การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่แยกได้จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

Screening and Optimization for Lipase Production from Thermophilic Bacteria Isolated from Palm Oil Mills

จุรีรัตน์ แซ่แต้

Jureerat Saetae

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology

Prince of Songkla University

2541

2

แหล่งที่ QP 609.L5 จ74 2541 ฉ.2

Bib Key 151472

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่แยกได้จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ผู้เขียน นางสาวจุรีรัตน์ แซ่แต้

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ สันตินานาเลิศ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นันทา เชิงเชาว์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ก้าน จันทร์พรหมมา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่แยกได้จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

ผู้เขียน นางสาวจุรีรัตน์ แซ่แต้

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2541

บทคัดย่อ

ผลการสุ่มตัวอย่างดินและน้ำที่มีน้ำมันปนเปื้อนจำนวน 98 ตัวอย่างจากบริเวณที่มีอุณหภูมิสูงของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 5 โรงงาน พบแบคทีเรีย 29 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างวงใสบนอาหารที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อศึกษาสมบัติบางประการด้านสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี ของแบคทีเรียที่สร้างวงใสได้กว้างที่สุด 3 สายพันธุ์คือ UN16a, PS15 และ IN5 จัดอยู่ในสกุล *Bacillus* โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* sp. PS15 ให้กิจกรรมของไลเปสสูงสุดคือ 0.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 36 ชั่วโมง

ผลการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญและการผลิตไลเปสโดย *Bacillus* sp. PS15 ในอาหารซึ่งมี K_2HPO_4 0.18 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 0.10 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4$ $7H_2O$ 0.03 เปอร์เซ็นต์ และกัมอราบิค 0.10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่างๆ พบว่า ไขมันวัวความเข้มข้น 1.50 เปอร์เซ็นต์ NH_4NO_3 ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับยีสต์สกัดความเข้มข้น 0.06 เปอร์เซ็นต์ ให้การผลิตไลเปสสูงสุดคือ 0.38 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 48 ชั่วโมง ในสภาวะการเลี้ยงคือ พีเอชเริ่มต้น 7.0 ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสโดย *Bacillus* sp. PS15 ในถังหมักขนาด 3 ลิตร มีอาหารปริมาตร 1.5 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากผลการทดลองข้างต้น พบว่าสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมคือ พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ

7.0 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ไม่มีการควบคุมพีเอชของอาหารในระหว่างการเลี้ยง ให้อากาศ 2.0 ปริมาณอากาศต่อปริมาณอาหารต่อนาที อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที เชื้อผลิตไลเปสได้สูงสุดเท่ากับ 0.22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 36 ชั่วโมง

การศึกษาคุณสมบัติของไลเปสในน้ำหมักจาก *Bacillus* sp. PS15 พบว่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 9.5 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และมีความคงตัวสูงในพีเอชช่วง 9.0-9.5 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เอนไซม์มีกิจกรรมคงเหลือมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และกิจกรรมลดลงเหลือ 31 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

Thesis Title	Screening and Optimization for Lipase Production from Thermophilic Bacteria Isolated from Palm Oil Mills
Author	Miss Jureerat Saetae
Major Program	Biotechnology
Academic Year	1998

Abstract

Form 98 oil-contaminated samples collected from high temperature sections of 5 plam oil mills, 29 isolates formed colonies with clear zone around them on agar plate medium consisted of palm oil as a sole carbon source. The morphological, physiological and biochemical characteristics of the isolates UN16a, PS15 and IN5 that produced large clear zone were examined and identified as genus *Bacillus*. Studies on lipase production in liquid medium revealed that the strain PS15 exhibited the highest lipase activity of 0.15 U/ml at 36 h.

Optimization of lipase production by *Bacillus* sp. PS15 was studied in the medium containing 0.18% K_2HPO_4 , 0.10% KH_2PO_4 , 0.03% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ and 0.10% gum arabic by varying carbon and nitrogen sources. The *Bacillus* sp. PS15 produced maximum lipase activity of 0.38 U/ml at 48 h in 50 ml medium in 250 ml-flask contained 1.50% beef tallow, 0.20% NH_4NO_3 and 0.06% yeast extract., pH 7.0 on a rotary shaker incubator at 200 rpm and 55°C.

When *Bacillus* sp. PS15 was cultivated in 3 L fermentor with 1.5 L working volume in the optimized medium. The optimum culture conditions included the initial pH of 7.0, incubation temperature at 55°C, aeration 2.0 vvm and agitation speed of 200 rpm. The strain PS 15 produced the hightest activity of 0.22 U/ml after 36 h of cultivation.

Crude lipase from culture broth of *Bacillus* sp. PS15 had the maximum activity at pH 9.5 and temperature 55°C. The enzyme was stable at pH 9.0-9.5. More than 80% of the enzyme activity remained at 70°C for 2 h while at 80°C for 30 min the lipase activity decreased to 31%.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำตลอดการทำวิจัย การค้นคว้าและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำแนะนำต่าง ๆ ในการทำวิจัยและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ สันตินานาเลิศ กรรมการผู้แทนคณะอุตสาหกรรมเกษตร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นันทา เชิงเชาว์ กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) ที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาและวิจัยเป็นเวลา 2 ปีการศึกษา และขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ ด้วยความเคารพรักยิ่ง ที่ได้ให้กำลังใจและสนับสนุนการศึกษาของข้าพเจ้ามาโดยตลอด ขอขอบคุณเพื่อนๆ และเจ้าหน้าที่คณะอุตสาหกรรมเกษตร ตลอดจนทุกท่านที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัย และให้คำแนะนำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

จุรีรัตน์ แซ่แต้

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(10)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	30
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	31
วัสดุ	31
อุปกรณ์	32
การวิเคราะห์	32
วิธีการ	34
3. ผลและวิจารณ์	39
4. สรุป	69
เอกสารอ้างอิง	71
ภาคผนวก	83
ภาคผนวก ก. สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	83
ภาคผนวก ข. สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์	84
ภาคผนวก ค. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	87
ประวัติผู้เขียน	92

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง	5
2.	การประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่คงตัวที่อุณหภูมิสูงในทางอุตสาหกรรม	8
3.	จุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูงที่ผลิตไลเปส	15
4.	อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสชอบอุณหภูมิสูง	22
5.	การนำไลเปสจากจุลินทรีย์ไปใช้ในอุตสาหกรรม	25
6.	คุณสมบัติของแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่ผลิตไลเปสซึ่งคัดเลือกได้จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม	40
7.	คุณสมบัติของแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงสายพันธุ์ UN16a, PS15 และ IN5	42

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1.	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญและอุณหภูมิของแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง	3
2.	ผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ด้วยไลเปสชนิดต่างๆ	10
3.	ความสามารถในการทำงานของไลเปส	12
4.	ขั้นตอนการผลิตโกโก้บัตเตอร์	27
5.	การสังเคราะห์กลูโคไซด์เอสเทอร์จากกรดไขมันและกลูโคไซด์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antarctica*	28
6.	การเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และกิจกรรมไลเปสของแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *Bacillus* สายพันธุ์ UN16a, PS15 และ IN5	43
7.	ผลของแหล่งคาร์บอน (คาร์โบไฮเดรต) ต่อการเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอชและกิจกรรมไลเปสของ *Bacillus* sp. PS15	45
8.	ผลของแหล่งคาร์บอน (น้ำมันและไขมัน) ต่อการเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และกิจกรรมไลเปสของ *Bacillus* sp. PS15	46
9.	ผลของปริมาณไขมันวัวต่อการเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอชและกิจกรรมไลเปสของ *Bacillus* sp. PS15	48
10.	ผลของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ต่อการเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอชและกิจกรรมไลเปสของ *Bacillus* sp. PS15	49
11.	ผลของปริมาณแอมโมเนียมไนเตรตต่อการเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และกิจกรรมไลเปสของ *Bacillus* sp. PS15	51
12.	ผลของปริมาณยีสต์สกัดต่อการเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอชและกิจกรรมไลเปสของ *Bacillus* sp. PS15	52
13.	ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และกิจกรรมไลเปสของ *Bacillus* sp. PS15	54

ภาพที่ หน้า

14. ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอชและกิจกรรมไลเปสของ *Bacillus* sp. PS15 56
15. ผลของการควบคุมพีเอชของอาหารต่อการเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอชและกิจกรรมไลเปสของ *Bacillus* sp. PS15 58
16. ผลของการให้อากาศต่อการเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอชและกิจกรรมไลเปสของ *Bacillus* sp. PS15 59
17. การเจริญและกิจกรรมไลเปสของ *Bacillus* sp. PS15 ที่สภาวะที่เหมาะสม 61
18. ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของไลเปสจาก *Bacillus* sp. PS15 63
19. ผลของพีเอชต่อความคงตัวของไลเปสจาก *Bacillus* sp. PS15 64
20. ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของไลเปสจาก *Bacillus* sp. PS15 66
21. ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของไลเปสจาก *Bacillus* sp. PS15 67

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ตรงพันธะเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันโมเลกุลยาวกับกลีเซอรอล ได้กรดไขมัน กลีเซอรอล โมโนกลีเซอไรด์ และไดกลีเซอไรด์ นอกจากนี้ยังเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ของแอลกอฮอล์และกรดไขมัน และการแลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่างเอสเทอร์ชนิดต่างๆ ทำให้มีการนำไลเปสไปใช้ในการสังเคราะห์สารต่างๆ มากมาย เช่น กรดไขมัน และกลีเซอรอล (Ibrahim, *et al.*, 1987) โมโนกลีเซอไรด์ (McNeill, *et al.*, 1990) และไตรกลีเซอไรด์ (Ergan, *et al.*, 1990) ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตโกโก้บัตเตอร์ (Bosley, 1996) และสารสดแรงตึงผิว (Bjorkling, *et al.*, 1991) ใช้ในการพัฒนากลิ่นและรสชาติในอุตสาหกรรมอาหาร ใช้ในทางเภสัชกรรม อุตสาหกรรมเครื่องสำอางและอุตสาหกรรมสารซักล้าง

สำหรับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเหล่านี้ เอนไซม์ไลเปสทนอุณหภูมิสูงมีข้อได้เปรียบเพราะมีความเสถียรต่อความร้อน สามารถทำปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิสูง จึงสามารถใช้ในการสังเคราะห์สารที่ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เกิดที่อุณหภูมิสูง และเมื่อใช้วัตถุดิบที่มีจุดหลอมเหลวสูง เช่น ไขมันวัว ก็สามารถใช้ไลเปสทำงานที่อุณหภูมิสูงเพื่อป้องกันการแข็งตัวของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้การทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูงเป็นผลให้อัตราของปฏิกิริยาเร็วขึ้น ช่วยเพิ่มอัตราการส่งผ่านสาร อัตราการแพร่ผ่าน ลดความหนืด และลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ (Herbert, 1992 ; Becker, *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังสามารถทนต่อสภาวะที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ และสามารถใช้ในปฏิกิริยาที่มีสภาวะที่เอนไซม์ปกติทำไม่ได้ เช่นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในตัวทำละลายอินทรีย์เป็นต้น (พรทิพา อังคนุรักษ์พันธ์, 2534) จากการที่เอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิปกติ จึงมีความคงทนในการผลิตทางการค้า และยืดระยะเวลาการเก็บรักษาเอนไซม์ได้นานขึ้น (Godfrey and Reichelt, 1983)

เนื่องจากมีความต้องการใช้เอนไซม์ไลเปสทนอุณหภูมิสูงมากขึ้นดังนั้นจึงมีความสนใจที่จะคัดเลือกจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูงที่ผลิตไลเปสกันมาก ส่วนใหญ่จะคัดเลือกเชื้อจากแหล่งธรรมชาติที่มีอุณหภูมิสูงเช่นบริเวณน้ำพุร้อน (Emanuilova, *et al.*, 1993 ; Wang, *et al.*, 1995 ; Svetlitshnyi, *et al.*, 1996) นอกจากนี้ยังพบจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูงได้ตามบริเวณที่มีการทับถมของถ่านหิน กองหญ้าหมัก และน้ำทิ้งอุณหภูมิสูงจากโรงงานอุตสาหกรรม (Brock, 1986)

เนื่องจากภาคใต้ของประเทศไทยมีอุตสาหกรรมการสกัดน้ำมันปาล์มมาก และในขั้นตอนของการย่อยผลปาล์มนั้นจะมีการเติมน้ำร้อน (อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส) ลงไปเพื่อช่วยสกัดน้ำมันออกจากส่วนเปลือก (pericarp) (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และคณะ, 2533) เมื่อแยกน้ำมันออกแล้วจะมีน้ำทิ้งที่มีอุณหภูมิสูงและมีไขมันเป็นองค์ประกอบสำคัญ จึงน่าสนใจนำมาคัดเลือกจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูงที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งที่จะคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไลเปสจากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม และศึกษาคุณสมบัติบางประการของไลเปสที่ได้

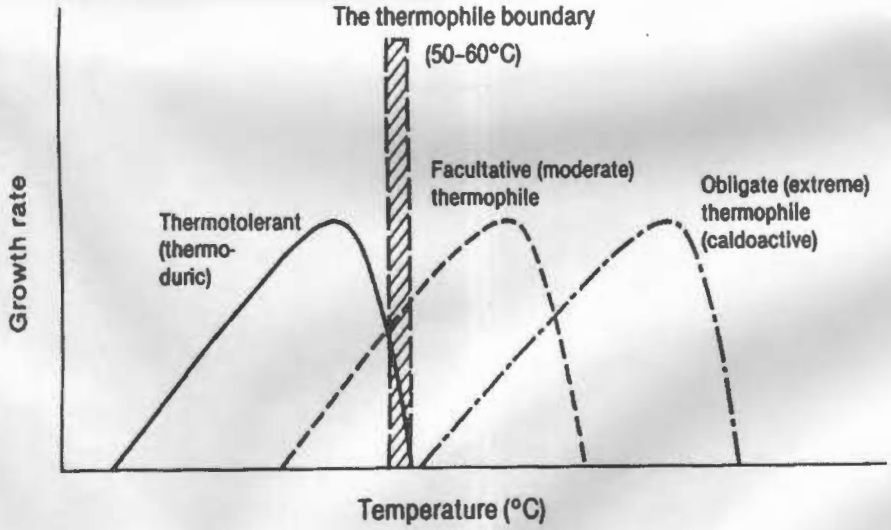
ตรวจเอกสาร

1. แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic bacteria)

จุลินทรีย์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญแตกต่างกัน โดยทั่วไปสามารถแบ่งจุลินทรีย์ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญได้เป็น 3 กลุ่มคือ จุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophiles) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 25 ถึง 40 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (psychrophiles) เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสจนถึงอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งของน้ำ และจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophiles) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญในช่วง 45-50 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า (VanDermark and Batzing, 1987)

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูง[redacted]ช่วงกว้าง อาจจะหมายถึงจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำสุด 37 องศาเซลเซียส หรือจุลินทรีย์ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญสูงกว่า 55 องศาเซลเซียส ในส่วนของแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงมักพบในสกุลที่สร้างสปอร์ เช่น *Bacillus* และ *Clostridium* (VanDermark and Batzing, 1987) โดยทั่วไปจุลินทรีย์พวกโปรคารีโอต (procaryotes) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่าจุลินทรีย์พวกยูคารีโอต (eucaryote) พบว่ามีราและสาหร่ายจำนวนไม่กี่ชนิดที่เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิสูงถึง 55-60 องศาเซลเซียส (Brock, 1986)

แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงบางชนิดจัดเป็น แฟคคัลเทตีฟเทอร์โมไฟล์ (facultative thermophiles) คือสามารถเจริญได้ตั้งแต่ช่วงอุณหภูมิปานกลางถึงอุณหภูมิสูง โดยมีอัตราการเจริญสูงสุดที่อุณหภูมิสูงกว่า 50-60 องศาเซลเซียส แต่ยังสามารถเจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50-60 องศาเซลเซียสได้ (ภาพที่ 1) สำหรับแบคทีเรียบางชนิดต้องดำรงชีวิตในที่ที่มีอุณหภูมิสูงเท่านั้น ไม่สามารถเจริญได้ภายใต้อุณหภูมิต่ำกว่า 50-60 องศาเซลเซียส เรียกว่า ออบลิเกท หรือ เอ็กทรีมเทอร์โมไฟล์ (obligate หรือ extreme thermophiles) หรือ คาลโดแอคตีฟ (caldoactive) ส่วนแบคทีเรียที่สามารถอยู่รอดที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส แต่อัตรา



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญและอุณหภูมิของแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง
ที่มา : Brock, 1986

การเจริญสูงสุดอยู่ภายใต้อุณหภูมิต่ำกว่า 50-60 องศาเซลเซียส เรียกว่าแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง (thermotolerant หรือ thermoduric bacteria) แบคทีเรียเหล่านี้จะทนต่อขบวนการพาสเจอไรซ์ได้ เช่น *Micrococcus* sp. , *Mycobacterium* sp. (Brock, 1986 ; Ketchum, 1988)

การที่กำหนดขอบเขตอุณหภูมิ (thermophile boundary) เป็น 50-60 องศาเซลเซียส นั้นตั้งอยู่บนพื้นฐานทางนิเวศวิทยาและวิวัฒนาการคือ อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส พบได้ทั่วไปบนโลก ในขณะที่ช่วงอุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส พบได้น้อยในธรรมชาติ โดยเกี่ยวพันธ์กับแหล่งที่อยู่บนพื้นโลกที่มีอุณหภูมิต่างกัน และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นขอบเขตจำกัดสูงสุดสำหรับยูคาริโอต ดังนั้น ที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส จึงพบเพียงโปรคาริโอตเท่านั้น (Brock, 1986)

ส่วนแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูงยิ่งยวด (hyperthermophiles) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญระหว่าง 80-110 องศาเซลเซียส จัดเป็นตัวแทนของสิ่งมีชีวิตที่มีฟีโนไทป์ (phenotype) โบราณที่สุด ซึ่งอาจจะสะท้อนวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตในระยะเริ่มต้น (Schonheit and Schafer, 1995) ตัวอย่างเช่น *Pyrodictium brockii* เป็นอาคีแบคทีเรีย (archaebacteria) ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญที่ 105 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 และไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (Cowan, 1992)

จากรายละเอียดเกี่ยวกับการวิเคราะห์ 16 เอส อาร์เอ็นเอ (16sRNA) โดย Fox และคณะ (1980) ได้เสนอ phylogenetic scheme สำหรับสิ่งมีชีวิตโดยแบ่งสิ่งมีชีวิตออกเป็น 3 อาณาจักรคือ ยูคาริโอต (eucaryote), ยูแบคทีเรีย (eubacteria) และ อาคีแบคทีเรีย (archaebacteria) และเมื่อพิจารณาตารางที่ 1 ซึ่งแสดงสายพันธุ์แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงและช่วงอุณหภูมิที่สามารถเจริญได้ จะเห็นว่าจุลินทรีย์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึงจุดเดือดของน้ำ (hyperthermophiles) ล้วนเป็นจุลินทรีย์กลุ่มอาคีแบคทีเรียทั้งสิ้น (Brock 1986)

เหตุผลที่แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงสามารถมีชีวิตรอดและเจริญได้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงนั้นเนื่องจากโครงสร้างไลปิดของผนังเซลล์ประกอบด้วยกรดไขมันประเภทอิ่มตัว กรดไขมันที่มีกิ่งสาขา และกรดไขมันสายยาวในสัดส่วนที่สูง เนื่องจากผนังเซลล์ทำหน้าที่ในการขนส่งสาร จึงต้องการไขมันที่อยู่ในสภาวะกึ่งของเหลว (semifluid state) ซึ่งสภาวะการเป็นของเหลวนี้ ขึ้นกับธรรมชาติทางเคมีของไลปิดและอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อม ผนังเซลล์ที่

ตารางที่ 1 แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง

สกุล	จำนวนสายพันธุ์	ช่วงอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
Phototrophic bacteria		
Cyanobacteria	16	55-70 (One strain, 74)
Purple bacteria	1	55-60
Green bacteria	1	70-73
Gram-positive bacteria		
Bacillus	15	50-70
Clostridium	11	50-75
Lactic acid bacteria	5	50-65
Actinomycetes	23	55-75
Other eubacteria		
Thiobacillus	3	50-60
Spirochete	1	54
Desulfotomaculum	7	37-55
Gram-negative aerobes	7	50-75
Gram-negative anaerobes	4	50-75
Archaebacteria		
Methanogens	4	55-95
Sulfur-dependent	10	55-110
Thermoplasma	1	37-55

ที่มา : Brock, 1986

ประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัวสายยาวและกรดไขมันที่มีกิ่งสาขาในสัดส่วนที่สูง จะมีสภาวะเหลวที่อุณหภูมิสูงเท่านั้น ดังนั้นแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงจึงสามารถดำรงชีวิตได้ในช่วงอุณหภูมิสูงเท่านั้น และเมื่อพิจารณาความแตกต่างทางธรรมชาติของโปรตีนและเอนไซม์ พบว่าคุณสมบัติหลายข้อของโปรตีนและเอนไซม์ของแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง เช่น น้ำหนักโมเลกุล องค์ประกอบหน่วยย่อย (subunit composition) และผลของสารแอลโลสเตอริกที่มาจับ (allosteric effectors) คล้ายคลึงกับแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง แต่กลับมีความเสถียรที่อุณหภูมิสูง จึงควรเป็นผลมาจากลำดับของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ ซึ่งจะมีผลต่อโครงสร้างตติยภูมิ (tertiary) และจตุรภูมิ (quarternary) ทำให้โมเลกุลของโปรตีนมีความแข็งและยืดหยุ่นต่ำภายใต้ระดับอุณหภูมิปานกลาง แต่สามารถทำงานและเสถียรภายใต้อุณหภูมิสูง (VanDermark and Batzing, 1987)

2. เอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง

แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงให้ประโยชน์ในทางเทคโนโลยีชีวภาพเป็นอย่างมาก ในทางอุตสาหกรรมนั้นการเลี้ยงแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงในถังปฏิกรณ์ขนาดใหญ่จะใช้ปริมาณน้ำหล่อเย็นน้อยกว่าปกติ ทั้งยังสามารถลดปริมาณการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นเนื่องจากจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในทางในกระบวนการทางชีววิทยาส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง นอกจากนี้แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงมีอัตราการเจริญรวดเร็วจึงลดระยะเวลาในการเลี้ยงด้วย (Brock, 1986)

เนื่องจากเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงสามารถทำปฏิกิริยาทางชีวเคมีภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิสูงกว่าเอนไซม์ที่ผลิตโดยสิ่งมีชีวิตทั่วๆ ไป นอกจากนี้เอนไซม์จากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงมีความเสถียรที่อุณหภูมิปกติ ดังนั้นจึงมีความคงทนในการผลิตทางการค้า และยืดระยะเวลาการเก็บเอนไซม์ได้นานขึ้น จึงสามารถลดต้นทุนในทางอุตสาหกรรม (Godfrey and Reichelt, 1983) มีรายงานว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงบางตัวสามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูงมาก เช่น Bragger และคณะ (1989) พบว่าเอนไซม์ เบต้ากลูโคซิเดส ไซลาเนส และเซลลูเลสจากแบคทีเรีย *Thermotoga* และ แอลฟากลูโคซิเดส เบต้ากลูโคซิเดส อะไมเลส และพลูลูลาเนสจากอาคีแบคทีเรียมีกิจกรรมคงเหลือครึ่งหนึ่งเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที

ตัวอย่างการประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่ทำงานที่อุณหภูมิสูงที่รู้จักกันดีคือการใช้เอนไซม์ DNA polymerase (Taq polymerase) จาก *Thermus aquaticus* ในกระบวนการ polymerase chain reaction (PCR) (Herbert, 1992) และมีการใช้เอนไซม์ที่มีความคงตัวที่อุณหภูมิสูงในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น เป็นส่วนผสมในสารซักล้าง ใช้ในการผลิตสารให้ความหวานตามธรรมชาติ และใช้ในกระบวนการผลิตทางเภสัชกรรม (Godfrey and Reichelt, 1983) ดังตารางที่ 2 แสดงรายชื่อเอนไซม์ที่คงตัวที่อุณหภูมิสูงที่ใช้ในอุตสาหกรรม

3. ไลเปส

ไลเปส (EC 3.1.1.3) เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า glycerol ester hydrolase หรือ acylglycerol hydrolase เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ ได้กรดไขมัน กลีเซอรอล และ partial glycerides ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่สามารถย้อนกลับได้ (Macrae, 1983)

Shahani (1975) กล่าวว่า ไลเปสเป็นเอนไซม์กลุ่มหนึ่งในเอสเทอเรส เนื่องจากนิยามของเอสเทอเรสเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ของกรดคาร์บอกไซลิกได้ ดังนั้นจึงมีความหมายกว้าง แม้แต่เปปติเดส เช่น ทริปซิน ไคโมทริปซิน และ ปาเปน ก็สามารถย่อยสลายเอสเทอร์ของกรดไขมันอย่างง่ายได้ เอสเทอเรสที่ย่อยสลายคาร์บอกไซลิกเอสเทอร์ (carboxylic esters) ของกรดไขมันและแอลกอฮอล์อย่างง่าย เรียกว่าคาร์บอกซิลเอสเทอร์เรส (carboxylesterase) (EC 3.1.1.1) ซึ่งเดิมเรียกว่า เอลีเอสเทอเรส (aliesterase) หรือ บีเอสเทอเรส (B esterase) ส่วนเอสเทอเรสที่ย่อยสลายอะโรมาติกเอสเทอร์ (aromatic esters) เช่น ฟีนิลอะซิเตต (phenyl acetate) เรียกว่าเอริวเอสเทอเรส (arylesterase) (EC 3.1.1.2) หรือเดิมเรียกว่าเอเอสเทอเรส (A esterase) และเอสเทอเรสที่ย่อยสลายคาร์บอกไซลิกเอสเทอร์ของกลีเซอรอลเรียกว่าไลเปส (EC 3.1.1.3)

ไลเปสจะทำปฏิกิริยากับสับสเตรทที่อยู่ในสถานะเป็นอิมัลชั่น โดยทำปฏิกิริยาตรงผิวระหว่างน้ำกับสับสเตรท (oil-water interface) แต่ถ้าสับสเตรทอยู่ในสภาวะที่ละลายน้ำไลเปสจะทำปฏิกิริยาได้ช้ามาก ในขณะที่เอสเตอเรสสามารถย่อยสลายสับสเตรทที่อยู่ในรูปสารละลายได้ (Shahani, 1975)

ตารางที่ 2 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่คงตัวที่อุณหภูมิสูงในทางอุตสาหกรรม

Enzyme	Operating temperature (°C)	Major applications
Carbohydrases		
α-Amylase (bacterial)	90-110	Starch hydrolysis, brewing, baking, detergents
Glucoamylase	50-60	Maltodextrin hydrolysis
α-Amylase (fungal)	50-60	Maltose
Pullulanase	50-60	High glucose syrups
Xylose isomerase	45-55	High fructose syrups
Pectinase	20-50	Clarification of juices/wine
Cellulase	45-55	Cellulose hydrolysis
Lactase	30-50	Lactose hydrolysis, food processing
Proteases		
Acid protease	30-50	Food processing
Fungal protease (neutral protease)	40-60	Baking, brewing, food processing
Alkaline protease	40-60	Detergent
Lipase	30-70	Detergent, food processing

ที่มา Brock, 1986

3.1 แหล่งของไลเปส

ไลเปสพบได้ทั้งในพืชเช่น เมล็ดละหุ่ง (castor bean) , ธัญญพืช (cereal grains) พวกข้าวสาลี ข้าวไรย์ และข้าวบาร์เล่ย์ และพบทั่วไปในเนื้อเยื่อ อวัยวะ ของสัตว์ เช่น หัวใจ ไต สมอง กล้ามเนื้อ และ ขี้รั้ง ซึ่งแหล่งที่สำคัญที่พบไลเปสมากคือ ตับอ่อน มีการศึกษาไลเปสจากตับอ่อนสุกร (hog pancreatic lipase) กันมาก เนื่องจากมีความเข้มข้นสูงและสามารถนำ

