastewater containing oil such as wastewater generated from palm oil mill.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Field of Study: Biotechnology	Student's Signature ....
Academic Year: 2015	Advisor's Signature ....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนช่วยตรวจสอบและแก้ไขรายละเอียดในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ รวมทั้งขอกราบขอบพระคุณ กรรมการในการสอบ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ต่อศักดิ์ สีลานันท์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กนกทิพย์ ภักดีบำรุง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชมภูนุช กลิ่นวงษ์ และ ดร.เฉลิมชัย เรืองชัยนิคม ที่สละเวลามาเป็นในครั้งนี้ อีกทั้งยังให้ข้อเสนอแนะเพิ่มเติมในการเขียนให้วิทยานิพนธ์นี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ ดร.มนต์ณัฐ ธีระชาติ นักวิจัยหลังปริญญาเอก หน่วยปฏิบัติการวิจัยเชื้อเพลิงชีวภาพ ด้วยตัวเร่งชีวภาพ และดร.ชินพร วงศ์วัฒนไพบูลย์ ที่ให้คำปรึกษาและคำแนะนำรวมถึงช่วยเหลือในการจัดทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วง

ขอขอบคุณ ทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา

ขอขอบคุณ บริษัทสุขสมบูรณ์น้ำมันปาล์ม ที่อนุเคราะห์น้ำเสียในการทดลองในครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อน พี่ๆ น้องๆ ในหน่วยปฏิบัติการวิจัยเชื้อเพลิงชีวภาพ ด้วยตัวเร่งชีวภาพ ที่ ช่วยเหลือและให้กำลังใจเสมอมา

และสุดท้ายที่สำคัญคือ บิดา มารดา ที่อบรมเลี้ยงดู ให้กำลังใจ พร้อมทั้งสนับสนุนข้าพเจ้าในทุกๆด้านเสมอมา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ... จ

กิตติกรรมประกาศ ... ฉ

สารบัญ ... ช

สารบัญภาพ ... 1

บทที่ 1 ... 1

บทนำ ... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย ... 2

ขั้นตอนการวิจัย ... 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ... 3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ... 4

2.1 น้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันและไขมัน ... 4

วิธีทางกายภาพ (physical method) ... 5

วิธีทางเคมี (chemical methods) ... 5

วิธีทางชีวภาพ (biological methods) ... 5

2.2. ไลเพส ... 6

2.2.2 แหล่งของไลเพส ... 7

-แบคทีเรียที่ผลิตไลเพส ... 8

-เชื้อราที่ผลิตไลเพส ... 8

-ยีสต์ที่ผลิตไลเพส ... 9

2.3 *Candida rugos*a ... 11

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไลเพส ... 11

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

2.4.1 อิทธิพลของอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างต่อการผลิตไลเพส 12
2.4.2 อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลเพส.. 12
2.4.3 อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไลเพส.. 13
2.4.4 อิทธิพลของโลหะอิออนต่อการผลิตไลเพส 13
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของไลเพส 14
2.51.อุณหภูมิ... 14
2.5.2 ความเป็นกรดด่าง.. 14
2.5.3. อิออนโลหะ 14
2.6 การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์และไลเพสในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย 15
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย 18
วิธีการดำเนินการวิจัย 20
3.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส... 20
3.1.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส 20
3.1.2 การศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส 20
3.1.3 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นน้ำมันที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส 21
3.1.4 การศึกษาความเข้มข้นของตัวเหนี่ยวนำที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส........................ 21
3.1.5 การศึกษาชนิดแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส 21
3.1.6 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส 22
3.1.8 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส 23
3.2 การศึกษาการเจริญและค่ากิจกรรมของ *C. rugosa* ที่เวลาต่าง ๆ... 23
3.3 การศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของไลเพสจาก *C. rugosa*.. 24
3.3.1 การศึกษาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส 24
3.3.2 การศึกษาความเสถียรของไลเพสในความเป็นกรดด่างต่างๆ 24

หน้า

3.3.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส 24

3.3.4 การศึกษาความเสถียรของไลเพสในอุณหภูมิต่างๆ 25

3.4 การประยุกต์ใช้ไลเพสในการย่อยน้ำมันในน้ำเสีย.. 25

3.4.1 การทดสอบความสามารถการย่อยน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ 25

3.4.2 การทดสอบความสารมารถการย่อยน้ำมันจากน้ำเสียจากโรงกลั่นน้ำมันปาล์ม 25

3.5 การวัดกิจกรรมของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพส 26

บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล.. 27

4.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส.. 27

4.1.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส 27

4.1.2 การศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส 28

4.1.3 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของน้ำมันที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส..................... 29

4.1.4 การศึกษาความเข้มข้นของตัวเหนี่ยวนำที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส....................... 30

4.1.5 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส 31

4.1.6 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส 33

4.1.7 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส 34

4.1.8 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส 35

4.2 การศึกษาการเจริญและเวลาที่เหมาะสมในการผลิตไลเพสของ *C. rugosa* 36

4.3 การศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของไลเพสจาก *C. rugosa*.. 37

4.3.1 การศึกษาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส 37

4.3.2 การศึกษาความเสถียรของไลเพสที่ความเป็นกรดด่างต่างๆ.. 38

4.3.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส 39

4.3.4 การศึกษาความเสถียรของไลเพสในอุณหภูมิต่างๆ 40

การประยุกต์ใช้ไลเพสในการย่อยน้ำมันในน้ำเสีย... 41

หน้า

4.4.1 การทดสอบความสามารถในการย่อยน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ 41
4.4.2 การทดสอบความสามารถในการย่อยน้ำมันและการลดค่าซีโอดีในน้ำเสียจากโรงกลั่นน้ำมันปาล์ม 43
ความสามารถในการย่อยน้ำมัน 43
ความสามารถในการลดค่าซีโอดี 45
รายการอ้างอิง 48
ภาคผนวก 59
ภาคผนวก ก 60
ภาคผนวก ข 62
ภาคผนวก ค 63
ภาคผนวก ง 64
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 65

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญภาพ

ภาพที่ 4.1 ค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยีสต์ *C. rugosa* 27

ภาพที่ 4.2 ค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยีสต์ *C. rugosa* 28

ภาพที่ 4.3 ค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยีสต์ *C. rugosa* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยชนิดน้ำมันต่างๆ 30

ภาพที่ 4.4 ค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยีสต์ *C. rugosa* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำมันเมล็ดฝ้ายที่ความเข้มข้นต่างๆ 31

ภาพที่ 4.5 ค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยีสต์ *C. rugosa* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็น์โดยมวลต่อปริมาตร 32

ภาพที่ 4.6 ค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยีสต์ *C. rugosa* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่างๆ 33

ภาพที่ 4.7 ค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยีสต์ *C. rugosa* 35

ภาพที่ 4.8 ค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยีสต์ *C. rugosa* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ 36

ภาพที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและค่าแอกทิวิตี ของ *C. rugosa* ที่เวลาต่างๆ 37

ภาพที่ 4.10 ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส 38

ภาพที่ 4.11 ความเสถียรของไลเพสที่ความเป็นกรดด่างต่างๆ 39

ภาพที่ 4.12 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพส จาก *C. rugosa* 40

ภาพที่ 4.13 ความเสถียรของของไลเพสที่อุณหภูมิต่างๆ 41

ภาพที่ 4.14 ปริมาณน้ำมันและกรดไขมันจากการไฮโดรไลซิสของไลเพส ที่ความเข้มข้นต่างๆที่เวลา 24 ชั่วโมง 42

ภาพที่ 4.15 เปอร์เซ็นต์การย่อยน้ำมันจากการไฮโดรไลซิสของไลเพส 43

ภาพที่ 4.16 ปริมาณน้ำมันหลังผ่านการบำบัดด้วยไลเพสความเข้มข้น 7.5 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง 44

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพที่ 4.17 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหลังผ่านการบำบัดด้วยไลเพส ที่ความเข้มข้น 7.5 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง 45

ภาพที่ 4.18 ค่าซีโอดีในน้ำเสียหลังผ่านการบำบัดด้วยไลเพส ที่ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร.. 46

ภาพที่ 4.19 ค่าซีโอดีในน้ำเสียหลังผ่านการบำบัดด้วยไลเพส ที่ความเข้มข้นไลเพส 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร 47

ภาพที่ 4.20 เปอร์เซ็นต์การลดลงของค่าซีโอดีในน้ำเสียหลังผ่านการบำบัดด้วยไลเพส ที่ความเข้มข้นไลเพส 7.5 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร 47

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 ปริมาณน้ำมันในน้ำทิ้งจากกิจกรรมต่างๆในอุตสาหกรรม (Patterson, 1985) 4

ตารางที่ 2.2 ยีสต์ที่สามารถผลิตไลเพสได้ (Sharma และคณะ, 2001) 10

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันอัตราการเพิ่มของประชากรโลกมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้อุตสาหกรรมอาหารนั้นมีอัตราการผลิตอาหารที่สูงขึ้นเพื่อให้เพียงพอต่อผู้บริโภค ซึ่งส่งผลกระทบถึงปริมาณน้ำเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตอาหารในอุตสาหกรรมที่มีปริมาณมหาศาล ซึ่งส่วนใหญ่จะมีการปนเปื้อนของน้ำมันและไขมันในปริมาณสูง เช่น อุตสาหกรรมนม อุตสาหกรรมน้ำมันพืช อุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อสัตว์ อุตสาหกรรมผลิตชิ้นส่วนจากสัตว์ และร้านอาหารต่างๆ ซึ่งปริมาณน้ำเสียมหาศาลดังกล่าวที่ถูกปล่อยมีการเจือปนน้ำมันและไขมันในปริมาณสูง ทำให้เกิดปัญหาที่ยากต่อการกำจัดออกนำไปสู่การการสะสมของน้ำมันและไขมันปริมาณมากขึ้น ก่อให้เกิดมลพิษทั้งบนบกและในน้ำ โดยน้ำมันและไขมันจะเกาะตัวเป็นแผ่นฟิล์มเคลือบอยู่บนผิวน้ำและขัดขวางการการแพร่ของออกซิเจนจากอากาศสู่ผิวน้ำ (Chao และคณะ, 1981; Song และคณะ, 2001) ทำให้สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำขาดออกซิเจนและน้ำเน่าเสียส่งกลิ่นเหม็น นอกจากนี้ทำให้ตะกอนหรือสารแขวนลอยต่างๆ ลอยขึ้นสู่ผิวน้ำ ยากต่อการตกตะกอนและแยกออก อีกทั้งหากน้ำมันและไขมันหลุดผ่านเข้าไปในระบบบำบัดส่วนอื่น อาจส่งผลให้เกิดการอุดตันท่อต่างๆและถังปฏิกรณ์ที่ใช้ในกระบวนบำบัดอีกทั้งการเสียหายของอุปกรณ์อื่นตามมาได้ นอกจากนี้น้ำมันและไขมันที่เจือปนในน้ำเสียจะส่งผลต่อค่าบีโอดี (Biochemical Oxygen Demand) และซีโอดี (Chemical Oxygen Demand) สูงขึ้นด้วย กระบวนการบำบัดน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสามารถทำหลายวิธีคือ วิธีทางกายภาพ วิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพ ซึ่งการบำบัดทางวิธีทางกายภาพ เช่น การใช้ถังดักไขมัน การเติมอากาศเพื่อให้น้ำมันและไขมันมีการลอยตัว จากนั้นทำการตักชั้นน้ำมันและไขมันออกไป ในส่วนของวิธีทางเคมี เช่น การใช้สารสารลดแรงตึงผิวเพื่อทำให้น้ำมันและไขมันเกิดการแตกตัว โดยวิธีกายภาพมีข้อเสียคือ มีค่าใช้จ่ายสูงเนื่องจากค่าใช้จ่ายของอุปกรณ์ในการกำจัดน้ำมันและไขมันและค่าใช้จ่ายในการกำจัดน้ำมันและไขมันที่ตักออกไปทิ้งบนบก นอกจากนี้แล้วการใช้ถังดักไขมันยังส่งกลิ่นไม่พึงประสงค์อีกด้วย ในส่วนของทางเคมีคือ ต้องใช้ค่าใช้จ่ายในการบำบัดนั้นค่อนข้างสูง ประสิทธิภาพในการกำจัดต่ำ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นรุนแรง ไม่จำเพาะ อีกทั้งหลังจากกระบวนการบำบัดอาจมีสารตกค้างซึ่งเป็นส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและเป็นอันตรายกับสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำ (Matsumiya และคณะ, 2007; Tano-Debrah และคณะ, 1999; Willey, 2001) ดังนั้นการใช้วิธีทางชีวภาพโดยอาศัยไลเพสในการย่อยน้ำมันและไขมันเป็นวิธีที่น่าสนใจ เนื่องจากสามารถกำจัดน้ำมันและไขมันได้สมบูรณ์โดยไม่ต้องตักออกไปทิ้งเหมือนวิธีทางกายภาพ ทั้งยังปฏิกิริยาที่เกิดไม่รุนแรง เกิดปฏิกิริยาที่จำเพาะกับน้ำมันและไขมัน ไลเพสเป็นเอนไซม์มีความสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสพันธะเอสเทอร์ของไตรกลี

เซอไรด์ไปเป็นกลีเซอรอล และ กรดไขมันอิสระ (Kamini และคณะ, 2000) ในอุตสาหกรรมต่างๆนิยมนำไลเพสจากจุลินทรีย์มาใช้ เนื่องจากไลเพสจากจุลินทรีย์มีความเสถียรสูงและมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นหลายชนิด(Cardenas และคณะ, 2001) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ไลเพสจาก *Candida rugosa* เนื่องจากเป็นยีสต์ที่มีการเจริญเติบโตได้ดี ความสามารถในการผลิตไลเพสได้สูง หลั่งเอนไซม์ออกนอกเซลล์ (extracellular lipase) สะดวกต่อการคัดแยกนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อแหล่งอาหารและปัจจัยทางกายภาพได้ต่างกัน จึงส่งผลให้ประสิทธิภาพการสร้างไลเพสได้ไม่เท่ากัน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต่างกันจะมีปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อกระบวนการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสเช่น อุณหภูมิ พีเอช แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และตัวชักนำให้มีการผลิตไลเพส เป็นต้น (Benjamin และคณะ, 1998) ได้ศึกษาสูตรอาหารและปริมาณของน้ำมันมะกอกที่เหมาะสมในการผลิตไลเพสจาก *C. rugosa* จากการศึกษาพบว่าปริมาณของน้ำมันมะกอก 10 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้มีค่าแอกทิวิตีไลเพสสูงที่สุด อีกทั้งเมื่อนำมอลโตสแทนกลูโคสในสูตรอาหาร พบว่าค่าแอกทิวิตีไลเพสสูงขึ้นถึง 12.55 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ และความเป็นกรดด่าง รวมถึงชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ตัวชักนำ ที่เหมาะสมในการผลิตไลเพสจาก *C. rugosa* พร้อมทั้งศึกษาลักษณะสมบัติของไลเพสและทดสอบประสิทธิภาพของไลเพสจาก *C. rugosa* ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียจากการเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานที่น้ำมันปาล์ม เพื่อเป็นแนวทางหนึ่งในการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไปในอนาคต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมและลักษณะสมบัติของไลเพสจาก *C. rugosa*
2. เพื่อนำไลเพสจาก *C. rugosa* มาประยุกต์ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียเบื้องต้น

ขั้นตอนการวิจัย

1. ค้นคว้าเอกสารและข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
2. ศึกษาอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส
3. ศึกษาชนิดของตัวเหนี่ยวนำ แหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส
4. ศึกษาความเข้มข้นของตัวเหนี่ยวนำ แหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส
5. ศึกษาสมบัติบางประการของไลเพส
6. ศึกษาการนำไลเพสประยุกต์ในการบำบัดน้ำมันในน้ำเสียในระดับห้องปฏิบัติการ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถหาภาวะและสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพสและนำไปประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายนำมันและไขมันในน้ำเสียในกระบวนการบำบัดน้ำเสียเบื้องต้นได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 น้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันและไขมัน

น้ำทิ้งจากแหล่งต่างๆ ส่วนใหญ่มักมีการปนเปื้อนของน้ำมันและไขมัน ทั้งระดับชุมชนที่ได้จากอาคารบ้านเรือน ร้านอาหาร ร้านกาแฟ จนถึงระดับอุตสาหกรรม โดยเฉพาะโรงงานผลิตอาหาร โรงงานผลิตภัณฑ์จากนม โรงงานผลิตน้ำมันพืช โรงงานอาหารกระป๋อง โรงงานผลิตหนังสัตว์ โรงงานทำสบู่ โรงงานผลิตอาหารสัตว์ และโรงงานฆ่าสัตว์ น้ำเสียที่ถูกปล่อยออกมานั้นก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมต่างๆมากมาย ในปี 2002 ประเทศบราซิลได้มีการผลิตนมปริมาตร 2.1×10^{9} ลิตร เพื่อนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์นมต่างๆ และได้มีการปล่อยน้ำเสียทิ้งออกมาถึง 84×10^{9} ลิตร เมื่อเทียบปริมาณน้ำที่ถูกปล่อยมาเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรน้ำที่ใช้ทั้งหมดในตอนแรก นอกจากนี้ปริมาณน้ำเสียที่ถูกปล่อยทิ้งออกมานั้น ไม่ได้รับการบำบัดก่อนปล่อยออกสู่ธรรมชาติ (Jung และคณะ, 2002) นอกจากโรงงานนมแล้ว ยังมีโรงงานฆ่าสัตว์ที่มีการใช้น้ำในกระบวนการผลิตถึง $1\text{-}8.3\times10^{3}$ ลิตร และน้ำที่ถูกใช้หลังกระบวนการผลิตจะถูกปล่อยออกมาถึง $0.4\text{-}3.1\times10^{3}$ ลิตร (Caixeta และคณะ, 2002) โดยน้ำมันและไขมันในน้ำเสียจะลอยอยู่บนผิวน้ำรวมตัวกันเป็นฟิล์มเคลือบชั้นผิวน้ำทำให้ขัดขวางการถ่ายเทออกซิเจนจากอากาศสู่แหล่งน้ำ ส่งผลให้สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำตาย (Cammarota และคณะ, 2006; Demirel และคณะ, 2005; Rosa และคณะ, 2009; Valladão และคณะ, 2011) เกิดภาวะน้ำเน่าเสียและส่งกลิ่นไม่พึงประสงค์ นอกจากนี้น้ำมันและไขมันที่เหลืออยู่ในน้ำเสียจะจับตัวเป็นกลุ่มก้อน และเมื่อผ่านเข้าสู่ระบบการบำบัดส่งผลให้เกิดการอุดตันอุปกรณ์ต่างๆ ทำให้ประสิทธิภาพในกระบวนการบำบัดนั้นลดลง อีกทั้งต้องเสียค่าใช้จ่ายในการซ่อมแซมอีกด้วย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องมีกำจัดน้ำมันและไขมันที่ปนเปื้อนในน้ำเสียก่อนที่เข้าสู่การบำบัดในส่วนอื่น

ตารางที่ 2.1 ปริมาณน้ำมันในน้ำทิ้งจากกิจกรรมต่างๆในอุตสาหกรรม (Patterson, 1985)

กระบวนการในอุตสาหกรรม	ปริมาณน้ำมัน (มิลลิกรัม/ลิตร)
โรงกลั่นน้ำมันปริโตรเลียม	20-4,000
การรีดอลูมิเนียม	5,000-50,000
การขึ้นรูปเหล็ก	1,000-10,000
อาหาร (ปลาและสัตว์ทะเล)	500-14,000
โรงกลั่นน้ำมันพืช	4,000-6000

กระบวนการในอุตสาหกรรม	ปริมาณน้ำมัน (มิลลิกรัม/ลิตร)
โรงผลิตสี	1,000-2,000
การฟอกหนังสัตว์	200-40,000
การกำจัดไขมันบนขนสัตว์	1,500-12,500

วิธีทางกายภาพ (physical method)

วิธีทางกายภาพเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกในกระบวนการกำจัดน้ำมันและไขมัน เช่น การติดตั้งถังดักไขมัน (oil and grease trap) เพื่อให้ชั้นน้ำและน้ำมันมีการแยกชั้นกัน การให้อากาศ(dissolved air flotation system:DAF) โดยเป่าอากาศให้เป็นฟองเล็กๆ จากนั้นฟองอากาศที่ลอยตัวขึ้นจะพาน้ำมันและไขมันลอยตัวและแยกชั้นจากส่วนน้ำ จากนั้นตักกวาดน้ำมันและไขมัน เพื่อไปกำจัดต่อไป นอกจากนี้ยังมีการเสริมด้วยวิธีต่างๆ เพื่อให้การแยกชั้นของน้ำมันและชั้นไขมันได้ดี เช่น การเพิ่มอุณหภูมิเพื่อลดความหนืดและค่าถ่วงจำเพาะของน้ำมันและไขมัน ทำให้ลอยตัวได้ดีขึ้น ข้อเสียของวิธีนี้คือ ค่าใช้จ่ายของอุปกรณ์และพลังงานค่อนข้างสูง เนื่องจากต้องให้ความร้อนกับระบบบำบัด อีกทั้งต้องมีค่าใช้จ่ายหลังจากคัดแยกน้ำมันและไขมันในน้ำเสีย เพื่อไปกำจัดต่อไปอีกด้วย (Willey, 2001)