กลับมาใช้ใหม่ได้มาก ส่วนไลเปสจากน้ำนมเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติไม่คงตัวและทำให้บริสุทธิ์ได้ยาก เนื่องจากการมีสิ่งปนเปื้อน เช่น เคซีนและโปรตีนอื่น ๆ (Shahani, 1975) นอกจากจะพบไลเปสในพืชและสัตว์แล้วยังพบในจุลินทรีย์ด้วย ไลเปสจากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจมากเนื่องจากมีความคงตัวมากกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์ และสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก เนื่องจากจุลินทรีย์เจริญได้รวดเร็ว สามารถเพิ่มผลผลิตได้รวดเร็วโดยวิธีปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์และสามารถปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตได้ง่ายจึงนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมและการวินิจฉัยโรค

จุลินทรีย์ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย สามารถผลิตไลเปสที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์และสภาวะในการผลิต จุลินทรีย์บางสายพันธุ์ผลิตไลเปสที่ทำงานได้ดีในสภาวะพีเอชเป็นกลาง (neutral lipase) เช่น *Pseudomonas* sp. (Yamamoto and Fujiwara, 1988) บางสายพันธุ์ผลิตไลเปสที่ทำงานได้ดีในสภาวะเป็นด่าง (alkaline lipase) เช่น *Pseudomonas nitroreducens* nov. var. *thermotolerans* (Watanabe, *et al.*, 1977) บางสายพันธุ์ผลิตไลเปสที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง (thermostable lipase) เช่น *Bacillus* sp. (Handelsman and Shoham, 1994)

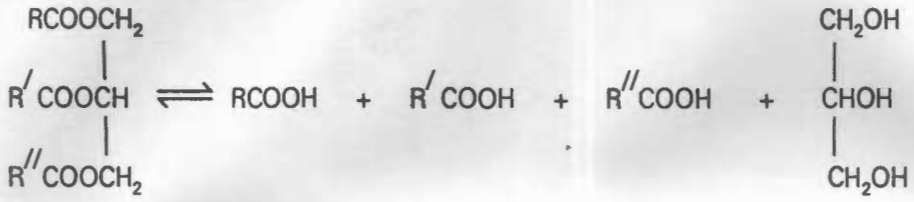
3.2 ชนิดของไลเปส

Macrae (1983) แบ่งไลเปสออกเป็น 3 กลุ่ม ตามความจำเพาะที่แตกต่างกันดังภาพที่ 2

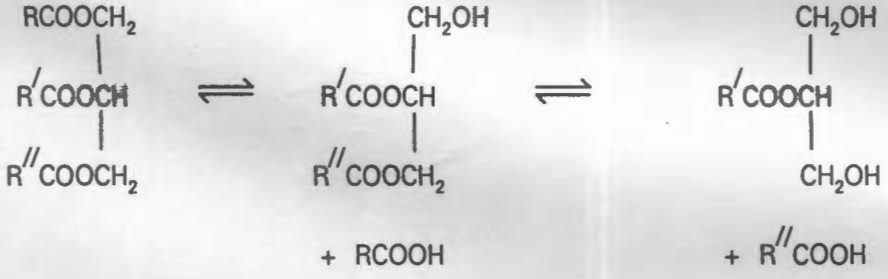
กลุ่มแรกเป็นไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลของกลีเซอไรด์ ไลเปสกลุ่มนี้จะย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ได้อย่างสมบูรณ์ เกิดเป็นกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอล โดยพบไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เป็นสารตัวกลาง (intermediates) ในปฏิกิริยา ตัวอย่างของเอนไซม์ในกลุ่มนี้คือ ไลเปสจาก *Candida cylindracae* (Seong and Omar, 1991), *Penicillium cyclopium* (Okumura, *et al.*, 1976) และ *Pseudomonas cepacia* (Sugihara, *et al.*, 1992)

กลุ่มที่สองเป็นไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 ของกลีเซอไรด์ ไลเปสกลุ่มนี้จะย่อยไตรกลีเซอไรด์ให้กรดไขมันอิสระ, 1,2(2,3)-ไดกลีเซอไรด์ และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ เนื่องจาก 1,2(2,3)-ไดกลีเซอไรด์ และ 2-โมโนกลีเซอไรด์ เป็นสารประกอบที่มีรูปแบบไม่เสถียร จะเกิดการเคลื่อนย้ายกลุ่ม acyl ได้เป็น 1,3-ไดกลีเซอไรด์ และ 1(3)-โมโนกลีเซอไรด์

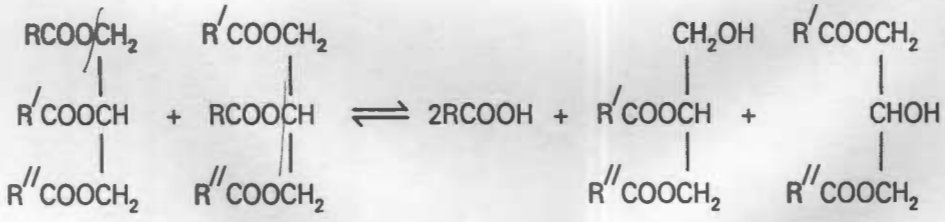
(1) Nonspecific lipase:



(2) 1,3-specific lipase:



(3) Fatty acid specific lipase:



ภาพที่ 2 ผลิตภัณฑ์จากการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ด้วยไลเปสชนิดต่างๆ

ที่มา : Macrae (1983)

ตามลำดับ ดังนั้นการบ่มไขมันในไลเปสที่จำเพาะต่อตำแหน่ง 1,3 เป็นเวลานาน จะเกิดการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ของไตรกลีเซอไรด์ได้กรดไขมันและกลีเซอรอล ไลเปสจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จำเพาะต่อตำแหน่ง 1,3 ตัวอย่างเช่น ไลเปสจาก *Aeromonas sorbia* LP004 (Lotrakul and Dharmsthiti, 1997) , *Bacillus thermocatenulatus* (Schmidt-Dannert, *et al.*, 1994) , *Rhizopus oryzae* และ *Rhizopus rhizopodiformis* (Rasak, *et al.*, 1997)

กลุ่มที่สามเป็นไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลกลีเซอไรด์ ไลเปสจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มีความจำเพาะต่อกรดไขมันเพียงเล็กน้อย เมื่อบ่มกับน้ำมันและไขมันตามธรรมชาติ แต่ไลเปสจาก *Geotrichum candidum* มีความจำเพาะอย่างมากต่อการย่อยสลายเอสเตอร์ของกรดไขมันสายยาว ดังนั้นเอนไซม์จะย่อยกรดไขมันสายยาวที่ประกอบด้วยพันธะคู่แบบ *cis* ตรงตำแหน่งที่ 9 จากไตรกลีเซอไรด์ ได้ดีกว่ากรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่ไม่มีพันธะคู่ตรงตำแหน่งที่ 9 (Jensen, 1974 อ้างโดย Macrae, 1983)

3.3 การทำงานของไลเปส

ไลเปสสามารถทำปฏิกิริยาได้ 3 ชนิดคือ ไฮโดรไลซิส (hydrolysis), สังเคราะห์เอสเทอร์ (synthesis of ester) และ ทรานเอสเทอริฟิเคชั่น (tranesterification) ซึ่งทรานเอสเทอริฟิเคชั่น สามารถแบ่งย่อยออกเป็น 4 ชนิด ตามชนิดของสารเคมีที่เอสเทอร์ทำปฏิกิริยาด้วย คือ อะซิโดไลซิส (acidolysis), แอลกอฮอล์ไลซิส (alcoholysis), เอสเทอร์เอ็กเชนจ์ (ester exchange) หรืออินเตอร์เอสเทอริฟิเคชั่น (interesterification) และ อะมิโนไลซิส (aminolysis) ดังแสดงในภาพที่ 3 (Yamane, 1987)

3.4 วิธีตรวจวัดกิจกรรมของไลเปส

วิธีตรวจวัดกิจกรรมของไลเปสที่นิยมใช้กันมากมี 2 วิธีคือ วิธีแรกเป็นการไตเตรตกรดที่เกิดขึ้นด้วยด่าง (titrimetric method) สับสเตรทที่ใช้เช่นไตรโอลีอิน (triolein) หรือ น้ำมันมะกอก ในช่วงสุดท้ายของการบ่มจะหยุดปฏิกิริยาโดยเติมแอลกอฮอล์หรืออะซิโตน แล้วไตเตรทด้วยด่างให้ได้จุดยุติที่พีเอช 9.0 หรือใช้ไทมอลบลู (thymol blue) หรือ ฟีนอพทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ เช่นวิธีการของ Yamada และคณะ (1962 อ้างโดย Arima, *et al.*, 1972) ใช้น้ำมันมะกอกเป็นสับสเตรท ทำปฏิกริยาใน Tris-HCl buffer พีเอช 8.0 หยุดปฏิกิริยาด้วยอะซิโตน : เอธานอล (1:1) แล้วไตเตรทด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

(1) Hydrolysis of Ester

(2) Synthesis of Ester

(3) Transesterification

(3.1) Acidolysis

(3.2) Alcoholysis

(3.3) Ester Exchange (Interesterification)

(3.4) Aminolysis

ภาพที่ 3 ความสามารถในการทำงานของไลเปส

ที่มา : Yamane (1987)

วิธีที่สองเป็นการตรวจวัดสีที่เกิดจากปฏิกิริยา (colorimetric method) สามารถใช้สับสเตรทที่ให้ผลผลิตที่มีสีโดยตรงจากการย่อยสลายโดยไลเปสเช่น naphthyl esters และ *p*-nitrophenyl esters สับสเตรทที่นิยมใช้กันมากคือ β-naphthyl acetate, β-naphthyl caprylate, *p*-nitrophenyl laurate, *p*-nitrophenyl palmitate แล้วตรวจสอบโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงเช่นวิธีการของ Hoshino และคณะ (1992) ใช้ *p*-nitrophenyl palmitate เป็นสับสเตรท หยุดปฏิกิริยาโดยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร ไลเปสจะย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ระหว่าง *p*-nitrophenol group และโมเลกุลของกรดไขมัน ทำให้ปรากฏสีเหลืองในสารละลายเนื่องจากมี *p*-nitrophenolate anion ซึ่งสีจะเข้มที่สุดภายใต้สภาวะด่าง ข้อดีของกระบวนการนี้คือ การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์สะดวก เนื่องจากมองเห็นได้ ยิ่งไปกว่านั้น ความเข้มของสีสามารถใช้เป็นตัวชี้ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ได้ (Yeoh, *et al.*, 1986) นอกจากการวัดสีโดยตรงยังสามารถใช้น้ำมันมะกอกเป็นสับสเตรท แล้วตรวจวัดกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นโดยการสร้างเกลือคอปเปอร์ (copper soaps) เช่นวิธีของ Schmidt-Dannert และคณะ (1994) ใช้น้ำมันมะกอกเป็นสับสเตรท หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดไฮโดรคลอริก สกัดกรดไขมันที่เกิดขึ้นด้วยไอโซออกเทน หลังจากนั้นจึงสร้างเกลือคอปเปอร์โดยใช้ Copper(II)-acetate-1-hydrate แล้วจึงพัฒนาสีโดยใช้ diethyldithiocarbamate ซึ่งละลายในเอธานอล วัดการดูดกลืนแสงที่ 430 นาโนเมตร

4. การคัดเลือกจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูงที่ผลิตไลเปส

จุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูงที่ผลิตไลเปสสามารถพบได้ตามบริเวณที่มีการทับถมของถ่านหิน กองหญ้าหมัก น้ำพุร้อน และน้ำทิ้งอุณหภูมิสูงจากโรงงานอุตสาหกรรม (Brock, 1986) การศึกษาส่วนใหญ่จะคัดเลือกเชื้อจากแหล่งธรรมชาติที่มีอุณหภูมิสูงโดยเฉพาะบริเวณน้ำพุร้อนซึ่งมีการศึกษากันหลายแห่งทั่วโลก ในการคัดเลือกขั้นต้นนั้นสามารถทำได้หลายวิธีเช่น พิจารณาจากวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของจุลินทรีย์บนจานอาหารแข็งที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน (Handelsman and Shoham, 1994 ; Gowland, *et al.*, 1987) การผลิตโคโลนีที่มีสีส้มเรืองแสงบนอาหารแข็งที่มี Rhodamine B 0.001 เปอร์เซ็นต์ เป็นส่วนประกอบ (Kim, *et al.*, 1994 ; Schmidt-Dannert, *et al.*, 1994 ; Wang, *et al.*, 1995) และการเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารวุ้น แล้วทดสอบด้วยสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตอิ่มตัว คัดเลือก

โคโลนีที่มีวงสีเขียวแกมน้ำเงินเนื่องจากเกลือของคอปเปอร์กับกรดไขมันอิสระที่เกิดจากการสลายน้ำมัน (พรทิพา อังคนุรักษ์พันธ์, 2534) การศึกษาจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูงที่ผลิตไลเปสพบทั้งในราและแบคทีเรียดังรวบรวมในตารางที่ 3

Arima และคณะ (1972) คัดเลือกเชื้อราที่ชอบอุณหภูมิสูงและผลิตไลเปสจากตัวอย่างดินบริเวณโตเกียว ประเทศญี่ปุ่น จำนวน 300 ตัวอย่าง ได้เชื้อราชอบอุณหภูมิสูง 185 สายพันธุ์ พบว่ามี 3 สายพันธุ์ที่ผลิตไลเปสที่คงตัวที่อุณหภูมิสูงได้ดีและพบว่าใน 3 สายพันธุ์นั้น No. S-38 ซึ่งจัดจำแนกเป็น *Humicola lanuginosa* S-38 ให้การผลิตไลเปสสูงสุด 30 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอช 8.0

Omar และคณะ (1987b) คัดเลือกราชอบอุณหภูมิสูง 20 สายพันธุ์ จากบริเวณมหาวิทยาลัย Hiroshima ในญี่ปุ่น พบรา *Humicola lanuginosa* 3 สายพันธุ์ สามารถผลิตไลเปสได้ ในจำนวนนี้ *H. lanuginosa* No.3 แสดงกิจกรรมไลเปสสูงสุดและการผลิตไลเปสเพิ่มสูงขึ้นเมื่อให้ซอร์บิทอล 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและน้ำแช่ข้าวโพด 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 80-120 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังการเลี้ยง 25 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอชคงที่ในช่วง 7-8 เอนไซม์ที่ได้มีกิจกรรมคงเหลือ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

Salleh และคณะ (1993) ศึกษาราชอบอุณหภูมิสูง *Rhizopus oryzae* ที่แยกได้จากบ่อน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มในประเทศมาเลเซีย พบว่าเปปโตนและกลีเซอรอลกระตุ้นการผลิตไลเปส อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสออกนอกเซลล์คือ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอช 8.0

Venkateshwarlu และ Reddy (1993) ศึกษาการผลิตไลเปสโดยรา 5 สายพันธุ์ พบว่า *Emericella rugulosa* และ *Thermomyces lanuginosus* สามารถผลิตไลเปสได้โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสคือ 45 องศาเซลเซียส ไลเปสที่ได้ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0

Razak และคณะ (1997) คัดเลือกราชอบอุณหภูมิสูงจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มได้ *Rhizopus oryzae* และ *R. rhizopodiformis* ซึ่งสามารถเจริญที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และผลิตไลเปสออกมาภายนอกเซลล์ ไลเปสจากราทั้งสองนี้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน มีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 45 องศาเซลเซียส และพีเอช 6.0

ตารางที่ 3 จุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูงที่สามารถผลิตไลเปส

จุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
Bacteria	
Bacillus sp.	Gowland, *et al.*, 1987; Handelsman and Shoham, 1994; Kambourova, *et al.*, 1996; Rath and Subramanyam, 1996; Sigurgisladottir, *et al.*, 1993
Bacillus sp. IHI-91	Becker, *et al.*, 1997
Bacillus sp. strain MC7	Emanuilova, *et al.*, 1993
Bacillus sp. 398	Kim, *et al.*, 1994
Bacillus thermocatenulatus	Schmidt-Dannert, *et al.*, 1994
Bacillus sp. RS-12	Sidhu, *et al.*, 1998
Bacillus sp. A30-1(ATCC 53841)	Wang, *et al.*, 1995
Bacillus T20	กนกพร บุญเผื่อน และคณะ, (2534)
Thermosyntropha lipolytica	Svetlitshnyi, *et al.*, 1996
Thermus P1	กนกพร บุญเผื่อน และคณะ, (2534)
Thermus sp.	Sigurgisladottir, *et al.*, 1993
Molds	
Emericella rugulosa	Venkateshwarlu and Reddy, 1993
Humicola lanuginosa S-38	Arima, *et al.*, 1972
Humicola lanuginosa No3	Omar, *et al.*, 1987b
Rhizopus oryzae	Razak, *et al.*, 1997; Salleh, *et al.*, 1993
Rhizopus rhizopodiformis	Razak, *et al.*, 1997
Sporotrichum (Chrysosporium) thermophile Apinis	Johri, *et al.*, 1990
Thermomyces lanuginosus	Venkateshwarlu and Reddy, 1993

Gowland และคณะ (1987) คัดเลือกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่ผลิตไลเปสจากกองหญ้าหมัก กองถ่านหิน ในทางตะวันตกเฉียงเหนือของประเทศอังกฤษและจากน้ำพุร้อนบริเวณตอนกลางฝั่งตะวันตกของสหรัฐอเมริกา โดยมีการนำน้ำมันมะกอกไปเทไว้บริเวณที่จะเก็บตัวอย่างหลายสัปดาห์ก่อนการเก็บตัวอย่างเพื่อให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายไขมัน สามารถคัดเลือกเชื้อได้ 94 โคโลนีจากกองถ่านหิน และ 46 โคโลนีจากตัวอย่างจากน้ำพุร้อน พบว่าสายพันธุ์ CT42 ให้การผลิตไลเปสดี จัดจำแนกเป็น *Bacillus* sp. มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญประมาณ 65 องศาเซลเซียสและผลิตไลเปสสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ในอาหารซึ่งมี tween 80 เป็นแหล่งคาร์บอน

Emanuilova และคณะ (1993) คัดเลือกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่ผลิตไลเปสจากตัวอย่างที่แยกได้จากบริเวณน้ำพุร้อน Bulgalian ในประเทศบุลกาเรีย พบ 3 สายพันธุ์ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่งซึ่งสร้างสปอร์ ให้การผลิตไลเปสสูงในอาหารที่มี tween 80 และสายพันธุ์ที่ให้ไลเปสสูงสุด (2.0-3.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) คือ *Bacillus* sp. MC7 ไลเปสที่ได้ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 8.5 และยังคงมีกิจกรรม 100 เปอร์เซ็นต์เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

Sigurgisladottir และคณะ (1993) คัดเลือกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่ผลิตไลเปสจากแบคทีเรียที่เก็บในแหล่งรวบรวมสายพันธุ์แบคทีเรียของ Technological Institute of Iceland (Ice Tec) ซึ่งเก็บแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกได้จากน้ำพุร้อนทั่วประเทศไอซ์แลนด์มากกว่า 700 สายพันธุ์ พบว่ามีแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ที่แสดงกิจกรรมการย่อยสลายน้ำมันมะกอกสูงสุดคือ *Thermus* 1 สายพันธุ์ และ *Bacillus* 2 สายพันธุ์

Handelsman และ Shoham (1994) คัดเลือกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงจากตัวอย่างที่มีน้ำมันปนเปื้อนในประเทศอิสราเอลได้แบคทีเรีย 44 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่าสายพันธุ์ H1 ผลิตไลเปสได้มากที่สุดในอาหารที่มี tween 80 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน จัดจำแนกเป็น *Bacillus* sp. ให้การผลิตไลเปส 0.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์ที่ได้มีความคงตัวเป็นอย่างสูงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในช่วงพีเอชช่วงกว้าง (6.5-9.0)

Kim และคณะ (1994) คัดเลือกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่ผลิตไลเปสจากดินบริเวณ

น้ำพุร้อน Korean ในประเทศเกาหลี ได้ *Bacillus* sp. strain 398 ผลิตไลเปสได้มากที่สุด เอนไซม์ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ไม่สูญเสียกิจกรรมเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีและเอนไซม์คงตัวในช่วงพีเอชจาก 4 ถึง 11

Schmidt-Dannert และคณะ (1994) คัดเลือกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง 15 สายพันธุ์ ซึ่งเก็บใน the German Collection of Microorganisms เมือง Braunschweig ประเทศเยอรมัน พบว่ามี 5 สายพันธุ์ที่แสดงกิจกรรมไลเปส และใน 5 สายพันธุ์นี้ *Bacillus thermocatenulas* (DSM 730) ผลิตไลเปสสูงสุดคือ 0.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5

Wang และคณะ (1995) คัดเลือกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงจากน้ำพุร้อนบริเวณ Yellowstone National Park ในสหรัฐอเมริกา ได้ *Bacillus* sp. A30-1 (ATCC 53841) ซึ่งเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส พีเอช 6-9 ไลเปสที่ได้ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 9.5 มีความคงตัวที่อุณหภูมิสูง ในช่วงพีเอชที่เป็นด่างคือยังคงมีกิจกรรมคงเหลือ 100 เปอร์เซ็นต์ หลังการบ่มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลาครึ่งชั่วโมงที่พีเอช 7.2 และ มีกิจกรรมคงเหลืออย่างน้อย 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอชช่วง 5.0-10.5 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง

Rath และ Subramanyam (1996) คัดเลือกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงจากน้ำพุร้อน 3 แห่งในเมือง Orissa ประเทศอินเดีย ได้แบคทีเรีย 19 สายพันธุ์ จัดจำแนกอยู่ในสกุล *Bacillus* ทั้งสิ้น เชื้อเจริญได้ถึงอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ในพีเอชช่วงกว้าง ตรวจพบกิจกรรมเอนไซม์หลายชนิดเช่น amylase protease beta-lactamase lipase glutaminase และ DNase เอนไซม์ส่วนมากทำงานที่อุณหภูมิสูงถึง 50-60 องศาเซลเซียส

Svetlitshnyi และคณะ (1996) แยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็น anaerobic thermophilic organoheterotrophic lipolytic alkalitolerant bacterium จากน้ำพุร้อนบริเวณทะเลสาบ Bogoria ในประเทศเคนยา ได้แบคทีเรีย *Thermosyntropha lipolytica* gen. nor., sp.nov. ซึ่งเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 52-70 องศาเซลเซียส (ที่พีเอช 8.5) โดยอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 60-66 องศาเซลเซียส และพีเอช 8.1-8.9 ตามลำดับ

Becker และคณะ (1997) ศึกษาแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *Bacillus* sp. IHI-91 ซึ่งแยกได้จากน้ำพุร้อน Icelandic ในบริเวณ Hverageroj ประเทศไอซ์แลนด์ แบคทีเรียเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0-6.5 เลี้ยงในถังหมักแบบต่อเนื่องพบว่า กิจกรรมไลเปสสูงสุด 340 ยูนิตต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่อัตราการเจือจาง 0.4 ต่อชั่วโมง กิจกรรมไลเปสเพิ่มขึ้นมากกว่าการเลี้ยงแบบกะ ถึง 50 เปอร์เซ็นต์

Sidhu และคณะ (1998) แยกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *Bacillus* sp. RS-12 ได้จากดิน เชื้อที่แยกได้มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 50 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมไลเปสสูงสุด 0.98 นาโนเคทโทลต่อมิลลิลิตร (1katal = $6x10^7$ ยูนิต) ที่พีเอช 8.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

สำหรับในประเทศไทยมีการคัดเลือกเชื้อที่ผลิตไลเปสจากน้ำพุร้อนเทพพนม จังหวัดเชียงใหม่ โดยพรทิพา อังคนุรักษ์พันธ์ และคณะ (2534) ได้เก็บตัวอย่างน้ำและดิน 10 ตัวอย่างที่มีพีเอชระหว่าง 8.3-8.8 และอุณหภูมิ 56-95 องศาเซลเซียส เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ทนความร้อนที่ผลิตไลเปส สามารถคัดเลือกได้ 28 โคโลนี พบว่าไอโซเลท TLO41 ให้กิจกรรมไลเปสสูงสุด 0.76 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีกิจกรรมจำเพาะ 8.44 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

กนกพร บุญเผื่อน และคณะ (2534) คัดเลือกจุลินทรีย์จากแหล่งน้ำพุร้อนในจังหวัดเชียงใหม่ที่สามารถผลิตไลเปสได้หลายสายพันธุ์ นำสายพันธุ์ที่มีแนวโน้มที่จะผลิตไลเปสได้ดีมาศึกษาลักษณะเฉพาะและสมบัติของเอนไซม์ 3 สายพันธุ์คือ *Thermus* P1 จากน้ำพุร้อนป่าแป๋ *Thermus* F11 จากน้ำพุร้อนฝาง และ *Bacillus* T20 จากน้ำพุร้อนเทพพนม พบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์มีสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญใกล้เคียงกันคือ พีเอช 7.2-7.4 และอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส *Thermus* P1 มีกิจกรรมไลเปสมากที่สุดคือ 5.3 ยูนิตต่อมิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 5.6 รองลงมาคือ *Thermus* F11 และ *Bacillus* T20 มีกิจกรรมเท่ากันคือ 2.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

5. การผลิตและปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไลเปสโดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตไลเปสออกมาภายนอกเซลล์ เช่น *Bacillus* sp. 398 (Kim, *et al.*, 1994) , *Bacillus* sp. (Handelsman and Shoham, 1994) , *Pseudomonas* sp. KWI-56 (Iizumi, *et al.*, 1990) เป็นต้น แต่บางพวกก็ผลิตไลเปสอยู่ภายในเซลล์ เช่น *Alcaligenes denitrificans* (Odera, *et al.*, 1986) บางพวกก็ผลิต cell-bound lipase เช่น *Streptococcus thermophilus* (DeMoraes and Chandan, 1982)

พิจารณาช่วงการเจริญที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสจากจุลินทรีย์พบว่า จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตไลเปสได้สูงสุดในช่วงปลายระยะล็อก (exponential phase) เช่น *Bacillus* sp. MC7 (Emanuilova, 1993), *Pseudomonas aeruginosa* (Stuer, *et al.*, 1986) แต่จุลินทรีย์บางชนิดจะผลิตไลเปสได้สูงสุดเมื่ออยู่ในช่วงระยะคงที่ (stationary phase) เช่น *Bacillus* sp. (Handelsman and Shoham, 1994), และ *Alcaligenes* sp. No 679 (Kokusho, *et al.*, 1982)

5.1 แหล่งคาร์บอน

จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสแตกต่างกัน และจะมีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสต่างกัน Handelsman และ Shoham (1994) พบว่ากิจกรรมไลเปสของ *Bacillus* sp. H1 เพิ่มสูงถึง 0.45 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ ทวีน 80 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน แทนการใช้น้ำมันมะกอก 0.1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีกิจกรรมเพียง 0.062 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนใน *Rhizopus oligosporus* ตรวจพบกิจกรรมของไลเปสเพิ่มขึ้นเป็น 27 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 55.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย ทวีน 20 และ ทวีน 80 เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ เปรียบเทียบกับเมื่อใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนมีกิจกรรมของไลเปสเพียง 4.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Nahas, 1988) ในบรรดาน้ำตาลที่ใช้ทดสอบ เดกซ์ตริน 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้การผลิตไลเปสสูงสุด สำหรับ *Rhizopus delemar* CDBB H313 ซึ่งสูงกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนถึง 1.6 เท่า (Espinosa, *et al.*, 1990) ส่วนเชื้อ *Vibrio* sp. TA43 ซึ่งคัดเลือกโดยวิภูมิ แก้วทอง (2539) ผลิตไลเปสได้สูงสุด 7.26 ยูนิตต่อมิลลิลิตรในแหล่งคาร์บอนแมนนิทอลที่ระดับความเข้มข้น 1.5-2.0 เปอร์เซ็นต์

หอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

5.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตไลเปสจาก *Humicola lanuginosa* No.3 คือ น้ำแช่ข้าวโพด 1.0 เปอร์เซ็นต์ (v/v) (Omar, *et al.*, 1987b) Nahas (1988) พบว่า *Rhizopus oligosporus* ผลิตไลเปสได้มากขึ้น 5 เท่า เมื่อใช้กากถั่วเหลืองสกัดแทนยีสต์สกัด ส่วน กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย (2532) พบว่า $(NH_4)_2HPO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสโดย *Pseudomonas aeruginosa* KM-2

5.3 แร่ธาตุ

การมี Ca^{2+}, Fe^{3+}, Mn^{2+}, และ Sn^{2+} มีผลให้การผลิตไลเปสของเชื้อ *Humicola lanuginosa* No 3 เพิ่มขึ้น ในขณะที่ Fe^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} และ Co^{2+} ไม่ได้ส่งเสริมการผลิตไลเปส (Omar, *et al.*, 1987b) ส่วนพงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล (2538) พบว่าการเติมแคลเซียมคลอไรด์ 0.01 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหาร nutrient broth สามารถกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ไลเปสของ *Aeromonas sobria* LP004 โดยกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มจาก 42.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตรไปเป็น 109.47 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.4 อุณหภูมิ, พีเอช และการให้อากาศ

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสแตกต่างกัน เช่น *Bacillus* sp. สายพันธ์ H1 (Handelsman and Shoham,1994) มีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสคือ 60 องศาเซลเซียสและพีเอช 7.0 ตามลำดับ ส่วน *Bacillus* sp. สายพันธ์ 398 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสเป็น 55 องศาเซลเซียสและพีเอชที่เหมาะสมเป็น 7.2 ตามลำดับ (Kim, *et al.*, 1994) ในบางครั้งการผลิตไลเปสมีผลกระทบโดยการให้อากาศ เช่น การจำกัดการให้ออกซิเจนแก่ *Pseudomonas aeruginosa* EF 2 ทำให้กิจกรรมของไลเปสลดลง (Gilbert, *et al.*, 1991)

6. ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานและความคงตัวของไลเปส

6.1 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อกิจกรรมและความคงตัวของเอนไซม์ ไลเปสจากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่แตกต่างกัน ดังรวบรวมไว้ใน

ตารางที่ 4 แต่เอนไซม์อาจจะไม่คงตัวที่ระดับอุณหภูมิที่มีกิจกรรมสูงสุดเช่น *Humicola lanuginosa* No 3 ผลิตไลเปสที่มีกิจกรรมสูงสุดที่ 45 องศาเซลเซียส แต่ความคงตัวสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสโดยยังคงมีกิจกรรม 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มเป็นเวลา 20 ชั่วโมง (Omar, *et al.*, 1987a) และ ไลเปสจาก *Bacillus thermocatenulatus* มีกิจกรรมสูงสุดที่ 60-70 องศาเซลเซียส แต่คงตัวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Schmidt-Dannert, *et al.*, 1994)

6.2 พีเอช

ไลเปสจากจุลินทรีย์ที่ทนอุณหภูมิสูงส่วนใหญ่จะมีกิจกรรมสูงสุดที่ช่วงพีเอชเป็นกลางและค่อนไปทางด่าง มีจำนวนน้อยที่มีกิจกรรมสูงสุดค่อนไปทางกรดเช่น *Aeromonas sobria* LP 004 และ *Pseudomonas cepacia* มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสเท่ากับ 6.0 ที่ 37 องศาเซลเซียส และ 5.5-6.5 ที่ 50 องศาเซลเซียสตามลำดับ (พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล, 2538 ; Sugihara, *et al.*, 1992)

ส่วนความคงตัว พบว่าไลเปสส่วนใหญ่มีความคงตัวในพีเอชช่วงกว้าง เช่นไลเปสจาก *Bacillus* sp. 398 มีความคงตัวในช่วงพีเอช 4-11 เมื่อบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Kim, *et al.*, 1994) และภายในระยะเวลาบ่ม 24 ชั่วโมง ไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. KWI-56 มีความคงตัวในช่วงพีเอช 4-10 (Iizumi, *et al.*, 1990)

6.3 ไอออนของโลหะ และ reagents ต่าง ๆ

โดยทั่วไปไอออนของโลหะเช่น Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^{+} , Li^{+} ช่วยเพิ่มการทำงานของไลเปส เช่น Ca^{2+} , Na^{+} , K^{+} และ Co^{2+} มีผลกระตุ้นกิจกรรมของไลเปสจาก *Bacillus* sp. ได้เล็กน้อยประมาณ 7 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Ba^{2+} กระตุ้นกิจกรรมของไลเปสได้ถึง 32 เปอร์เซ็นต์ (Handelsman and Shoham, 1994)

Ca^{2+} มีผลให้กิจกรรมของไลเปสจาก *Humicola lanuginosa* No3 เพิ่มขึ้นเป็น 59.7 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุม 23.3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Omar, *et al.*, 1987a) ส่วนใน *Aeromonas sobria* LP 004 พบว่า Ca^{2+} ช่วยเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงที่ไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์ (พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล, 2538)

Wang และคณะ (1988) ได้สรุปสมมุติฐานความเป็นไปได้ของกลไกการทำงานของแคลเซียมไอออนต่อการส่งเสริมการทำงานของไลเปสไว้ 3 ประการคือ แคลเซียมไอออน

ตารางที่ 4 อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสชอบอุณหภูมิสูง

จุลินทรีย์	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	พีเอช	เอกสารอ้างอิง
Alcaligenes sp. No.679	50	9.0	Kokusho, *et al.*, 1982
Bacillus sp. RS-12	50-55	8.0	Sidhu, *et al.*, 1998
Bacillus sp. IHI-91	60	7.2	Becker, *et al.*, 1997
Bacillus sp. A30-1(ATCC 53841)	60	9.5	Wang, *et al.*, 1995
Bacillus sp.	70	7.2	Handelsman and Shoham, 1994
Bacillus sp. 398	65	8.2	Kim, *et al.*, 1994
Bacillus thermocatenulatus	60-70	8.0	Schmidt-Dannert, *et al.*, 1994
Bacillus sp. MC7	60	8.5	Emanuilova, *et al.*, 1993
Bacillus sp	60	5.5-7.2	Sugihara, *et al.*, 1991
Chromobacterium viscosum	65	7.0	Yamaguchi, *et al.*, 1973
Flavobacterium odoratum	50-65	9.0-10.5	Labuschagne, et al., 1997
Pseudomonas aeruginosa EF2	50	8.5	Gilbert, *et al.*, 1991
Pseudomonas aeruginosa KM-2	60	7.5	กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย, 2532
Pseudomonas cepacia	55-60	5.5-6.5	Sugihara, *et al.*, 1992
Pseudomonas sp. KWI-56	60	5.5-7.5	Iizumi, *et al.*, 1990
Pseudomonas fluorescens	55	8.0	Sztajer, *et al.*, 1991
Pseudomonas fragi 22.39 B	65	9.0	Nishio, *et al.*, 1987
Pseudomonas nitroreducens nov. var. *thermotolerans*	50	9.5	Watanabe, *et al.*, 1977
Pseudomonas sp.	60	7.0	Yamamoto and Fujiwara,1988

ช่วยเปลี่ยนรูปร่าง (conformation) ของเอนไซม์ให้ทำงานได้ดีขึ้น ช่วยเพิ่มการดูดซึมของไลเปสที่ oil-water interface และช่วยขจัดกรดไขมันออกจาก oil-water interface ทำให้ไลเปสทำงานได้ดีขึ้น ส่วน Kundu และคณะ (1987) กล่าวว่าแคลเซียมไอออนอาจทำหน้าที่เป็นตัวตกตะกอนกรดไขมันเป็นเกลือแคลเซียมทำให้ลดการยับยั้งการทำงานของไลเปสอันเนื่องจากกรดไขมัน

บางครั้งมีรายงานว่าไอออนของโลหะไม่มีผลกระตุ้นกิจกรรมของไลเปสเช่น Sugihara และคณะ (1991) พบว่า Ca^{2+}, Mg^{2+}, Sr^{2+} และ Ba^{2+} ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ไม่มีผลต่อกิจกรรมของไลเปสจาก *Bacillus* sp. และพบว่า Ca^{2+} ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ไม่มีผลต่อการทำงานของไลเปสจาก *Pseudomonas* sp. KWI-56 (Iizumi และคณะ, 1990) แต่ไลเปสส่วนใหญ่ถูกยับยั้งโดยไอออนของโลหะหนัก พวก Fe^{2+}, Fe^{3+}, Zn^{2+} Cu^{2+} และ Hg^{2+} เช่น *Humicola lanuginosa* No3 (Omar, *et al.*, 1987a) *Bacillus* sp. (Sugihara, *et al.*, 1991; Handelsman and Shoham, 1994) และ *Flavobacterium odoratum* (Labuschagne, *et al.*, 1997)

ในบางครั้งพบว่าสารจับโลหะ (metal chelating agent) เช่น EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) ไม่มีผลต่อไลเปสเช่น ไลเปสจาก *Bacillus* sp. (Sugihara, *et al.*, 1991), *Pseudomonas cepacia* (Sugihara, *et al.*, 1992) และ *Bacillus* sp. (Handelsman and Shoham, 1994) ชี้ให้เห็นว่าไลเปสเหล่านี้ไม่ใช่ metalloenzyme แต่ Muderhwa และ Ratamahenina (1985) พบว่า EDTA และ *p*CMB (parachloromercuribenzoate) ยับยั้งการทำงานของไลเปสจาก *Candida deformans* CBS 2701 ซึ่งสอดคล้องกับ Yamamoto และ Fujiwara (1988) ซึ่งพบว่า EDTA และ *p*CMB ยับยั้งการทำงานของไลเปสจาก *Pseudomonas* sp.

6.4 ลักษณะของสับสเตรท (Physical state of substrate)

การทำงานของไลเปสจะเกิดขึ้นเมื่อไลเปสถูกดูดซับที่ผิวระหว่างน้ำกับสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำ (oil-water interface) อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาจึงขึ้นอยู่กับจำนวนโมเลกุลของไลเปสที่ถูกดูดซับไว้ และขึ้นกับพื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับสับสเตรทด้วย ถ้าพื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับสับสเตรทมีมากขึ้น การทำงานของไลเปสจะดีขึ้นด้วย (Shahani, 1975)

6.5 ตัวทำละลายอินทรีย์

Sugihara และคณะ (1991) พบว่าอะซิโตน 20 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ช่วยเพิ่มกิจกรรมของไลเปสจาก *Bacillus* sp. ได้ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อความเข้มข้นของอะซิโตนมากกว่า 60

เปอร์เซ็นต์ จะทำให้กิจกรรมของไลเปสลดลงอย่างรวดเร็ว อาจจะเนื่องจากอะซิโตนที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ทำให้พื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับสับสเตรทมีมากขึ้น ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้นโดยปราศจากการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน ส่วนอะซิโตนที่ความเข้มข้นมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ อาจทำให้เอนไซม์เสียสภาพและสูญเสียกิจกรรม ส่วนเฮกเซนยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ในทุกความเข้มข้นตั้งแต่ 5 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับในเชื้อ *Pseudomonas cepacia* การเติม dimethylsulfoxide หรือ อะซิโตน 0-35 เปอร์เซ็นต์ (v/v) จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ในขณะที่เบนซีนหรือเฮกเซนมีผลยับยั้ง(Sugihara, *et al.*, 1992)

6.6 Emulsifying agent

Sodium taurocholate เป็นสารลดแรงตึงผิวซึ่งทำหน้าที่เป็นอิมัลซิไฟเออร์ จะยับยั้งกิจกรรมของเอสเตอเรสและเร่งกิจกรรมของไลเปส (Handelsman and Shoham, 1994) แต่อิมัลซิไฟเออร์ไม่ได้ช่วยเพิ่มการทำงานของไลเปสเสมอไป Watanabe และคณะ (1977) พบว่า ทั้งสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุลบ (anionic surfactant) และเกลือน้ำดีจะยับยั้งกิจกรรมของไลเปสของจาก *Pseudomonas fragi* และ *Pseudomonas nitroreducens* nov. var. *thermotolerans*

7. การใช้ประโยชน์ไลเปส

ไลเปสจากจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมาย เช่น ใช้ในการบำบัดรักษาโรค การพัฒนากลิ่นและรสชาติในอุตสาหกรรมอาหาร และใช้ในอุตสาหกรรมซักล้าง ดังรวบรวมในตารางที่ 5 สำหรับการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเหล่านี้ เอนไซม์ไลเปสที่ชอบอุณหภูมิสูงจากจุลินทรีย์มีข้อได้เปรียบเพราะมีความเสถียร คงทนต่อการเก็บเป็นเวลานาน จึงสามารถลดต้นทุนในการผลิต และเอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมสูงเมื่อทำงานที่อุณหภูมิสูง ๆ (Godfrey and Reichelt, 1983) การทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูงช่วยเพิ่มอัตราการส่งผ่านสาร (mass-transfer rates), อัตราการแพร่ผ่าน (diffusion rates), ลดความหนืด (viscosity), เพิ่มความสามารถในการละลายของไขมันและลดความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ (Herbert, 1992 ; Becker, *et al.*, 1997)

ตารางที่ 5 การนำไลเปสจากจุลินทรีย์ไปใช้ในอุตสาหกรรม

Industry	Effect	Product
Dairy	Hydrolysis of milk fat	Flavour agents
	Cheese ripening	Cheese
	Modification of butter fat	Butter
Bakery	Flavor improvement and shelf life prolongation	Bakery products
Beverage	Improved aroma	Beverages
Food dressing	Quality improvement	Mayonnaise, dressings, and whipped toppings
Health food	Transesterification	Health foods
Meat and fish	Flavor development and fat removal	Meat and fish products
Fat and oils	Transesterification	Cocoa butter, margarine
	Hydrolysis	Fatty acids, glycerol, mono- and di-glycerides
Chemical	Enantioselectivity	Chiral building blocks and chemicals
	Synthesis	Chemicals
Phamaceutical	Transesterification	Specialty lipids
	Hydrolysis	Digestive aids
Cosmetics	Synthesis	Emulsifiers, moisturizing agents
Leather	Hydrolysis	Leather products
Paper	Hydrolysis	Paper products
Cleaning	Hydrolysis	Removal of cleaning agents, e.g. surfactants

ที่มา : Godtfredsen, 1993

Bjorkling และคณะ (1991) กล่าวว่า แม้จะมีการใช้ไลเปสในอุตสาหกรรมเป็นเวลาหลายทศวรรษ เช่นใช้ในการพัฒนากลิ่นรสของอาหาร แต่ปริมาณการใช้ไลเปสยังจำกัดอยู่เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์หลักในทางอุตสาหกรรมเช่น โปรติเอสและคาร์โบไฮเดรส จนกระทั่งเมื่อไม่กี่ปีที่ผ่านมานี้ ศักยภาพการประยุกต์ใช้ไลเปสในแบบใหม่เกิดขึ้นมาก เนื่องจากไลเปสเร่งปฏิกิริยาการสลายและสร้างพันธะเอสเตอร์ในสภาวะที่ไม่รุนแรงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ตัวเร่งทางเคมี จึงลดค่าใช้จ่ายในด้านพลังงานและอุปกรณ์ที่ใช้ นอกจากนี้ยังมีความจำเพาะต่อสับสเตรท จึงทำให้แยกผลิตภัณฑ์ที่ได้ง่ายขึ้นเนื่องจากมีผลิตผลข้างเคียงปะปนมาน้อย ดังนั้นไลเปสจึงมีความสำคัญเพิ่มขึ้น ไม่เพียงแต่ใช้แบบดั้งเดิมเช่นในอุตสาหกรรมสารซักล้างและในอุตสาหกรรมอาหารเท่านั้น แต่ยังมีแนวโน้มในการใช้เทคโนโลยีของไลเปสเพื่อสังเคราะห์สารประกอบใหม่ ๆ ส่งผลให้เกิดการขยายการนำไปใช้ในสาขาใหม่ ๆ เช่น

7.1 การปรับปรุงคุณภาพของไขมัน

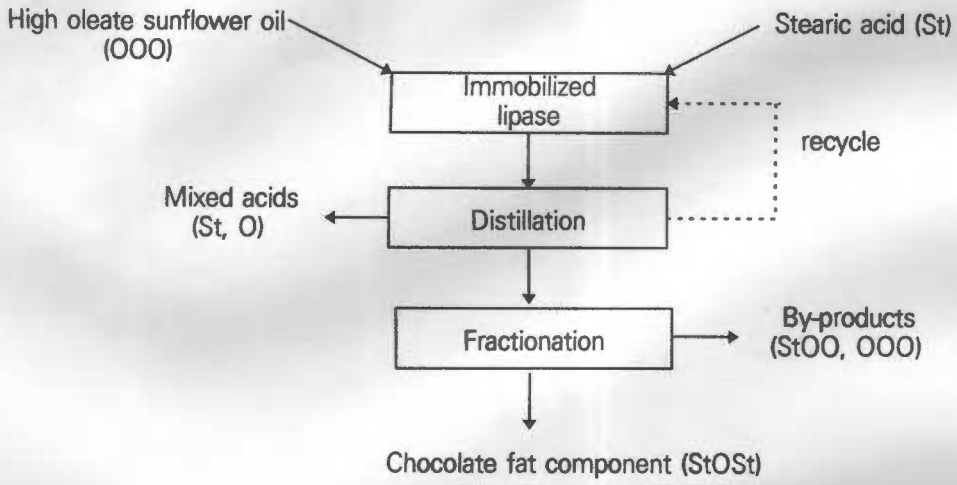
7.1.1 ใช้เป็นเชื้อเพลิงและสารหล่อลื่น

การทำปฏิกิริยา transesterification ไตรกลีเซอไรด์ เช่น ไขมันวัว และ น้ำมันถั่วเหลืองกับแอลกอฮอล์ได้เป็น methyl esters, ethyl esters และ alkyl esters (เมื่อทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์สายสั้น) เป็นแนวทางในการใช้เป็นสารดีเซลชีวภาพ (biodiesel), สารหล่อลื่นที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable lubricants) และสารเติมแต่งความยืดหยุ่น (additives for fuel and lubricants) (Ali, *et al.*, 1995 ; Nelson, *et al.*, 1996) และรวมถึงการผลิต wax esters จากแอลกอฮอล์สายยาว และ methyl ester ด้วยการทำปฏิกิริยา transesterification โดยใช้ไลเปสที่เสถียรที่อุณหภูมิสูงตรึงรูป ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 55-65 องศาเซลเซียส (Gomadoncescu and Legoy, 1997)

7.1.2 การผลิตโกโก้บัตเตอร์

ไขมันต่างชนิดกันจะมีตำแหน่ง ความยาวของสายโซ่ และระดับความอิ่มตัวของกรดไขมันในไตรกลีเซอไรด์ต่างกัน ซึ่งมีผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพ รสชาติ ความสามารถในการย่อย และคุณค่าทางอาหารต่างกัน ดังนั้นจึงมีการปรับปรุงคุณภาพของไขมัน โดยการนำไขมันราคาถูกมาเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดไขมัน โดยการทำปฏิกิริยา interesterification ด้วยไลเปสที่มีความจำเพาะ จะได้ไขมันซึ่งมีมูลค่าสูงขึ้น เช่นการผลิต

โกโก้บัตเตอร์โดยใช้น้ำมันดอกทานตะวัน ซึ่งมีปริมาณกรดไขมันโอลิอิก (O) สูง ทำปฏิกิริยา interesterification กับกรดไขมันสเตียริก (St) โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ได้โกโก้บัตเตอร์ที่ต้องการซึ่งมีลำดับกรดไขมันเป็น สเตียริก-โอลิอิก-สเตียริก (StOSt) ดังภาพที่ 4 (Bosley, 1996)



ภาพที่ 4 ขั้นตอนการผลิตโกโก้บัตเตอร์

ที่มา : Bosley (1996)

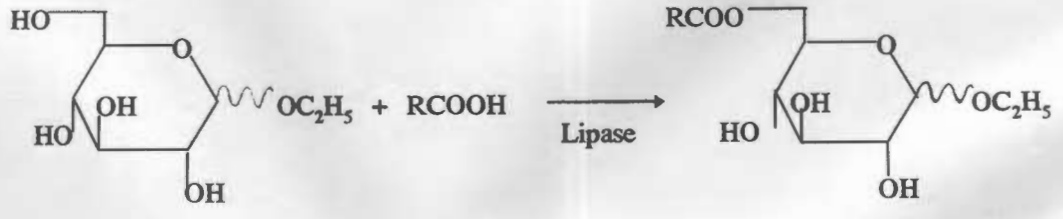
7.2 การผลิตกรดไขมัน

ปัจจุบันได้มีความสนใจศึกษาการไฮโดรไลซ์ไขมันเพื่อผลิต กรดไขมัน และ กลีเซอรอล ในทางอุตสาหกรรม กระบวนการทางอุตสาหกรรมที่ใช้กันอยู่คือ Colgate-Emery steam hydrolysis ที่อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส ความดัน 30-50 บรรยากาศ เป็นวิธีการทางเคมีที่ใช้อุณหภูมิและความดันสูง ซึ่งสิ้นเปลืองพลังงานมาก แต่ปัจจุบันสามารถใช้เอนไซม์ไลเปสเพื่อเร่งปฏิกิริยาให้เกิดที่ความดันปกติและอุณหภูมิลดลงอยู่ในช่วง 40-60 องศาเซลเซียสเป็นผลให้ต้นทุนการผลิตต่ำลง และเนื่องจากมีการใช้ไขมันจากสัตว์ เช่น ไขมันวัวและไขมันหมู ซึ่งมีจุดหลอมเหลวสูงเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในทางอุตสาหกรรม จึงมีความต้องการใช้เอนไซม์ที่สามารทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง เพื่อป้องกันการแข็งตัวของสับสเตรทและผลิตภัณฑ์ (Posorske, 1984 ; Kosugi and Suzuki, 1988 ; Renobales, 1992 ; Garcia, *et al.*, 1995) เช่นเดียวกับกระบวนการผลิตโมโนกลีเซอไรด์เพื่อใช้เป็น binders ในยาเม็ด เป็นสารปรุงแต่งใน

ทางยา (emollients) และเป็นอิมัลชั่นที่ดีในไส้กรอกและขนมอบ ปัจจุบันมีการใช้ไลเปสโดยกระบวนการ glycerolysis ไขมันและน้ำมัน การใช้เอนไซม์ช่วยให้ปฏิกิริยาเกิดที่อุณหภูมิต่ำลง (40-70 องศาเซลเซียส) ความดัน 20.7-34.5 MPa ในถังปฏิกรณ์ขนาดเล็ก เป็นการช่วยป้องกันการเกิดการเปลี่ยนแปลงสี และการเปลี่ยนแปลงของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวซึ่งมักจะเกิดที่อุณหภูมิสูง (Jackson and King, 1997)

7.3 กระบวนการทางเคมีอินทรีย์ (Organic chemical processing)

มีการศึกษาการใช้ไลเปสเพื่อสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์เอสเทอร์ (ester products) ซึ่งปัจจุบันสังเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมี จึงมีการศึกษาเกี่ยวกับเอสเทอร์ชีวภาพ (bioester) เช่นการสังเคราะห์เอสเทอร์อย่างง่ายของกรดไขมันสายยาวคือ isopropyl myristate (Staal, 1990 อ้างโดย Bjorkling, *et al.*, 1991 ; Bosley, 1996) และการสังเคราะห์กลูโคไซด์เอสเทอร์ (glucoside esters) จากกรดไขมันและกลูโคไซด์ดังภาพที่ 5 ซึ่งกลูโคไซด์เอสเทอร์ที่ได้มีคุณสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว อาจนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง สารซักล้างในครัวเรือน อุตสาหกรรมอิเล็กทรอนิคส์ อุตสาหกรรมเครื่องหนัง และใช้ de-greasing โลหะ ข้อดีของสารประกอบเหล่านี้คือวัตถุดิบตั้งต้นได้จากผลิตผลทางเกษตรกรรมและกระบวนการผลิตใช้เอนไซม์จึงลดการใช้สารเคมีอันตราย ผลิตภัณฑ์ที่ได้ปลอดภัยสำหรับผู้ใช้ และมีผลดีต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากย่อยสลายได้โดยธรรมชาติและความเป็นพิษต่ำ ("green" chemicals) การสังเคราะห์กลูโคไซด์เอสเทอร์โดยวิธีนี้ปัจจุบันได้ทำถึงขั้น pilot plant scale เป็นวิธีที่ง่ายและประหยัดซึ่งแสดงให้เห็นว่าเทคโนโลยีของไลเปสมีความหลากหลายทางการค้าในการผลิตผลิตภัณฑ์ใหม่ๆ (Bjorkling, *et al.*, 1991)



ภาพที่ 5 การสังเคราะห์กลูโคไซด์เอสเทอร์จากกรดไขมันและกลูโคไซด์โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida antractica*

ที่มา : Bjorkling และคณะ (1991)

เนื่องจากโปรตีนจากจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูงโดยทั่วไปจะมีความคงตัวต่อการทำงานที่อุณหภูมิสูงและทนทานต่อการเสียสภาพในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ (Brock, 1986 ;Mozhaev, 1993 ; Becker, *et al.*, 1997) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญต่อการประยุกต์ใช้เอนไซม์ในทางอุตสาหกรรม (Brock, 1986 ; Herbert, 1992) ดังนั้นจึงมีความต้องการคัดเลือกจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูงที่ผลิตไลเปสกันมาก ซึ่งส่วนใหญ่จะคัดเลือกจากแหล่งน้ำพุ[redacted] เช่น น้ำพุร้อน Icelandic ประเทศไอซ์แลนด์ (Sigurgisladottir, *et al.*, 1993) , น้ำพุร้อนบริเวณ Yellowstone National Park ประเทศสหรัฐอเมริกา (Wang, *et al.*,1995) และมีการเพิ่มผลผลิตไลเปสโดยวิธีการทางพันธุวิศวกรรมเช่น Schmidt-Dannert และคณะ (1996) ตัดต่อยีนที่ผลิตไลเปสจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงของ *Bacillus thermocatenulatus* ลงใน *Escherichia coli* ได้ไลเปสที่มีกิจกรรมจำเพาะสูงขึ้นถึง 320-1675 เท่า โดยมีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส พีเอช 9.0 เมื่อใช้ triolein เป็นสับสเตรท เอนไซม์แสดงความคงตัวอย่างสูงในตัวทำละลายอินทรีย์และสารซักล้าง โดยที่กิจกรรมลดลงเพียง 20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มในตัวทำละลายเมธานอล, โพรพานอล และอะซิโตน 30 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จากข้อมูลข้างต้นชี้ให้เห็นว่าเทคโนโลยีของไลเปสไม่เพียงแต่ทำให้เกิดผลกระทบต่ออุตสาหกรรมเอนไซม์แบบดั้งเดิมแต่จะทำให้เกิดการประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตใหม่ๆ มากมาย ทั้งยังช่วยให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการทางเคมีแบบดั้งเดิม เทคโนโลยีของไลเปสอาจจะทวีความสำคัญอย่างสูงในอนาคตอันใกล้ (Bjorkling, *et al.*, 1991)

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่สามารถผลิตไลเปสที่คงตัวที่อุณหภูมิสูงจากบริเวณที่มีอุณหภูมิสูงและมีน้ำมันปนเปื้อนของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม
2. ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไลเปสจากสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้
3. ศึกษาคุณสมบัติของไลเปสที่ผลิตได้

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. ตัวอย่าง

ตัวอย่างดินและน้ำที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสในการทดลองนี้เก็บจากบริเวณต่างๆ ที่มีอุณหภูมิสูงและมีน้ำมันปนเปื้อนภายในโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 5 โรงงาน คือ บริษัทยูนิปาล์มอินดัสทรีจำกัด จังหวัดสุราษฎร์ธานี (UN) บริษัทปาล์มน้ำมันพระแสง จำกัด จังหวัดสุราษฎร์ธานี (PS) บริษัทศรีเจริญปาล์มออยล์จำกัด จังหวัดกระบี่ (SJ) บริษัทไทยทาโลว์ แอนด์ ออลย์ จำกัด จังหวัดสุราษฎร์ธานี (TT) และบริษัทสหอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มจำกัด จังหวัดกระบี่ (IN) โดยเก็บตัวอย่างโรงงานละ 20 ตัวอย่าง

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารพื้นฐานที่ใช้สำหรับคัดเลือกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่ผลิตไลเปสดัดแปลงจาก กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย (2532) ซึ่งในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย $(NH_4)_2SO_4$ 5.0 กรัม, K_2HPO_4 1.8 กรัม, KH_2PO_4 1.0 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.3 กรัม, กัมอราบิค 1.0 กรัม, ยีสต์สกัด 0.6 กรัม และ น้ำมันปาล์ม 10.0 มิลลิลิตร พีเอช 7.0 ในกรณีของอาหารแข็งเติมผงวุ้น 20.0 กรัม ลงในอาหารพื้นฐานที่ปราศจากน้ำมันปาล์ม นำไปหลอมละลายด้วยความร้อน แล้วจึงนำมา homoginize กับน้ำมันปาล์มปริมาตร 3 มิลลิลิตร ด้วย homogenizer ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที (ภาคผนวก ก)

3. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ตามวิธีของ MacFaddin (1980) และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมไลเปสตามวิธีของ Hoshino และคณะ (1992) เป็นสารเคมีเกรดวิเคราะห์ รายการสารเคมีแสดงในภาคผนวก ข

อุปกรณ์

1. ถังหมักจุลินทรีย์ ยี่ห้อ B.E.MARUBISHI รุ่น MDL-4CR
2. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ LAB-LINE รุ่น NO 3525-ICC
3. เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ KOKUSAN รุ่น H-103NR
4. เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ HITACHI รุ่น SCR 20 B
5. ตู้อบแห้งควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ MEMMERT รุ่น ULM 500
6. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ MEMMERT รุ่น B 50
7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ MEMMERT รุ่น W 350
8. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ HITACHI รุ่น U-2000
9. เครื่องวัดพีเอช ยี่ห้อ DENVER MODEL 15
10. กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ NIKON รุ่น YS2-H

การวิเคราะห์

1. ค่าพีเอช

ตรวจวัดค่าพีเอชของอาหารโดยใช้เครื่องวัดพีเอช

2. การเจริญของเชื้อ

วัดการเจริญของเชื้อโดยการวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

3. การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ปิเปตตัวอย่างอาหารที่มีแบคทีเรียเจริญ 5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดสอบที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที (3,200 x *g*) เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นแล้วปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์เหมือนเดิม 2 ครั้ง นำหลอดทดสอบ

ที่มีแบคทีเรียไปอบในตู้อบแห้งอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบแล้วทำให้เย็นในเดสิเคเตอร์ ชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง (มก.ต่อมล.) โดยหาผลต่างของน้ำหนักของหลอดที่มีแบคทีเรียหลังอบแห้ง (มก.) กับน้ำหนักหลอดเปล่า (มก.) ต่อปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ (มล.)