วิธีทางเคมี (chemical methods)

วิธีทางเคมีทำโดยการเติมสารเคมีลงไปเพื่อเปลี่ยนสภาพของน้ำมันและไขมัน เช่น คลอรีน เฟอริกคลอไรด์ อลูมิเนียมซัลเฟส แต่วิธีนี้เป็นวิธีที่ไม่นิยม เนื่องจากค่าใช้จ่ายของสารเคมีในกระบวนการบำบัดค่อนข้างสูง รวมถึงประสิทธิภาพการทำให้น้ำมันและไขมันแตกตัวและละลายได้กับน้ำค่อนข้างต่ำ นอกจากนี้ยังเกิดปฏิกิริยาค่อนข้างรุนแรงและทิ้งสารตกค้างในน้ำเสียส่งผลให้ทำลายจุลินทรีย์ในระบบการบำบัดน้ำเสียทางชีวภาพอีกด้วย เช่น การบำบัดแบบเลี้ยงตะกอนอีกด้วย (activated sludge) (Cammarota และคณะ, 2006; Tano-Debrah และคณะ, 1999)

วิธีทางชีวภาพ (biological methods)

วิธีทางชีวภาพคือวิธีที่นำสิ่งมีชีวิตหรือผลิตภัณฑ์จากสิ่งมีชีวิต เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ มาย่อยสลายน้ำมันและไขมัน โดยอาศัยจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันและไขมันนำไปใช้ในการเจริญเติบโตผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึม นอกจากนี้การย่อยน้ำมันสามารถเร่งการย่อยสลายน้ำมันและไขมันได้โดยตรงด้วยการใช้ไลเพสที่จากจุลินทรีย์ เนื่องจากไลเพสสามารถย่อยสลายน้ำมันและไขมันได้อย่างมีประสิทธิภาพ เกิดปฏิกิริยาไม่รุนแรงและไม่ทิ้งสารตกค้างในน้ำเสียเมื่อปล่อยลงสู่แหล่ง

น้ำ จึงจัดได้ว่าเป็นระบบการบำบัดน้ำเสียที่ยั่งยืนและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ดังนั้นวิธีทางชีวภาพจึงถือเป็นแนวทางเลือกที่น่าสนใจในการบำบัดน้ำเสีย ที่มีการปนเปื้อนน้ำมันและไขมัน (Paraskeva และคณะ, 2006)

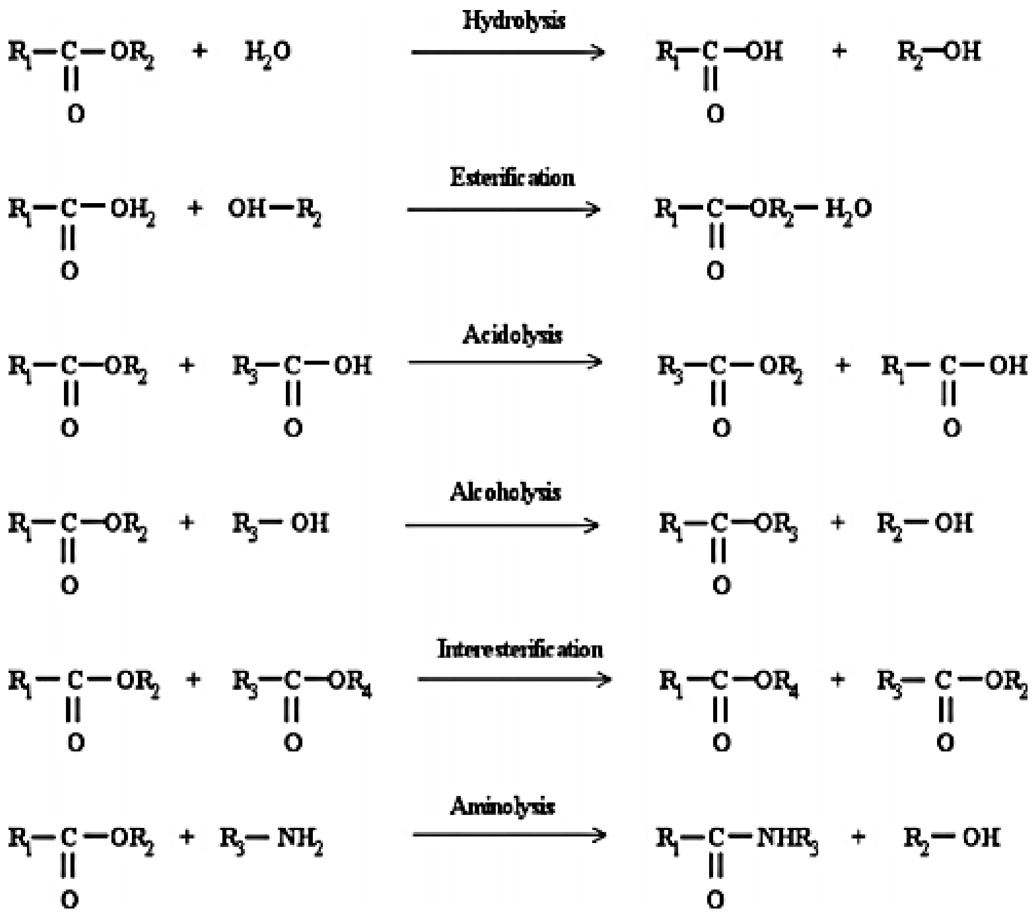
2.2. ไลเพส

ไลเพส (lipase; ec 3.1.1.3) มีชื่อเรียกตามระบบ international union of biochemistry ว่ากลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (glycerol ester hydrolase) หรือไตรเอซิลเซอรอลไฮโดรเลส (Triacylglycerol hydrolase) มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลส์พันธะเอสเทอร์ (ester bonds) ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ได้เป็นไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) มอนอกลีเซอไรด์ (monoglyceride) กรดไขมัน (fatty acid) และ กลีเซอรอล (glycerol) โดยเกิดปฏิกิริยาบริเวณผิวหน้าของน้ำและโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ไลเพสถูกจัดกลุ่มให้อยู่ในเอนไซม์โดยมีรหัสประจำตัวเอนไซม์ (code number) 4 ชุด แต่ละชุดแยกจากกันโดยใช้จุดคั้น ตัวเลขในชุดแรกหมายถึงกลุ่ม (class) ซึ่งกลุ่มของเอนไซม์มีทั้งหมด 6 กลุ่ม ถัดมาตัวเลขชุดที่ 2 และ 3 แสดงถึงปฏิกิริยาที่ถูกเร่งและเลขสุดท้ายบอกถึงลักษณะการเร่งปฏิกิริยาซึ่งสามารถแยกปฏิกิริยาที่คล้ายออกจากกันได้ ไลเพสมีรหัสประจำเอนไซม์ดังนี้ (Pernas และคณะ, 2000; Thakur, 2012)

E.C.3.-.-.- Hydrolases.
E.C.3.1.-.- Acting on ester bonds.
E.C.3.1.1.- Carboxylic ester hydrolases.
E.C.3.1.1.3 Triglycerol lipase

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

นอกจากนี้ไลเพสสามารถเกิดปฏิกิริยาอื่นๆได้ เช่น สังเคราะห์เอสเทอร์ (esterification) และทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (trans esterification) ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาได้เมื่ออยู่ในสภาพที่มีน้ำน้อย ด้วยความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาที่หลากหลาย จึงมีการนำไลเพสไปใช้ประโยชน์ต่างๆ ในอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ซักล้าง อุตสาหกรรมเกี่ยวกับเภสัชกรรม อุตสาหกรรมฟอกหนัง เครื่องสำอาง โดยเฉพาะการบำบัดน้ำเสียซึ่งได้รับความสนใจในปัจจุบัน (Kademi และคณะ, 2003)



ภาพที่ 2.1 แสดงปฏิกิริยาต่างๆของไลเพส (Singh และคณะ, 2012)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.2.2 แหล่งของไลเพส

ไลเพสสามารถผลิตได้ทั้งใน สัตว์ พืช จุลินทรีย์ ไลเพสที่ผลิตจากจุลินทรีย์นั้นได้รับความนิยมในอุตสาหกรรมค่อนข้างมาก เนื่องจากเป็นสิ่งมีชีวิตที่เจริญเติบโตรวดเร็ว จึงส่งผลให้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณสูงและมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายดี มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นหลายชนิด จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆได้อย่างกว้างขว้าง ไลเพสที่นิยมทางการค้าส่วนใหญ่ผลิตจากยีสต์ เนื่องจากมีความเสถียรของเอนไซม์สูง เจริญเติบโตได้เร็ว มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นหลายชนิด และเอนไซม์ที่ผลิตได้สามารถหลั่งออกมานอกเซลล์ ซึ่งง่ายต่อการนำไปใช้ รวมถึงขั้นตอนในการคักแยกเอนไซม์ออกจากเซลล์อีกด้วย (Macrae และคณะ, 1985) นอกจากนี้การผลิตไลเพสยังสามารถใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาเป็นแหล่งอาหารต่างๆ ในกระบวนการผลิตได้ เช่น น้ำแช่ข้าวโพด กากน้ำตาล กากถั่วเหลืองเป็นต้น โดยทำการหมักแบบสถานะแข็ง (solid state

fermentation) ซึ่งทำให้ช่วยลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ได้ (Idrees และคณะ, 2002) จุลินทรีย์ที่ผลิตไลเพสสามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ เช่น ในดิน กองปุ๋ยคอกหรือในน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนน้ำมันและไขมัน รวมถึงเมล็ดพืชที่มีน้ำมันและแหล่งอาหารที่เน่าเสียต่างๆ หรือแม้กระทั่งในบ่อน้ำพุร้อน ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์สามารถผลิตไลเพสที่มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน จึงเป็นข้อดีในการนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย (Treichel และคณะ, 2010)

-แบคทีเรียที่ผลิตไลเพส

กลุ่มแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติของไลเพสที่น่าสนใจและมีแนวโน้มการนำไปใช้ประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ เช่น *Bacillus subtilis Bacillus pumilus Bacillus licheniformis Bacillus coagulans Bacillus stearothermophilus* และ *Bacillus alcalophilus* เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถผลิตไลเพสได้ทั่วไป นอกจากนี้ *Pseudomonas aeruginosa Burkholderia multivorans Burkholderia cepacia* และ *Staphylococcus caseolyticus* มีรายงานว่าเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตไลเพสได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังมีการศึกษาคัดแยกแบคทีเรียเพื่อค้นหาแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติใหม่ๆ จากแหล่งต่างๆ shariff และคณะ (2001) คัดแยกแบคทีเรียทนร้อนสายพันธุ์ *Bacillus* sp. จากบ่อน้ำพุร้อน Perak ประเทศมาเลเซีย ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตไลเพสได้ที่อุณหภูมิสูง พร้อมทั้งได้ศึกษาความเสถียรต่ออุณหภูมิของไลเพส พบว่า *Bacillus* sp สามารถทนต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 70 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ertuğrul และคณะ (2007) ได้คัดแยกแบคทีเรียทั้งหมด 17 ไอโซเลต และศึกษาการเจริญเติบโตโดยเลี้ยงแบคทีเรียในน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันมะกอกและคัดเลือกไอโซเลตที่สามารถผลิตไลเพสได้ พบว่า *Bacillus* sp. สามารถผลิตไลเพสได้ดีที่สุดและมีค่าแอกทิวิตีของไลเพสสูงถึง 168 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

-เชื้อราที่ผลิตไลเพส

เชื้อราที่นิยมใช้ผลิตไลเพสในอุตสาหกรรม เช่น *Rhizopus* sp. *Aspergillus* sp. *Pegjgdueferum* sp. *Geotrichum* sp. *Mucor* sp. และ *Rhizomucor* sp. (Cihangir และคณะ, 2004) เชื้อราเหล่านี้สามารถผลิตไลเพสได้ขึ้นกับหลายปัจจัย เช่นปัจจัยทางกายภาพ ส่วนประกอบต่างๆในอาหาร ซึ่งส่งผลให้ประสิทธิภาพของการผลิตเอนไซม์ต่างกัน ในแต่ละอุตสาหกรรมมีความต้องการไลเพสที่คุณสมบัติต่างกันตามวัตถุประสงค์ของการใช้งาน อีกทั้งเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพจึงมีการค้นหาและศึกษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ใหม่ๆ ที่สามารถผลิตไลเพสได้ Cihangir และ

คณะ (2004) ได้คัดแยกเชื้อ *Aspergillus* sp. จากตัวอย่างดินที่แตกต่างกัน จากนั้นได้ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไลเพส พบว่า *Aspergillus* sp. ให้ค่ากิจกรรมของไลเพสที่สูงสุดถึง 16.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่คัดแยกเชื้อรา 59 ไอโซเลตจากดินและพบว่า *Colletotrichum gloesporioides* เป็นเชื้อราที่ความสามารถผลิตไลเพสได้สูงที่สุดจากไอโซเลตทั้งหมดที่คัดแยกได้ (Colen และคณะ, 2006)

-ยีสต์ที่ผลิตไลเพส

ยีสต์จัดได้ว่าเป็นที่นิยมในการนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตไลเพส เนื่องจากสามารถเจริญเติบโตได้ง่าย ผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูง และสามารถปล่อยเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ซึ่งง่ายต่อการแยกเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ (Kademi และคณะ, 2003) นอกจากการใช้สายพันธุ์ดั้งเดิมในการผลิตไลเพสแล้ว เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ จึงมีการคัดแยกเชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติการผลิตเอนไซม์ตามวัตถุประสงค์การใช้งานเช่นกัน Potumarthi และคณะ (2008) ได้เก็บตัวอย่างดินในทะเล Arabian ใกล้บริเวณแท่นสกัดน้ำมันและสามารถคัดแยกเชื้อที่สามารถผลิตไลเพสได้สูงที่สุด โดยทำการศึกษาจากพื้นที่การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสไตบิวไทรีนบนอาหารวุ้นที่มีส่วนผสมของไตรบิวไทรีน 2 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Kumar และคณะ (2008) ได้คัดแยกเชื้อ 15 ไอโซเลต จากบริเวณที่มีโคลนที่ปนเปื้อนปริโตรเลียมและน้ำมัน ใน Delphi ประเทศอินเดีย ไอโซเลตที่ผลิตไลเพสได้ดีที่สุดคือ *Trichosporon asahii*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 2.2 ยีสต์ที่สามารถผลิตไลเพสได้ (Sharma และคณะ, 2001)

สกุล	ชนิด	อ้างอิง
Candida	*C. rugosa*	Wang และคณะ, 1995
		Frense และคณะ, 1996
		Yee และคณะ, 1995
		Brocca และคณะ, 1998
		Xie และคณะ, 1998
	C. tropicalis	Takahashi และคณะ, 1998
	C. cylindracea	Kamiya และ Gotto, 1998
		Helisto และ Korpela, 1998
	C. parapsilosis	Lacointe และคณะ, 1996
	C. deformans	Lacointe และคณะ, 1996
	C. curvata	Ghosh และคณะ, 1996
	C. valida	Ghosh และคณะ, 1996
Yarrowia	*Y. lipolytica*	Merek และ Bednasski, 1996
		Pignede และคณะ, 2000
Rhodotorula	*Rho. glutinis*	Papaparaskevas และคณะ, 1992
	Rho. pilimornae	Tahoun และคณะ, 1985
Pichia	*Pi. bispora*	Hou, 1994
	Pi. maxicana	Hou, 1994
	Pi. sivicola	Sugihara และคณะ, 1995
	Pi. xylosa	Sugihara และคณะ, 1995
	Pi. burtonii	Sugihara และคณะ, 1995

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.3 *Candida rugosa*

C. rugosa จัดเป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตไลเพสที่มีการนำไปประยุกต์ใช้อย่างหลากหลายในอุตสาหกรรม เนื่องจากเป็นยีสต์ที่มีศักยภาพในการผลิตไลเพสที่มีสมบัติที่ดี (He และคณะ, 2006) มีค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์สูง ทั้งในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และปฏิกิริยาการสังเคราะห์อื่นๆ (Redondo และคณะ, 1995) มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นได้หลากหลาย ไลเพสที่ผลิตนั้นจัดเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มที่ไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อตำแหน่งของกรดไขมันบนโครงสร้างโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ จึงสามารถไฮโดรไลซิสกรดไขมันได้ทุกตำแหน่ง (Benzonana และคณะ, 1971; Macrae, 1983) ด้วยคุณสมบัติที่เด่นในการผลิตไลเพส จึงมีการนำ *C. rugosa* มาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย ในประเทศญี่ปุ่นมีบริษัทผู้ผลิตทำอุตสาหกรรมผลิตกรดไขมันจากเมล็ดละหุ่งโดยใช้ไลเพสจาก *C. rugosa* (Macrae และคณะ, 1985) นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมการผลิตกลิ่นนมและครีมจากนม พบว่า ไลเพสจาก *C. rugosa* เป็นไลเพสที่มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ที่สุด (Pandey และคณะ, 1999) จะเห็นได้ว่าความต้องการไลเพสจาก *C. rugosa* มาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมนั้นมีมาก เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตไลเพสจึงต้องมีการศึกษาเชิงลึกเกี่ยวกับสภาวะในการเลี้ยงและสูตรอาหารที่เหมาะ เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง ตัวเหนี่ยวนำ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน เป็นต้น

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไลเพส

การผลิตไลเพสจากจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่นิยมเลี้ยงในอาหารเหลว (submerged culture) (Ito และคณะ, 2001) รองลงมาคืออาหารแข็ง (solid state fermentation) (Christi, 1999) ในงานวิจัยหลายๆงานนั้น มีการเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตไลเพส โดยการหาสภาวะการเลี้ยงและสารอาหารที่เหมาะสมในการผลิตไลเพส ซึ่งอิทธิพลในการผลิตไลเพสมีความเกี่ยวข้องกับชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ความเป็นกรดด่างในการเลี้ยง อุณหภูมิในการเจริญเติบโต และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหาร (Elibol และคณะ, 2000) โดยเฉพาะแหล่งคาร์บอนในกลุ่มพวกน้ำมันและไขมันซึ่งจะมีผลต่อผลผลิตของไลเพส

2.4.1 อิทธิพลของอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างต่อการผลิตไลเพส

อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างมีผลกับจุลินทรีย์อย่างมาก เนื่องจากมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ Kiran และคณะ (2008) รายงานว่าเชื้อ *Pseudomonas* sp. (MSI057) สามารถผลิตไลเพสได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเป็นกรดด่างเท่ากับ 9 นอกจากนี้ Kumar และคณะ (2012) พบว่าหาอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการผลิตเพสจากเชื้อ *Bacillus* sp. คือ 35 องศาเซลเซียสและ 8 ตามลำดับ ในขณะที่ Papagora และคณะ (2013) รายงานว่าสภาวะที่เหมาะสมในการส่งเสริมการผลิตไลเพสได้ดีที่สุดของ *Debaryomyces hansenii* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.4

2.4.2 อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไลเพส

แหล่งคาร์บอนที่ต่างกันนั้นมีผลในการชักนำให้จุลินทรีย์มีการผลิตไลเพสได้แตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่ความจำเพาะของโครงสร้างแหล่งคาร์บอนกับชนิดของจุลินทรีย์ Sugihara และคณะ (1991) ได้รายงานว่า *Bacillus* sp. สามารถผลิตไลเพสได้เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำมันมะกอกความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อในอาหารไม่มีน้ำมันมะกอกส่งผลให้ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์มีน้อยมาก ถึงแม้จะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาน้ำตาลฟรักโตส และน้ำมันปาล์มซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตไลเพสจากเชื้อยีสต์ *Rhodotorula glutinis* จากการทดสอบแหล่งคาร์บอนทั้งสองเปรียบเทียบกัน พบว่า เมื่อใช้น้ำมันปาล์มที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์มีผลทำให้ค่าแอกทิวิตีของไลเพสมากกว่าการใช้น้ำตาลฟรักโตสถึง 12 เท่า (Papaparaskevas และคณะ, 1992) และยังมีงานวิจัยอื่นๆรายงานว่า ยีสต์ *C. rugosa* สามารถผลิตไลเพสที่ให้ค่าแอกทิวิตีสูงที่สุด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ประกอบกรดไขมันโอเลอิกความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเพิ่มปริมาณของกรดโอเลอิก ส่งผลให้ค่าแอกทิวิตีของไลเพสลดลง Gordillo และคณะ (1995) ได้มีการศึกษาต่อว่าน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีในการชักนำ *Candida rugosa* ผลิตไลเพสในปริมาณมาก (Fadiloglu และ คณะ, 2002)

2.4.3 อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไลเพส

แหล่งไนโตรเจนนั้นเป็นแหล่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์เนื่องจากเป็นธาตุที่เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิก แหล่งไนโตรเจนสามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่มคือแหล่งไนโตรเจนในรูปสารอนินทรีย์และแหล่งไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์แต่ละชนิดนั้นมีความจำเพาะต่อชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ต่างกัน (Iizumi และคณะ, 1990; Montesinos และคณะ , 1996) ดังนั้นควรต้องมีการศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนให้เหมาะสมกับชนิดของจุลินทรีย์ Iizumi และคณะ (1990) ได้รายงานว่า *Pseudomonas* sp. (KW1-56) สามารถผลิตไลเพสได้ดี เมื่อใช้เปปโตน 2 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์สกัด 0.1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Sztajer และคณะ (1989) ได้รายงานว่า *Penicillium citrinum* สามารถผลิตไลเพสได้เมื่อใช้น้ำแช่ข้าวโพด และกากถั่วเหลือง และเมื่อใช้ 5 เปอร์เซ็นต์ เปปโตน เป็นแหล่งไนโตรเจน ทำให้ *Penicillium citrinum* ผลิตไลเพสได้สูงที่สุด สอดคล้องกับงานวิจัยของ Pinheiro และคณะ (2008) ได้รายงานว่าแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดในการผลิตไลเพสของ *Penicillium verrucosum* คือเปปโตน และยีสต์สกัด นอกจากนี้มีงานวิจัยที่รายงานว่า แอมโมเนียมซัลเฟส ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนในรูปของสารอนินทรีย์ที่สามารถเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่ทำให้ *Aspergillius niger* สามารถผลิตไลเพสได้อีกด้วย (Dutra และคณะ, 2008)

2.4.4 อิทธิพลของโลหะอิออนต่อการผลิตไลเพส

อิออนถือเป็นกลุ่มแร่ธาตุที่สำคัญที่ช่วยเสริมการเจริญเติบโตและการผลิตไลเพส เนื่องจากช่วยรักษาความสมดุลภายในเซลล์และเป็นโคเอนไซม์ของเอนไซม์หลายชนิดในจุลินทรีย์ ส่งผลให้เซลล์จุลินทรีย์มีการเจริญและผลิตเอนไซม์อย่างสมบูรณ์ Pokorny และคณะ (1994) ได้รายงานว่าในสามารถเพิ่มผลผลิตของไลเพสของเชื้อ *Aspergillus niger* ได้เมื่อในอาหารประกอบด้วยอิออน Mg^{2+} เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Sharon และคณะ (1998) ได้รายงานว่า *Pseudomonas aeruginosa* (KKA-5) สามารถผลิตไลเพสได้สูงสุดในอาหารประกอบด้วยความเข้มข้น Mg^{2+} 0.8 โมลาร์ นอกจากนี้ Kok และคณะ (1995) สามารถเพิ่มการผลิตไลเพสจากเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* (BD413) ได้เมื่อในอาหารมีการเติม Mg^{2+} Ca^{2+} Cu^{2+} และ Co^{2+}

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของไลเพส

2.51.อุณหภูมิ

ไลเพสจากจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์นั้นมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันออกไป ทั้งอุณหภูมิที่เหมาะสมและความเสถียรของอุณหภูมิต่างๆ Mayordomo และคณะ (2000) พบว่า *Aspergillus nidulans* สามารถทำงานได้ดีในช่วง 0-20 องศาเซลเซียส ในขณะที่ *Pseudomonas putida* (3sk) มีอุณหภูมิที่เหมาะในการทำงานของไลเพสที่ 37 องศาเซลเซียส และเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ไลเพสนั้นมีความเสถียรของไลเพสสูงกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตไลเพสของ *Bacillus thermoleovorans* (ihi-918) คือ 5 องศาเซลเซียส จะเห็นได้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้นมีความสำคัญในการพัฒนาและผลิตไลเพสได้ดียิ่งขึ้น (Lee และคณะ, 1993; Markossian และคณะ, 2000)

2.5.2 ความเป็นกรดด่าง

ความเป็นกรดด่างต่างกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถือเป็นปัจจัยทางกายภาพที่มีส่งผลการเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตไลเพสของเชื้อจุลินทรีย์ Hiol และคณะ (2000) ได้ศึกษาไลเพสจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* พบว่าสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ค่าเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.5 ซึ่งอยู่ในช่วงกลาง ในขณะที่ไลเพสจากจุลินทรีย์อื่น สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด เช่น *Kurtzmanomyces* sp (Oishi และคณะ, 1999) และบางสายพันธุ์ไลเพสทำงานได้ดีที่สุดที่ภาวะที่เป็นด่าง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kumar และคณะ (2005) ได้รายงานว่าไลเพสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus coagulans* สามารถทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างซึ่งเท่ากับ 8.5 เช่นเดียวกับรายงานของ Kojima และคณะ (1994) พบว่าไลเพสจากเชื้อ *Pseudomonas fluorescence* (ak102) สามารถผลิตไลเพสได้ดีที่สุดที่ภาวะที่เป็นด่างเช่นกัน

2.5.3. อิออนโลหะ

อิออนโลหะบางชนิดสามารถส่งเสริมและยับยั้งการกระบวนการเมตาบอลีซึม การเจริญเติบโตรวมถึงการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ จากรายงาน Cu^{2+} Hg^{2+} Ni^{2+} Pb^{2+} Co^{2+}และ Sn^{2+}จะไปยับยั้งการทำงานของของไลเพส เช่น *Chromobacterium* sp. *Humicola langinosa* no. 3 นอกจากนี้ยังมีไลเพสจากจุลินทรีย์ที่สามารถทนต่อการยับยั้งจากอิออนโลหะบางชนิดได้แต่ไม่สามารถต้านทานต่อการยับยั้งอิออนโลหะบางชนิดได้ เช่น *Candida deformans* สามารถทนต่อ Co^{2+} ได้แต่ถูกยับยั้ง

โดย Cu^{2+}และ Zn^{2+} (Yamaguchi และคณะ, 1973) ในขณะที่อิออนโลหะหนักบางชนิดสามารถส่งเสริมการทำงานของไลเพสได้ เช่น Mg^{2+} Mn^{2+} Li^{+} Na^{+} K^{+} Ca^{2+} เป็นต้น โดย Li^{+} Ca^{2+} และ K^{+} สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของไลเพสของ *H. lanuginose* (Omar และคณะ, 1987) นอกจากนี้ Mg^{2+} และ Ca^{2+} ยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานไลเพสจาก *C. rugosa* (Benjamin และคณะ, 2001) แต่ยับยั้งไลเพสในจุลินทรีย์บางชนิด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Muderhwa และคณะ (1985) พบว่า Mg^{2+} และ Ca^{2+} สามารถยับยั้งการทำงานไลเพสของ *C. deformans* ดังนั้นในการนำไลเพสไปประยุกต์ควรคำนึงการใช้และเลือกชนิดของอิออนโลหะที่ช่วยส่งเสริมการทำงานของไลเพส เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพได้ดียิ่งขึ้น

2.6 การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์และไลเพสในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย

ปัจจุบันมีงานวิจัยที่มีการนำจุลินทรีย์เข้ามามีบทบาทในกระบวนการบำบัดน้ำเสียอย่างแพร่หลายมากยิ่งขึ้น เนื่องจากเป็นระบบการบำบัดที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมและยั่งยืน เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียจากนั้นจะใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งอาหารต่างๆในการดำรงชีวิตและเจริญเติบโต จึงไม่มีสารตกค้างเหมือนการบำบัดด้วยวิธีทางเคมี

Wakelin และคณะ (1997) ได้ศึกษาการลดน้ำมันและไขมันปริมาณ 8 กรัมต่อลิตร ในน้ำเสียจากโรงอาหาร โดยเปรียบเทียบการเลี้ยงแบบใช้เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์เดี่ยวและแบบการใช้จุลินทรีย์แบบผสม พบว่าการเลี้ยงเชื้อแบบสายพันธุ์เดี่ยวของเชื้อ *Actinetobacter* sp. มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการลดปริมาณน้ำมันและไขมัน ซึ่งสามารถลดปริมาณไขมันและน้ำมันได้ถึง 60-65 เปอร์เซ็นต์

Mongkolthanaruk และคณะ (2002) ได้ศึกษาการใช้กลุ่มแบคทีเรียในการย่อยสลายนำมนและไขมันทางชีวภาพโดยประกอบด้วย *P. aeruginosa* (Lp602) *Bacillus* sp. (B304) และ *A. calcoaceticus* (Lp009) ในการบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำมันและไขมันเท่ากับ 3,600 มิลลิกรัมต่อลิตร จากการทดลอง พบว่า กลุ่มจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถลดค่าบีโอดี (Biolocal Oxygen Demand, COD) และปริมาณน้ำมันและไขมันเหลือน้อยกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในเวลา 12 วัน ภายใต้การบำบัดแบบใช้ออกซิเจน

Gonçalves และคณะ (2009) ได้ศึกษาการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกซึ่งมีค่าซีโอดี (Chemical Oxygen Demand, COD) อยู่ในช่วง 100-200 กรัมต่อลิตร โดยทำการศึกษาการเจริญเติบโต การลดน้ำตาลรีดิวซิงค์ การลดค่าซีโอดี และการผลิตไลเพสของยีสต์ *Y. lipolytica* *C. rugosa* และ *C. cylindracea* พบว่า ยีสต์ทั้งสามสายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำทิ้งที่มีการ

ปนเปื้อนของน้ำมันมะกอกและสารประกอบฟีนอลได้ อีกทั้งยังสามารถผลิตไลเพสและลดค่าซีโอดี โดย *C. cylindracea* สามารถลดค่าซีโอดีได้ดีที่สุดเท่ากับ 70.2 เปอร์เซ็นต์

De Felice และคณะ (1997) ได้ศึกษายีสต์ *Y. lipolytica* (ATTCC 20255) โดยใช้น้ำเสียจากโรงงานสกัดน้ำมันมะกอกเป็นส่วนประกอบของอาหารในการเลี้ยงแบบกะ จากการทดลอง พบว่า ยีสต์สามารถลดค่าซีโอดี ได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังสามารถผลิตไลเพสและเจริญเติบโตได้โดยมีน้ำหนักเซลล์ถึง 22.45 กรัมต่อลิตร

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่นำไลเพสมาใช้การการย่อยน้ำมันและไขมันโดยตรง ซึ่งมีข้อดีกว่าการใช้จุลินทรีย์คือ สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสน้ำมันและไขมันได้โดยทันที ในขณะที่การใช้จุลินทรีย์ไม่สามารถทำได้ เนื่องจากแหล่งน้ำเสียอาจไม่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตและผลิตไลเพสได้ นอกจากนี้แล้วจุลินทรีย์บางชนิดอาจเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคอีกด้วย

Dharmsthiti และคณะ (1998) ได้ศึกษาการใช้ไลเพสจาก *P. aeruginosa* เพื่อบำบัดน้ำมันและไขมันในน้ำเสียของโรงอาหาร พบว่า น้ำมันและไขมันในน้ำเสียที่เริ่มต้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตรถูกย่อยสลายถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ภายในช่วง 24 ชั่วโมงแรก และไม่สามารถตรวจสอบปริมาณน้ำมันไขมันได้หลังจากบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง อีกทั้งยังสามารถลดค่าบีโอดีในน้ำเสียได้ถึง 94.1 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 8 วัน

Jung และคณะ (2002) ใช้ไลเพสจาก *P. restrictum* ร่วมกับการบำบัดแบบเลี้ยงตะกอน (activated sludge) ในการย่อยน้ำมันที่ความเข้มข้น 400 600 และ 800 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถลดค่าซีโอดีได้เท่ากับ 93 92 และ 82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Rigo และคณะ (2008) ศึกษาการใช้ไลเพสจากสามแหล่งคือ Lipolase 100T Novozymes ซึ่งเป็นไลเพสทางการค้า และไลเพสที่ได้จากการเลี้ยง *P. restrictum* ในอาหารสำหรับผลิตไลเพสแบบแข็ง (Solid state fermentation:SSF) .ในการย่อยน้ำมันและไขมันของน้ำเสียที่ได้จากโรงงานเนื้อหมูและเนื้อวัวที่ประกอบด้วยน้ำมันและไขมัน 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถลดซีโอดีได้มากกว่าชุดควบคุมที่ไม่ใส่เอนไซม์ถึง 22 เปอร์เซ็นต์

Alberton และคณะ (2010) ได้ศึกษาไลเพสจากเชื้อรา *Rhizopus microspores* (CPQBA 312-07 DRM) โดยการเลี้ยงแบบสถานะแข็ง (Solid-state cultivation:SSC) เพื่อนำไปใช้การไฮโดรไลซิสไขมันและน้ำมันในน้ำเสียจากนมเบื้องต้น พบว่า การใส่ไลเพสในน้ำเสียสามารถลดระดับของน้ำมันและไขมันจาก 1,300 มิลลิกรัมต่อลิตร เหลือต่ำกว่า 300 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35

องศาเซลเซียส ภายใน 72 ชั่วโมง ในขณะที่ชุดควบคุม (ไม่ได้ใส่ไลเพส) ยังคงมีปริมาณน้ำมันและไขมันเท่าเดิมจากปริมาณเริ่มต้น

Kempka และคณะ (2013) ได้ศึกษาการย่อยน้ำมันและไขมันในน้ำเสียจากโรงงานผลิตชิ้นส่วนจากสุกร โดยใช้ไลเพสและฟอสโฟไลเพสร่วมกับการบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้ออกซิเจนเพื่อผลิตแก๊สชีวภาพ พบว่าการใส่ฟอสโฟไลเพสสามารถผลิตแก๊สชีวภาพได้สูงกว่าการไม่ใส่เอนไซม์ได้ ซึ่งได้แก๊สชีวภาพเท่ากับ 896.50 มิลลิลิตรและยังช่วยลดค่าซีโอดีได้ถึง 90.01 เปอร์เซ็นต์

Adulkar และคณะ (2015) ศึกษาไลเพสทางการค้าจาก 4 แหล่ง คือ Novozyme 435 Lipozyme RM IM ไลเพสทางการค้าจาก *P. fluorescens* และ ไลเพสทางการค้าจาก *C. rugosa* มาเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยน้ำมัน (1,200 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในน้ำเสียจากโรงงานนม พบว่าไลเพสจาก *C. rugosa* สามารถย่อยสลายน้ำมันได้ดีที่สุด โดยย่อยสลายน้ำมันได้ 75 เปอร์เซ็นต์ และสามารถลดค่าซีโอดีได้ 72 เปอร์เซ็นต์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

กระดาษกรองเบอร์ 1	(whatman,Germany)
คอลัมน์โครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมรรถนะสูง	(Alltech Associates.Inc,USA
Model: Apollo Silica 5U, length 250mm,i.d.4.6 mm)	
เครื่องกวนแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer)	(Barnstead, USA)
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (sharking incubator)	(Vision Scientific Co., LtD)
เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวแบบสมถรรถนะสูง	(Shimadzu,Japan)
(High performance liquid chromatography, HPLC)	
เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (digital balance)	(Satorius, Germany)
เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อความดันสูง (autoclave)	(Ta Chang Medical instrument, Taiwan)
เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerate centrifuge)	(Hanil, Korea)
เครื่องผสมแบบหมุน (vortex)	(Scitific industry, USA)
เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)	(Electronic Co., Ltd, Taiwan)
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแบบควบคุมอุณหภูมิ (spectrophotometer)	(BioTek, USA)
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)	(BioTek, USA)
ชุดกรองแบบสุญญากาศ (suction flask, Buchner funnel)	(Satorius, Germany)
ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)	(Biobase, China)
ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven)	(memmert, Germany)
ตู้ดูดควัน (fume hood)	(Biobase, China)
อ่างควบคุมอุณหภูมิ (waterbath)	(memmert, Germany)

<u>สารเคมี</u>

กรดซัลฟูริก (H_2SO_4)	(QRëC , New Zealand)
กรดฟอร์มิก (CH_2O_2)	(QRëC , New Zealand)
กรดโอเลอิก ($C_{18}H_{34}O_2$)	(Panreac, EU)
กลีเซอรอล ($C_3H_8O_3$)	(Ajax Finechem, Australia)
ซิลเวอร์ซัลเฟส (Ag_2SO_4)	(Merck, Germany)
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	(Ajax Finechem, Australia)

โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส (NaH_2PO_4)	(Ajax Finechem, Australia)
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	(Ajax Finechem, Australia)
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (Na_2HPO_4)	(Ajax Finechem, Australia)
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	(Ajax Finechem, Australia)
น้ำตาลกลูโคส (glucose)	(Ajax Finechem, Australia)
น้ำตาลกาแลคโตส (galactose)	(Ajax Finechem, Australia)
น้ำตาลซูโครส (sucrose)	(Ajax Finechem, Australia)
น้ำตาลไซโลส (xylose)	(Ajax Finechem, Australia)
น้ำมันข้าวโพด (corn oil)	(บริษัทโกลเด้น ดร็อป จำกัด, ประเทศไทย)
น้ำมันงา (sesame oil)	(บริษัทเคอร์รี่ แอนด์ สไปร์ จำกัด,ประเทศไทย)
น้ำมันดอกทานตะวัน (sunflower oil)	(บริษัทธนากรผลิภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด,ประเทศไทย)
น้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil)	(บริ ษัทน้ำมันพืชไทย จำกัด, ประเทศไทย)
น้ำมันปาล์ม (palm oil)	(บริษัทโอลีน จำกัด, ประเทศไทย)
น้ำมันมะกอก (olive)	(Strategic Catering, Thailand)
น้ำมันมะพร้าว (coconut oil)	(บริษัทน้ำมันมะพร้าวไทย จำกัด, ประเทศไทย)
น้ำมันเมล็ดฝ้าย (cotton seed oil)	(บริษัทอุตสาหกรรมวิวัฒน์ จำกัด,ประเทศไทย)
เปปโตน (peptone)	(Himedia, India)
พาราไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol, *p*NP)	(Merck, Germany)
พาราไนโตรฟีนีลบิวทิเรต (*p*-nitrophenyl butyrate, *p*NPB)	(Aldrich, Germany)
โพแทสเซียมไดโครเมต ($K_2Cr_2O_7$)	(Ajax Finechem, Australia)
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	(Ajax Finechem,Australia)
เฟอรัสแอมโมเนียมซัลเฟส ($Fe(NH_4)_2(SO_2)_2.6H_2O$)	(Ajax Finechem, Australia)
เฟอโรอีนอินดิเคเตอร์ (feroin indicator)	(Loba Chemie, India)
เมทิล-2บิวทานอล (2-methyl-2 butanol)	(Aldrich, Germany)
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	(Ajax Finechem, Australia)
วุ้นผง (agar)	(วุ้นบริสุทธิ์,ประเทศไทย)
สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)	(Himedia, India)
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	(Himedia, India)
อิโคเซน (eicosane)	(Aldrich, Germany)
เอทิลแอซิเตท (eathyl acetate)	(B&J, Korea)
เฮกเซน (hexane)	(Honeywell, US)

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส

3.1.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพสของ *C. rugosa* เลี้ยงเชื้อด้วยอาหารสูตร YM เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวสูตรสำหรับผลิตไลเพส ปริมาตรอาหาร 25 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเริ่มต้นเชื้อที่ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 บ่มที่อุณหภูมิต่างกัน ดังนี้ 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำการเก็บส่วนใสมาทดสอบค่ากิจกรรมของไลเพส โดยใช้พารา-ไนโตรฟีนิลบิวทิเรตเป็นสารตั้งต้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.1.2 การศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส

ศึกษาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพสของ *C. rugosa* โดยเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารสูตร YM เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตไลเพส โดยเริ่มต้นเชื้อในอาหารเหลวสูตรผลิตไลเพสที่ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 ปริมาตรอาหาร 25 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเริ่มต้นค่าความกรดด่างในอาหารต่างๆ ดังนี้ 5 6 7 8 และ 9 จากนั้นนำตัวอย่างบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากการศึกษาในข้อ 3.1.1 เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเก็บส่วนใสมาทดสอบค่ากิจกรรมของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสโดยใช้พารา-ไนโตรฟีนิลบิวทิเรตเป็นสารตั้งต้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.1.3 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นน้ำมันที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส

ศึกษาชนิดของน้ำมันที่เป็นตัวเหนี่ยวนำที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพสของ *C. rugosa* โดยเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารสูตร YM เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตไลเพส โดยเริ่มต้นเชื้อในอาหารที่ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 ปริมาตรอาหาร 25 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยตัวเหนี่ยวนำต่างๆ ทั้งหมด 9 ชนิด ดังนี้ น้ำมันมะพร้าว น้ำมันข้าวโพด น้ำมันเมล็ดฝ้าย น้ำมันสบู่ดำ น้ำมันปาล์ม น้ำมันงา น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันดอกทานตะวัน และ กรดโอเลอิก ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตไลเพสที่ได้ศึกษาจากข้อ 3.1.1 และ 3.1.2 เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง และนำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเก็บส่วนใสมาทดสอบค่ากิจกรรมของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสโดยใช้พารา-ไนโตรฟีนิลบิวทิเรตเป็นสารตั้งต้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.1.4 การศึกษาความเข้มข้นของตัวเหนี่ยวนำที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส

การหาความเข้มข้นของตัวเหนี่ยวนำที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพสของ *C. rugosa* โดยเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารสูตร YM เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตไลเพสเริ่มต้นเชื้อในอาหารที่ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 ปริมาตรอาหาร 25 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรในอาหารที่ประกอบด้วยชนิดของน้ำมันที่ดีที่สุดจากการศึกษาในข้อ 3.1.3 ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำมันที่ต่างกันดังนี้ 0.5 1 3 5 7 และ 9 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างเริ่มต้นจากการศึกษาข้างต้นในการผลิตไลเพสที่ได้ศึกษาจากข้อ 3.1.1 และ 3.1.2 เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง และนำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเก็บส่วนใสมาทดสอบค่ากิจกรรมของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสโดยใช้พารา-ไนโตรฟีนิลบิวทิเรตเป็นสารตั้งต้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.1.5 การศึกษาชนิดแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส

การหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการของ *C. rugosa* โดยเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารสูตร YM เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ

ต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตไลเพส โดยเริ่มต้นเชื้อในอาหารเหลวสูตรผลิตไลเพสที่ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 ปริมาตรอาหาร 25 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลิลิตร ที่ประกอบด้วยชนิดและปริมาณน้ำมันที่ได้ศึกษาในข้อ 3.1.3 และ 3.1.4 และแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน ดังนี้ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลไซโลส และ กากน้ำตาล ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างเริ่มต้มจากการศึกษาข้างต้นในการผลิตไลเพสที่ได้ศึกษาจากข้างต้น เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง และนำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเก็บส่วนใสมาทดสอบค่ากิจกรรมของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสโดยใช้พารา-ไนโตรฟีนิลบิวทิเรตเป็นสารตั้งต้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.1.6 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส

การหาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการของ *C. rugosa* โดยเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารสูตร YM เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตไลเพส โดยเริ่มต้นเชื้อในอาหารเหลวสูตรผลิตไลเพสที่ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 ปริมาตรอาหาร 25 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลิลิตรในอาหาร โดยประกอบด้วยชนิดและปริมาณน้ำมันที่ได้ศึกษาในข้อ 3.1.3 และ 3.1.4 ซึ่งประกอบด้วยปริมาณของแหล่งคาร์บอนชนิดที่เหมาะสมจากการศึกษาในข้อ 3.1.5 ที่ความเข้มข้นต่างกันดังนี้ 0.1 0.5 1 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างเริ่มต้มจากการศึกษาข้างต้นในการผลิตไลเพสที่ได้ศึกษาจากข้างต้น เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง และนำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเก็บส่วนใสมาทดสอบค่ากิจกรรมของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสโดยใช้พารา-ไนโตรฟีนิลบิวทิเรตเป็นสารตั้งต้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.1.7 การศึกษาชนิดแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส

การหาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการของ *C. rugosa* โดยเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารสูตร YM เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตไลเพส โดยเริ่มต้นเชื้อในอาหารเหลวสูตรผลิตไลเพสที่ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 ปริมาตรอาหาร 25 มิลลิลิตร ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลิลิตร ในอาหารเหลวโดยประกอบด้วยชนิดและปริมาณน้ำมันที่ได้

ศึกษาในข้อ 3.1.3 และ 3.1.4 ชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ได้ศึกษาในข้อ 3.1.5 และ 3.1.6 ที่ประกอบด้วยชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ต่างกันดังนี้ สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ยูเรีย (urea) กากถั่วเหลือง (soybean mill) และ น้ำแช่ข้าวโพด(corn steep liquor) โดยเริ่มต้นที่ปริมาณไนโตรเจนเท่ากับสูตรอาหารดั้งเดิมซึ่งวัดด้วยวิธี Kjeldahl (Bremner และคณะ, 1982) บ่มที่อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมจากการผลิตไลเพสที่ได้ศึกษาข้างต้น เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง และนำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเก็บส่วนใสมาทดสอบค่ากิจกรรมของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสโดยใช้พารา-ไนโตรฟีนิลบิวทิเรตเป็นสารตั้งต้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.1.8 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส

การหาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการของ *C. rugosa* โดยเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารสูตร YM เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตไลเพส โดยเริ่มต้นเชื้อในอาหารเหลวสูตรผลิตไลเพสที่ค่าการดูดกลืนแสง ที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 ปริมาตรอาหาร 25 มิลลิลิตร ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรในอาหารเหลวสำหรับผลิตไลเพสโดยประกอบด้วยชนิดและปริมาณน้ำมันที่ได้ศึกษาในข้อ 3.1.3 และ 3.1.4 ชนิดและปริมาณแหล่งคาร์บอน ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ได้ศึกษาในข้อ 3.1.5 3.1.6 และ 3.1.7 ที่ปริมาณไนโตรเจนต่างกันดังนี้ 0.1 0.5 1 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างเริ่มต้มจากการศึกษาข้างต้น เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง และนำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเก็บส่วนใสมาทดสอบค่ากิจกรรมของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสโดยใช้พารา-ไนโตรฟีนิลบิวทิเรตเป็นสารตั้งต้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2 การศึกษาการเจริญและค่ากิจกรรมของ *C. rugosa* ที่เวลาต่าง ๆ

ศึกษาการเจริญของ *C. rugosa* โดยเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารสูตร YM เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตไลเพสสูตรปรับปรุงพร้อมทั้งสภาวะการเลี้ยงที่ได้จากการศึกษามาในข้อ 3.1.1 ถึง 3.1.8 จากนั้นนำตัวอย่างที่เวลา 3 6 9 12 18 24 48 72 96 120 144 และ 168 ชั่วโมง จากนั้นศึกษาการเจริญ ด้วยวิธี Colony forming unit โดยเจือจางตัวอย่างแล้วดูดตัวอย่าง

มา 100 ไมโครลิตร ลงบนอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อสูตร YM เกลี่ยเชื้อให้ทั่วบนอาหารด้วยแท่งแก้วปลอดเชื้อรูปตัวแอล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวอย่างที่เหลือมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อมาทดสอบค่ากิจกรรมของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพส โดยใช้พารา-ไนโตรฟีนิลบิวทิเรตเป็นสารตั้งต้น ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3 การศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของไลเพสจาก *C. rugosa*

3.3.1 การศึกษาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

นำไลเพสมาวัดค่าวัดกิจกรรมของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยใช้พารา-ไนโตรฟีนิลบิวทิเรตเป็นสารตั้งต้น ในบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ โดยที่ 5-6 ใน Citrate buffer และค่าความเป็นกรดด่างที่ 7-8 ใน ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณพาราไนโตรฟีนอลที่ปลดปล่อยออกมาจากปฏิกิริยา ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.2 การศึกษาความเสถียรของไลเพสในความเป็นกรดด่างต่างๆ

นำไลเพสบ่มในบัฟเฟอร์ในช่วงค่าความเป็นกรดด่าง 4 -10 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บเอนไซม์ที่เวลา 24 ชั่วโมง มาวัดวัดกิจกรรมของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยใช้พารา-ไนโตรฟีนิลบิวทิเรตเป็นสารตั้งต้น บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณพาราไนโตรฟีนอลที่ปลดปล่อยออกมาจากปฏิกิริยา ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

นำไลเพสที่ผลิตด้วยสูตรอาหารที่ปรับปรุงมาวัดค่าวัดกิจกรรมของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยใช้พารา-ไนโตรฟีนิลบิวทิเรตเป็นสารตั้งต้น เร่งปฏิกิริยาในเป็นบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะที่ได้จากการศึกษาข้อ 3.3.1 บ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกันคือ 30 35 40 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณพาราไนโตรฟีนอลที่ปลดปล่อยออกมาจากปฏิกิริยา ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.4 การศึกษาความเสถียรของไลเพสในอุณหภูมิต่างๆ

นำไลเพสไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 40 และ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดที่ถูกบ่มในช่วงเวลาต่างๆ ดังนี้ 0 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง มาวัดวัดกิจกรรมของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสโดยใช้พารา-ไนโตรฟีนิลบิวทิเรตเป็นสารตั้งต้น เร่งปฏิกิริยาในเป็นบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะที่ได้จากการศึกษาข้อ 3.3.1บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจากการศึกษาข้อ 3.3.1 นาน เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาปริมาณพาราไนโตรฟีนอลที่ปลดปล่อยออกมาจากปฏิกิริยา ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.4 การประยุกต์ใช้ไลเพสในการย่อยน้ำมันในน้ำเสีย

3.4.1 การทดสอบความสามารถการย่อยน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์

เตรียมน้ำเสียสังเคราะห์ที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันโดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นตัวแทนน้ำมันในการทดลอง ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยน้ำเสียสังเคราะห์ 25 มิลลิลิตร น้ำมัน 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร แต่ละการทดลองจะประกอบด้วยในน้ำเสียที่ความเข้มข้นต่างกัน ดังนี้ 2.5 5 7.5 10 12.5 15 17.5 และ 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บตัวอย่างมาสกัดด้วยคลอโรฟอร์มและนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.4.2 การทดสอบความสารมารถการย่อยน้ำมันจากน้ำเสียจากโรงกลั่นน้ำมันปาล์ม

เก็บตัวอย่างน้ำเสียจากโรงกลั่นน้ำมันปาล์มสุขสมบูรณ์ อำเภอหนองใหญ่ จังหวัดชลบุรี มาทดสอบการย่อยน้ำมัน ทำการปรับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) จากนั้นนำน้ำเสียปริมาตร 25 มิลลิลิตรใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้สทำการเติมไลเพสที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในข้อ 3.4.1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง โดยแบ่งตัวอย่างเป็นสองส่วน ส่วนที่หนึ่งสกัดด้วยคลอโรฟอร์มแล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำมันด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ส่วนที่สองนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิห้องและนำส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณซีโอดี ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.5 การวัดกิจกรรมของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพส

ทำการวัดกิจกรรมของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยวิธีสเปกโทรโฟโตรมิทรี ด้วยการใช้พารา-ไนโตรฟีนิลบิวทิเรตเป็นสารตั้งต้น วิธีการวัดดัดแปลงจาก (Piamtongkam และคณะ, 2011) ในปฏิกิริยาประกอบด้วยไลเพส 20 ไมโครลิตร ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่างที่ 7.2 ปริมาตร 175 ไมโครลิลิตร และ พารา-ไนโตรฟีนิลบิวทิเรตความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ทำปฏิกิริยาในไมโครเพลตที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายพาราไนโตรฟีนอลความเข้มข้น 0-0.24 มิลลิโมลาร์

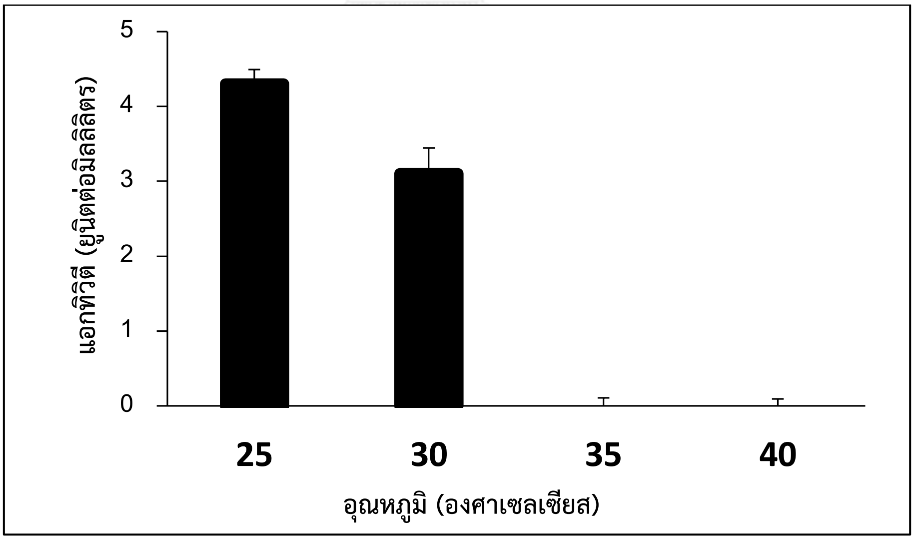
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปลายผล

4.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส

4.1.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส

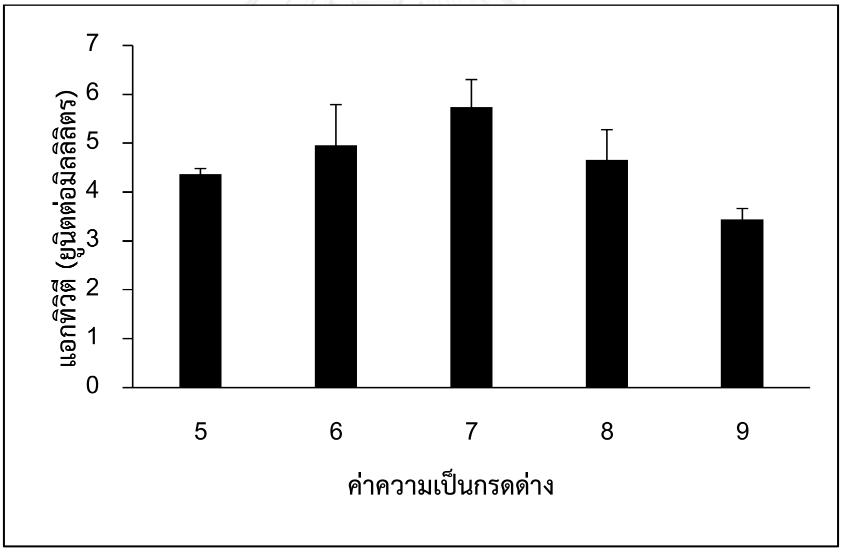
จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส โดยการเลี้ยงในช่วงอุณหภูมิต่างๆ คือ 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (ภาพที่ 4.1) พบว่า ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสมีค่าแอกทิวิตีที่สูงที่สุดเท่ากับ 4.32 ± 0.19 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสได้ค่าแอกทิวิตีเท่ากับ 3.10± 0.34 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียสนั้นตรวจไม่พบค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และไม่พบการเจริญเติบโตของยีสต์ (ภาพที่ 4.1) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Tan และคณะ (2003) ที่พบว่า *Candida* sp. (99-125) สามารถผลิตไลเพสได้ในช่วงอุณหภูมิไม่เกิน 30 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Kumar และคณะ (2008) พบว่าส่วนใหญ่แล้วยีสต์จะสามารถผลิตไลเพสได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.1 ค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยีสต์ *C. rugosa*
เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ

4.1.2 การศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส

การศึกษาค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นในอาหารสำหรับผลิตไลเพสเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ต่างกัน (5 6 7 8 และ 9) ในอาหารสำหรับผลิตไลเพส ดังแสดงในภาพที่ 4.2 เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 120 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส พบว่า ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 ได้ค่าแอกทิวิตีสูงที่สุดเท่ากับ 5.74±0.57 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ ค่าความเป็นกรดด่างที่ 6 และ 8 ได้ค่าแอกทิวิตีเท่ากับ 4.95±0.83 และ 4.66±0.62 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่าความเป็นกรดด่างที่ให้ค่าแอกทิวิตีน้อยสุดคือ 9 ซึ่งได้ค่าเท่ากับเท่ากับ 3.44±0.23 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่ 6.5 เหมาะสมที่สุดในการผลิตไลเพสของเชื้อ *C. rugosa* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pabai และคณะ (1996) ที่กล่าวว่าในช่วงค่าความเป็นกรดด่างที่ 4-7 นั้นเป็นช่วงที่เหมาะสมในการผลิตไลเพสจากยีสต์

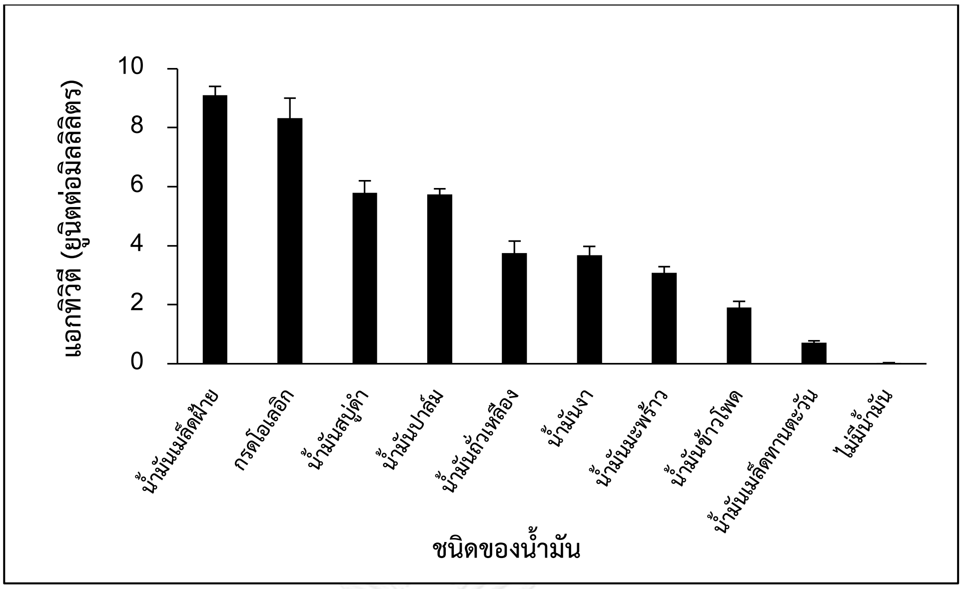


ภาพที่ 4.2 ค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยีสต์ C. rugosa
เมื่อเลี้ยงที่ค่าความเป็นกรดด่างต่างๆ

4.1.3 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของน้ำมันที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส

กระบวนการผลิตไลเพสของจุลินทรีย์จำเป็นต้องอาศัยสารที่เป็นตัวเหนี่ยวนำ ได้แก่ น้ำมันชนิดต่างๆ โดยจะเป็นตัวเหนี่ยวนำแล้วจัดได้ว่าเป็นแหล่งคาร์บอนอีกด้วย จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อชนิดและความเข้มข้นของตัวเหนี่ยวนำที่แตกต่างกัน จากการศึกษาชนิดของน้ำมันที่ใช้เป็นตัวเหนี่ยวนำในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตไลเพส ที่ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาในข้อ 4.1.1 และ 4.1.2 โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยน้ำมันชนิดต่างๆ ดังนี้ น้ำมันเมล็ดฝ้าย กรดไขมันโอเลอิก น้ำมันสบู่ดำ น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันงา น้ำมันมะพร้าว น้ำมันมะกอก น้ำมันข้าวโพด และ น้ำมันเมล็ดทานตะวัน เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 120 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเอนไซม์มาวัดค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ผลการทดลอง พบว่า น้ำมันเมล็ดฝ้ายเหมาะสมที่สุดในการเหนี่ยวนำให้เชื้อ *C. rugosa* ผลิตไลเพสได้สูงที่สุด ซึ่งมีค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเท่ากับ 9.12±0.30 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ กรดไขมันโอเลอิก (8.33±0.67 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) น้ำมันสบู่ดำ (5.80±0.40 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) น้ำมันปาล์ม (5.74±0.18 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) น้ำมันถั่วเหลือง (3.75±0.41 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) น้ำมันงา (3.68±0.29 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) น้ำมันมะพร้าว (3.09±0.20 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) น้ำมันข้าวโพด (1.90±0.22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) น้ำมันเมล็ดทานตะวัน (7.20±0.07 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) (ภาพที่ 4.3) จากผลการทดลองในข้างต้น เมื่อดูองค์ประกอบในน้ำมันเมล็ดฝ้ายที่เป็นตัวเหนี่ยวนำที่ดีที่สุด จะเห็นว่าน้ำมันเมล็ดฝ้ายมีองค์ประกอบของกรดไขมันโอเลอิกปริมาณสูงเท่ากับ 17.2 เปอร์เซ็นต์ (Winayanuwattikun และคณะ, 2013) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆที่กล่าวว่ากรดโอเลอิกสามารถเหนี่ยวนำให้ *C. rugosa* มีค่าแอกทิวิตีสูง (Benjamin และคณะ, 1996; Gordillo และคณะ, 1995; Lotti และคณะ, 1998) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Turki และคณะ (2009) ได้ศึกษาผลของน้ำมันทั้งหมด 10 ชนิดในการผลิตไลเพสจากเชื้อ *Yarrowia lipolitica* พบว่า น้ำมันส่วนใหญ่ที่มีองค์ประกอบของกรดโอเลอิกสูง จึงส่งผลให้ยีสต์ผลิตไลเพสที่มีค่าแอกทิวิตีสูงตาม เนื่องจากที่บริเวณผนังเซลล์ของยีสต์ความจำเพาะต่อกรดไขมันแตกต่างกันไป (Fickers และคณะ, 2005) และได้ข้อสรุปว่ายีสต์ *Y. lipolitica* มีความจำเพาะต่อกรดไขมันได้มากกว่า 1 ชนิด