4. การวิเคราะห์กิจกรรมของไลเปส

วิเคราะห์กิจกรรมของไลเปสโดยดัดแปลงจากวิธีของ Hoshino และคณะ (1992) โดยนำสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.1 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายสับสเตรท 2.0 มิลลิลิตรที่เตรียมใหม่ๆ (ประกอบด้วย *p*-nitrophenyl palmitate 30 มิลลิกรัมที่ละลายใน 2-propanol 10 มิลลิลิตร ผสมกับ sodium phosphate buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมล พีเอช 7.0 ปริมาณ 90 มิลลิลิตร ที่มี sodium deoxycholate (Na-DOC) 207 มิลลิกรัมและกัมอราบิค 100 มิลลิกรัมละลายอยู่) บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกริยาด้วยการเติม sodium carbonate solution ความเข้มข้น 2 โมลาร์ 2.9 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร คำนวณค่ากิจกรรมเอนไซม์โดยใช้ค่า extinction coefficient เท่ากับ 15 $L.mmol^{-1}.cm^{-1}$ และกำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกริยาการย่อยสลายสับสเตรตให้กรดพลามิติกอิสระ 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส สำหรับการหาคุณสมบัติของเอนไซม์เปรียบเทียบโดยใช้ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ กำหนดให้กิจกรรมของเอนไซม์ในสภาวะที่มีกิจกรรมสูงสุดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทรีตเมนต์ละ 3 ซ้ำ และทำการทดลอง 2 ครั้ง ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ (เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลอง) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ IRRISTAT Version 90-1 (1990)

วิธีการ

1. การแยกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งธรรมชาติ

1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินและน้ำจากแหล่งต่างๆ ที่มีอุณหภูมิสูง (ประมาณ 70 องศาเซลเซียส) และมีน้ำมันปนเปื้อน เช่น บริเวณเครื่องสกัดน้ำมัน บริเวณหม้อนึ่ง พื้นโรงงาน บ่อดักไขมัน และบ่อน้ำทิ้ง ของโรงงานสกัดน้ำมันปาลม์ 5 โรงงาน ประมาณโรงงานละ 20 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างดินประมาณ 200 กรัม ใส่ถุงพลาสติก และตัวอย่างน้ำประมาณ 200 มิลลิลิตร ใส่ขวดพลาสติก นำตัวอย่างมาแยกเชื้อแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงในห้องปฏิบัติการ

1.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่ผลิตไลเปสโดยดูการสร้างวงใส

1.2.1 นำตัวอย่าง 0.5-1.0 กรัม ใส่ในอาหารพื้นฐานสำหรับคัดเลือกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่ผลิตไลเปส ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เมื่อมีเชื้อแบคทีเรียขึ้น (สังเกตจากความขุ่นของอาหาร) ถ่ายเชื้อปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ ใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหารชนิดเดียวกัน เลี้ยงในสภาวะเช่นเดิม เมื่อมีเชื้อแบคทีเรียเจริญ ทำซ้ำตามวิธีการเดิมอีก 1 ครั้ง

1.2.2 เขี่ยเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงในหลอดทดลองครั้งสุดท้ายลงบนจานอาหารแข็งที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารวุ้นและให้ลักษณะวงใสรอบโคโลนี คัดเลือกจนได้โคโลนีบริสุทธิ์ วัดขนาดของวงใส เก็บเชื้อที่คัดเลือกได้บนอาหารวุ้นเอียงสูตรเดิม

1.2.3 นำเชื้อที่คัดเลือกได้ไปย้อมสีแบบแกรม และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. การจำแนกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกได้

ศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ของแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่ให้กิจกรรมไลเปสสูง เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียถึงระดับสกุลตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg and Holt, 1984)

3. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไลเปส

คัดเลือกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่ให้วงใสรอบโคโลนีกว้าง มาเลี้ยงในอาหารพื้นฐานเพื่อศึกษาการเจริญและประสิทธิภาพในการผลิตไลเปส การเตรียมเชื้อเริ่มต้นทำโดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 18 ชั่วโมงในอาหารพื้นฐาน ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้วปรับความเข้มข้นของเชื้อให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรเท่ากับ 1.0 ก่อนนำไปใช้

ทำการเลี้ยงแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงโดยใช้เชื้อเริ่มต้นปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรอาหารเหลวทั้งหมด เติมเชื้อเริ่มต้นลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลวปริมาตร 50 มิลลิลิตร เลี้ยงเป็นเวลา 60 ชั่วโมง ในสภาวะเช่นเดียวกับการเตรียมเชื้อเริ่มต้นเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง โดยเก็บชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ นำไปวัดการเจริญโดยวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร วัดพีเอช และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หากิจกรรมของไลเปส คัดเลือกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่ให้กิจกรรมไลเปสสูงใช้ในการทดลองต่อไป

4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสของแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกได้

4.1 การเลี้ยงบนเครื่องเขย่า

นำแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกได้จากข้อ 3 มาเลี้ยงในอาหารพื้นฐาน เป็นชุดควบคุมครั้งแรก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 เติมเชื้อเริ่มต้นปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเหลวทั้งหมด บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง โดยเก็บชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ นำไปวัดพีเอช, การเจริญ

และวิเคราะห์กิจกรรมของไลเปส คัดเลือกอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปส โดยเปลี่ยนแปลงปัจจัยที่ศึกษาดังนี้

4.1.1 ผลของแหล่งคาร์บอน

4.1.1.1 ผลของชนิด

เลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ในอาหารพื้นฐานซึ่งมีน้ำมันปาล์มโอลีอิน 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนเปรียบเทียบกับการใช้ กลูโคส ซูโครส แป้ง เดกซ์ตริน น้ำมันถั่วเหลือง ปาล์มสเตียริน น้ำมันมะพร้าว ไขมันวัว ทวีน 20 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate) และ ทวีน 80 (polyoxyethylene sorbitan monooleate) ในปริมาณ 1.0 เปอร์เซ็นต์

4.1.1.2 ผลของปริมาณ

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ จากผลข้อ 4.1.1.1 โดยเติมแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในปริมาณต่างๆ คือ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์

4.1.2 ผลของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์

4.1.2.1 ผลของชนิด

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ จากผลข้อ 4.1.1.2 ซึ่งมี $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนเปรียบเทียบกับการใช้ NH_4NO_3, NH_4Cl, $(NH_4)_2HPO_4$ และ $NH_4H_2PO_4$ ในปริมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์

4.1.2.2 ผลของปริมาณ

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ จากผลข้อ 4.1.2.1 เติมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เหมาะสมในปริมาณต่างๆ คือ 0.1, 0.2, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์

4.1.3 ผลของปริมาณยีสต์สกัด

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจากผลข้อ 4.1.2.2 เติมยีสต์สกัดในปริมาณต่างๆ คือ 0.12 และ 0.24 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับปริมาณตั้งต้นคือ 0.06 เปอร์เซ็นต์

4.2 การเลี้ยงในถังหมัก (fermentor)

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปส จากผลข้อ 4.1.3 ปริมาตร 1.5 ลิตร บรรจุในถังหมักขนาด 3 ลิตร โดยใส่เชื้อเริ่มต้นปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณอาหารทั้งหมด เลี้ยงเป็นเวลา 60 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ปริมาณอากาศ 1.0 vvm วัดพีเอช การเจริญ และวิเคราะห์กิจกรรมของไลเปสที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสคือ

4.2.1 ผลของอุณหภูมิ

เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิแตกต่างกันคือ 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส

4.2.2 ผลของพีเอชเริ่มต้น

ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 6.0, 7.0 และ 8.0 ด้วยสารละลายกรดซัลฟุริก หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 3 นอร์มอล เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากผลข้อ 4.2.1

4.2.3 ผลของการควบคุมพีเอช

เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมโดยควบคุมพีเอชให้คงที่ตลอดการทดลองด้วยสารละลายกรดซัลฟุริก หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 3 นอร์มอล เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่มีการควบคุมพีเอชตลอดการทดลอง

4.2.4 ผลของการให้อากาศ

ใช้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสจากข้อ 4.2.3 ปรับปริมาณอากาศให้เท่ากับ 0.5, 1.0 และ 2.0 vvm.

4.2.5 ผลของระยะเวลาในการเจริญและสร้างไลเปสในอาหาร

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสตามข้อ 4.2.4 เลี้ยงเชื้อแล้วสุ่มตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง

5. ศึกษาคุณสมบัติบางประการของไลเปส

เตรียม crude enzyme โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะและเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสตามข้อ 4.2.4 จากนั้นเตรียมส่วนใสด้วยการหมุนเหวี่ยงน้ำหมักที่ความเร็ว 4500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปศึกษาปัจจัยต่างๆ คือ

5.1 พีเอชที่เหมาะสม

ศึกษาผลของพีเอชต่อกิจกรรมของไลเปสโดยวิเคราะห์กิจกรรมไลเปสในสารละลายบัฟเฟอร์ต่างชนิดกัน ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอชต่างๆ คือ พีเอช 4.0, 5.0 และ 6.0 ใช้ sodium citrate buffer พีเอช 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 ใช้ phosphate buffer พีเอช 8.0, 8.5 และ 9.0 ใช้ Tris(hydroxymethyl) aminomethane พีเอช 9.0, 9.5, 10.0 และ 10.5 ใช้ glycine-NaOH buffer และพีเอช 10.5, 11.0, 11.5 และ 12.0 ใช้ Na_2HPO_4-NaOH buffer

5.2 ความคงตัวต่อพีเอช

ศึกษาความคงตัวของไลเปสโดยการเก็บเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ที่มีพีเอชต่างๆกัน คือพีเอช 5.0 และ 6.0 ใช้ sodium citrate buffer พีเอช 7.0 และ 8.0 ใช้ phosphate buffer พีเอช 9.0 และ 10.0 ใช้ glycine-NaOH buffer พีเอช 11.0 ใช้ Na_2HPO_4-NaOH buffer บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำมาวิเคราะห์กิจกรรมไลเปสที่พีเอชที่เหมาะสมจากผลข้อ 5.1

5.3 อุณหภูมิที่เหมาะสม

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมไลเปสโดยวิเคราะห์กิจกรรมไลเปสที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 55, 60, 70, 80 และ90 องศาเซลเซียสที่พีเอชที่เหมาะสมตามข้อ 5.1

5.4 ความคงตัวต่ออุณหภูมิ

ศึกษาความคงตัวของไลเปสที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 55, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาการบ่ม 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที โดยวิเคราะห์กิจกรรมไลเปสที่พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมตามข้อ 5.3

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

1. การแยกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งธรรมชาติ

จากตัวอย่างดินและน้ำ 98 ตัวอย่างที่เก็บได้จากบริเวณที่มีอุณหภูมิสูงและมีน้ำมันปนเปื้อนของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารวุ้นซึ่งมีเพียงน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนและให้วงใสรอบโคโลนี ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสได้ 29 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 6 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากตัวอย่างจากโรงงานบริษัทยูนิปาล์มอินดัสทรีจำกัด จังหวัดสุราษฎร์ธานี (UN) 9 สายพันธุ์ บริษัทปาล์มน้ำมันพระแสงจำกัด จังหวัดสุราษฎร์ธานี (PS) 9 สายพันธุ์ บริษัทศรีเจริญปาล์มออยล์จำกัด จังหวัดกระบี่ (SJ) 5 สายพันธุ์ บริษัทไทยทาโลว์แอนด์ออลย์จำกัด จังหวัดสุราษฎร์ธานี (TT) 4 สายพันธุ์ และบริษัทสหอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มจำกัด จังหวัดกระบี่ (IN) 2 สายพันธุ์ สำหรับแหล่งที่พบแบคทีเรียเหล่านี้พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียได้จากตัวอย่างที่เก็บจากบริเวณที่สกัดน้ำมันปาล์มถึง 16 สายพันธุ์ รองลงมาคือจากบ่อดักไขมัน 6 สายพันธุ์ บ่อบำบัดน้ำทิ้ง 3 สายพันธุ์ บริเวณหม้อนึ่ง 3 สายพันธุ์ และจากท่อน้ำทิ้ง 1 สายพันธุ์ จากการย้อมสีแบบแกรมของเชื้อที่คัดเลือกได้หลังการเจริญบนอาหาร nutrient agar เป็นเวลา 6-24 ชั่วโมง และตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวกทั้งหมด มีรูปร่างเป็นท่อน 23 สายพันธุ์ และรูปท่อนยาว 6 สายพันธุ์ นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้สามารถสร้างสปอร์ได้ถึง 26 สายพันธุ์ ซึ่งแบคทีเรียที่สร้างเอนโดสปอร์พบในกลุ่ม *Bacillus Clostridium Sporosarcina Thermoactinomyces* และสกุลอื่นๆ เล็กน้อย แบคทีเรียจะสร้างเอนโดสปอร์ในช่วงหลังของการเจริญในระยะล็อก (log phase) ซึ่งเอนโดสปอร์จะมีความทนทานต่อความร้อน รังสี สารเคมี และความแห้งได้ดี เนื่องจากในเอนโดสปอร์มีสารประกอบทางเคมีคือ กรดไดพิโคลินิก (diplicolinic acid) ซึ่งไม่พบในเซลล์ปกติ และ Ca^{++} จึงเป็นสาเหตุให้แบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงมักจะสร้างเอนโดสปอร์เพื่อสามารถอยู่รอดในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงและมีความแห้งได้ดี (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2533)

ตารางที่ 6 คุณสมบัติของแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่ผลิตไลเปสซึ่งคัดเลือกได้จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม

สายพันธุ์	แกรม[1]	รูปร่าง	การเกิดวงใส[2]	การสร้างสปอร์[3]	แหล่งที่เก็บตัวอย่าง
UN1	แกรมบวก	ท่อนยาว	+	+	บริเวณที่สกัดน้ำมันปาล์ม
UN3	แกรมบวก	ท่อนยาว	+	+	บริเวณที่สกัดน้ำมันปาล์ม
UN6a	แกรมบวก	ท่อน	+	+	บริเวณที่สกัดน้ำมันปาล์ม
UN6b	แกรมบวก	ท่อน	+	+	บริเวณที่สกัดน้ำมันปาล์ม
UN8	แกรมบวก	ท่อน	+	+	ท่อน้ำทิ้ง
UN14	แกรมบวก	ท่อน	++	+	บ่อดักไขมัน
UN16a	แกรมบวก	ท่อน	+++	+	บ่อดักไขมัน
UN20a	แกรมบวก	ท่อนยาว	+	+	บ่อบำบัดน้ำทิ้ง
UN20b	แกรมบวก	ท่อน	++	+	บ่อบำบัดน้ำทิ้ง
PS1	แกรมบวก	ท่อน	+	+	บริเวณที่สกัดน้ำมันปาล์ม
PS7	แกรมบวก	ท่อน	+	+	บริเวณที่สกัดน้ำมันปาล์ม
PS9	แกรมบวก	ท่อน	+	+	บริเวณที่สกัดน้ำมันปาล์ม
PS10	แกรมบวก	ท่อน	+	+	บริเวณที่สกัดน้ำมันปาล์ม
PS15	แกรมบวก	ท่อนยาว	+++	+	บริเวณที่สกัดน้ำมันปาล์ม
PS17	แกรมบวก	ท่อน	+	+	บริเวณหม้อนึ่ง
PS22	แกรมบวก	ท่อนยาว	+	-	บ่อดักไขมัน
PS23a	แกรมบวก	ท่อน	+	+	บ่อดักไขมัน
PS23b	แกรมบวก	ท่อนยาว	+	-	บ่อดักไขมัน
SJ9	แกรมบวก	ท่อน	+	+	บริเวณที่สกัดน้ำมันปาล์ม
SJ10	แกรมบวก	ท่อน	++	-	บริเวณที่สกัดน้ำมันปาล์ม
SJ12	แกรมบวก	ท่อน	+	+	บริเวณหม้อนึ่ง
SJ13	แกรมบวก	ท่อน	+	+	บริเวณหม้อนึ่ง
SJ15	แกรมบวก	ท่อน	+	+	บ่อดักไขมัน

TT3	แกรมบวก	ท่อน	++	+	บริเวณที่สกัดน้ำมันปาล์ม
TT6	แกรมบวก	ท่อน	+	+	บริเวณที่สกัดน้ำมันปาล์ม
TT12	แกรมบวก	ท่อน	+	+	บริเวณที่สกัดน้ำมันปาล์ม
TT16	แกรมบวก	ท่อน	+	+	บ่อบำบัดน้ำทิ้ง
IN5	แกรมบวก	ท่อน	+++	+	บริเวณที่สกัดน้ำมันปาล์ม
IN10a	แกรมบวก	ท่อน	++	+	บริเวณที่สกัดน้ำมันปาล์ม

[1] การย้อมแกรมแบคทีเรียสายพันธุ์ UN8, UN20b, PS1, PS9, SJ12, SJ15, TT3, TT12, TT16 และ IN5 ทำที่เวลา 6 ชั่วโมง

[2] ขนาดการเกิดวงใสบนอาหารแข็งที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ 55 องศาเซลเซียส โดยวัดจากขอบโคโลนี (มิลลิเมตร)

+ = ขนาดวงใสเล็กกว่า 0.5 มิลลิเมตร

++ = ขนาดวงใส 0.5-1.0 มิลลิเมตร

+++ = ขนาดวงใสมากกว่า 1.0 มิลลิเมตร

[3] การสร้างสปอร์ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์หลังการเลี้ยงบนอาหารพื้นฐานแบบแข็ง

2. การจำแนกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกได้

จากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ 29 สายพันธุ์ พบว่ามีแบคทีเรียที่ให้วงใสกว้างที่สุด 3 สายพันธุ์ คือ UN16a, PS15 และ IN5 นำมาศึกษาลักษณะทางสันฐานวิทยา และลักษณะทางชีวเคมีได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 7 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน ต้องการออกซิเจนในการเจริญ สามารถเคลื่อนที่ได้และสามารถผลิตเอนไซม์คะตาเลส สายพันธุ์ UN16a และ PS15 สร้างเอนโดสปอร์ที่ตำแหน่งปลายเซลล์ ขณะที่สายพันธุ์ IN5 สร้างเอนโดสปอร์ตำแหน่งกลางเซลล์ อุณหภูมิที่สามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 35-75 องศาเซลเซียส ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง

จากคุณสมบัติทั้งหมดข้างต้น เมื่อเปรียบเทียบกับ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Kreig and Holt, 1984) พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์นี้จัดอยู่ในสกุล *Bacillus* ตรงกับที่ VanDermark และ Batzing (1987) กล่าวว่าแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงมักพบในสกุลที่สร้างสปอร์เช่น *Bacillus* และ *Clostridium* และจากรายงานการคัดเลือกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงจากแหล่งธรรมชาติพบว่าแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสที่คัดเลือกได้เป็น *Bacillus* แทบทั้งสิ้นเช่น การคัดเลือกโดย Gowland และคณะ (1987), Emanuilova และคณะ (1993),

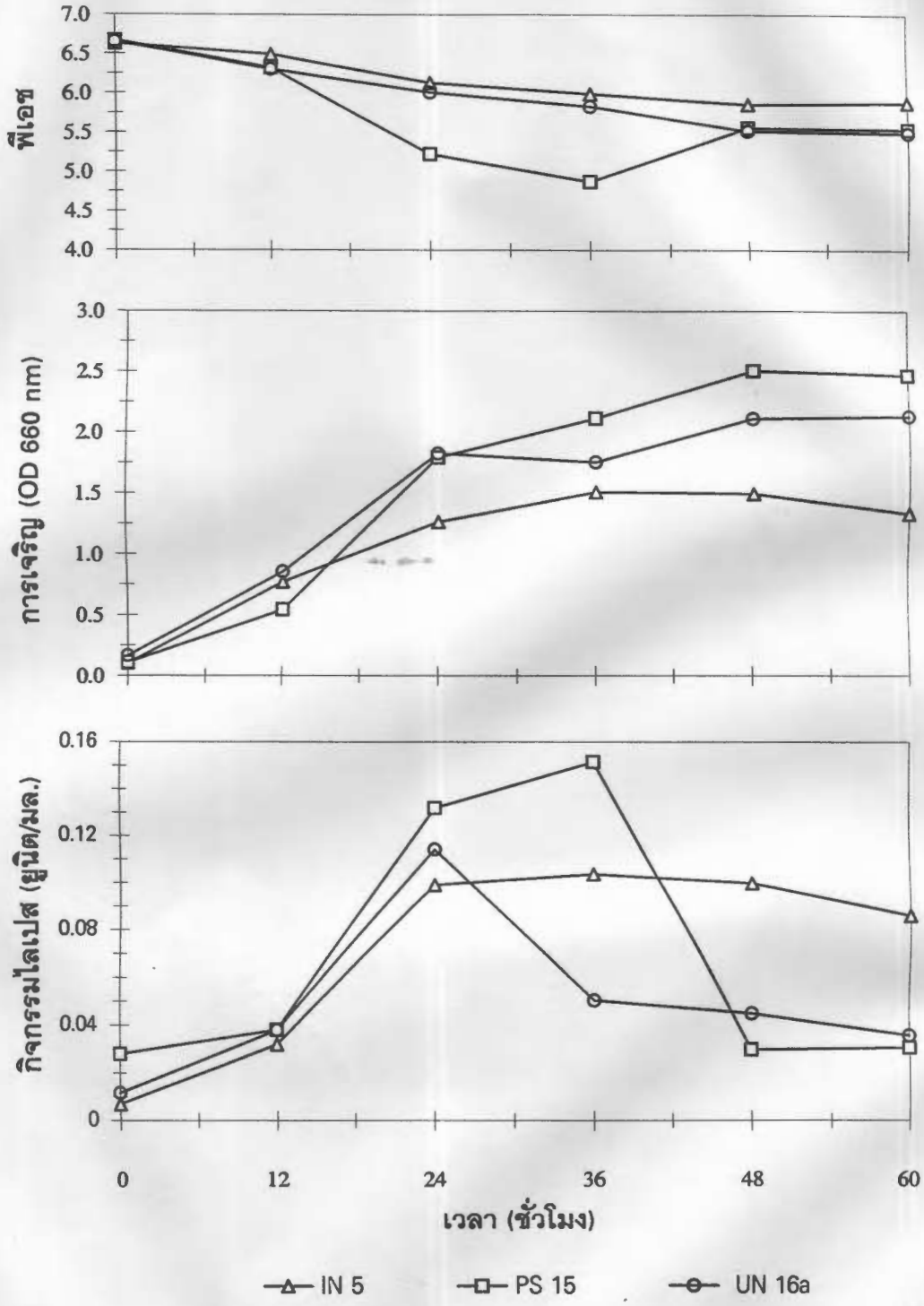
Handelsman และ Shoham (1994), Kim และคณะ (1994), Schmidt-Dannert และคณะ (1994), Wang และคณะ (1995), Rath และ Subramanyam (1996), Becker และคณะ (1997) และ Sidhu และคณะ (1998)

ตารางที่ 7 คุณสมบัติของแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงสายพันธุ์ UN16a, PS15 และ IN5

คุณลักษณะที่ตรวจสอบ	
รูปร่างเซลล์	ท่อน
	-UN16a : กว้าง 1.0 µm, ยาว 2.0-6.0 µm
	-PS15 : กว้าง 0.5 µm, ยาว 3.0-6.0 µm
	-IN5 : กว้าง 0.5 µm, ยาว 1.0-2.0 µm
ลักษณะโคโลนีบนอาหาร NA	โคโลนีกลม ขอบเรียบ สีเหลืองอ่อน
การติดสีแกรม	แกรมบวก
การสร้างสปอร์	-UN16a : สร้างเอนโดสปอร์ตำแหน่งปลายเซลล์
	-PS15 : สร้างเอนโดสปอร์ตำแหน่งปลายเซลล์
	-IN5 : สร้างเอนโดสปอร์ตำแหน่งกลางเซลล์
การใช้อากาศ	Aerobic
การสร้างเอนไซม์คะตาเลส	+
การเคลื่อนที่	+

3. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไลเปส

ตรวจวัดกิจกรรมไลเปสที่ผลิตโดยแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์คือ UN16a, PS15 และ IN5 โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง ตรวจวัดการเจริญ พีเอช และกิจกรรมไลเปสทุก 12 ชั่วโมง ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 6 แบคทีเรียสายพันธุ์ UN16a และ PS15 มีอัตราการเจริญสูงสุดระหว่างชั่วโมงที่ 12 ถึง 24 และเริ่มคงที่เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 48 โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ 2.11 และ 2.51 ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ IN5 มีอัตราการเจริญสูงสุดภายใน 12 ชั่วโมงแรก และเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 36 มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.51



ภาพที่ 6 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอชและ กิจกรรมไลเปสของแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *Bacillus* สายพันธุ์ UN16a, PS15 และ IN5 (เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส)

พบว่ากิจกรรมไลเปสของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์จะเพิ่มขึ้นตามการเจริญ โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ UN16a ให้กิจกรรมไลเปสสูงสุด 0.11 ยูนิตต่อมิลลิ ลิตร ที่ 24 ชั่วโมง ในขณะที่แบคทีเรียสายพันธุ์ IN5 ให้กิจกรรมไลเปสสูงสุด 0.10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในระหว่างชั่วโมงที่ 24-48 และพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PS15 ให้กิจกรรมไลเปสสูงที่สุดเท่ากับ 0.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังจากการเลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง จึงเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ PS15 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสต่อไป