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

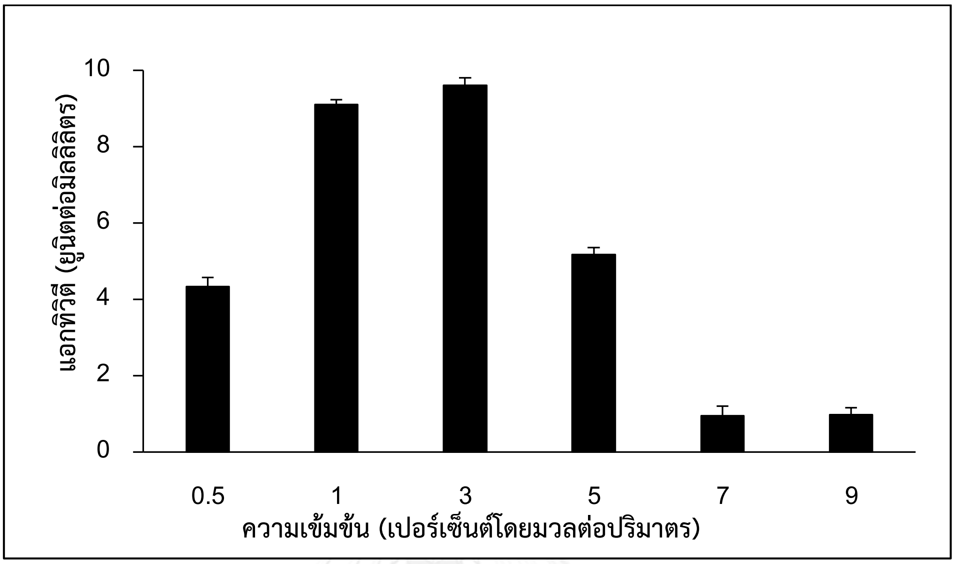


ภาพที่ 4.3 ค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยีสต์ *C. rugosa*
ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยชนิดน้ำมันต่างๆ

4.1.4 การศึกษาความเข้มข้นของตัวเหนี่ยวนำที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส

จากการศึกษาในข้อ 4.1.3 สามารถสรุปได้ว่า น้ำมันเมล็ดฝ้าย เป็นตัวเหนี่ยวนำที่เหมาะสมที่สุด นอกจากชนิดของตัวเหนี่ยวนำที่มีผลต่อการผลิตไลเพสแล้ว ได้มีการศึกษาปริมาณของน้ำมันเมล็ดฝ้ายที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.5 1 3 5 7 และ 9 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเอนไซม์มาวัดค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ผลการทดลองพบว่า ปริมาณน้ำมันเมล็ดฝ้ายที่ 3 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ให้ค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสูงที่สุดเท่ากับ 9.61± 0.22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อความเข้มข้นน้ำมันเมล็ดฝ้ายสูงกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ส่งผลให้ค่าแอกทิวิตีของไลเพสนั้นมีแนวโน้มลดลงอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 4.4) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Fickers และคณะ (2005) พบว่าปริมาณของตัวเหนี่ยวนำส่งผลต่อการผลิตไลเพสของยีสต์ *Y. lipolitica* โดยปริมาณน้ำมันที่ 1-5 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรเป็นช่วงที่เหมาะสมในการผลิตไลเพส ในขณะที่ปริมาณตัวเหนี่ยวนำมากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป มีผลการยับยั้งการผลิตไลเพส นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Benjamin และคณะ (1996) ซึ่งได้ศึกษาปริมาณน้ำมันมะกอกที่ความเข้มข้น 2-15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พบว่า ที่ความเข้มข้นน้ำมันเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นความเข้มข้นที่ดีที่สุดใน

การชักนำให้เชื้อ *C. rugosa* ผลิตไลเพสที่มีค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเท่ากับ 9.36 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่งานวิจัยนี้ผู้ศึกษาได้ใช้น้ำมันเมล็ดฝ้ายเพียงแค่ 3 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรก็สามารถชักนำให้ค่าแอกทิวิตีใกล้เคียงงานวิจัยของ Benjamin และคณะ (1996)



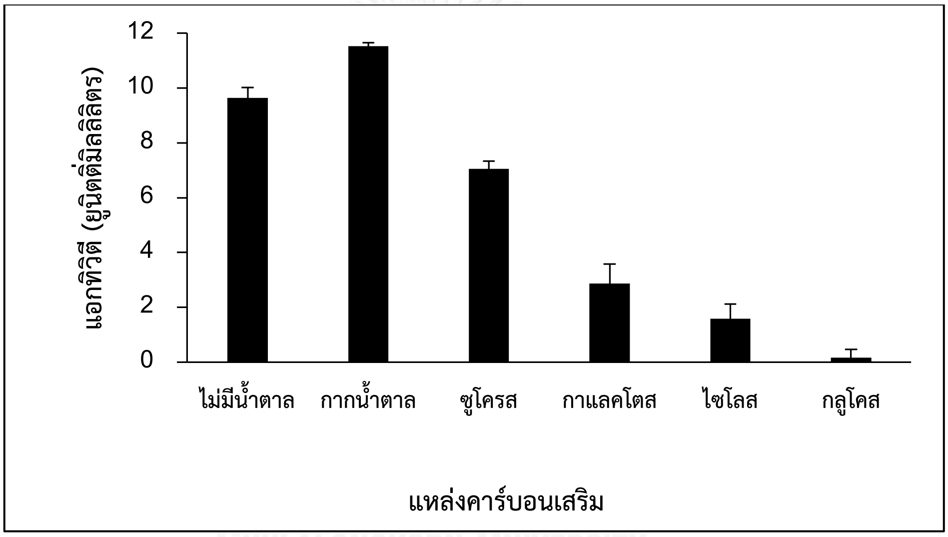
ภาพที่ 4.4 ค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยีสต์ C. rugosa
ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำมันเมล็ดฝ้ายที่ความเข้มข้นต่างๆ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

4.1.5 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส

เนื่องจากแหล่งคาร์บอนนั้นถือเป็นปัจจัยหลักในการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ของยีสต์ จึงได้ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม โดยเลือกน้ำตาล 5 ชนิดเพื่อทดสอบ ได้แก่ กากน้ำตาล (แหล่งวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร) ซูโครส (น้ำตาลโมเลกุลคู่) กาแลคโตส (น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 6 คาร์บอน) กลูโคส (น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 6 คาร์บอน) และ ไซโลส (น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 5 คาร์บอน) โดยมีชุดควบคุมโดยไม่ใส่น้ำตาล จากการศึกษาพบว่าค่า แอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพสนั้นสูงที่สุดเมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ค่าแอกทิวิตีปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเท่ากับ 11.54±0.13 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือน้ำตาลซูโครส ได้ค่าแอกทิวิตีปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเท่ากับ 7.04±0.28 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ น้ำตาลกาแลคโตส ไซโลส และ กลูโคสนั้นให้ค่ากิจกรรมปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่น้อยเท่ากับ 2.87±0.71 1.58±0.54 และ 0.17±0.30 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4.5) จากการทดลองเห็นได้ว่า กากน้ำตาลซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรที่ได้จากน้ำตาลซูโครสสามารถให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Benjamin และคณะ (1996) ได้กล่าวว่าน้ำตาลโมเลกุลคู่นั้นสามารถให้ค่าแอกทิวิตีปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ดีกว่า

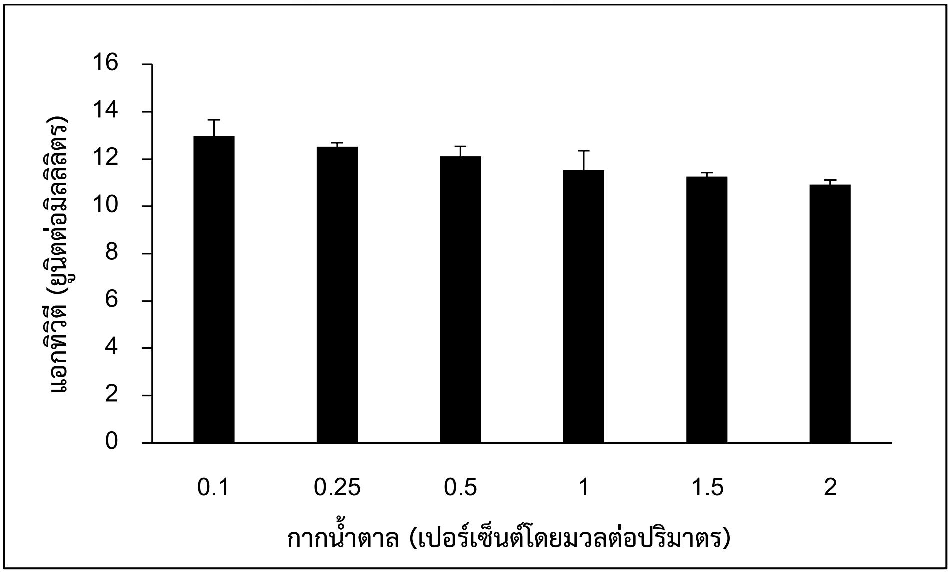
น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโพลีแซคคาร์ไรด์ และเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองที่ไม่มีการเติมน้ำตาล พบว่า การทดลองที่ไม่ได้เติมน้ำตาลได้ค่าแอกทิวิตีปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสดีมากกว่าการทดลองที่มีการเติมน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอย่างเห็นได้ชัด อาจเนื่องมาจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวนั้นถือได้ว่าเป็นแหล่งคาร์บอนที่เซลล์สามารถดูดซึมไปใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ทันที ซึ่งใช้ได้ง่ายกว่าน้ำมัน ดังนั้นจึงอาจส่งผลให้เซลล์ยีสต์ *C. rugosa* ไม่ผลิตไลเพสออกมาเพื่อย่อยน้ำมันไว้ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้เมื่อดูถึงองค์ประกอบในกากน้ำตาลไม่ได้ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสแต่ยังประกอบด้วยน้ำตาลราฟิโนส ซึ่งเป็นน้ำตาลเชิงซ้อน (โอลิโกแซคาไรด์) รวมไปถึงแร่ธาตุต่างๆ เช่น ไบโอติน แคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) แมกนีเซียมอิออน (Mg^{2+}) ซึ่งอาจจะส่งเสริมกระบวนการผลิตไลเพสของ *C. rugosa* ให้ดียิ่งขึ้น (Ravichandra และคณะ, 2008)



ภาพที่ 4.5 ค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยีสต์ *C. rugosa* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร

4.1.6 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส

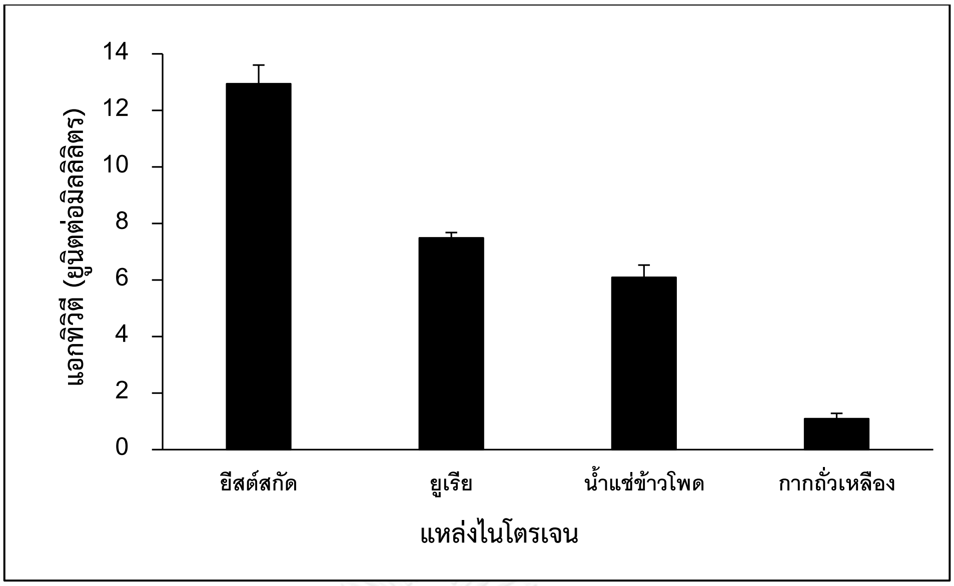
จากการทดลองในข้างต้นข้อ 4.1.5 ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตไลเพส คือ กากน้ำตาล ในการทดลองนี้ได้ศึกษาความเข้มข้นของกากน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยปริมาณกากน้ำตาลที่ต่างกันดังนี้ 0.1 0.25 0.5 1 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ผลการทดลองพบว่า ปริมาณกากน้ำตาลที่ 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรสามารถให้ค่าแอกทิวิตีปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสูงสุดเท่ากับ 12.97±0.68 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.6) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกากน้ำตาลส่งผลให้ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Potumarthi และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของกากน้ำตาล เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเสริมในกระบวนการผลิตไลเพสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพของเชื้อยีสต์ *Rhodotorula mucilaginosa* (MTTCC 8737) พบว่า กากน้ำตาลที่ 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร มีความเหมาะสมในการผลิตไลเพสมากที่สุด และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นกากน้ำตาลที่มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร จะมีผลยับยั้งการสร้างไลเพส นอกจากนี้ Segura และคณะ (2006) ได้ศึกษาความเข้มข้นของกากน้ำตาลและได้ค่าความเข้มข้นที่ดีที่สุดเท่ากับ 0.75 เปอร์เซ็นต์โดยมวล แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกากน้ำตาลส่งผลให้ค่าแอกทิวิตีของไลเพสลดลงเช่นกัน จากงานวิจัยดังกล่าวจะเห็นได้ว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกากน้ำตาลมากเกินไปส่งผลต่อแอกทิวิตีของไลเพส อาจเนื่องมากจากกากน้ำตาลมีลักษณะทางกายภาพที่หนืดอาจส่งผลให้เชื้อสัมผัสกับโมเลกุลของน้ำน้อยจึงส่งผลให้แอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสลดลง



ภาพที่ 4.6 ค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยีสต์ *C. rugosa*
ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.1.7 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส

แหล่งไนโตรเจนเป็นสารอาหารหนึ่งที่จำเป็นอย่างยิ่งในการสังเคราะห์ไลเพส เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์นั้นมีความจำเพาะกับแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ในการทดลองนี้ได้ทำการคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนมาศึกษา 4 แหล่ง ได้แก่ แหล่งไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์คือ ยีสต์สกัด และที่มาจากเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร คือ น้ำแช่ข้าวโพด และ กากถั่วเหลือง แหล่งไนโตรเจนในรูปสารอนินทรีย์ได้แก่ ยูเรีย ผลการทดลองพบว่า แหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดคือยีสต์สกัดซึ่งให้ค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเท่ากับ 12.95±0.67 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือยูเรียได้ค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเท่ากับ 7.50±0.19 ยูนิตต่อมิลลิลิตร น้ำแช่ข้าวโพด และ กากถั่วเหลือง ได้ค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเท่ากับ 6.10±0.42 และ 1.1±0.19 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (ภาพที่ 4.7) จากการทดลองเห็นได้ว่ายีสต์สกัดนั้นเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Shirazi และคณะ (1998) ได้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่า ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดในการผลิตไลเพส เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Muralidhar และคณะ (2001) พบว่ายีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดในการผลิตไลเพสของยีสต์ *C. cylindracea* เช่นกัน จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่นั้นให้ค่าแอกทิวิตีสูงเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนที่อยู่ในรูปสารอินทรีย์ เนื่องจากประกอบด้วยแหล่งของกรดอะมิโนที่หลากหลาย จึงช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์เอนไซม์ได้ดี (Dheeman และคณะ, 2010; Heravi และคณะ, 2008) ในขณะที่กากถั่วเหลืองและน้ำแช่ข้าวโพดนั้นให้ค่าแอกทิวิตีน้อยเนื่องมาจากชนิดของกรดอะมิโนในแหล่งทั้งสองไม่เหมาะสมในการส่งเสริมการผลิตไลเพส โดยในกากถั่วเหลืองประกอบด้วย ซีสทีน (cystine) และ เมทไทโอนีน (methionine) ในปริมาณที่ต่ำ (Kuiken และคณะ, 1949) จึงอาจจะส่งผลในกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ ส่วนน้ำแช่ข้าวโพดนั้นมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนเซอรีน (serine) ในปริมาณที่ต่ำ (Cardinal และคณะ, 1948) ซึ่งกรดอะมิโนเซอรีนนั้นจะพบในบริเวณเร่งของไลเพส (Cygler และคณะ, 1994)

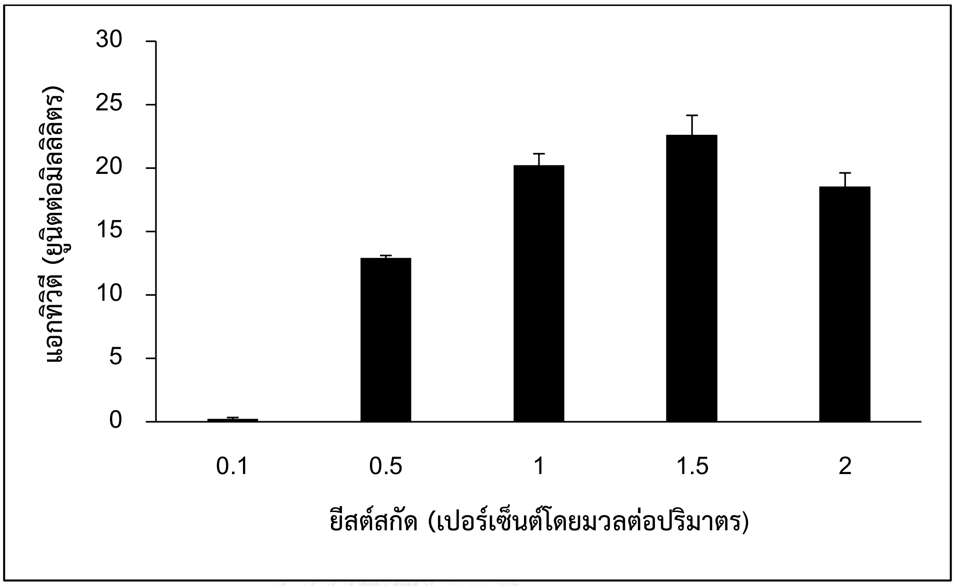


ภาพที่ 4.7 ค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยีสต์ *C. rugosa*
ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่างๆ
ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร

4.1.8 การศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเพส

ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนก็ถือเป็นอีกหนึ่งปัจจัยหนึ่งที่ควรได้รับการศึกษา หากมีปริมาณไนโตรเจนเพียงพอในการผลิตเอนไซม์ก็จะส่งเสริมให้มีค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาที่สูงตามไปด้วย จากการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 0.1 0.5 1 1.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร จากการทดลองสามารถสรุปผลได้ว่ายีสต์สกัดที่ความเข้มข้นที่ 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรมีความเหมาะสมในการผลิตไลเพสโดยให้ค่าแอคทิวิติของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสูงที่สุดเท่ากับ 22.63±1.53 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือที่ความเข้มข้นที่ 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตรให้ค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาเท่ากับ 20.23±0.93 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.8) จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าปริมาณของยีสต์สกัดนั้นมีผลต่อค่าแอกทิวิตีของไลเพส ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gupta และคณะ (2007) ได้ศึกษาปริมาณยีสต์สกัด พบว่า ความเข้มข้นที่ดีที่สุดเท่ากับ 0.36 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเป็น 1.08 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ส่งผลให้ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลดลง เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Liu และคณะ (2012) พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมของยีสต์สกัดเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร แต่เมื่อเพิ่ม

ความเข้มข้นส่งผลให้ค่าแอกทิวิตีของเอนไซม์ลดลง สันนิษฐานว่าอาจเกิดจากการยับยั้งของของแหล่งไนโตรเจนที่มากเกินไป

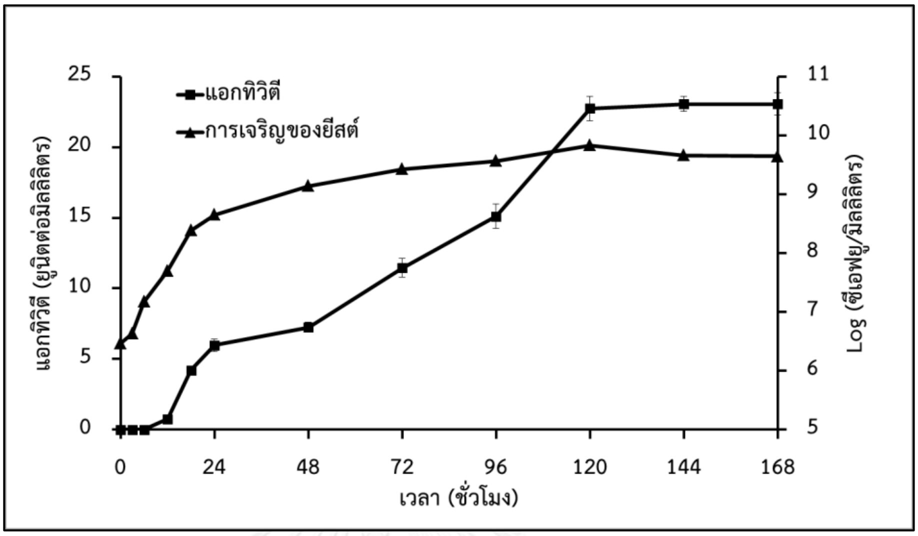


ภาพที่ 4.8 ค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของยีสต์ *C. rugosa*
ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ

4.2 การศึกษาการเจริญและเวลาที่เหมาะสมในการผลิตไลเพสของ *C. rugosa*

จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์ได้ดีในช่วงเวลาแตกต่างกัน นอกจากนี้บางสายพันธุ์มีการสร้างเอนไซม์ได้ดีที่สุดในช่วงการเจริญเติบโตระยะ log phase บางชนิดสร้างในช่วงระยะ stationary phase ดังนั้นเพื่อเป็นการหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ จึงต้องมีการศึกษาเวลาที่ผลิตเอนไซม์เพื่อนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ได้สูงสุด จากการศึกษาการเวลาที่เหมาะสมในการผลิตไลเพสในเชื้อ *C. rugosa* ในอาหารสูตรที่ได้พัฒนาจากการศึกษาในข้างต้นและทำการศึกษาการเจริญเติบโต พบว่า เมื่ออัตราการเจริญของยีสต์มีแนวโน้มสูงขึ้นส่งผลให้ยีสต์มีการผลิตไลเพสมากยิ่งขึ้น โดยใน 24 ชั่วโมงแรกเป็นช่วงที่ยีสต์มีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด ซึ่งอยู่ในระยะ log phase หลังจาก 24 ชั่วโมงนั้นอัตราการเจริญของยีสต์ช้าลงและเข้าสู่ระยะ stationary phase ที่เวลา 120 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่เชื้อ *C. rugosa* สามารถผลิตไลเพสได้ดีที่สุดและมีค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเท่ากับ 22.74±0.87 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.9) ผลการทดลอง

ที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าเวลา 120 ชั่วโมงเป็นเวลาที่เหมาะสมในการผลิตไลเพสจากเชื้อ *C. rugosa* โดยการหมักในอาหารแข็ง (Rekha และคณะ, 2012; Tan และคณะ, 2003)



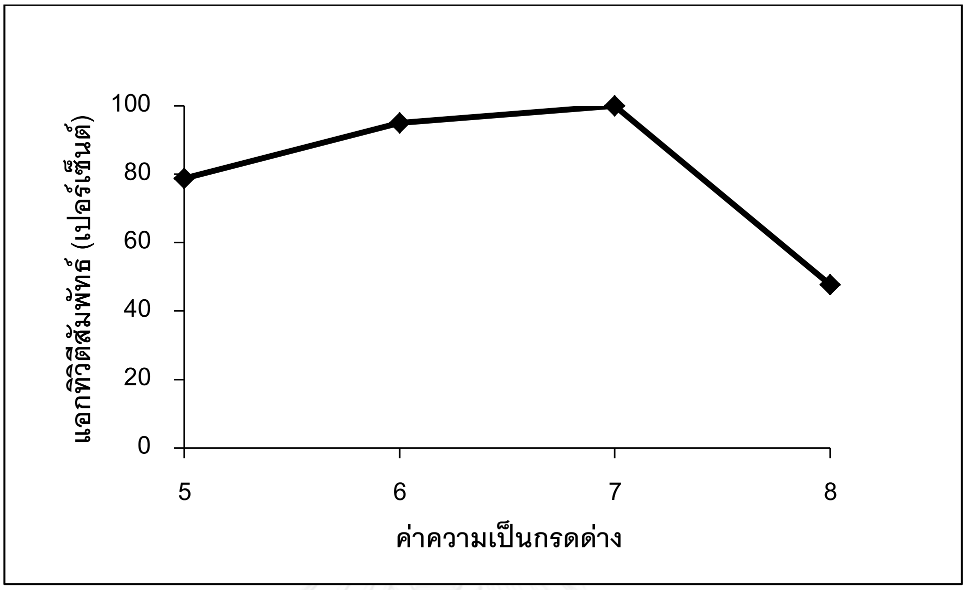
ภาพที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและค่าแอกทิวิตี
ของ *C. rugosa* ที่เวลาต่างๆ

4.3 การศึกษาลักษณะสมบัติบางประการของไลเพสจาก *C. rugosa*

4.3.1 การศึกษาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

ความเป็นกรดด่างถือเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อกระบวนการทำงานของไลเพส เนื่องมาจากส่งผลกับโครงสร้างสามมิติของไลเพสโดยเฉพาะบริเวณเร่งปกิกิริยา ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมของไลเพสในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ที่ความเป็นกรดด่างต่างๆ คือ 5 6 7 และ 8 ดังแสดงในภาพที่ 4.10 พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างที่ส่งเสริมการทำงานของไลเพสในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสอยู่ในช่วง 5-7 และดีที่สุดที่ 7 แต่เมื่อเพิ่มค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 นั้น ส่งผลให้แอกทิวิตีสัมพัทธ์ (relative activity) ลดลงเหลือ 47.66 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าแอกทิวิตีที่ความเป็นกรดด่าง 7 (100 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้ศึกษาผลของความเป็นกรดด่างของไลเพสจาก *C. rugosa* ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งได้ผลในทางเดียวกันคือ ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 เหมาะสมที่สุดในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Pereira และคณะ, 2001; Yong และคณะ, 2008) แต่เมื่อเพิ่มค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 ส่งผลให้แอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสลดลง ซึ่งสอดคล้องงานวิจัยอื่นที่รายงานว่า

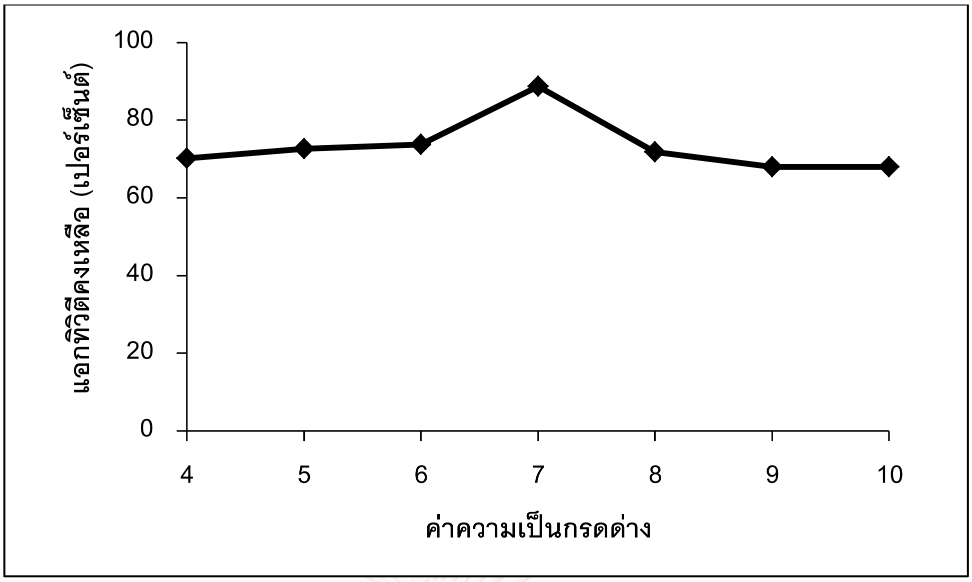
ไลเพสส่วนใหญ่นั้นสามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลาง (Aryee และคณะ, 2007; Castro-Ochoa และคณะ, 2005; Segura และคณะ, 2006)



ภาพที่ 4.10 ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

4.3.2 การศึกษาความเสถียรของไลเพสที่ความเป็นกรดด่างต่างๆ

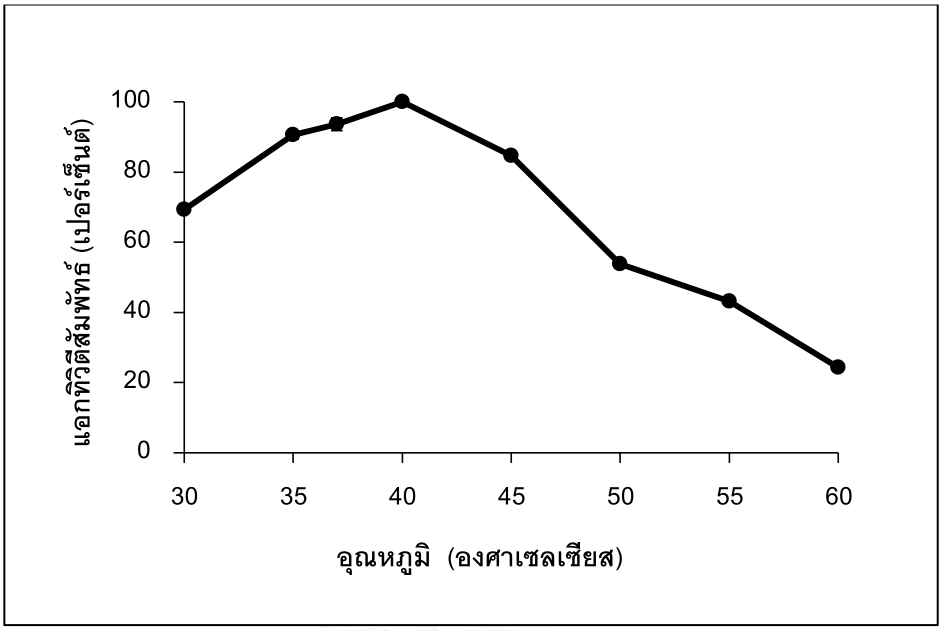
ความเสถียรของเอนไซม์ในสภาวะค่าความเป็นกรดด่างที่ต่างกันนั้น มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างสามมิติของเอนไซม์และแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เอนไซม์จากจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความเสถียรที่ต่างกัน การทดลองนี้ได้ศึกษาความเสถียรของไลเพสที่ค่าความเป็นกรดด่างกันโดยบ่มเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่ค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 4-10 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดค่าแอกทิวิตีของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส จากผลการทดลองสามารถสรุปผลการทดลองได้ว่า ไลเพสจากเชื้อ *C. rugosa* มีความเสถียรต่อค่าความเป็นกรดด่างได้ดีในช่วง 4-8 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์แอกทิวิตีคงเหลือ (residual activity) เทียบกับแอกทิวิตีเวลา ณ เวลาเริ่มต้นที่บ่มในบัฟเฟอร์ต่างๆ เท่ากับประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป และมีความเสถียรดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรดด่างที่ 7 โดยมีแอกทิวิตีคงเหลือประมาณ 89 เปอร์เซ็นต์แต่เมื่อเพิ่มค่าความเป็นกรดด่างตั้งแต่ 9 ขึ้นไปนั้นส่งผลให้ ลดลงเหลือ 60 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.11) สอดคล้องกับงานวิจัยซึ่งก่อนหน้านี้มีที่พบว่า ความเสถียรของไลเพสที่ผลิตจากยีสต์นั้น ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงค่าความเป็นกรดด่างที่ 3-10 (Dharmsthiti และคณะ, 1997; Tsujisaka และคณะ, 1973)



ภาพที่ 4.11 ความเสถียรของไลเพสที่ความเป็นกรดด่างต่างๆ

4.3.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

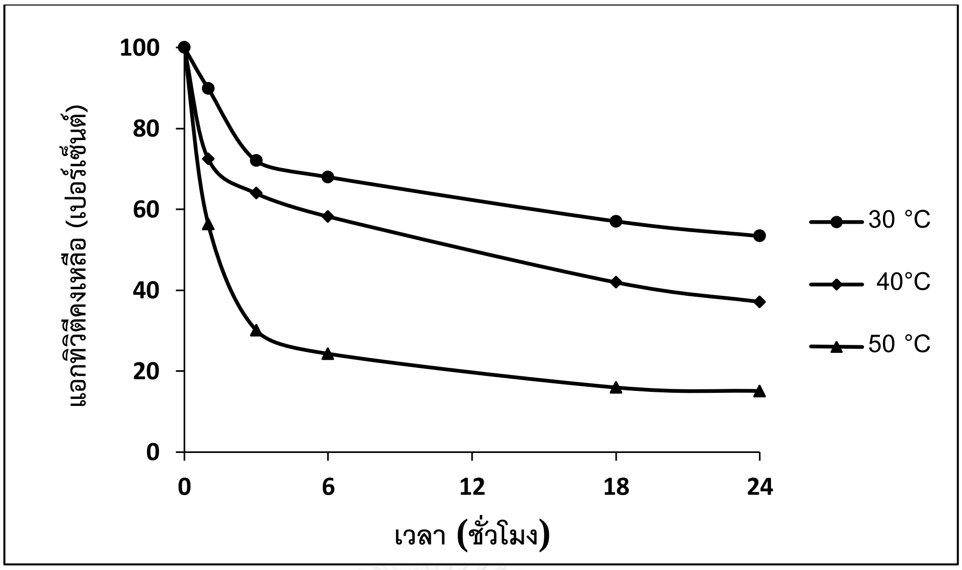
อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งต่อการทำงานของเอนไซม์ หากอุณหภูมิไม่เหมาะสม อาจทำให้เอนไซม์นั้นเสียสภาพและไม่สามารถทำงานได้ จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพส โดยทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในช่วงอุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 พบว่าที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส เป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยมีค่าแอกทิวิตีสัมพันธ์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับอุณหภูมิที่ดีที่สุดคือ 40 องศาเซลเซียส (100 เปอร์เซ็นต์) แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ค่าแอกทิวิตีสัมพันธ์ลดลงเหลือแค่ 60 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิถึง 60 องศาเซลเซียส ค่าแอกทิวิตีสัมพันธ์ลดลงเหลือ 20 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ ได้ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมของไลเพสจาก *C. rugosa* ได้กล่าวว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของไลเพสคือ 35-40 องศาเซลเซียส โดยที่ 50 องศาเซลเซียสค่าแอกทิวิตีสัมพันธ์ลดอยู่ที่ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ (Pereira และคณะ, 2001; Yong และคณะ, 2008)



ภาพที่ 4.12 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเพส จาก *C. rugosa*

4.3.4 การศึกษาความเสถียรของไลเพสในอุณหภูมิต่างๆ

เมื่อทดสอบความเสถียรของไลเพสที่อุณหภูมิต่างกันในแต่ละช่วงเวลา พบว่าเมื่อบ่มไลเพสที่อุณหภูมิ 30 40 และ 50 ค่าแอกทิวิตีคงเหลือเท่ากับ 89.89 72.46 และ 56.36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง และจากการการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าไลเพสจาก *C. rugosa* มีความเสถียรได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่าแอกทิวิตีคงเหลือเท่ากับ 53.38 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียสมีค่าแอกทิวิตีคงเหลือ 37.12 และ15.09 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.13) เมื่อเปรียบเทียบงานวิจัยของ Yong และคณะ (2008) ได้ศึกษาความเสถียรของไลเพสจาก *C. rugosa* ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสพบว่าที่เวลา 60 นาที มีค่าแอกทิวิตีคงเหลือประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถตรวจพบแอกทิวิตีเมื่อบ่มเอนไซม์เป็นระยะเวลา 150 นาที จะเห็นได้ว่าไลเพสที่ได้จากงาน Yong และคณะ (2008) มีความเสถียรน้อยกว่างานวิจัยในครั้งนี้ประมาณ 2 เท่า อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่สูงขึ้น มีผลทำให้ค่าแอกทิวิตีของไลเพสลดลงเนื่องจากที่อุณหภูมิสูงจะทำให้เอนไซม์มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ทำให้บริเวณที่จับกับสารตั้งต้น (active site) มีการเปลี่ยนแปลงและจับกับสารตั้งต้นได้น้อยลง หากอุณหภูมิสูงขึ้นมากอาจทำให้เอนไซม์เสียสภาพอย่างถาวร จึงไม่สามารถตรวจพบแอกทิวิตีของไลเพสได้ (Singh และคณะ, 2012)



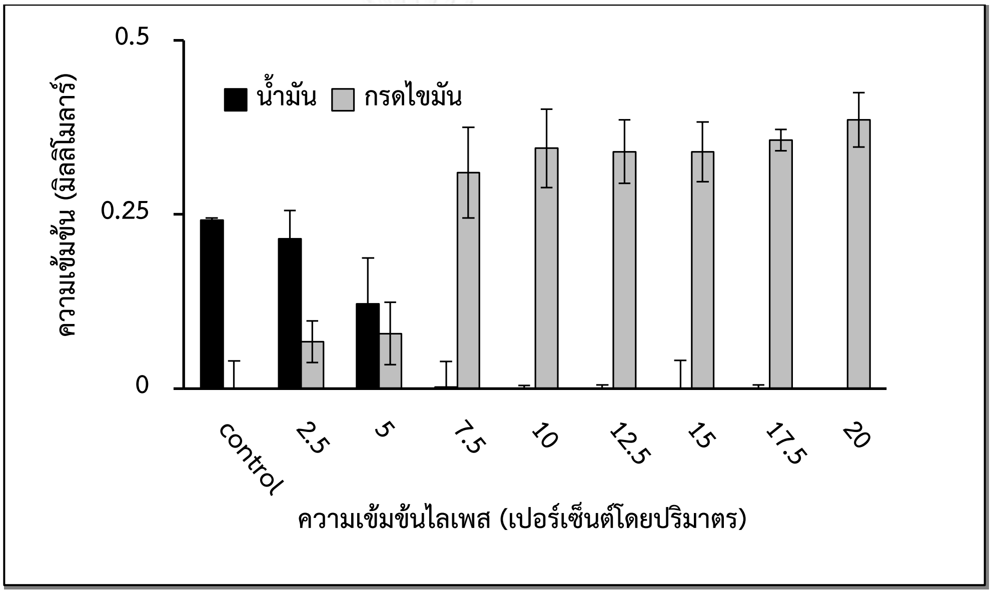
ภาพที่ 4.13 ความเสถียรของของไลเพสที่อุณหภูมิต่างๆ

การประยุกต์ใช้ไลเพสในการย่อยน้ำมันในน้ำเสีย

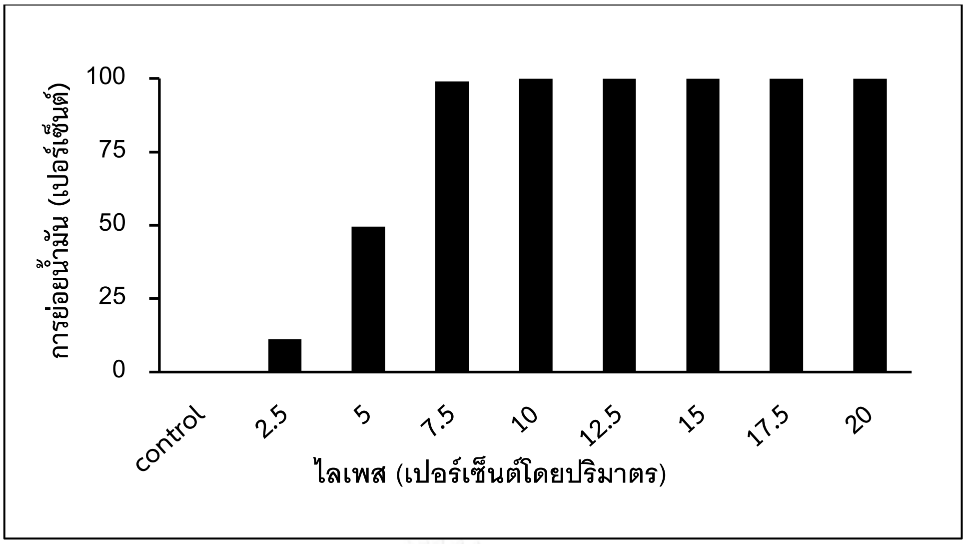
4.4.1 การทดสอบความสามารถในการย่อยน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการย่อยน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ โดยเลือกศึกษาที่ช่วงความเข้มข้นของไลเพส 2.5-20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในน้ำเสียสังเคราะห์จะประกอบด้วยน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์โดยมวลต่อปริมาตร ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ไลเพสปริมาณมากขึ้นส่งผลให้ปริมาณน้ำมัน (Triglyceride: TAG) มีแนวโน้มลดลงในขณะที่ปริมาณกรดไขมัน (fatty acids: FFA) เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในทุกความเข้มข้น แสดงให้เห็นว่าไลเพสสามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของน้ำมันไปเป็นกรดไขมันได้ (Singh และคณะ, 2012) จากภาพที่ 4.14 จะเห็นว่าเมื่อใช้ไลเพสที่ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สามารถลดปริมาณน้ำมันเหลือเพียงแค่ 0.008 มิลลิโมลาร์ และเมื่อความเข้มข้นมากกว่า 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ไม่สามารถตรวจพบน้ำมันในน้ำเสียสังเคราะห์ได้ (ภาพที่ 4.15) เมื่อวิเคราะห์ถึงประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันจากการใช้ไลเพสที่ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พบว่าสามารย่อยสลายได้ 99.17 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อความเพิ่มความเข้มข้นเอนไซม์สูงกว่า 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สามารถย่อยสลายน้ำมันได้ 100 เปอร์เซ็นต์ซึ่งไม่แตกต่างจากการใช้ไลเพสที่ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรมากนัก (ภาพที่ 4.16) ดังนั้นเมื่อคำนึงประสิทธิภาพการย่อยและต้นทุนในการผลิตไลเพสจึงสรุปได้ว่าไลเพสที่ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการ