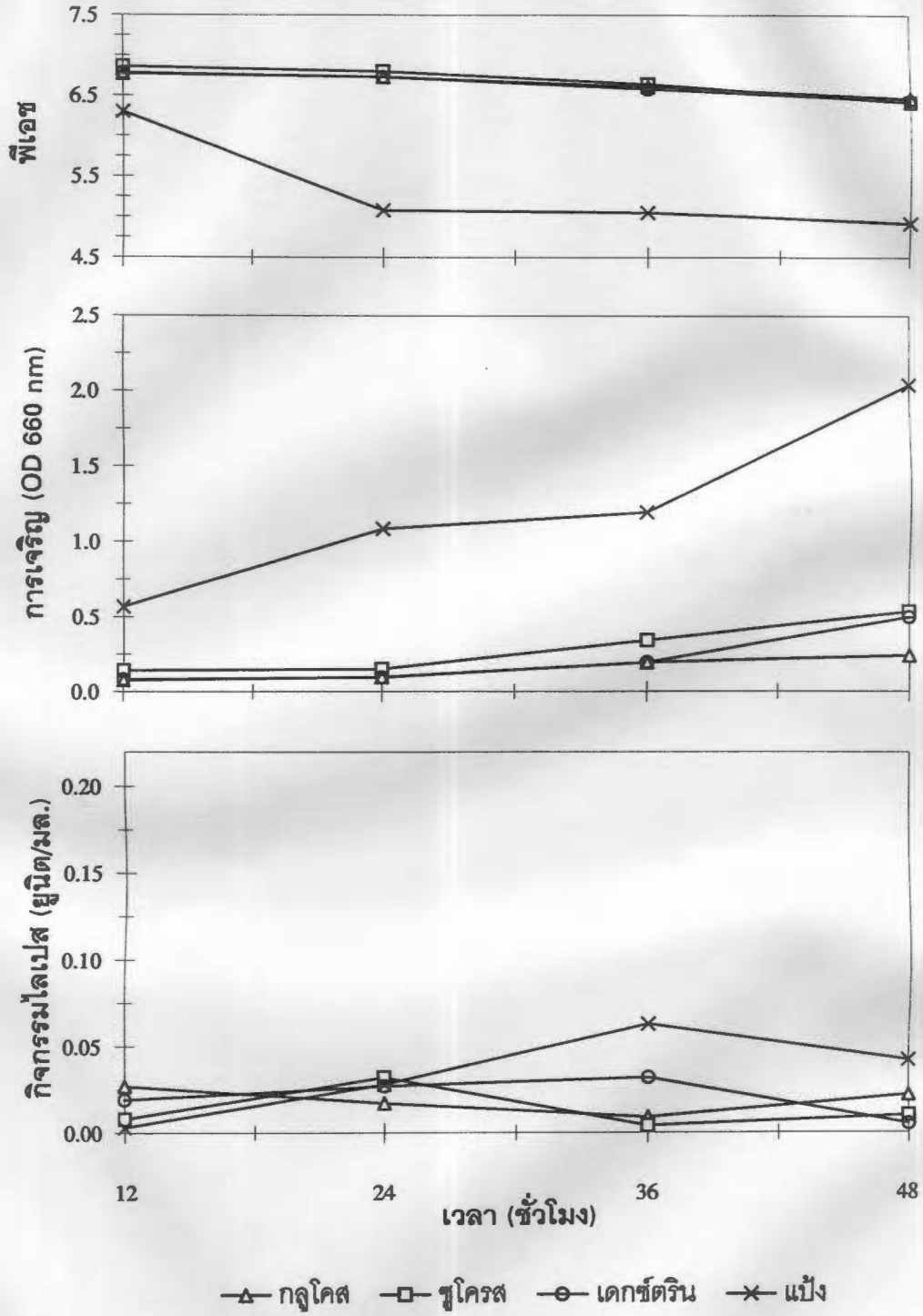
4. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสโดยแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *Bacillus* sp. PS15

4.1 การเลี้ยงบนเครื่องเขย่า

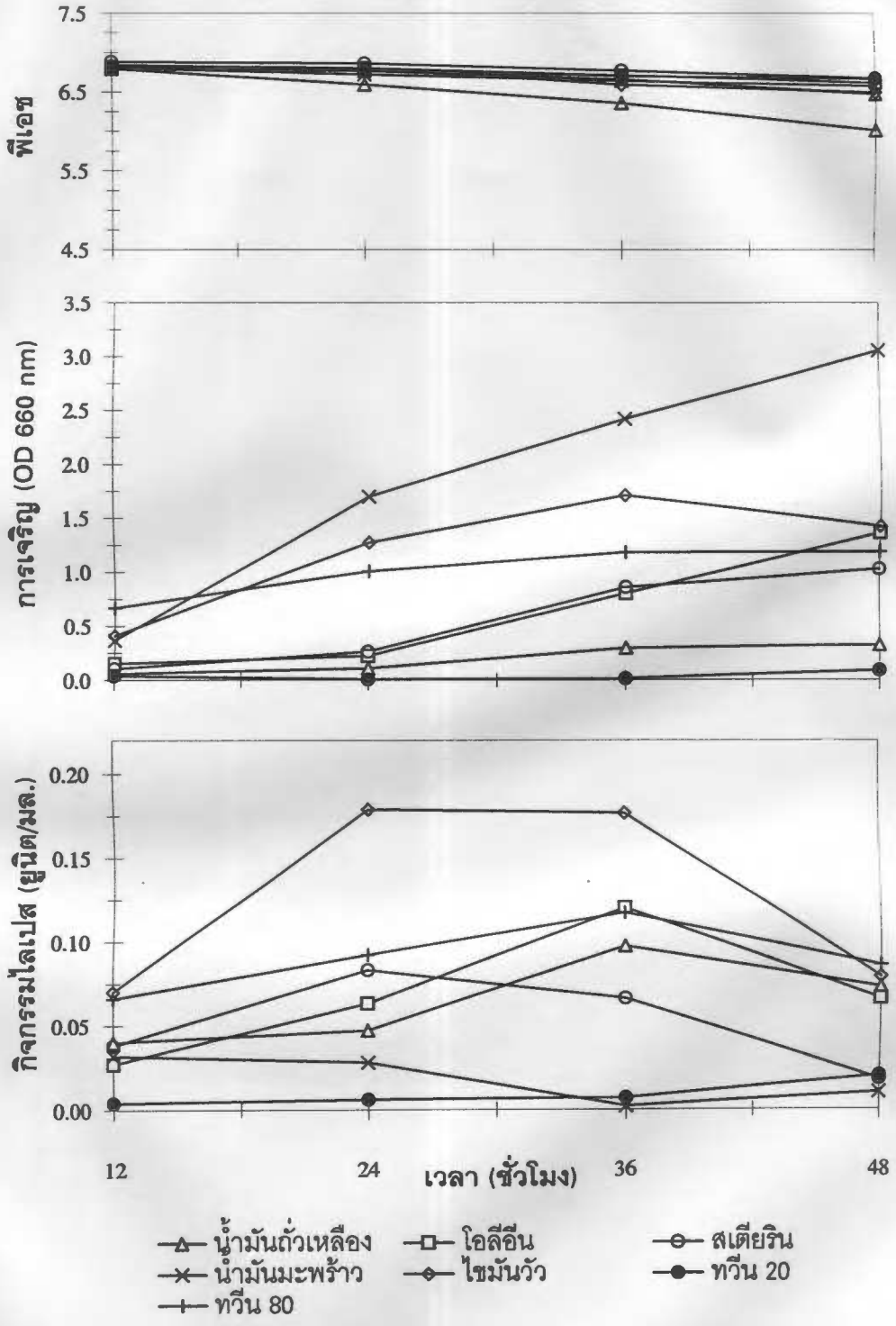
4.1.1 ผลของแหล่งคาร์บอน

การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสโดย *Bacillus* sp. PS15 ซึ่งได้ทดสอบน้ำตาล แป้ง น้ำมัน ไขมัน และ ทวีน ชนิดต่างๆ ผลดังแสดงในภาพที่ 7 และ 8 พบว่าเมื่อใช้น้ำมันและไขมันรวมทั้งน้ำมันสังเคราะห์ (synthetic triglycerides) คือ ทวีน 20 และทวีน 80 เป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า เชื้อเจริญได้ดีที่สุดในน้ำมันมะพร้าว รองลงมาคือ ไขมันวัวและทวีน 80 แต่เชื้อเจริญได้น้อยมากในทวีน 20 ส่วนกิจกรรมไลเปสสูงสุดเมื่อใช้ไขมันวัวเป็นแหล่งคาร์บอน คือมีกิจกรรม 0.18 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ระหว่างชั่วโมงที่ 24 จนถึงชั่วโมงที่ 36 รองลงมาคือทวีน 80 และน้ำมันปาล์มโอลีอิน มีกิจกรรมใกล้เคียงกันคือประมาณ 0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เชื้อเจริญได้น้อยมากเมื่อใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนทั้งน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมเลกุลคู่และเดกซ์ตริน และเมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อสามารถเจริญได้เพิ่มขึ้นมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 2.04 ที่ชั่วโมงที่ 48 พีเอชสุดท้ายเป็น 4.92 แต่กิจกรรมไลเปสต่ำมากโดยมีกิจกรรมสูงสุด 0.06 ยูนิตต่อมิลลิลิตรที่ 36 ชั่วโมง

จากผลข้างต้นจะเห็นได้ว่าเชื้อ *Bacillus* sp. PS15 เจริญและผลิตไลเปสในแหล่งคาร์บอนที่เป็นไขมันและน้ำมันได้ดีกว่าแหล่งคาร์บอนประเภทแป้งและน้ำตาล ประกอบกับการผลิตไลเปสเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับการเจริญ (growth associated) แสดงว่าแบคทีเรียผลิตไลเปสออกมาย่อยสลายไขมันและน้ำมัน เพื่อให้ได้กรดไขมันใช้ในการเจริญ



ภาพที่ 7 ผลของแหล่งคาร์บอน (คาร์โบไฮเดรต) ต่อการเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และกิจกรรมไลเปสของ *Bacillus* sp. PS15
(เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส)



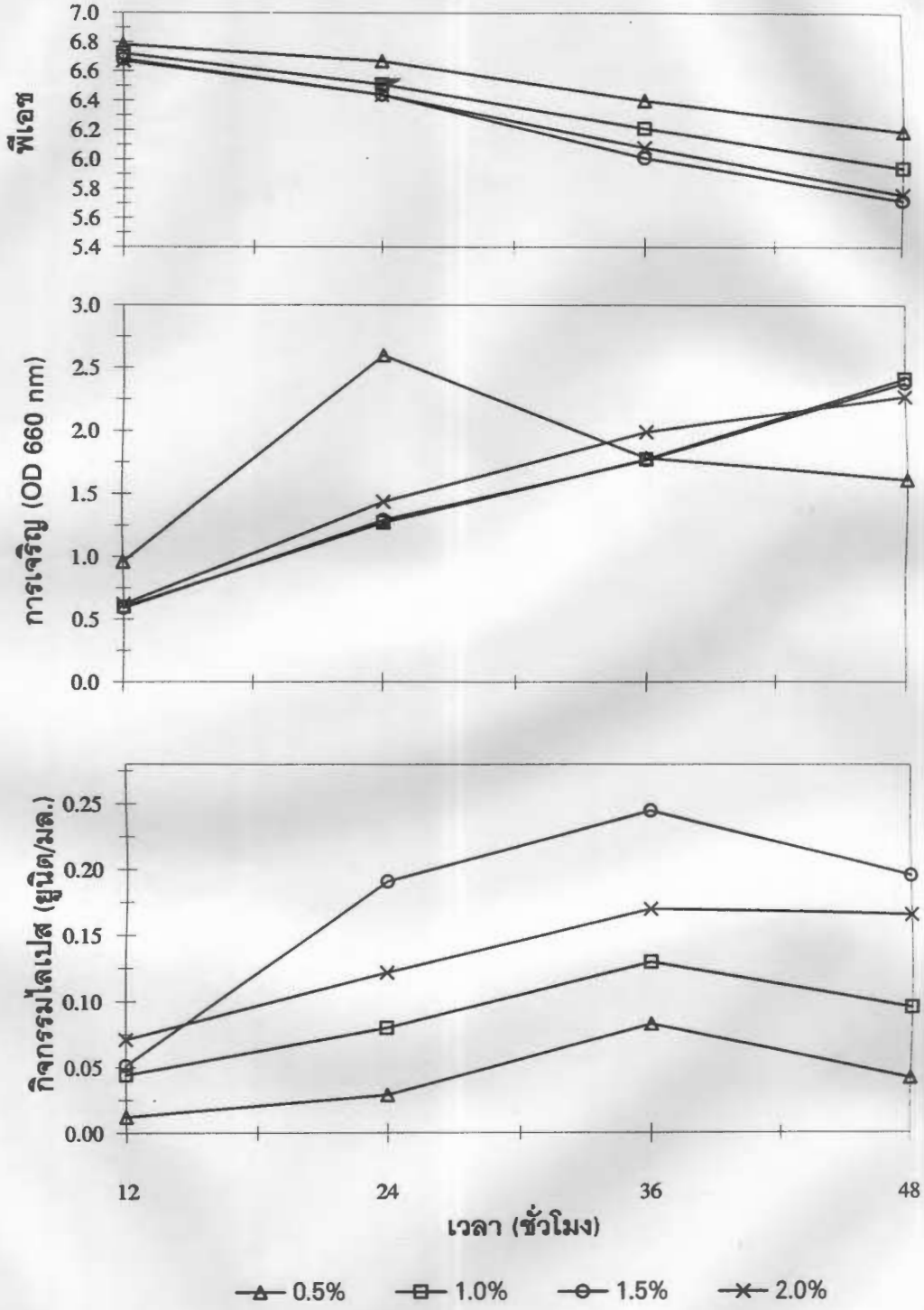
ภาพที่ 8 ผลของแหล่งคาร์บอน (น้ำมันและไขมัน) ต่อการเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และกิจกรรมไลเปสของ *Bacillus* sp. PS15 (เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส)

และอาจจะเนื่องจากโครงสร้างไลปิดของผนังเซลล์ของแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัวสายยาว และกรดไขมันที่มีกิ่งสาขาในสัดส่วนที่สูง (VanDermark and Batzing, 1987) ดังนั้นแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงจึงเจริญในแหล่งคาร์บอนที่เป็นไขมันและน้ำมันได้ดีกว่าแหล่งคาร์บอนประเภทแป้งและน้ำตาล ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงโดยทั่วไปซึ่งพบว่าต้องการแหล่งคาร์บอนประเภทไขมันและน้ำมันเช่นกัน เช่น น้ำมันมะกอก (Schmidt-Dannert, *et al.*, 1994 ; Becker, *et al.*, 1997) น้ำมันข้าวโพด (Wang, *et al.*, 1995) ทวีน 80 (Gowland, *et al.*, 1987 ; Handelsman and Shoham, 1994) หรือมีไขมันและน้ำมันเป็นตัวเหนี่ยวนำการผลิตไลเปส (inducer) เช่นน้ำมันละหุ่ง (Omar, *et al.*, 1987) และทวีน 80 (Emanuilova, *et al.*, 1993)

ในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ไขมันวัว 1.0 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนแทนการใช้น้ำมันปาล์ม 1.0 เปอร์เซ็นต์ซึ่งให้กิจกรรมไลเปสเพียง 0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร การทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Marek และ Bednarski (1996) ซึ่งรายงานว่รา *Rhizomucor miehei* NH และยีสต์ *Yarrowia lipolytica* 2 ให้กิจกรรมไลเปสสูงสุดในอาหารที่มีไขมันวัว 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 24 ชั่วโมงและ 36 ชั่วโมงตามลำดับ นอกจากชนิดของแหล่งคาร์บอนจะมีความสำคัญต่อการผลิตแล้ว ปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมก็มีความสำคัญเช่นกัน โดยปริมาณไขมันวัวมากหรือน้อยเกินไปจะทำให้การผลิตไลเปสต่ำ จากการศึกษาปริมาณไขมันวัวที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสพบว่า ปริมาณไขมันวัวเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ให้การผลิตไลเปสสูงสุด 0.24 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 36 ชั่วโมง (ภาพที่ 9) จึงใช้ไขมันวัว 1.5 เปอร์เซ็นต์ในการทดลองขั้นต่อไป

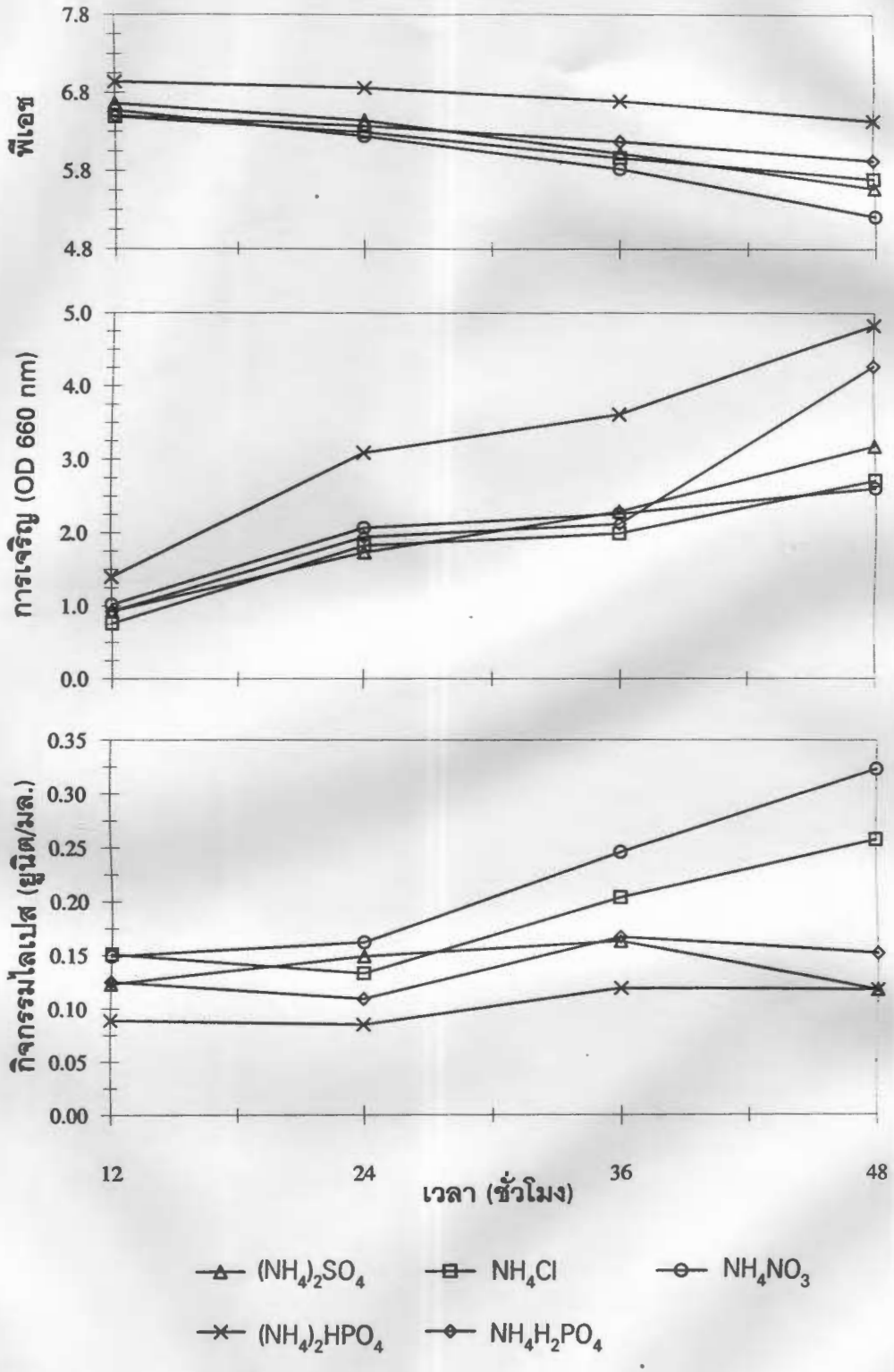
4.1.2 ผลของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์

จากการทดลองเลี้ยง *Bacillus* sp. PS15 ในอาหารที่มีไขมันวัว 1.5 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ชนิดต่าง ๆ คือ NH_4NO_3, NH_4Cl, $(NH_4)_2HPO_4$, และ $NH_4H_2PO_4$ ปริมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *Bacillus* sp. PS15 เจริญดีที่สุดเมื่อใช้แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ดังภาพที่ 10 อาจจะเนื่องจากแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตมีคุณสมบัติการเป็นบัฟเฟอร์ ช่วยรักษาระดับพีเอชไม่ให้ลดต่ำจนเกินไป ทำให้เชื้อสามารถเจริญได้ดี ส่วนแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นมีแนวโน้มการเจริญใกล้



ภาพที่ 9 ผลของปริมาณไขมันวัวต่อการเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และกิจกรรมไลเปสของ *Bacillus* sp. PS15

(เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส)



ภาพที่ 10 ผลของแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ต่อการเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และกิจกรรมไลเปสของ *Bacillus* sp. PS15
(เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส)

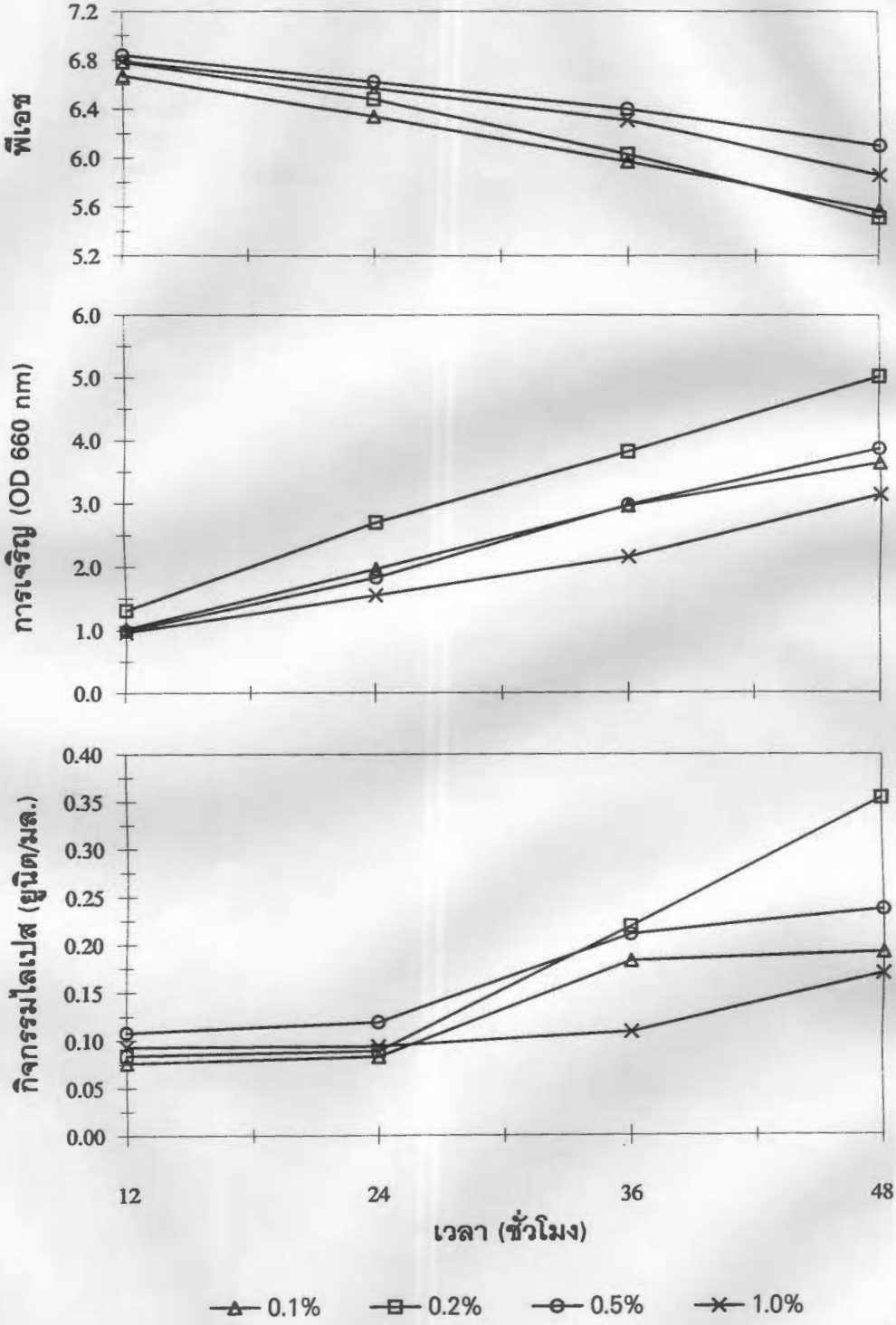
เดียงกัน แต่พบว่ากิจกรรมไลเปสสูงสุดเกิดขึ้นเมื่อใช้แอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยให้กิจกรรม 0.32 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 48 ชั่วโมง

ศึกษาปริมาณแอมโมเนียมไนเตรตที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสโดย *Bacillus* sp. PS15 ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 11 พบว่าเชื้อเจริญและผลิตไลเปสได้ดีที่สุดในอาหารที่มี แอมโมเนียมไนเตรตเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าการดูดกลืนแสง 5.02 และกิจกรรมไลเปส 0.35 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 48 ชั่วโมง พีเอชสุดท้าย 5.51 สอดคล้องกับบางรายงานที่ใช้แอมโมเนียมไนเตรตในการผลิตไลเปส ซึ่งพบว่าปริมาณแอมโมเนียมไนเตรตที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสอยู่ในช่วง 0.1-0.5 เปอร์เซ็นต์ (วิภูมิ แก้วทอง, 2539 ; Roa, *et al.*, 1993 ; Pokorny, *et al.*, 1994) ดังนั้นจึงใช้แอมโมเนียมไนเตรตในระดับความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ในการศึกษาขั้นต่อไป