ประยุกต์ใช้ในกระบวนการย่อยสลายน้ำมัน จากการทดลองนี้เมื่อเปรียบประสิทธิภาพการย่อยน้ำมันกับ Basheer และคณะ (2011) ได้ศึกษาการย่อยน้ำมันปาล์มโดยใช้ไลเพสที่ผลิตจากเชื้อ *Aspergillus awamori* ที่ความเข้มข้นไลเพส 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (300 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สามารถย่อยน้ำมันได้ 80.16 เปอร์เซ็นต์ และ Leal และคณะ (2002) ได้ศึกษาไลเพสที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรในการย่อยน้ำมันในน้ำเสียจากโรงงานนมปริมาณ 1,200 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าไลเพสสามารถย่อยน้ำมันได้ 80 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่ผลการทดลองของผู้วิจัยสามารถย่อยสลายน้ำมันได้ 99 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 24 ชั่วโมง แสดงให้ว่าไลเพสจาก *C. rugosa* มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยน้ำมัน



ภาพที่ 4.14 ปริมาณน้ำมันและกรดไขมันจากการไฮโดรไลซิสของไลเพส
ที่ความเข้มข้นต่างๆที่เวลา 24 ชั่วโมง



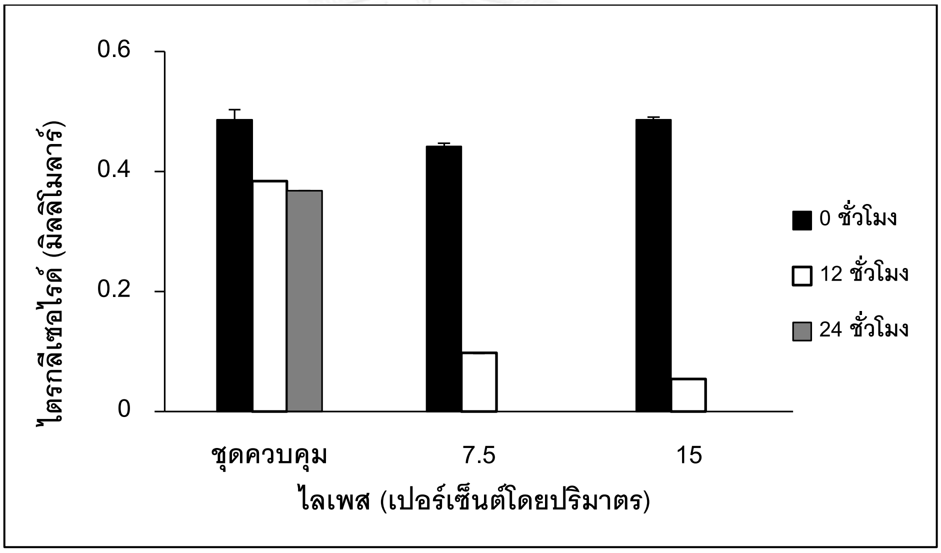
ภาพที่ 4.15 เปอร์เซ็นต์การย่อยน้ำมันจากการไฮโดรไลซิสของไลเพส ที่ความเข้มข้นต่างๆที่เวลา 24 ชั่วโมง

4.4.2 การทดสอบความสามารถในการย่อยน้ำมันและการลดค่าซีโอดีในน้ำเสียจากโรงกลั่นน้ำมันปาล์ม

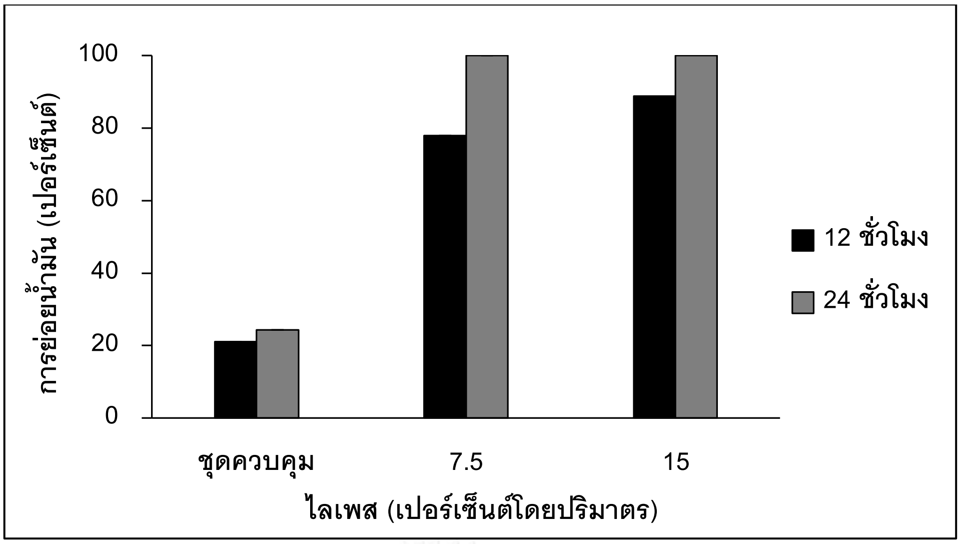
ความสามารถในการย่อยน้ำมัน

จากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ แสดงให้เห็นว่าไลเพสจาก *C. rugosa* มีความสามารถย่อยน้ำมันปาล์มในน้ำเสียสังเคราะห์ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เพื่อเป็นการทดสอบการนำไลเพสไปประยุกต์ใช้ในน้ำเสียจริง จึงได้มีการเก็บตัวอย่างน้ำเสียจากโรงงานน้ำมันปาล์มสุขสมบูรณ์ อำเภอหนองใหญ่ จังหวัดชลบุรี ทำการทดสอบกับไลเพส โดยทำการเก็บตัวอย่างที่ 0 12 และ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันและค่าซีโอดี พบว่าที่เวลา 0 ชั่วโมง ชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมไลเพส มีปริมาณน้ำมัน 0.486±0.01 มิลลิโมลาร์ เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมงเหลือ 0.384±0.002 มิลลิโมลาร์ และเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 24 (0.368 มิลลิโมลาร์) ในขณะที่ชุดการทดลองที่ใส่เอนไซม์ที่ความเข้มข้น 7 และ15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร มีปริมาณน้ำมันเริ่มต้น 0.442±.0.01 และ0.49±0.04 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมงเหลือ 0.097±0.002 และ 0.054±0.002 มิลลิโมลาร์ และไม่สามารถตรวจพบค่าได้ในชั่วโมงที่ 24 ของทั้งสองความเข้มข้น (ภาพที่ 4.16) เมื่อเปรียบเทียบชุดควบคุมกับการใส่เอนไซม์ที่ 7.5 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มเท่ากับ 78.01 และ 88.87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมมีความสามารถในการย่อยเพียง 21.06 เปอร์เซ็นต์ และที่เวลา 24 ชั่วโมงตรวจไม่พบน้ำมัน

ทั้งสองความเข้มข้น แสดงถึงประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันได้อย่างสมบูรณ์ ในขณะที่ชุดควบคุมสามารถย่อยได้เพียง 24.35 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่ 4.17) จะเห็นได้ว่าเมื่อเปรียบเทียบชั่วโมงต่างๆ ที่ใส่ไลเพสกับชุดการทดลองควบคุมที่ไม่ได้ใส่เอนไซม์นั้น มีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดว่าการใส่ไลเพสมีผลต่อการย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ดีกว่าชุดควบคุม และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปจนย่อยได้อย่างสมบูรณ์ที่ 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับการวิจัยของ Dharmsthiti และคณะ(1998) ซึ่งใช้ไลเพสจากเชื้อ *P. aeruginosa* (LP602) 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ย่อยน้ำมันในน้ำเสียจากโรงอาหารที่มีความน้ำมันและไขมันเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร สามารถลดปริมาณน้ำมันและไขมันได้ 70 เปอร์เซ็นต์ใน 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังมีการนำไลเพสจากเชื้อ *Aeromonas* sp. มาย่อยน้ำมันและสามารถลดปริมาณน้ำมันในน้ำเสียได้ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ที่ภายใน 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกัน (Mahdi และคณะ, 2012)



ภาพที่ 4.16 ปริมาณน้ำมันหลังผ่านการบำบัดด้วยไลเพสความเข้มข้น 7.5 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง

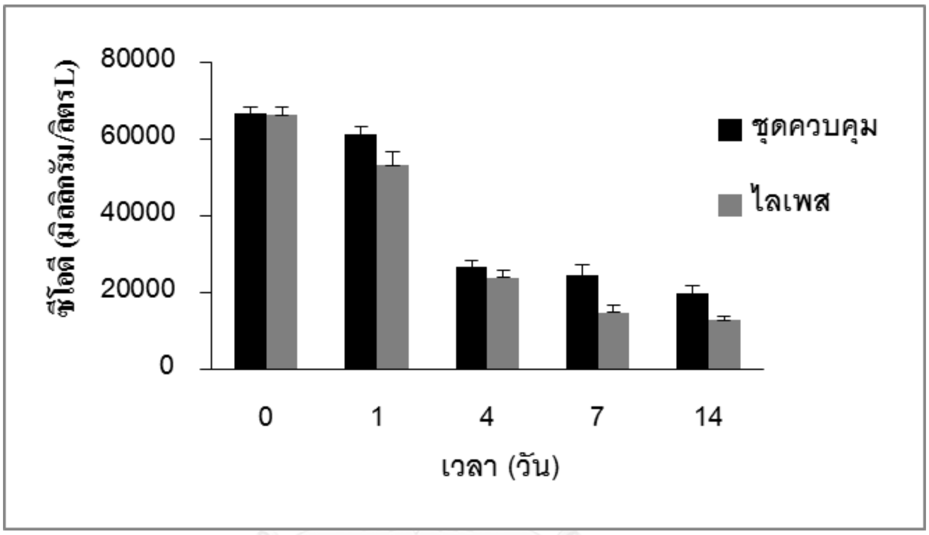


ภาพที่ 4.17 ประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันหลังผ่านการบำบัดด้วยไลเพส
ที่ความเข้มข้น 7.5 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง

ความสามารถในการลดค่าซีโอดี

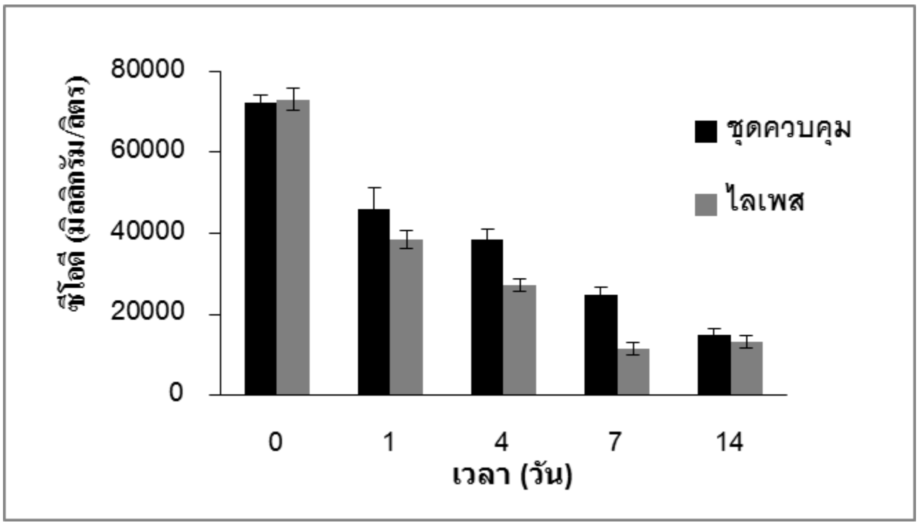
เมื่อพิจารณาปริมาณซีโอดีที่เปลี่ยนแปลงไปหลังจากการบำบัดด้วยไลเพสที่ความเข้มข้น 7.5 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการใส่ไลเพส พบว่าทั้งชุดควบคุมและชุดการทดลองมีความสามารถในการลดค่าซีโอดีได้ โดยการทดลองที่ใช้ไลเพสความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร มีปริมาณซีโอดีเริ่มต้นเท่ากับ 66,128 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน ลดเหลือเพียง 12,744 มิลลิกรัมต่อลิตร และชุดควบคุมมีค่าซีโอดีลดเหลือเท่ากับ 19,662 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.18) ในขณะที่ความเข้มข้นไลเพส 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ปริมาณซีโอดีจากเริ่มต้นเท่ากับ 73,092 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน ลดเหลือเพียง 13,131 มิลลิกรัมต่อลิตร และชุดควบคุมมีค่าซีโอดีลดเหลือเท่ากับ 15,670 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.19) เมื่อนำมาคิดเป็นประสิทธิภาพในการลดค่าซีโอดีของชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นไลเพสที่ 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พบว่า มีค่าเท่ากับ 70.44 และ 80.81 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่ ชุดควบคุมและและชุดการทดลองที่ใช้เพสที่ 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พบว่าสามารถลดค่าซีโฮดีได้เท่ากับ 79.11 และ 83.04 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 4.20) จากผลการทดลองจะเห็นว่าถึงแม้ชุดควบคุมจะสามารถลดค่าซีโอดีได้แต่การใส่เอนไซม์นั้นช่วยให้ลดค่าซีโอดีนั้นได้ดีกว่าการไม่ใส่เอนไซม์ อาจเนื่องมาจากน้ำเสียที่นำมาทดลองไม่ได้ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อ ดังนั้นชุดควบคุมอาจจะมีเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในน้ำเสียและสามารถลดค่าซีโอดีได้ แต่เมื่อมีการเพิ่มไลเพสเข้าไปในชุดการทดลอง ไลเพสนั้นจะไปช่วยเร่งการย่อยสลายโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ให้เป็น กลีเซอรอลและกรดไขมัน

จากนั้นเชื้อที่อาศัยอยู่ในน้ำเสียจะสามารถใช้กลีเซอรอลและกรดไขมันเป็นแหล่งคาร์บอนและดูดซึมเข้าภายในเซลล์เพื่อเกิดการย่อยสลายระดับเซลล์ ได้ผลิตภัณฑ์คือคาร์บอนไดออกไซด์ และ น้ำ (Nunn, 1986; Ratledge, 1992) จึงส่งผลให้ค่าซีโอดีลดลงได้ดีกว่าชุดควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Leal และคณะ, 2002) ซึ่งใช้ไลเพสจากเชื้อ *Penicillium restrictum* ย่อยสลายน้ำมันในน้ำเสียจากอุตสาหกรรมนมร่วมกับการบำบัดแบบไม่ใช้ออกซิเจน พบว่าการใช้ไลเพสเข้าในการบำบัดร่วมสามารถทำให้ลดค่าซีโอดีมากกว่าการไม่ใช้ไลเพสถึง 10 เท่า

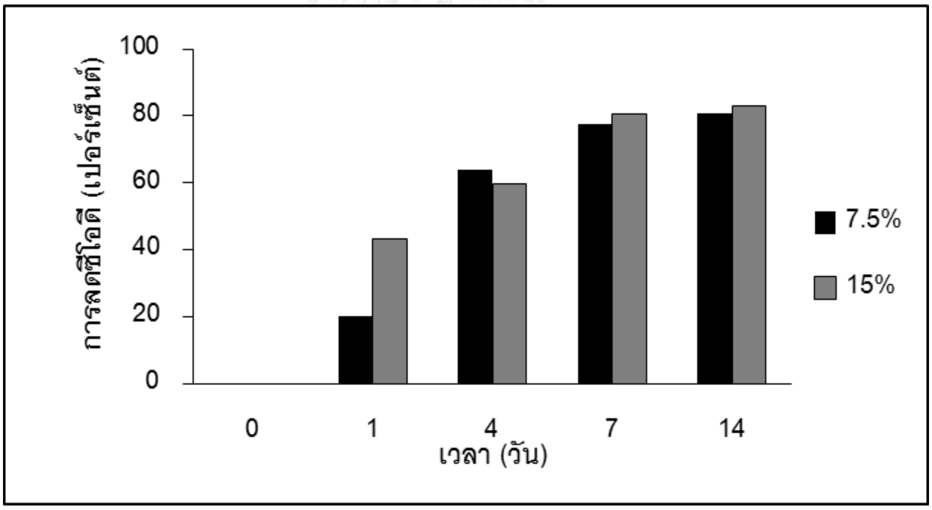


ภาพที่ 4.18 ค่าซีโอดีในน้ำเสียหลังผ่านการบำบัดด้วยไลเพส
ที่ความเข้มข้น 7.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



ภาพที่ 4.19 ค่าซีโอดีในน้ำเสียหลังผ่านการบำบัดด้วยไลเพส
ที่ความเข้มข้นไลเพส 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร



ภาพที่ 4.20 เปอร์เซ็นต์การลดลงของค่าซีโอดีในน้ำเสียหลังผ่านการบำบัดด้วยไลเพส
ที่ความเข้มข้นไลเพส 7.5 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

รายการอ้างอิง

Adulkar, T. V., and Rathod, V. K. 2015. Pre-treatment of high fat content dairy wastewater using different commercial lipases. *Desalination and Water Treatment.* 53(9): 2450-2455.

Alberton, D., Alexander Mitchell, D., Cordova, J., Peralta Zamora, P., and Krieger, N. 2010. Production of a fermented solid containing lipases of *Rhizopus microsporus* and its application in the pre-hydrolysis of a high-fat dairy wastewater. *Food Technology and Biotechnology.* 48(1): 28.

Aryee, A. N., Simpson, B. K., and Villalonga, R. 2007. Lipase fraction from the viscera of grey mullet (Mugil cephalus): isolation, partial purification and some biochemical characteristics. *Enzyme and Microbial Technology.* 40(3): 394-402.

Basheer, S. M., Chellappan, S., Beena, P., Sukumaran, R. K., Elyas, K., and Chandrasekaran, M. 2011. Lipase from marine *Aspergillus awamori* BTMFW032: production, partial purification and application in oil effluent treatment. *New Biotechnology.* 28(6): 627-638.

Benjamin, S., and Pandey, A. 1996. Optimization of liquid media for lipase production by *Candida rugosa*. *Bioresource Technology.* 55(2): 167-170.

Benjamin, S., and Pandey, A. 1998. *Candida rugosa* lipases: molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast* 14(12): 1069-1087.

Benjamin, S., and Pandey, A. 2001. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 44(2): 213-221.

Benzonana, G., and Esposito, S. 1971. On the positional and chain specificities of *Candida cylindracea* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA).* 231(1): 15-22.

Bremner, J. M., and Mulvaney, C. 1982. Nitrogen—total. *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*(2): 595-624.

Caixeta, C. E., Cammarota, M. C., and Xavier, A. M. 2002. Slaughterhouse wastewater treatment: evaluation of a new three-phase separation system in a UASB reactor. *Bioresource Technology.* 81(1): 61-69.

Cammarota, M., and Freire, D. 2006. A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease content. *Bioresource Technology.* 97(17): 2195-2210.

Cardenas, F., De Castro, M., Sanchez-Montero, J., Sinisterra, J., Valmaseda, M., Elson, S., and Alvarez, E. 2001. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. *Enzyme and Microbial Technology.* 28(2): 145-154.

Cardinal, E. V., and Hedrick, L. R. 1948. Microbiological assay of corn steep liquor for amino acid content. *Journal of Biological Chemistry.* 172(2): 609-612.

Castro-Ochoa, L. D., Rodríguez-Gómez, C., Valerio-Alfaro, G., and Ros, R. O. 2005. Screening, purification and characterization of the thermoalkalophilic lipase produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR11. *Enzyme and Microbial Technology.* 37(6): 648-654.

Chao, A. C., and Yang, W.-f. 1981. Biological treatment of wool scouring wastewater. *Water Pollution Control Federation*: 311-317.

Christi, Y. 1999. Solid substrate fermentations, enzyme production, food enrichment. *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation.* 5: 2446-2462.

Cihangir, N., and Sarikaya, E. 2004. Investigation of lipase production by a new isolate of *Aspergillus* sp. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 20(2): 193-197.

Colen, G., Junqueira, R. G., and Moraes-Santos, T. 2006. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 22(8): 881-885.

Cygler, M., Grochulski, P., Kazlauskas, R. J., Schrag, J. D., Bouthillier, F., Rubin, B., Serreqi, A. N., and Gupta, A. K. 1994. A structural basis for the chiral preferences of lipases. *Journal of the American Chemical Society.* 116(8): 3180-3186.

De Felice, B., Pontecorvo, G., and Carfagna, M. 1997. Degradation of waste waters from olive oil mills by *Yarrowia lipolytica* ATCC 20255 and *Pseudomonas putida*. *Acta Biotechnologica.* 17(3): 231-239.

Demirel, B., Yenigun, O., and Onay, T. T. 2005. Anaerobic treatment of dairy wastewaters: a review. *Process Biochemistry.* 40(8): 2583-2595.

Dharmsthiti, S., and Ammaranond, P. 1997. Purification and characterization of lipase from a raw-milk yeast (Trichosporon asteroides). *Biotechnology and Applied Biochemistry.* 26(2): 111-116.

Dheeman, D. S., Frias, J. M., and Henehan, G. T. 2010. Influence of cultivation conditions on the production of a thermostable extracellular lipase from *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.* 37(1): 1-17.

Dutra, J. C., Terzi, S. d. C., Bevilaqua, J. V., Damaso, M. C., Couri, S., Langone, M. A., and Senna, L. F. 2008. Lipase production in solid-state fermentation monitoring biomass growth of *Aspergillus niger* using digital image processing. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 147(1-3): 63-75.

Elibol, M., and Ozer, D. 2000. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochemistry.* 36(4): 325-329.

Ertuğrul, S., Dönmez, G., and Takaç, S. 2007. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials.* 149(3): 720-724.

FADILOĞLU, S., and Erkmen, O. 2002. Effects of carbon and nitrogen sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences.* 26(3): 249-254.

Fickers, P., Benetti, P.-H., Wache, Y., Marty, A., Mauersberger, S., Smit, M., and Nicaud, J.-M. 2005. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast Yarrowia lipolytica, and its potential applications. *FEMS yeast research.* 5(6-7): 527-543.

Gonçalves, C., Lopes, M., Ferreira, J. P., and Belo, I. 2009. Biological treatment of olive mill wastewater by non-conventional yeasts. *Bioresource Technology.* 100(15): 3759-3763.

Gordillo, M. A., Obradors, N., Montesinos, J. L., Valero, F., Lafuente, J., and Sola, C. 1995. Stability studies and effect of the initial oleic acid concentration on lipase production by *Candida rugosa*. *Applied Microbiology and Biotechnology*

43(1): 38-41.

Gupta, N., Sahai, V., and Gupta, R. 2007. Alkaline lipase from a novel strain Burkholderia multivorans: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. *Process Biochemistry.* 42(4): 518-526.

He, Y.-Q., and Tan, T.-W. 2006. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lipase with *Candida* sp. 99-125. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.* 43(1): 9-14.

Heravi, K. M., Eftekhar, F., Yakhchali, B., and Tabandeh, F. 2008. Isolation and identification of a lipase producing Bacillus sp. from soil. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 11(5): 740-745.

Hiol, A., Jonzo, M. D., Rugani, N., Druet, D., Sarda, L., and Comeau, L. C. 2000. Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic Rhizopus oryzae strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology.* 26(5): 421-430.

Idrees, S., and Rajoka, M. I. 2002. Production of lipases by *Rhizopus oligosporous* by solid-state fermentation. *Process Biochemistry.* 37(6): 637-641.

Iizumi, T., Nakamura, K., and Fukase, T. 1990. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. *Agricultural and Biological Chemistry.* 54(5): 1253-1258.

Ito, T., Kikuta, H., Nagamori, E., Honda, H., Ogino, H., Ishikawa, H., and Kobayashi, T. 2001. Lipase production in two-step fed-batch culture of organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *Journal of bioscience and bioengineering.* 91(3): 245-250.

Jung, F., Cammarota, M., and Freire, D. 2002. Impact of enzymatic pre-hydrolysis on batch activated sludge systems dealing with oily wastewaters. *Biotechnology Letters.* 24(21): 1797-1802.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Kademi, A., Lee, B., and Houde, A. 2003. Production of heterologous microbial lipases by yeasts. *Indian Journal of Biotechnology.* 2(3): 346-355.

Kamini, N., Fujii, T., Kurosu, T., and Iefuji, H. 2000. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2. *Process Biochemistry.* 36(4): 317-324.

Kempka, A. P., Celuppi, R., and Revello, J. H. P. 2013. Lipase and phospholipase in the hydrolysis of lipids in wastewater from swine slaughterhouse and subsequent biological treatment study. *Journal of Agricultural Science and Technology. A.* 3(10A): 757.

Kiran, G. S., Shanmughapriya, S., Jayalakshmi, J., Selvin, J., Gandhimathi, R., Sivaramakrishnan, S., Arunkumar, M., Thangavelu, T., and Natarajaseenivasan, K. 2008. Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas* sp.(MSI057). *Bioprocess and Biosystems Engineering.* 31(5): 483-492.

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.

Kok, R. G., Thor, J. J., Nugteren-Roodzant, I. M., Brouwer, M. B., Egmond, M. R., Nudel, C. B., Vosman, B., and Hellingwerf, K. J. 1995. Characterization of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413 and sequence analysis of the cloned structural gene. *Molecular Microbiology.* 15(5): 803-818.

Kuiken, K., Lyman, C. M., BRADFORD, M., TRANT, M., and DIETERICH, S. 1949. Essential amino acid composition of soy bean meals prepared from twenty strains of soy beans. *Journal of Biological Chemistry.* 177: 29-36.

Kumar, D., Rejitha, R., Devika, S., Balakumaran, M., Rebecca, A., and Kalaichelvan, P. 2012. Production, optimization and purification of lipase from *Bacillus* sp. MPTK 912 isolated from oil mill effluent. *Advances in Applied Science Research.* 3: 930-938.

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.

Kumar, S. S., and Gupta, R. 2008. An extracellular lipase from *Trichosporon asahii* MSR 54: Medium optimization and enantioselective deacetylation of phenyl ethyl acetate. *Process Biochemistry.* 43(10): 1054-1060.

Leal, M., Cammarota, M., Freire, D., and Anna Jr, S. 2002. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewaters. *Brazilian Journal of Chemical Engineering.* 19(2): 175-180.

Lee, S. Y., and Rhee, J. S. 1993. Production and partial purification of a lipase from Pseudomonas putida 3SK. *Enzyme and Microbial Technology.* 15(7): 617-623.

Liu, C.-H., Huang, C.-C., Wang, Y.-W., and Chang, J.-S. 2012. Optimizing lipase production from isolated *Burkholderia* sp. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers.* 43(4): 511-516.

Lotti, M., Monticelli, S., Montesinos, J. L., Brocca, S., Valero, F., and Lafuente, J. 1998. Physiological control on the expression and secretion of *Candida rugosa* lipase. *Chemistry and Physics of Lipids.* 93(1): 143-148.

Macrae, A. 1983. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 60(2): 291-294.

Macrae, A., and Hammond, R. 1985. Present and future applications of lipases. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.* 3(1): 193-218.

Mahdi, B. A., Bhattacharya, A., and Gupta, A. 2012. Enhanced lipase production from *Aeromonas* sp. S1 using Sal deoiled seed cake as novel natural substrate for potential application in dairy wastewater treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 87(3): 418-426.

Markossian, S., Becker, P., Märkl, H., and Antranikian, G. 2000. Isolation and characterization of lipid-degrading *Bacillus thermoleovorans* IHI-91 from an Icelandic hot spring. *Extremophiles.* 4(6): 365-371.

Matsumiya, Y., Wakita, D., Kimura, A., Sanpa, S., and Kubo, M. 2007. Isolation and characterization of a lipid-degrading bacterium and its application to lipid-

containing wastewater treatment. *Journal of bioscience and bioengineering.* 103(4): 325-330.

Mayordomo, I., Randez-Gil, F., and Prieto, J. A. 2000. Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 48(1): 105-109.

Mongkolthanaruk, W., and Dharmsthiti, S. 2002. Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 50(2): 101-105.

Montesinos, J., Obradors, N., Gordillo, M., Valero, F., Lafuente, J., and Sola, C. 1996. Effect of nitrogen sources in batch and continuous cultures to lipase production by *Candida rugosa*. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 59(1): 25-37.

Muderhwa, J., Ratomahenina, R., Pina, M., Graille, J., and Galzy, P. 1985. Purification and properties of the lipase from *Candida deformans* (zach) langeron and guerra. *Journal of the American Oil Chemists Society.* 62(6): 1031-1036.

Muralidhar, R., Chirumamila, R., Marchant, R., and Nigam, P. 2001. A response surface approach for the comparison of lipase production by Candida cylindracea using two different carbon sources. *Biochemical Engineering Journal.* 9(1): 17-23.

Nunn, W. D. 1986. A molecular view of fatty acid catabolism in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews.* 50(2): 179.

Oishi, H., Morimoto, T., Watanabe, Y., and Tamai, Y. 1999. Purification and characterization of phospholipase B from *Kluyveromyces lactis*, and cloning of phospholipase B gene. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 63(1): 83-90.

Omar, I. C., Nishio, N., and Nagai, S. 1987. Production of a thermostable lipase by *Humicola lanuginosa* grown on sorbitol-corn steep liquor medium. *Agricultural and Biological Chemistry.* 51(8): 2145-2151.

Pabai, F., Kermasha, S., and Morin, A. 1996. Use of continuous culture to screen for lipase-producing microorganisms and interesterification of butter fat by lipase isolates. *Canadian Journa of Microbiology.* 42(5): 446-452.

Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N., and Soccol, V. T. 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry.* 29(2): 119-131.

Papagora, C., Roukas, T., and Kotzekidou, P. 2013. Optimization of extracellular lipase production by Debaryomyces hansenii isolates from dry-salted olives using response surface methodology. *Food and Bioproducts Processing.* 91(4): 413-420.

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.

Paraskeva, P., and Diamadopoulos, E. 2006. Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 81(9): 1475-1485.

Patterson, J. W. 1985. Industrial wastewater treatment technology. *Second edition. United States: Butterworth Publishers,Stoneham, MA.*

Pereira, E. B., De Castro, H. F., De Moraes, F. F., and Zanin, G. M. 2001. Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa*. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 91(1-9): 739-752.

Pernas, M., Lopez, C., Pastrana, L., and Rua, M. 2000. Purification and characterization of Lip2 and Lip3 isoenzymes from a *Candida rugosa* pilot-plant scale fed-batch fermentation. *Journal of Biotechnology.* 84(2): 163-174.

Pinheiro, T. d. L. F., Menoncin, S., Domingues, N. M., Oliveira, D. d., Treichel, H., Di Luccio, M., and Freire, D. M. G. 2008. Production and partial characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* obtained by submerged fermentation of conventional and industrial media. *Food Science and Technology (Campinas).* 28(2): 444-450.

Pokorny, D., Friedrich, J., and Cimerman, A. 1994. Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters.* 16(4): 363-366.

Potumarthi, R., Subhakar, C., Pavani, A., and Jetty, A. 2008. Evaluation of various parameters of calcium-alginate immobilization method for enhanced alkaline

protease production by *Bacillus licheniformis* NCIM-2042 using statistical methods. *Bioresource Technology.* 99(6): 1776-1786.

Ratledge, C. 1992. Microbial oxidations of fatty alcohols and fatty acids. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 55(4): 399-400.

Ravichandra, P., Subhakar, C., Vanajakshi, J., and Jetty, A. 2008. Effect of aeration and agitation regimes on lipase production by newly isolated Rhodotorula mucilaginosa-MTCC 8737 in stirred tank reactor using molasses as sole production medium. *Applied Biochem Biotechnol.* 151(2-3): 700-710.

Redondo, O., Herrero, A., Bello, J., Roig, M., Calvo, M., Plou, F., and Burguillo, F. 1995. Comparative kinetic study of lipases A and B from *Candida rugosa* in the hydrolysis of lipid p-nitrophenyl esters in mixed micelles with Triton X-100. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects.* 1243(1): 15-24.

Rekha, K., Lakshmi, M. V. C., Devi, V. S., and siddartha Kumar, M. 2012. Production and optimization of lipase from *Candida rugosa* using groundnut oilcake under solid state fermentation. *biosensors.* 27: 31.

Rigo, E., Rigoni, R. E., Lodea, P., Oliveira, D. d., Freire, D. M., and Luccio, M. D. 2008. Application of different lipases as pretreatment in anaerobic treatment of wastewater. *Environmental Engineering Science.* 25(9): 1243-1248.

Rosa, D. R., Duarte, I. C., Saavedra, N. K., Varesche, M. B., Zaiat, M., Cammarota, M. C., and Freire, D. M. 2009. Performance and molecular evaluation of an anaerobic system with suspended biomass for treating wastewater with high fat content after enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology.* 100(24): 6170-6176.

Segura, R. L., Betancor, L., Palomo, J. M., Hidalgo, A., Fernández-Lorente, G., Terreni, M., Mateo, C., Cortés, A., Fernández-Lafuente, R., and Guisán, J. M. 2006. Purification and identification of different lipases contained in PPL commercial extracts: a minor contaminant is the main responsible of most esterasic activity. *Enzyme and Microbial Technology.* 39(4): 817-823.

Shariff, F. M., Rahman, R. N. Z. R. A., Basri, M., and Salleh, A. B. 2011. A newly isolated thermostable lipase from *Bacillus* sp. *International Journal of Molecular Sciences.* 12(5): 2917-2934.

Sharma, R., Chisti, Y., and Banerjee, U. C. 2001. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances.* 19(8): 627-662.

Sharon, C., Furugoh, S., Yamakido, T., Ogawa, H., and Kato, Y. 1998. Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 20(5): 304-307.

Shirazi, S., Rahman, S., and Rahman, M. 1998. Production of extracellular lipases by *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 14(4): 595-597.

Singh, A. K., and Mukhopadhyay, M. 2012. Overview of fungal lipase: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 166(2): 486-520.

Song, Q., Lin, J., Rong, Y., and Wei, D. 2001. Studies on lipase production from Candida rugosa. *Chinese Journal of Biotechnology.* 17(1): 101-104.

Sugihara, A., Tani, T., and Tominaga, Y. 1991. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. *Journal of Biochemistry.* 109(2): 211-216.

Sztajer, H., and Maliszewska, I. 1989. The effect of culture conditions on lipolytic productivity of *Penicillium citrinum*. *Biotechnology Letters.* 11(12): 895-898.

Tan, T., Zhang, M., Wang, B., Ying, C., and Deng, L. 2003. Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. *Process Biochemistry.* 39(4): 459-465.

Tano-Debrah, K., Fukuyama, S., Otonari, N., Taniguchi, F., and Ogura, M. 1999. An inoculum for the aerobic treatment of wastewaters with high concentrations of fats and oils. *Bioresource Technology.* 69(2): 133-139.

Thakur, S. 2012. Lipases, its sources, properties and applications: A Review. *International Journal of Scientific & Engineering Research.* 3(7): 1-29.

Treichel, H., de Oliveira, D., Mazutti, M. A., Di Luccio, M., and Oliveira, J. V. 2010. A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology.* 3(2): 182-196.

Tsujisaka, Y., Iwai, M., and Tominaga, Y. 1973. Purification, crystallization and some properties of lipase from *Geotrichum candidum* Link. *Agricultural and Biological Chemistry.* 37(6): 1457-1464.

Turki, S., Kraeim, I. B., Weeckers, F., Thonart, P., and Kallel, H. 2009. Isolation of bioactive peptides from tryptone that modulate lipase production in *Yarrowia lipolytica*. *Bioresource Technology.* 100(10): 2724-2731.

Valladão, A., Torres, A., Freire, D., and Cammarota, M. 2011. Profiles of fatty acids and triacylglycerols and their influence on the anaerobic biodegradability of effluents from poultry slaughterhouse. *Bioresource Technology.* 102(14): 7043-7050.

Wakelin, N., and Forster, C. 1997. An investigation into microbial removal of fats, oils and greases. *Bioresource Technology.* 59(1): 37-43.

Willey, R. 2001. Fats, oils, and greases: The minimization and treatment of wastewaters generated from oil refining and margarine production. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 50(2): 127-133.

Winayanuwattikun, P., Kaewpiboon, C., Piriyakananon, 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.

Yamaguchi, T., Muroya, N., Isobe, M., and Sugiura, M. 1973. Production and properties of lipase from a newly isolated Chromobacterium. *Agricultural and Biological Chemistry.* 37(5): 999-1005.

Yong, Y., Bai, Y.-X., Li, Y.-F., Lin, L., Cui, Y.-J., and Xia, C.-G. 2008. Characterization of *Candida rugosa* lipase immobilized onto magnetic microspheres with hydrophilicity. *Process Biochemistry.* 43(11): 1179-1185.

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารแข็ง YM (YM Agar)

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3 กรัม
สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract)	5 กรัม
เปปโตน (Peptone)	5 กรัม
เดกโตรส (Dextrose)	10 กรัม
วุ้นผง (Agar)	15 กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1 ลิตร

ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโรคด้วยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสและความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเหลว YM (YM Broth)

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3 กรัม
สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract)	5 กรัม
เปปโตน (Peptone)	5 กรัม
เดกโตรส (Dextrose)	10 กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	1 ลิตร

ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.0 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโรคด้วยความร้อนชื้นที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียสและความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเหลวสูตร Lipase production medium

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	10 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	1 กรัม
น้ำมันปาล์ม (Palm oil) (w/v)	1 เปอร์เซ็นต์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสและความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

น้ำเสียสังเคราะห์ที่มีการน้ำมันปาล์ม

แบคโต-เปบโตน (Bacto-peptone)	0.6 กรัม
เนื้อสกัด (Beef extract)	0.4 กรัม
ยูเรีย (Urea)	0.1 กรัม
โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	0.1 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (Nacl)	0.03 กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	
0.014 กรัม	
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.014 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟส ($MgSO_4$)	0.01 กรัม
น้ำมันปาล์ม	1 เปอร์เซ็นต์
น้ำกลั่น (Distilled water)	1 ลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

สารเคมีสำหรับวัดแอกทิวิตีไลเพส

100 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟส บัฟเฟอร์ pH 7.2

Solution A:

100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NaH_2PO_4.2\ H_2O$)	7.8	กรัม
100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	2.9	กรัม

ปรับปริมาณเป็น 500 มิลลิลิตร

Solution B:

100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO4)	7.9	กรัม

100 มิลลิโมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

2.9 กรัม

ปรับปริมาณเป็น 500 มิลลิลิตร

จากนั้นเท Solution A ลงใน B จนได้ pH 7.2

40 มิลลิโมลาร์ พาราไนโตรฟีนิลบิวทิเรต

พาราไนโตรฟีนิลบิวทิเรต	418 มิลลิกรัม
2-เมทิล-2-บิวทานอล	50 มิลลิลิตร

เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของสารละลายพาราไนโตรฟีนอลที่ปริมาณ 0.04-0.24 มิลลิโมลาร์

วิธีสร้างกราฟมาตรฐานสารละลายพาราไนโตรฟีนอล

1. เตรียมสารละลายพาราไนโตรฟีนอล 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร โดยใช้ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ความเป็นกรดด่าง 7.2 เป็นตัวทำละลาย
2. ปิเปตสารละลายพาราไนโตรฟีนอล จากข้อ 1 และ 0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดด่าง 7.2 ลงใน ไมโครเพลต ตามตารางด้านล่าง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตรและนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานโดยให้แกน Y คือค่าการดูดกลืนแสง แกน X คือความเข้มข้นของพาราไนโตรฟีนอลในหน่วยมิลลิโมลาร์

พาราไนโตรฟีนอล (มิลลิโมลาร์)	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	
	พาราไนโตรฟีนอล (2 มิลลิโมลาร์)	0.1 โมลาร์ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7
0	0	500
0.04	10	490
0.08	20	480
0.12	30	470
0.16	40	460
0.2	50	450
0.24	60	440

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ง

การคำนวณค่าต่างๆ

1. การคำนวณค่าแอกทิวิตี

วิธีคำนวณทำโดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัดมาแทนค่าในสมการเส้นตรงจากกราฟมาตรฐานของพาราไนโตรฟีนอล ตามสมการดังนี้

$$Y = 6.967X+0.0523$$

โดยทำการแทนค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในค่า Y จะทำให้ได้ค่า X ซึ่งแทนปริมาณของพาราไนโตรฟีนอล ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเป็นมิลลิโมลาร์ จากนั้นปรับหน่วยของพาราไนโตรฟีนอลจากมิลลิโมลาร์ให้อยู่ในหน่วยไมโครโมล แล้วคูณกลับให้เป็นการใช้เอนไซม์ในหน่วยต่อมิลลิลิตร จะได้หน่วยเป็นไมโครโมลต่อเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร และสุดท้ายหารด้วยเวลาที่ใช้เกิดปฏิกิริยาคือ 10 นาที จะได้หน่วยสุดท้ายเป็นหน่วย ไมโครโมล ต่อมิลลิลิตร ต่อนาที หรือหน่วยยูนิตนั่นเอง

1 ยูนิตของไลเพส (U/ml) คือ การเปลี่ยนพารา-ไนโตรฟีนีลบิวทิเรตเป็นพารา-ไนโตรฟีนอล 1 ไมโครโมลต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวภัทรพรรณ ธนพงศ์ เกิดวันที่ 4 กันยายน.พ.ศ. 2532 ที่กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2554 จากนั้นเข้าศึกษาระดับปริญญาโท วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ที่คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษาถัดมา และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2558

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University