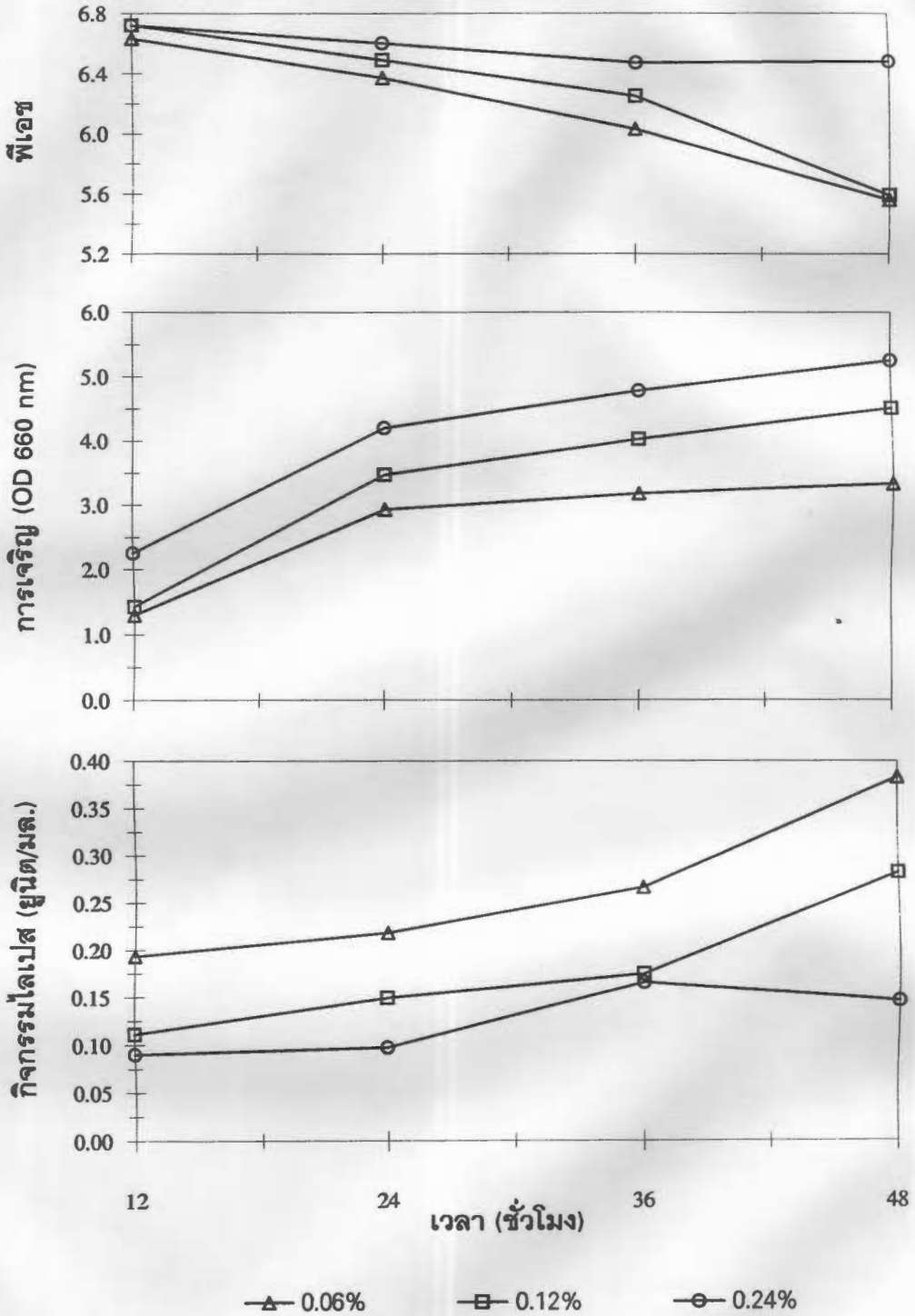
4.1.3 ผลของปริมาณยีสต์สกัด

จากการที่มีปริมาณยีสต์สกัด 0.06 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเพื่อเป็นแหล่งอาหารเสริมประเภทวิตามินและแร่ธาตุ จึงทดลองปรับปริมาณยีสต์สกัดที่แบคทีเรีย *Bacillus* sp. PS15 ต้องการเพื่อการเจริญและการผลิตไลเปส ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 12 พบว่าเชื้อเจริญได้ดีขึ้นเมื่อปริมาณยีสต์สกัดเพิ่มขึ้น คือเจริญได้ดีที่สุดที่ปริมาณยีสต์สกัด 0.24 เปอร์เซ็นต์ ตรงกันข้ามกับกิจกรรมไลเปสซึ่งเชื้อผลิตไลเปสสูงที่สุดเมื่อเจริญในอาหารที่มีปริมาณยีสต์สกัดต่ำสุดคือ 0.06 เปอร์เซ็นต์ โดยให้กิจกรรมสูงสุด 0.38 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 48 ชั่วโมง แสดงว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. PS15 สามารถใช้ยีสต์สกัดซึ่งเป็นไนโตรเจนอินทรีย์เป็นอาหารเพื่อการเจริญได้แต่ไม่ใช้เป็นตัวกระตุ้นสำหรับการผลิตไลเปส

จากการทดลองดังกล่าวข้างต้นซึ่งเป็นผลการศึกษาบนเครื่องเขย่าพบว่าสารอาหารมีผลต่อการเจริญและการผลิตไลเปส โดยกิจกรรมไลเปสของ *Bacillus* sp. PS15 เพิ่มสูงถึง 0.38 ยูนิตต่อมิลลิลิตรเมื่อใช้ไขมันวัว 1.5 เปอร์เซ็นต์และ NH_4NO_3 0.2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนแทนการใช้น้ำมันปาล์ม 1.0 เปอร์เซ็นต์และ $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ในอาหารพื้นฐานเริ่มต้น ซึ่งให้กิจกรรมไลเปสเพียง 0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับการเจริญของเชื้อที่เพิ่มขึ้น โดยค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นจาก 1.36 ในตอนเริ่มต้นเป็น 3.32 หลังการศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนปริมาณยีสต์สกัดที่เหมาะสม



ภาพที่ 11 ผลของปริมาณแอมโมเนียมไนเตรตต่อการเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และ กิจกรรมไลเปสของ *Bacillus* sp. PS15 (เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส)



ภาพที่ 12 ผลของปริมาณยีสต์สกัดต่อการเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และกิจกรรมไลเปสของ *Bacillus* sp. PS15
(เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส)

ต่อการผลิตไลเปสคือ 0.06 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเมื่อเพิ่มปริมาณยีสต์สกัดพบว่าการผลิตไลเปส ลดลง จึงใช้ปริมาณยีสต์สกัดเท่ากับในอาหารพื้นฐานเริ่มต้น ดังนั้นจึงได้สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไลเปสโดย *Bacillus* sp. PS15 คือ ไขมันวัว 1.50 เปอร์เซ็นต์ NH_4NO_3 0.20 เปอร์เซ็นต์ K_2HPO_4 0.18 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 0.10 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03 เปอร์เซ็นต์ กัมอราบิค 0.10 เปอร์เซ็นต์ และ ยีสต์สกัด 0.06 เปอร์เซ็นต์ พีเอชของอาหารเริ่มต้น 7.0 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อเจริญอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 24 มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 2.93 แล้วจึงเจริญเข้าสู่ระยะคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 48 โดยเชื้อผลิตไลเปสสูงสุด 0.38 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 48

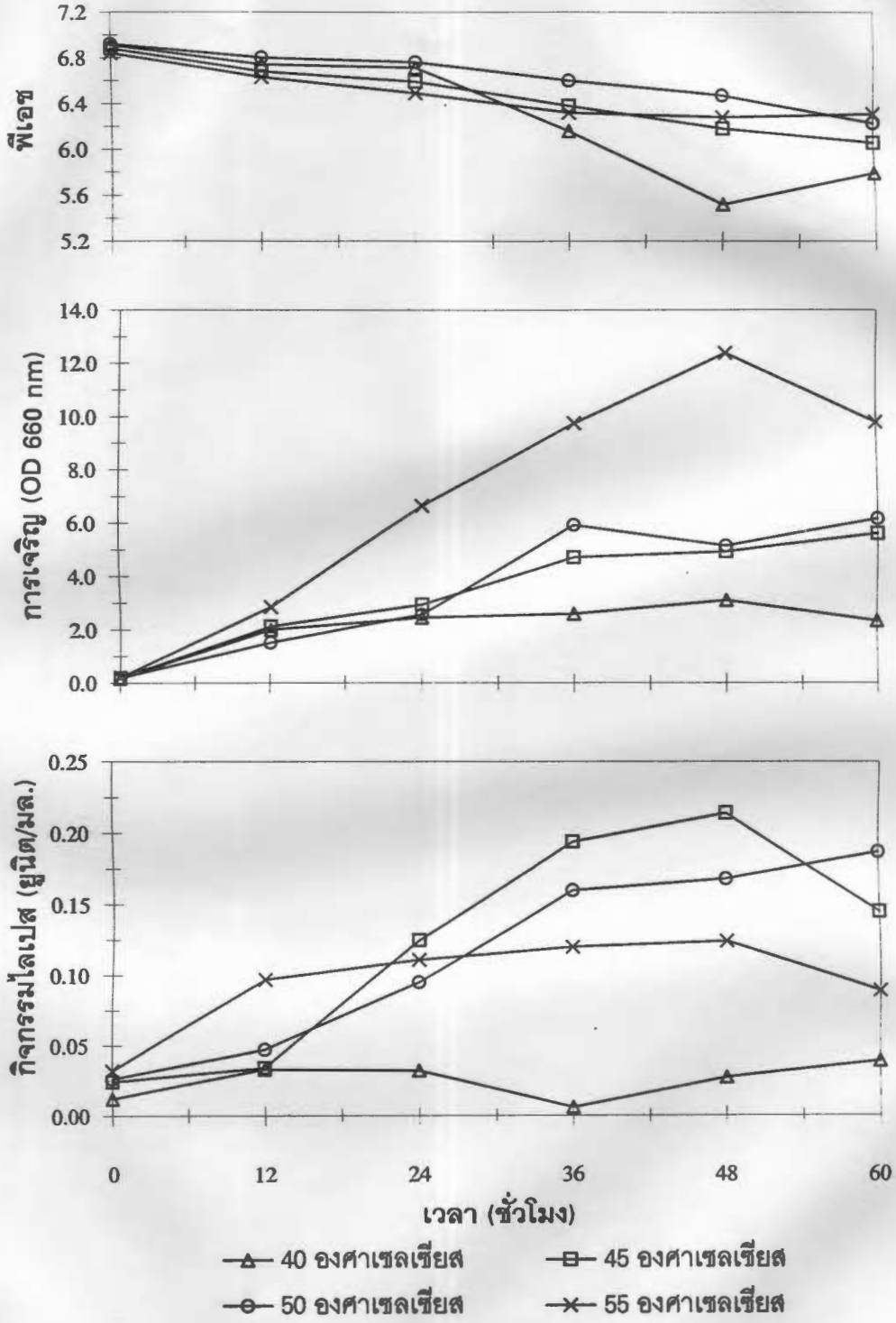
4.2 การเลี้ยงในถังหมัก

หลังจากได้สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไลเปสโดย *Bacillus* sp. PS15 แล้ว จากนั้นจึงศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปส โดยทำการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 3 ลิตร บรรจุอาหารเหลวปริมาตร 1.5 ลิตร โดยใช้เชื้อเริ่มต้นปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด อัตราการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ให้อากาศปริมาณ 1.0 vvm ภายใต้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 60 ชั่วโมง ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสคือ

4.2.1 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสม

ผลของอุณหภูมิต่อการเลี้ยง *Bacillus* sp. PS15 เพื่อผลิตไลเปส แสดงในภาพที่ 13 โดยทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อเจริญได้น้อยมากที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสและการเจริญเพิ่มมากขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น โดยเชื้อเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แต่พบว่าค่ากิจกรรมไลเปสสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส คือมีค่า 0.21 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 48 ชั่วโมง รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีค่า 0.17 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 48 ชั่วโมง แต่ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสซึ่งมีการเจริญมากที่สุด ตรวจพบกิจกรรมไลเปสเพียง 0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 48 ชั่วโมง ดังนั้นจึงคัดเลือกอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สำหรับการผลิตไลเปสในการทดลองข้อต่อไป

ส่วนการเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งให้กิจกรรมไลเปสต่ำมาก อาจจะเนื่องมาจาก *Bacillus* sp. PS15 เป็นแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง จึงเจริญได้น้อยลงที่



ภาพที่ 13 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และ กิจกรรมไลเปส ของ *Bacillus* sp. PS15

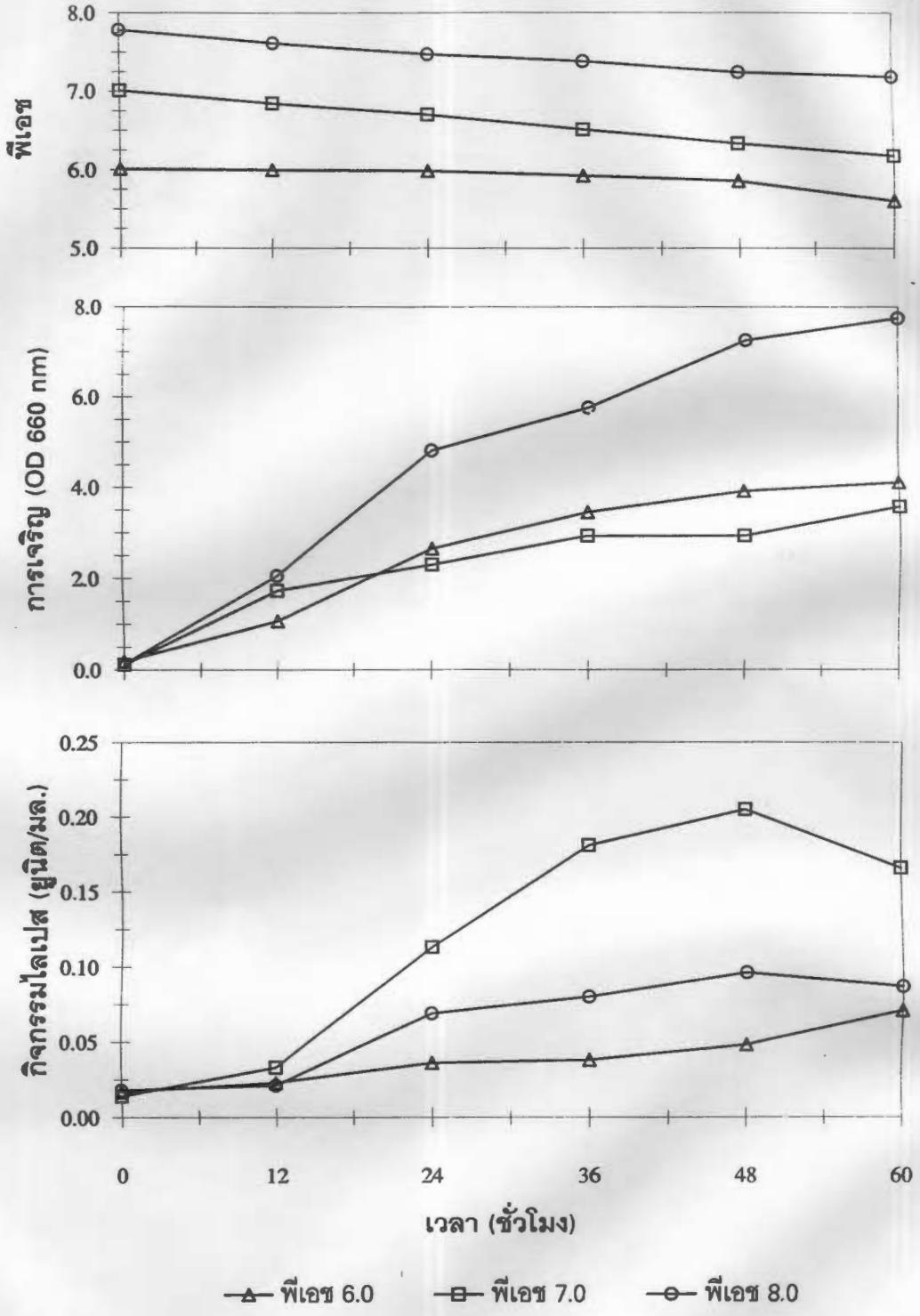
(ในถังหมักขนาด 3 ลิตร อัตรากวน 200 รอบต่อนาที ปริมาณอากาศ 1 vvm)

อุณหภูมิต่ำลงและจากการสังเกตพบว่าไขมันวัวอยู่ในสภาพกึ่งแข็งที่อุณหภูมินี้ จึงทำให้เชื้อไม่สามารถใช้ไขมันวัวได้ดีซึ่งเป็นปัญหาที่เกิดจากการใช้ไขมันวัว ดังนั้นถ้าต้องการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียส จึงควรเปลี่ยนชนิดของไขมันเป็นน้ำมันที่มีสภาพเหลวที่อุณหภูมิห้องเช่น น้ำมันปาล์มโอลีอิน น้ำมันถั่วเหลือง หรือทวีน 80

เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. PS15 ในถังหมักพบว่ามีกิจกรรมไลเปสต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในฟลาสก์บนเครื่องเขย่าแม้จะใช้อาหารชนิดเดียวกัน เลี้ยงที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเช่นกัน โดยการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าให้กิจกรรมไลเปสเป็น 0.38 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 48 ชั่วโมง แต่เมื่อเลี้ยงในถังหมักให้กิจกรรมไลเปสเพียง 0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 48 ชั่วโมง หรือมีกิจกรรมเหลือเพียง 32 เปอร์เซ็นต์ อาจเกิดขึ้นเนื่องจากสภาวะในถังหมักและสภาวะของเครื่องเขย่ามีความแตกต่างกันเช่น ปริมาณอากาศที่เชื้อได้รับเนื่องจากปริมาตรอาหารในถังหมักมีปริมาณ 1.5 ลิตร ในถังหมักขนาด 3 ลิตร ส่วนปริมาตรของอาหารในฟลาสก์เป็น 50 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นอกจากนี้ลักษณะการเขย่าอาหารบนเครื่องเขย่าแตกต่างกับการกวนและการพ่นอากาศในถังหมัก ดังนั้นปริมาณอากาศที่เชื้อได้รับจึงแตกต่างกัน ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Schmidth-Dannert และคณะ (1994) ที่ผลิตไลเปสจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *Bacillus thermocatenulatus* ในถังหมักขนาด 100 ลิตร ให้ปริมาณอากาศ 60 Nm^3/h ที่ความดัน 1 มิลลิบาร์ อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที ภายใต้อุณหภูมิ 63 องศาเซลเซียส พีเอชคงที่ที่ 6.5 พบว่ากิจกรรมไลเปสลดลงเหลือเพียง 30 เปอร์เซ็นต์ (0.31 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ของการเลี้ยงบนเครื่องเขย่า แต่ในทางตรงกันข้าม Kambourova และคณะ (1996) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงและทนด่าง *Bacillus* sp. ตรวจพบกิจกรรมไลเปส 117 นาโนเคทโทลต่อมิลลิลิตรเมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมัก โดยให้ระดับออกซิเจนละลายต่ำสุด 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งกิจกรรมไลเปสที่ได้สูงกว่าการเลี้ยงในฟลาสก์บนเครื่องเขย่า 1.5 เท่า

4.2.2 ผลของพีเอชเริ่มต้น

เมื่อศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปส โดยทำการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้มีพีเอชต่างๆ กัน ผลการทดลองที่ได้แสดงในภาพที่ 14 พบว่าเมื่อ *Bacillus* sp. PS15 เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7.0



ภาพที่ 14 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่อการเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และกิจกรรมไลเปสของ *Bacillus* sp. PS15

(ในถังหมักขนาด 3 ลิตร อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ปริมาณอากาศ 1 vvm อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส)

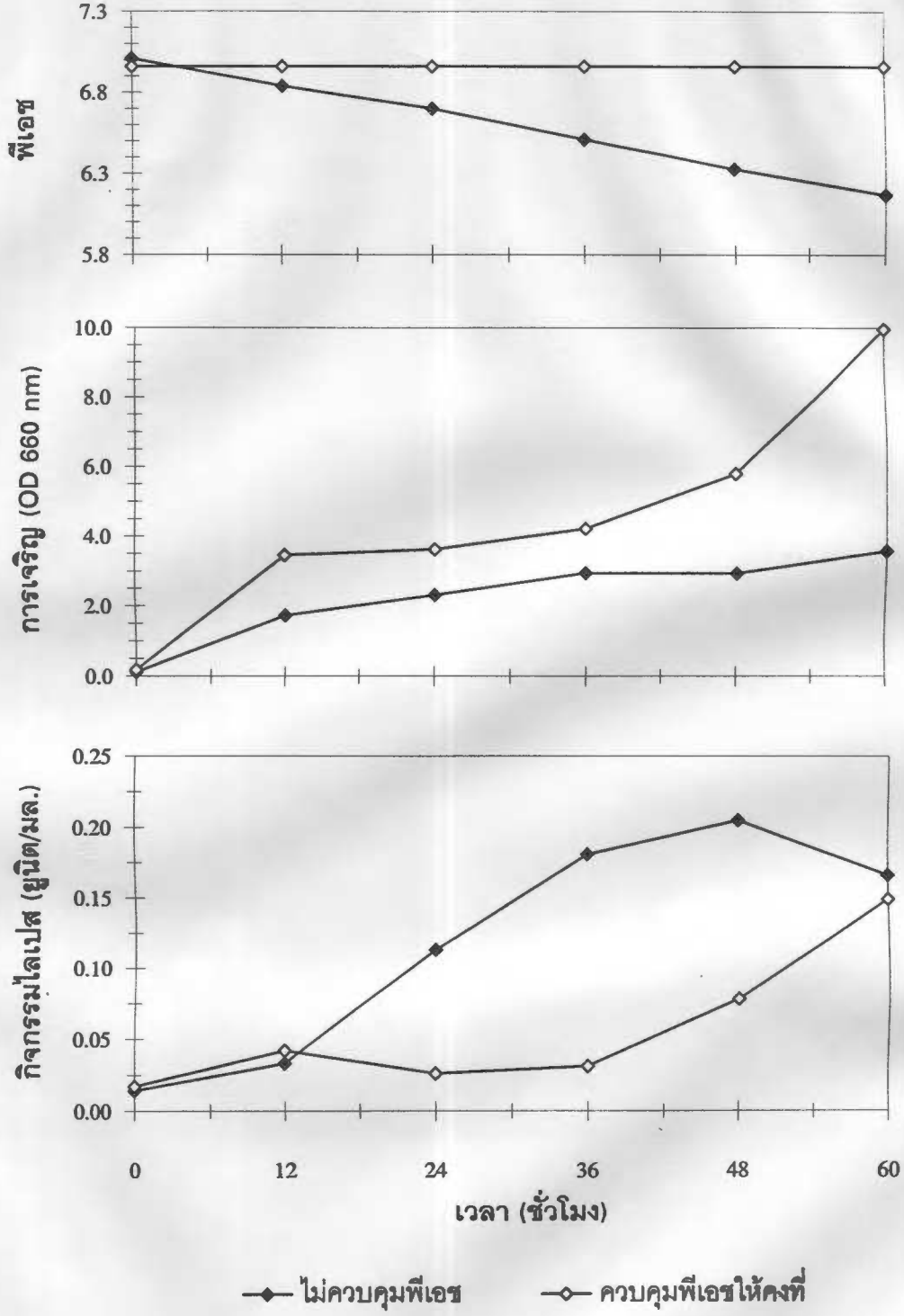
ให้ค่ากิจกรรมไลเปสสูงสุด 0.20 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 48 ชั่วโมง ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองอื่นที่พบว่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อจะอยู่ในช่วงเป็นกลาง (Nishio, *et al.*, 1987 ; Schmidt-Dannert, *et al.*, 1994) ยกเว้นแบคทีเรียที่ถูกคัดเลือกเพื่อผลิตไลเปสชอบด่างจึงจะมีพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมในสภาวะเป็นด่าง (วิภูมิ แก้วทอง, 2539 ; Kokusho, *et al.*, 1982 ; Wang, *et al.*, 1995)

4.2.3 ผลของการควบคุมพีเอช

เนื่องจากพีเอชเริ่มต้นของอาหารมีความสำคัญต่อการผลิตไลเปสโดย *Bacillus* sp. PS15 และพีเอชมีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการเลี้ยง โดยมีการเปลี่ยนแปลงลดลงจาก 7.01 จนกระทั่งเหลือ 6.17 ในชั่วโมงที่ 60 ดังนั้นจึงทำการทดลองควบคุมพีเอชของอาหารให้คงที่เท่ากับ 7.0 ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อโดยไม่ควบคุมพีเอชของอาหาร ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 15 พบว่าเชื้อเจริญในอาหารที่มีการควบคุมพีเอชได้ดีกว่าในอาหารที่ไม่ได้ควบคุมพีเอช ในขณะที่การผลิตไลเปสเกิดได้ดีกว่าเมื่อไม่มีการควบคุมพีเอชของอาหารโดยกิจกรรมไลเปสสูงสุด 0.20 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง ดังนั้นจึงไม่ควบคุมพีเอชของอาหารในระหว่างการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไลเปสในการทดลองขั้นต่อไป

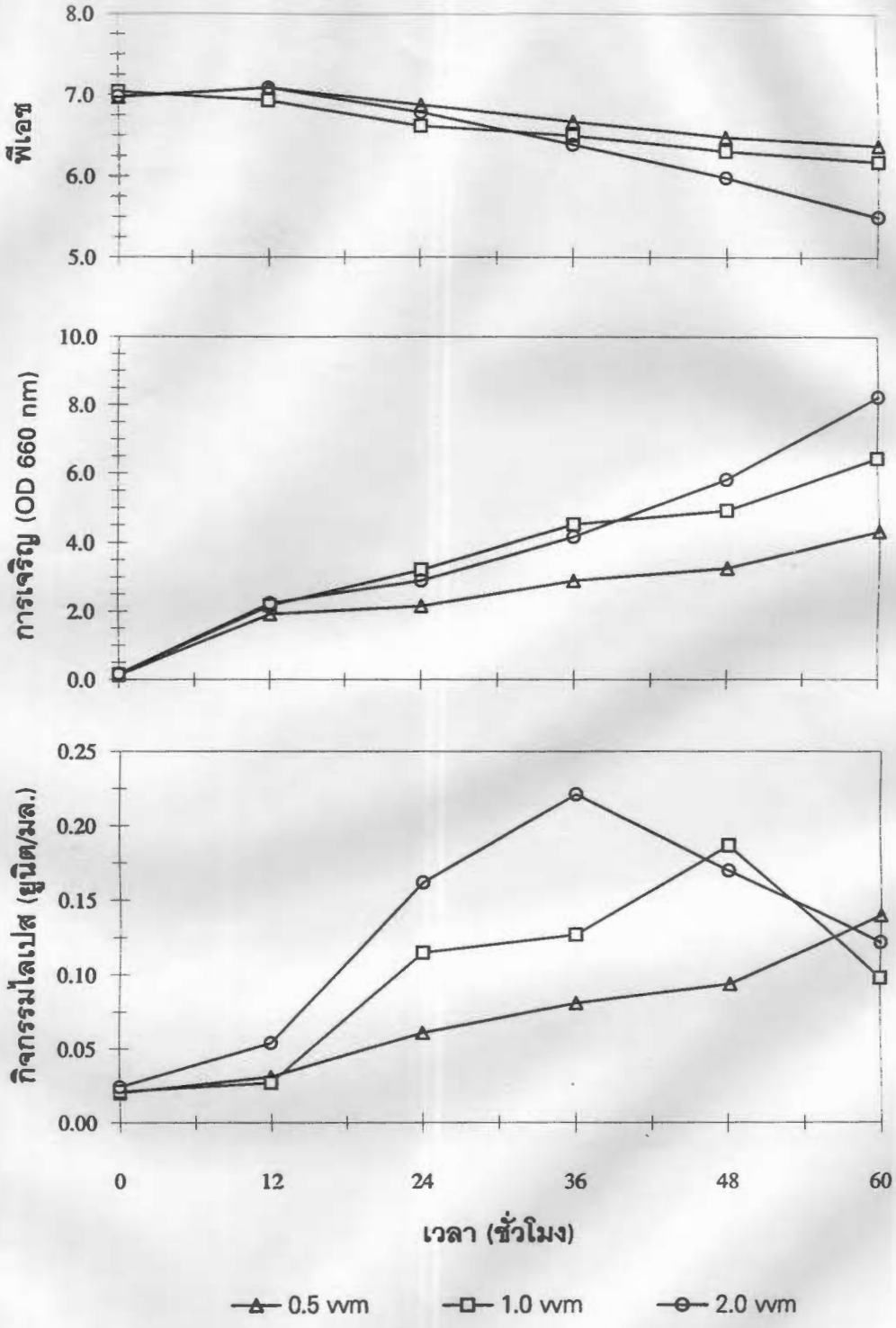
4.2.4 ผลของการให้อากาศ

ผลการศึกษาปริมาณการให้อากาศ 3 ระดับคือ 0.5, 1.0 และ 2.0 vvm ต่อการเจริญและการผลิตไลเปสโดย *Bacillus* sp. PS15 พบว่ากิจกรรมไลเปสสูงสุดจะตรวจพบได้เร็วขึ้นและสูงขึ้นตามปริมาณอากาศที่ให้มากขึ้น (ภาพที่ 16) คือเมื่อให้อากาศ 0.5 vvm ตรวจพบกิจกรรมสูงสุด 0.14 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 60 ชั่วโมง เมื่อให้อากาศ 1.0 vvm ตรวจพบกิจกรรมสูงสุด 0.19 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 48 ชั่วโมง และเมื่อให้อากาศ 2.0 vvm ตรวจพบกิจกรรมสูงสุด 0.22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 36 ชั่วโมง ส่วนการเจริญมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันเมื่อให้อากาศทั้ง 3 ระดับ นั่นคือปริมาณอากาศไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อมากนัก ตรงกับรายงานของ Frost และ Moss (1987) ซึ่งกล่าวว่าการให้อากาศในการหมักแบบเหลวด้วยการ กวนและการพ่นอากาศช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไลเปสโดยจุลินทรีย์ อีกทั้งยังย่นระยะเวลาในการผลิตด้วย เช่นเดียวกับ Schmidt-Dannert และคณะ (1994) รายงานว่า



ภาพที่ 15 ผลของการควบคุมพีเอชของอาหารต่อการเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอชและกิจกรรมไลเปสของ *Bacillus* sp. PS15

(ในถังหมักขนาด 3 ลิตร อัตรากวน 200 รอบต่อนาที ปริมาณอากาศ 1 vvm อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอชของอาหารเริ่มต้น 7.0)



ภาพที่ 16 ผลของการให้อากาศต่อการเจริญ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และกิจกรรมไลเปสของ *Bacillus* sp. PS15

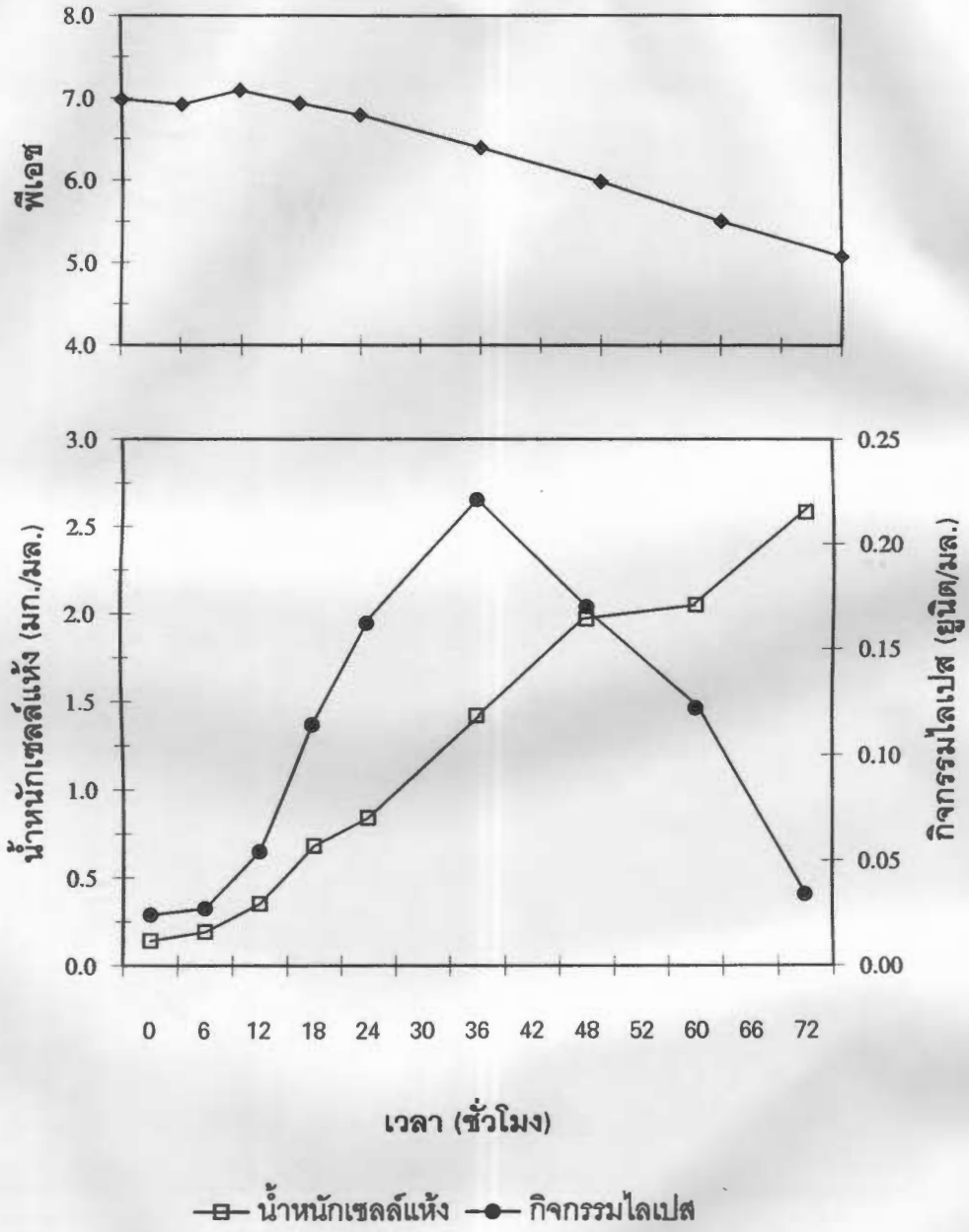
(ในถังหมักขนาด 3 ลิตร อัตรากวน 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 7.0)

การให้อากาศในระหว่างการเลี้ยงจะเพิ่มการผลิตไลเปสโดย *Bacillus thermocatenulatus* (DSM 730) โดยได้ทำการทดลองใส่สารช่วยเพิ่มออกซิเจน (chicanes) ลงในอาหารปริมาตร 400 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ตรวจพบกิจกรรมไลเปส 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังการเลี้ยงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ในขณะที่ในฟลาสก์ขนาด 0.5 ลิตรบรรจุอาหาร 200 มิลลิลิตรและไม่ใส่สารช่วยเพิ่มออกซิเจน ตรวจพบกิจกรรมไลเปสครั้งแรกหลังจากการเลี้ยงเป็นเวลาถึง 44 ชั่วโมง

4.2.5 ผลของระยะเวลาในการเจริญและสร้างไลเปสในอาหาร

เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. PS15 ในอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสคือ NH_4NO_3 0.20 เปอร์เซ็นต์ K_2HPO_4 0.18 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 0.10 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03 เปอร์เซ็นต์ กัมอราบิค 0.10 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สกัด 0.06 เปอร์เซ็นต์และไขมันวัว 1.50 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 1.5 ลิตร บรรจุในถังหมักขนาด 3 ลิตร ให้อากาศปริมาณ 2 vvm อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อผลิตไลเปสเพิ่มขึ้นพร้อมกับการเจริญ (ภาพที่ 17) โดยการผลิตไลเปสเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 12-36 ชั่วโมง มีกิจกรรมสูงสุด 0.22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 36 ชั่วโมงโดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.42 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นกิจกรรมไลเปสจะลดลงจนกระทั่งเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ การที่กิจกรรมไลเปสลดลงอาจเนื่องมาจากการที่เชื้อลดการผลิตไลเปสเมื่อเชื้อเจริญเต็มที่และเข้าสู่ระยะคงที่ ประกอบกับสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อความคงตัวของเอนไซม์เช่น พีเอชที่ลดต่ำลงและอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูงจึงทำให้กิจกรรมลดลงเรื่อยๆ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการผลิตไลเปสโดย *Bacillus* sp. (Gowland, *et al.*, 1987 ; Wang, *et al.*, 1995 ; Becker, *et al.*, 1997) และรา *Humicola lanuginosa* (Omar, *et al.*, 1987b) ส่วนไลเปสจาก *Bacillus* sp. ที่ศึกษาโดย Handelsman และ Shoham (1994) และ Emanuilova และคณะ (1993) พบว่าไลเปสเพิ่มขึ้นพร้อมกับการเจริญเช่นกันแต่พบกิจกรรมไลเปสสูงสุดเมื่อเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ ในบางครั้งพบว่าเชื้อจะผลิตไลเปสหลังการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่เช่นเชื้อ *Vibrio* sp. TA 43 (วิภูมิ แก้วทอง, 2539) และ *Alcaligenes* sp. strain No.679 (Kokusho, *et al.*, 1982)

จากผลที่ได้พบว่ากิจกรรมไลเปสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus* sp. PS15 ค่อนข้างต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับการผลิตไลเปสจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงส่วนใหญ่ ซึ่งมีกิจกรรม



ภาพที่ 17 การเจริญและกิจกรรมไลเปสของ *Bacillus* sp. PS15 ที่สภาวะที่เหมาะสม (เลี้ยงในถังหมักขนาด 3 ลิตร อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ปริมาณอากาศ 2 vvm อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 7.0)

ไลเปสค่อนข้างต่ำ แต่เชื้อมีการเจริญและผลิตไลเปสในระยะเวลารวดเร็ว เช่นจากการศึกษาการผลิตไลเปสจากแบคทีเรีย *Bacillus thermocatenulatus* โดย Schmidt-Dannert และคณะ (1994) ตรวจพบกิจกรรมไลเปสสูงสุด 1.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 16 ชั่วโมง เป็นต้น

5. ศึกษาคุณสมบัติบางประการของไลเปสจาก *Bacillus* sp. PS15

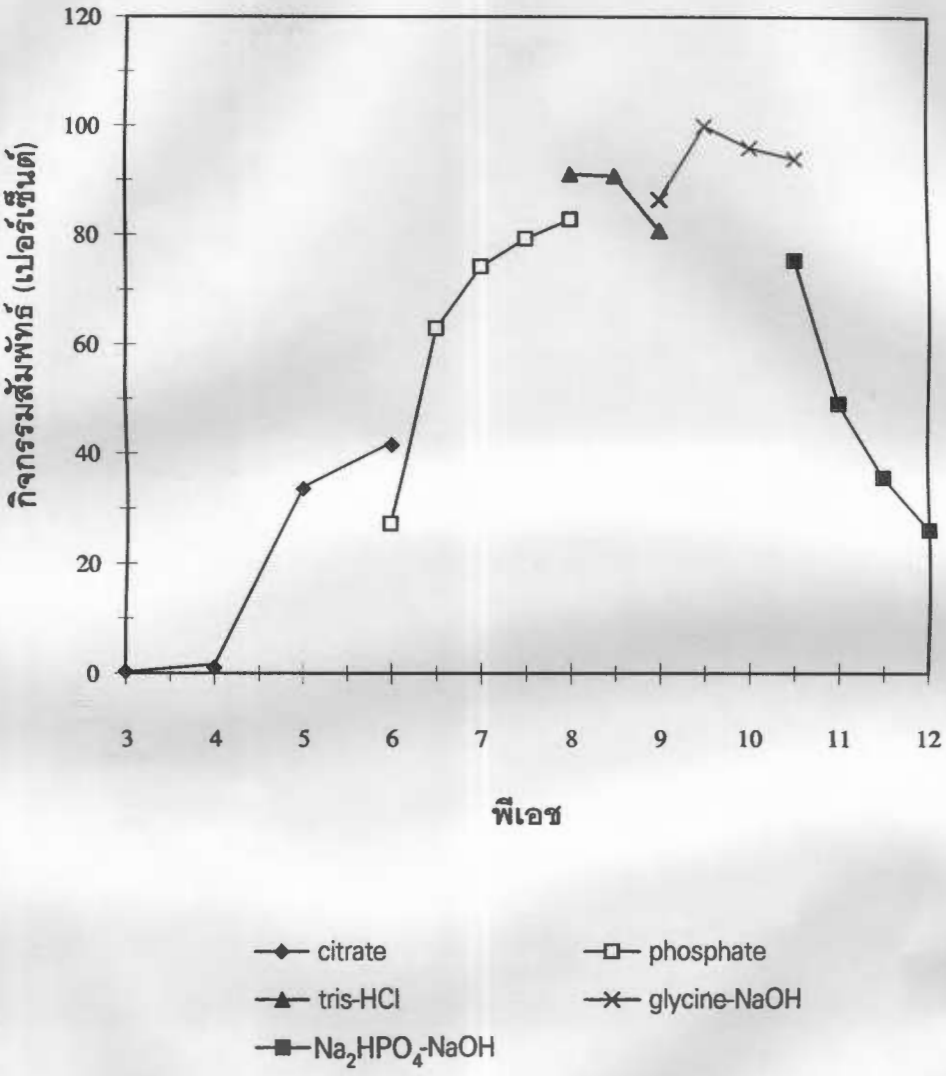
เตรียมสารละลายเอนไซม์ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีองค์ประกอบของอาหาร สภาวะและเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปส แล้วจึงนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำน้ำหมักที่ได้ไปศึกษาคุณสมบัติของไลเปสคือ

5.1 พีเอชที่เหมาะสม

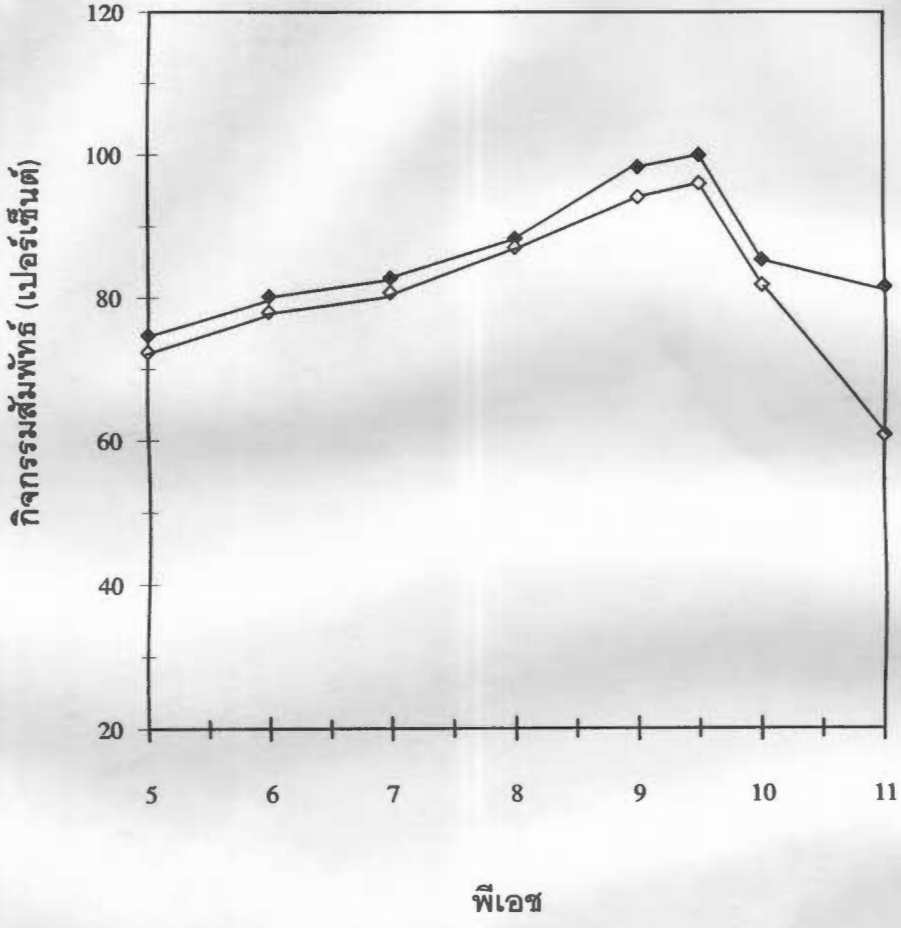
ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปสของ *Bacillus* sp. PS15 โดยวิเคราะห์กิจกรรมไลเปสด้วยสารละลายสับสเตรทในบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชต่างๆ กัน ตั้งแต่ 3.0 ถึง 12.0 พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีในพีเอชเป็นด่าง คือพีเอช 8.0-10.5 โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และมีกิจกรรมดีที่สุดที่พีเอช 9.5 (ดังภาพที่ 18) ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับไลเปสจาก *Flavobacterium odoratum* (Labuschagne, *et al.*, 1997) และ *Pseudomonas nitroreducens* nor var. *thermotolerans* (Watanabe, *et al.*, 1977) ซึ่งมีกิจกรรมดีที่สุดที่พีเอช 9.0-10.5 และ พีเอช 9.5 ตามลำดับ ไลเปสที่ได้มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานสูงกว่าไลเปสจาก *Bacillus thermocatemulatus* (Schmidt-Dannert, *et al.*, 1994) และแบคทีเรียชอบด่าง *Vibrio* sp. TA 43 (วิภูมิ แก้วทอง, 2539) ซึ่งมีกิจกรรมดีที่สุดที่พีเอช 7.5-8.0 และ 8.0 ตามลำดับ แต่พีเอชที่เหมาะสมต่ำกว่าไลเปสจาก *Bacillus subtilis* 168 (Lesuisse, *et al.*, 1993) ซึ่งมีกิจกรรมดีที่สุดที่พีเอชสูงถึง 10.0 ดังนั้นในการวิเคราะห์กิจกรรมไลเปสในครั้งต่อไปจึงเลือกใช้บัฟเฟอร์ glycine-NaOH พีเอช 9.5

5.2 ความคงตัวต่อพีเอช

ทดลองเก็บไลเปสในบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชต่างๆ กัน ตั้งแต่ 5.0 ถึง 11.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 19 พบว่าเอนไซม์คงตัวดีในช่วงพีเอช 9.0-9.5 โดยมีกิจกรรม



ภาพที่ 18 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของไลเปสจาก *Bacillus* sp. PS15 (วิเคราะห์กิจกรรมด้วยสับสเตรทที่มีพีเอชแตกต่างกัน บ่มเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส)



ภาพที่ 19 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของไลเปสจาก *Bacillus* sp. PS15 (บ่มเอนไซม์ในบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ กัน แล้ววิเคราะห์กิจกรรมในบัฟเฟอร์ glycine-NaOH พีเอช 9.5 เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส)

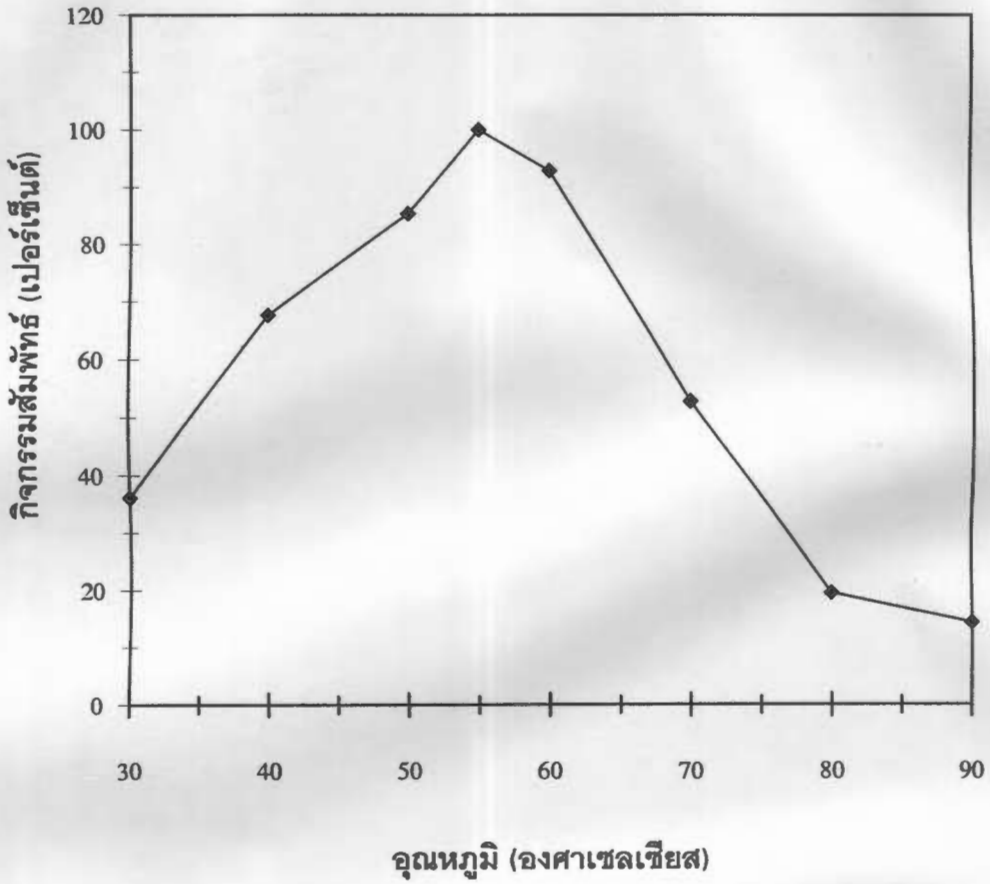
คงเหลือมากกว่า 94 เปอร์เซ็นต์ทั้งที่เก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แสดงว่าไลเปสจาก *Bacillus* sp. PS15 มีความคงตัวในช่วงพีเอชเป็นด่าง

5.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน

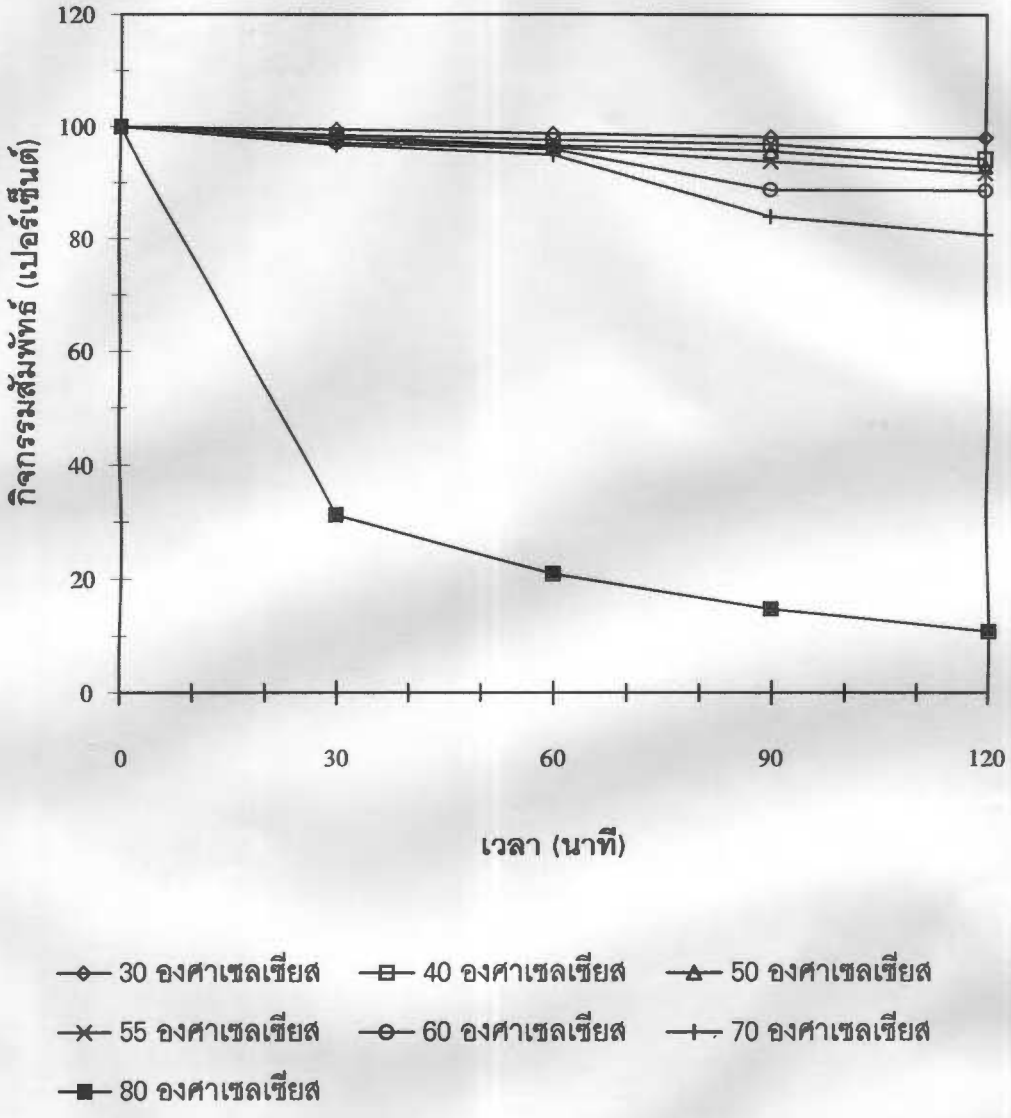
ผลการวิเคราะห์กิจกรรมไลเปสที่อุณหภูมิต่างๆ ในช่วง 30-90 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 9.5 ดังภาพที่ 20 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสคืออุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งต่ำกว่าไลเปสจาก *Bacillus* sp. (Handelsman and Shoham, 1994) และ*Bacillus* sp. A30-1(ATCC 53841) (Wang, *et al.*, 1995) ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสคือ 70 และ 60 องศาเซลเซียสตามลำดับ แต่สูงกว่าไลเปสจากรา *Humicola lanuginosa* No3 (Omar, *et al.*, 1987b) ซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมเป็น 45 องศาเซลเซียส ส่วนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส กิจกรรมเอนไซม์ลดเหลือ 92.80 เปอร์เซ็นต์ และลดเหลือ 52.85 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

5.4 ความคงตัวต่ออุณหภูมิ

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของไลเปสจาก *Bacillus* sp. PS15 โดยการบ่มเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ glycine-NaOH พีเอช 9.5 ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน และเวลาต่างๆ กัน ดังภาพที่ 21 พบว่าเอนไซม์คงตัวในช่วงอุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์คงเหลือ 80.80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แต่ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส พบว่ากิจกรรมลดลงอย่างรวดเร็ว โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์คงเหลือ 31.27 เปอร์เซ็นต์ หลังจากบ่มเป็นเวลา 30 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับไลเปสจากแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง *Bacillus licheniformis* strain H1 ที่ศึกษาโดย Khyami (1996) พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ลดเหลือ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีและที่อุณหภูมิและเวลาเดียวกันพบว่า ไลเปสจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *Bacillus thermocatenulatus* (DSM 730) ที่ศึกษาโดย Schmidt-Dannert และคณะ (1994) มีกิจกรรมไลเปสคงเหลือเพียง 20 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไลเปสจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *Bacillus* sp. A30-1 (ATCC 53841) ที่ศึกษาโดย Wang และคณะ (1995) มีกิจกรรมเอนไซม์คงเหลือถึง 100 เปอร์เซ็นต์ หลังบ่มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และกิจกรรมลดเหลือ 40



ภาพที่ 20 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของไลเปสจาก *Bacillus* sp. PS15 (วิเคราะห์กิจกรรมด้วย glycine-NaOH buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมล พีเอช 9.5 เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน)



ภาพที่ 21 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของไลเปสจาก *Bacillus* sp. PS15 (บ่มเอนไซม์ใน glycine-NaOH buffer พีเอช 9.5)

เปอร์เซ็นต์เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากผลที่ศึกษาได้กล่าวได้ว่าไลเปสจาก *Bacillus* sp. PS15 ที่ผลิตได้เป็นเอนไซม์ที่คงตัวที่อุณหภูมิสูง

บทที่ 4

สรุป

จากตัวอย่างดินและน้ำจำนวน 98 ตัวอย่าง ที่เก็บจากบริเวณที่มีอุณหภูมิสูงและมีน้ำมันปนเปื้อนของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม 5 โรงงาน สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่เจริญที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) โดยเจริญบนอาหารวุ้นซึ่งมีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนและให้วงใสรอบโคโลนี ได้ 29 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียแกรมบวกทั้งหมด มีรูปร่างเป็นท่อน 23 สายพันธุ์ และรูปท่อนยาว 6 สายพันธุ์ มีแบคทีเรียที่สามารถสร้างวงใสได้กว้างที่สุด 3 สายพันธุ์คือ UN16a, PS15 และ IN5 เมื่อจำแนกชนิดพบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์นี้จัดอยู่ในสกุล *Bacillus* และเมื่อศึกษาการเจริญและการผลิตไลเปสของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์พบว่าสายพันธุ์ PS15 ให้กิจกรรมไลเปสสูงสุดคือ 0.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 36 ชั่วโมง

ผลการศึกษาการเจริญและการผลิตไลเปสโดย *Bacillus* sp. PS15 บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอชของอาหารเริ่มต้น 7.0 พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมประกอบด้วย คือ ไขมันวัว 1.50 เปอร์เซ็นต์ NH_4NO_3 0.20 เปอร์เซ็นต์ K_2HPO_4 0.18 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 0.10 เปอร์เซ็นต์ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03 เปอร์เซ็นต์ กัมอราบิค 0.10 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์สกัด 0.06 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อเจริญอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 24 มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 2.93 แล้วจึงเข้าสู่ระยะคงที่ ให้กิจกรรมไลเปสสูงสุด 0.38 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หลังการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสโดยทำการเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 3 ลิตร บรรจุอาหารเหลวปริมาตร 1.5 ลิตร พบว่าเมื่อเลี้ยงในถังหมักกิจกรรมไลเปสต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในฟลาสก์บนเครื่องเขย่า โดยมีกิจกรรมคงเหลือ 32 เปอร์เซ็นต์ *Bacillus* sp. PS15 ผลิตไลเปสดีที่สุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอชของอาหารเริ่มต้น 7.0 อัตราการให้อากาศ 2 vvm อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที โดยการผลิตไลเปสเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 12-36 ชั่วโมง ให้กิจกรรมไลเปสสูงสุด 0.22 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่ 36 ชั่วโมง และมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.42 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ผลการศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. PS15 พบว่า

เอนไซม์มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 9.5 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ มีความคงตัวสูงในช่วงพีเอชเป็นด่าง (พีเอช 9.0-9.5) โดยมีกิจกรรมคงเหลือมากกว่า 94 เปอร์เซ็นต์ หลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และมีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมสัมพันธ์คงเหลือ 80.80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แต่ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส พบว่ากิจกรรมลดลงอย่างรวดเร็ว โดยมีกิจกรรมคงเหลือ 31.27 เปอร์เซ็นต์ หลังจากบ่มเป็นเวลา 30 นาที

เอกสารอ้างอิง

กนกพร บุญเผื่อน, ศศิธร สุวรรณภูชัย, ภาวิณี คณาสวัสดิ์ และ สุรีย์ ฟูตระกูล. 2534. การหาลักษณะเฉพาะของเทอร์มอฟิลิคแบคทีเรียสามชนิดที่ผลิตไลเปสที่แยกได้จากแหล่งท้องถิ่น. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

นิตติเดช สุวรรณสนธิชัย. 2532. การคัดเลือกแบคทีเรียจากดินเพื่อผลิตเอนไซม์ Lipase และศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิต. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล. 2538. การผลิต การทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาลักษณะของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aeromonas sobria* สายพันธุ์ LP004. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหิดล.

พรทิพา อังคนุรักษ์พันธ์, กนกพร บุญเผื่อน, ภาวิณี คณาสวัสดิ์ และ สุรีย์ ฟูตระกูล. 2534. การคัดเลือกเทอร์โมไฟล์ที่ผลิตไลเปสที่แยกได้จากน้ำพุร้อนเทพพนม. ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล และอรัญ หันพงศ์กิตติกุล. 2533. กระบวนการผลิต การใช้ประโยชน์วัสดุเหลือทิ้ง และคุณลักษณะน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำมันปาล์ม. ว. สงขลานครินทร์. 12 : 169-176.

วิภูมิ แก้วทอง. 2539. การคัดเลือกและการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากแบคทีเรียชอบด่าง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2533. สันฐานวิทยาและโครงสร้าง ใน ชีววิทยาของแบคทีเรีย. หน้า 20-63. สงขลา : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Ali, Y., Hanna, M.A. and Cuppett, S.L. 1995. Fuel properties of tallow and soybean oil esters. J. Amer. Oil Chem. Soc. 72 : 1557-1564.

Arima, K., Liu, W.H. and Beppu, T. 1972. Isolation and identification of the lipolytic and thermophilic fungus. Agric. Biol. Chem. 36 : 1913-1917.

Becker, P., Abu-Reesh, I., Markossian, S., Antranikian, G. and Markl, H. 1997. Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48 : 184-190.

Bjorkling, F., Godtfredson, S.E. and Kirk, O. 1991. The future impact of industrial lipases. Trends Biotechnol. 9 : 360-363.

Bosley, J. 1996. Turning lipases into industrial biocatalysts. Biochem. Soc. Trans. 25 : 174-178.

Bragger, J.M., Daniel, R.M., Coolbear, T. and Morgan, H.W. 1989. Very stable enzymes from extremely thermophilic archaebacteria and eubacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 31 : 556-561.

Brock, T.D. 1986. Thermophiles : General, Molecular, and Applied Microbiology. New York : John Wiley and Sons, Inc.

Cowan, D.A., 1992. Biotechnology of the archaea. Trends Biotechnol. 10 : 315-323.

DeMoraes, J. and Chandan, R.C. 1982. Factors influencing the production and activity of a *Streptococcus thermophilus* lipase. J. Food Sci. 47 : 1579-1583.

Emanuilova, E., Kambourova, M., Dekovska, M. and Manolov, R. 1993. Thermoalkalophilic lipase-producing *Bacillus* selected by continuous cultivation. FEMS Microbiol. Lett. 108 : 247-250.

Ergan, F., Trani, M. and Andre, G. 1990. Production of glycerides from glycerol and fatty acid by immobilized lipase in non-aqueous media. Biotechnol. Bioeng. 35 : 195-200.

Espinosa, E., Sanchez, S. and Farres, A. 1990. Nutritional factors affecting lipase production by *Rhizopus delemar* CDBB H313. Biotechnol. Lett. 12 : 209-214.

Fox, G.E., Stackebrandt, E., Hespell, R.B., Gibson, J., Manlioff, J., Dyer, T.A., Wolfe, R. S., Balch, W.E., Tanner, R.S., Magrum, L.J., Zablen. L.B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B.J., Stahl., Luehrsen, K.R., Chen, K.N. and Woese, C.R. 1980. The phylogeny of prokaryotes. Science 209 : 457-463.

Frost, G.M. and Moss, D.A. 1987. Production of Enzymes by Fermentation. *In* Biotechnology Vol.7a Enzyme Technology (ed. J.F. Kennedy) pp. 65-212, New York : VCH Publishers.

Garcia, H.S., Yang, B. and Parkin, K.L. 1995. Continuous reactor for enzymatic glycerolysis of butter oil in the absence of solvent. Food Res. Int. 28 : 605-609.

Gilbert, E.J., Cornish, A. and Jones, C.W. 1991. Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2. J. Gen. Microbiol. 137 : 2223-2229.

Godfrey, T. and Reichelt, J. 1983. Industrial Enzymology : the Application of Enzymes in Industry. England : Macmillan Publishers Ltd.

Godtfredsen, S.E. 1993. Lipase. *In* Enzymes in Food Processing. 3rd ed. (eds. T. Nagodawithana and G. Reed) pp 205-219, California : Academic Press.

Gomadoncescu, N. and Legoy, M.D. 1997. An original transesterification route for fatty acid ester production from vegetable-oils in a solvent-free system. J. Amer. Oil Chem. Soc. 74 : 1137-1143.

Gowland, P., Kernick, M. and Sundaram, T.K. 1987. Thermophilic bacterial isolates producing lipase. FEMS Microbiol. Lett. 48 : 339-343.

Handelsman, T. and Shoham, Y. 1994. Production and characterization of an extracellular thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J. Gen. Appl. Microbiol. 40 : 435-443.

Herbert, R.A. 1992. A perspective on the biotechnological potential of extremophiles. Trends Biotechnol. 10 : 395-402.

Hoshino, T., Sasaki, T., Watanabe, Y., Nagasawa, T. and Oxysporum, F. 1992. Purification and some characteristics of extracellular lipase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. Biosci. Biotech. Biochem. 56 : 660-664.

Ibrahim, C.O., Nishio, N. and Nagai, S. 1987. Fat hydrolysis and esterification by a lipase from *Humicola lanuginosa*. Agric. Biol. Chem. 51 : 2153-2159.

Ibrahim, C.O., Saeki, H., Nishio, N. and Nagai, S. 1989. Synthesis of acetone glycerol acyl ester by immobilized lipase of *Mucor miehei*. Biotechnol. Lett. 11 : 161-166.

Iizumi, T., Nakamura, K. and Fukase, T. 1990. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. Agric. Biol. Chem. 54 : 1253-1258.

Jackson, M.A. and King, J.W. 1997. Lipase-catalyzed glycerolysis of soybean oil in supercritical carbon dioxide. J. Amer. Oil Chem. Soc. 74 : 103-106.

Johri, J.N., Alurralde, J.D. and Klein, J. 1990. Lipase production by free and immobilized protoplasts of *Sporotrichum* (*Chrysosporium*) *thermophile* Apinis. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33 : 367-371.

Kambourova, M., Emanuilova, E. and Dimitrov, P. 1996. Influence of culture conditions on thermostable lipase production by a thermophilic alkalitolerant strain of *Bacillus* sp. Folia Microbiol. 41 : 146-148.

Ketchum, P.A. 1988. Nutrition, Cultivation, and Growth of Microorganisms. *In* Microbiology Concepts and Applications. pp. 148-167. New York : John Wiley and Sons.

Khyami, H.H. 1996. Thermotolerant strain of *Bacillus licheniformis* producing lipase. World J. Microbilo. Biotechnol. 12 : 399-401.

Kim, H.K., Sung M.H., Kim, H.M. and Oh, T.K. 1994. Occurrence of thermostable lipase in thermophilic *Bacillus* sp. strain 398. Biosci. Biotech. Biochem. 58 : 961-962.

Kokusho, Y., Machida, H. and Iwasaki, S. 1982. Production and properties of alkaline lipase from *Alcaligenes* sp. strain No. 679. Agric. Biol. Chem. 46 : 1743-1750.

Kosugi, Y. and Suzuki, H. 1988. Hydrolysis of beef tallow by lipase from *Pseudomonas* sp. Biotechnol. Bioeng. 31 : 349-356.

Krieg, N.R. and Holt, J.G. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.1. Baltimore : Williams and Wilkins.

Kundu, M., Basu, J., Guchhait, M. and Chakrabarti, P. 1987. Isolation and characterization of an extracellular lipase from the conidia of *Neurospora crassa*. J. Gen. Microbiol. 133: 149-153.

Labuschagne, R.B., Tonder, A.V. and Lithauer, D. 1997. *Flavobacterium odoratum* lipase : isolation and characterization. Enzyme Microb. Technol. 21 : 52-58.

Lesuisse, E., Schanck, K. and Colson, C. 1993. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, and extremely basic pH-tolerant enzyme. Eur. J. Biochem. 216 : 155-160.

Lotrakul, P. and Dharmsthiti, S. 1997. Purification and characterization of lipase from *Aeromonas sorbia* LP004. J. Biotechnol. 54 : 113-120.

MacFaddin, J.F. 1980. Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria. 2nd ed. Baltimore : Williams and Willkins.

Macrae, A.R. 1983. Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. J. Amer. Oil Chem. Soc. 60 : 291-294.

Marek, A. and Bednarski, W. 1996. Some factors affecting lipase production by yeasts and filamentous fungi. Biotechnol. Lett. 18 : 1155-1160.

McNeill, G.P., Shimizu, S. and Yamane, T. 1990. Solid phase enzymatic glycerolysis of beef tallow resulting in a high yield of monoglyceride. J. Amer. Oil Chem. Soc. 67 : 779-783.

Mozhaev, V.V. 1993. Mechanism-based strategies for protein thermostabilization. Trends Biotechnol. 11 : 88-95.

Muderhwa, J.M. and Ratamahenina, R. 1985. Purification and properties of the lipase from *Candida deformans* (zach) langeron and guerra. J. Amer. Oil Chem. Soc. 62 : 1031-1036.

Nahas, E. 1988. Control of lipase production by *Rhizopus oligosporus* under various growth conditions. J. Gen. Microbiol. 134 : 227-233.

Nelson., L.A., Foglia, T.A. and Marmer, W.N. 1996. Lipase-catalyzed production of biodiesel. J. Amer. Oil Chem. Soc. 73 : 1191-1195.

Nishio, T., Chikano, T. and Kamimura, M. 1987. Purification and some properties of lipase produced by *Pseudomonas fragi* 22.39 B. Agric. Biol. Chem. 51 : 181-186.

Ohara, M., Takeuchi, K. and Toh-e, A. 1986. Molecular cloning of lipase genes from *Alcaligenes denitrificans* and their expression in *Escherichia coli*. J. Ferment. Technol. 64 : 363-371.

Okumura, S., Iwai, M. and Tsujisaka, Y. 1976. Positional specificities of four kinds of microbial lipases. Agric. Biol. Chem. 40 : 655-660.

Omar, I.C., Hayashi, M. and Nagai, S. 1987a. Purification and some properties of a thermostable lipase from *Humicola lanuginosa* No.3. Agric. Biol. Chem. 51 : 37-45.

Omar, I.C., Nishio, N. and Nagai, S. 1987b. Production of a thermostable lipase by *Humicola lanuginosa* grown on sorbitol-corn steep liquor medium. Agric. Biol. Chem. 51 : 2145-2151.

Perrin, D.D. and Dempsey, B. 1974. Buffers for pH and Metal Ion Control. London : Chapman and Hall.

Pokorny, D., Friedrich, J. and Cimerman, A. 1994. Effect of nutritional factors on lipase biosynthesis by *Aspergillus niger*. Biotechnol. Lett. 16 : 363-366.

Posorske, L.H. 1984. Industrial-scale application of enzymes to the fats and oil industry. J. Amer. Oil Chem. Soc. 61 : 1758-1760.

Rao, P.V., Jayaraman, K. and Lakshmanan, C.M. 1993. Production of lipase by *Candida rugosa* in solid state fermentation 2 : medium optimization and effect of aeration. Process Biochem. 28 : 391-395.

Rasak, C.N.A., Salleh, A.B., Musani. R., Samad, M.Y. and Basri, M. 1997. Some characteristics of lipases from thermophilic fungi isolated from palm oil mill effluent. J. Mol. Catal. B Enzym. 3 : 153-159.

Rath, C.C. and Subramanyam, V.R. 1996. Thermotolerant enzyme activities of *Bacillus* species isolated from the hot springs of Orissa. Microbios 86 : 157-161.

Renobales, M.D., Agud, I., Lascaray, J.M., Mugica, J.C., Landeta, L.C. and Solozabal, R. 1992. Hydrolysis of animal fats by lipase at temperatures below their melting points. Biotechnol. Lett. 14 : 683-688.

Salleh, A.B., Musani, R., Basri, M., Ampon, K., Yunus, W.M.Z. and Razak, C.N.A. 1993. Extra- and intra-cellular lipases from a thermophilic *Rhizopus oryzae* and factors affecting their production. Can. J. Microbiol. 39 : 978-981.

Schmidt-Dannert, C., Sztajer, H., Stocklein, W., Menge, U. and Schmid, R.D. 1994. Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*. Biochim. Biophys. Acta 1214 : 43-53.

Schmidt-Dannert, C., Rua, M.L., Wahl, S. and Schmid, R.D. 1996. *Bacillus thermocatenulatus* lipase : a thermoalkalophilic lipase with interesting properties. Biochem. Soc. Trans. 25 : 178-182.

Schonheit, P. and Schafer, T. 1995. Metabolism of hyperthermophiles. World J. Microbiol Biotechnol. 11 : 26-57.

Seong, L.Y. and Omar, I.C. 1991. Hydrolysis of palm oil by calcium-alginate-entrapped lipase of *Candida cylindracea*. J. Biosci. 2 : 47-58.

Shahani, K.M. 1975. Lipase and Esterase. *In* Enzymes in Food Processing. 2nd ed. (ed. G. Reed) pp. 181-217, New York : Academic Press.

Sidhu, P., Sharma, R., Soni, S.K. and Gupta, J.K. 1998. Production of extracellular alkaline lipase by a new thermophilic *Bacillus* sp. Folia Microbiol. 43 : 51-54.

Sigurgisladottir, S., Konraosdottir, M., Jonsson, A., Kristjansson. J.K. and Matthiasson, E. 1993. Lipase activity of thermophilic bacteria from icelandic hot springs. Biotechnol. Lett. 15 : 361-366.

Stuer, W., Jaeger, K.E. and Winkler, U.K. 1986. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 168 : 1070-1074.

Sugihara, A., Tani, T. and Tominaga, Y. 1991. Purification and Characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. J. Biochem. 109 : 211-216.

Sugihara, A., Ueshima, M., Shimada, Y., Tsunasawa, S. and Tominaga, Y. 1992. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Pseudomonas cepacia*. J. Biochem. 112 : 598-603.

Svetlitshnyi, V., Rainey, F. and Wiegel, J. 1996. *Thermosyntropha lipolytica* gen. nov., sp. nov., a lipolytic, anaerobic, alkalitolerant, thermophilic bacterium utilizing short-and long-chain fatty acids in syntrophic coculture with a methanogenic archaeum. Int. J. Syst. Bacteriol. 46 : 1131-1137.

Sztajer, H., Borkowsdi, J. and Sobiech, K. 1991. Purification and some properties of *Pseudomonas fluorescens* lipase. Biotechnol. Appl. Biochem. 13 : 181-186.

VanDermark, P.J. and Batzing, B.L. 1987. The Microbes and Their Environments. *In* The Microbes : An Introduction to Their Nature and Importance. pp. 131-173. California : Benjamin Cummings.

Venkateshwarlu, N. and Reddy, S.M. 1993. Production of lipase by five thermophilic fungi. Indian J. Microbiol. 33 : 119-124.

Wang, Y.J., Sheu, J.y., Wang, F.F. and Shaw, J.F. 1988. Lipase-catalyzed oil hydrolysis in the absence of added emulsifier. Biotechnol. Bioeng. 31 : 628-633.

Wang, Y., Srivastava, K.C., Shen, G.J. and Wang, H.Y. 1995. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus*, strain A30-1(ATCC 53841) J. Ferment. Bioeng. 79 : 433-438.

Watanabe, N., Ota, Y., Minoda, Y. and Yamada, K. 1977. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. Agric. Biol. Chem. 41 : 1353-1358.

Winkler, U.K. and Stuckmann, M. 1979. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*, J. Bacteriol. 138 : 663-670.

Yamaguchi, T., Muroya, N., Isobe, M. and Sugiura, M. 1973. Production and properties of lipase from a newly isolated *Chromobacterium*. Agric. Biol. Chem. 37 : 999-1005.

Yamamoto, K. and Fujiwara, N, 1988. Purification and some properties of a castor-oil-hydrolyzing lipase from *Pseudomonas* sp. Agric. Biol. Chem. 52 : 3015-3021.

Yamane, T. 1987. Enzyme technology for the lipids industry : an engineering overview. J. Amer. Oil Chem. Soc. 64 : 1657-1662.

Yeoh, H.H., Wong, F.M. and Lim, G. 1986. Screening for fungal lipase using chromogenic lipid substrates. Mycologia 78 : 298-300.

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

อาหารพื้นฐานที่ใช้สำหรับการแยกและการเลี้ยงแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่สามารถผลิตไลเปส

$(NH_4)_2SO_4$	5.0 กรัม
K_2HPO_4	1.8 กรัม
KH_2PO_4	1.0 กรัม
$MgSO_4 7H_2O$	0.3 กรัม
กัมอราบิค	1.0 กรัม
ยีสต์สกัด	0.6 กรัม
น้ำมันปาล์ม	10.0 มิลลิลิตร
pH 7.0	

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดยกเว้นน้ำมันปาล์มให้เข้ากันในน้ำกลั่น 1 ลิตร (ใช้น้ำมันปาล์มทางการค้า ยี่ห้อแวว) นำไปปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ก่อนที่จะนำไปอุ่นให้ร้อน แล้วจึงเติมน้ำมันปาล์มลงไป นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สำหรับอาหารแข็งที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อ จะมีการเพิ่มผงวุ้น 20 กรัม (2.0 เปอร์เซ็นต์) และลดน้ำมันปาล์มเหลือ 3.0 มิลลิลิตร (0.3 เปอร์เซ็นต์)

วิธีการเตรียมอาหารจะทำโดยผสมส่วนผสมทั้งหมด ยกเว้นน้ำมันปาล์มและผงวุ้น ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นจึงนำไปปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 7.0 แล้วเติมผงวุ้นก่อนที่จะนำไปหลอมละลายด้วยความร้อน เมื่อวุ้นหลอมละลายแล้วจึงนำสารละลายร้อนนี้มาปั่นกันน้ำมันปาล์มทันที ด้วยเครื่องปั่นผสม (homogenizer) ความเร็ว 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

1. การย้อมแกรม

1.1 สารเคมี

1.1.1 สารละลาย A : ละลาย crystal violet 2.0 กรัม ในเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

1.1.2 สารละลาย B : ละลาย ammonium oxalate 0.8 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 80 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรอง ได้เป็น crystal violet staining reagent

1.1.3 mordant : บดไอโอดีน 1.0 กรัม และ potassium iodide 2.0 กรัม เข้าด้วยกัน ค่อยๆ เติมน้ำกลั่นลงไปและบดผสมไปเรื่อยๆ จนกระทั่งไอโอดีนละลาย ใช้น้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

1.1.4 decolorizing solvent : เอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์

1.1.5 counterstain : ละลาย safranin 2.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1.2 วิธีการ

1.2.1 ใช้ loop เกลี่ยซัสเพนชั่นของเชื้อให้กระจาย ทิ้งให้แห้ง นำสไลด์ผ่านเปลวไฟ แล้วหยดทับด้วย crystal violet staining ทิ้งไว้ 1 นาที

1.2.2 ล้างออกด้วยน้ำ หยดทับด้วย iodine mordant ทิ้งไว้ 1 นาที

1.2.3 ล้างออกด้วยน้ำ หยดทับด้วย decolerizing 30 วินาที รีบล้างออกด้วยน้ำ

1.2.4 หยดทับด้วย counterstain 10 วินาที

1.2.5 ล้างออกด้วยน้ำ ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส

2.1 สารเคมี

ละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3.0 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร บรรจุในขวดแก้วสีชา แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น

2.2 วิธีการ

หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนโคโลนีแบคทีเรียที่มีอายุ 24-48 ชั่วโมง ที่เจริญอยู่บนอาหาร nutrient agar ถ้ามีฟองอากาศเกิดขึ้นแสดงว่าเป็นผลบวก

3. การวิเคราะห์กิจกรรมของไลเปส ดัดแปลงจากวิธีการของ Hoshino และคณะ (1992)

3.1 สารเคมี

p-nitrophenyl palmitate ($C_{22}H_{35}NO_4$) (SIGMA)

2-propanol (J.T. Baker)

sodium deoxycholate (Na-DOC) (Fluka)

gum arabic (Fluka)

sodium carbonate (2 M) (Fluka)

sodium phosphate buffer (50 mM) พีเอช 7.0 วิธีการเตรียมแสดงในภาคผนวก ค

3.2 วิธีการ

3.2.1 สารละลาย A : ละลาย *p*-nitrophenyl palmitate 30 มิลลิกรัม ใน 2-propanol 10 มิลลิลิตร

3.2.2 สารละลาย B : ละลาย sodium deoxycholate 207 มิลลิกรัม และ gum arabic 100 มิลลิกรัม ใน sodium phosphate buffer ปริมาณ 90 มิลลิลิตร

3.2.3 ผสมสารละลาย A และสารละลาย B เข้าด้วยกัน ใช้เป็นสับสเตรท (เตรียมก่อนใช้)

3.2.4 นำสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายสับสเตรท 2.0 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.2.5 หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลาย sodium carbonate 2.9 มิลลิลิตร

3.2.6 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

3.3 การคำนวณกิจกรรมไลเปส

คำนวนความเข้มข้นของ *p*-nitrophenol จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Winkler and Stuckmann, 1979)

จาก Beer's law $C = \frac{A}{Eb}$

C = ความเข้มข้น E = extinction coefficent

A = ค่าการดูดกลืนแสง b = ความยาวที่แสงผ่าน

การคำนวณความเข้มข้นของ *p*-nitrophenol เมื่อ $E = 15\ L.mmol^{-1}.cm^{-1}$

$b = 1\ cm$

$$C = \frac{A_{410}}{E_{410}b}$$

$$= \frac{A_{410}}{(15\ L.mmol^{-1}.cm^{-1})\ (1\ cm)}$$

$$= \frac{A_{410}\ mmol}{15\ L}$$

$$= \frac{A_{410}\ \mu mol.ml^{-1}}{15}$$

การคำนวณกิจกรรมไลเปสเมื่อ เอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยา 0.1 มิลลิลิตร

ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา 5.0 มิลลิลิตร

ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มปฏิกิริยา 15.0 นาที

กิจกรรมไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) $= \frac{A_{410}}{15} \times 5 \times 10 \times \frac{1}{15}$

$$= 0.222\ A_{410}$$

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

1. การเตรียมสารละลายโซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ ตามวิธีของ Gomori (1955 อ้างโดย Perrin and Dempsey, 1974)

เตรียมได้โดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ตามพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A : 0.05 M citric acid ($C_6H_8O7 \cdot H_2O$ 10.51 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : 0.05 M sodium citrate ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ 14.70 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

พีเอช	สารละลาย A (มิลลิลิตร)	สารละลาย B (มิลลิลิตร)
3.0	46.5	3.5
3.2	43.7	6.3
3.4	40.0	10.0
3.6	37.0	13.0
3.8	35.0	15.0
4.0	33.0	17.0
4.2	31.5	18.5
4.4	28.0	22.0
4.6	25.5	24.5
4.8	23.0	27.0
5.0	20.5	29.5
5.2	18.0	32.0
5.4	16.0	34.0
5.6	13.7	36.3
5.8	11.8	38.2
6.0	9.5	40.5
6.2	7.2	42.8

2. **การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์** ตามวิธีของ Gomori (1955 อ้างโดย Perrin and Dempsey, 1974)

เตรียมได้โดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ตามพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A : 0.05 M monobasic sodium phosphate ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 7.80 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : 0.05 M dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 8.90 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

พีเอช	สารละลาย A (มิลลิลิตร)	สารละลาย B (มิลลิลิตร)
5.8	46.00	4.00
6.0	43.85	6.15
6.2	40.75	9.25
6.4	36.75	13.25
6.6	31.25	18.75
6.8	25.50	24.50
7.0	19.50	30.50
7.2	14.00	36.00
7.4	9.50	40.50
7.6	6.50	43.50
7.8	4.25	45.75
8.0	2.65	47.35

3. การเตรียม Tris(hydroxymethyl) aminomethane buffer ตามวิธีการของ Bates and Bower (1956 อ้างโดย Perrin and Dempsey, 1974)

เตรียมได้จากการผสมสารละลาย A 50 มิลลิลิตร และสารละลาย B x มิลลิลิตร เพื่อให้ได้พีเอชตามต้องการ

สารละลาย A : 0.05 M Tris(hydroxymethyl) aminomethane 6.06 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : 0.05 M HCl (ปิเปตกรดไฮโดรคลอริก 4.2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร)

พีเอช	สารละลาย B (มิลลิลิตร)	พีเอช	สารละลาย B (มิลลิลิตร)
7.0	46.6	8.0	29.2
7.1	45.7	8.1	26.2
7.2	44.7	8.2	22.9
7.3	43.4	8.3	19.9
7.4	42.0	8.4	17.2
7.5	40.3	8.5	14.7
7.6	38.5	8.6	12.4
7.7	36.6	8.7	10.3
7.8	34.5	8.8	8.5
7.9	32.0	8.9	7.0

4. การเตรียม glycine-NaOH buffer ตามวิธีของ Gomori (1955 อ้างโดย Perrin and Dempsey, 1974)

เตรียมได้จากการผสมสารละลาย A 25 มิลลิลิตร และสารละลาย B x มิลลิลิตร เพื่อให้ได้พีเอชตามต้องการ

สารละลาย A : 0.05 M glycine (3.75 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : 0.05 M NaOH (2.00 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร)

พีเอช	สารละลาย B (มิลลิลิตร)	พีเอช	สารละลาย B (มิลลิลิตร)
8.6	2.0	9.6	11.2
8.8	3.0	9.8	13.6
9.0	4.4	10.0	16.0
9.2	6.0	10.4	19.3
9.4	8.4	10.6	22.75

5. การเตรียม Na_2HPO_4-NaOH buffer ตามวิธีการของ Bates and Bower (1956 อ้างโดย Perrin and Dempsey, 1974)

เตรียมได้จากการผสมสารละลาย A 50 มิลลิลิตร และสารละลาย B x มิลลิลิตร เพื่อให้ได้พีเอชตามต้องการ

สารละลาย A : 0.05 M Na_2HPO_4 (7.10 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย A : 0.05 M NaOH (2.00 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร)

พีเอช	สารละลาย B (มิลลิลิตร)	พีเอช	สารละลาย B (มิลลิลิตร)
10.90	3.3	11.50	11.1
11.00	4.1	11.60	13.5
11.10	5.1	11.70	16.2
11.20	6.3	11.80	19.4
11.30	7.6	11.90	23.0
11.40	9.1	12.00	26.9