

ISOLATION OF LIPOLYTIC BACTERIA TO DIGEST USED COOKING OIL

การคัดแยกไลโปไลติกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อย
น้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว



โครงการพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานที่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ปีการศึกษา 2565
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISOLATION OF LIPOLYTIC BACTERIA TO DIGEST USED COOKING OIL



NAMFON SUTON
NITTAYA PRASATKETKARN

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, SCHOOL OF SCIENCE


KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ACADEMIC YEAR 2022

หัวข้อโครงการพิเศษ	การคัดแยกไลโปไลติกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อย น้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว Isolation of lipolytic bacteria to digest used cooking oil
ชื่อนักศึกษา	นางสาวน้ำฝน สุทน รหัสนักศึกษา 62050612 นางสาวนิตยา ประสาทเกษการณ รหัสนักศึกษา 62050613
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2565
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.นฤมล ตั้งธีระสุนันท์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้
โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา
อุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2565

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร.วิมลมาศ บุญมี ประธานกรรมการ	
ดร.นฤมล ตั้งธีระสุนันท์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	
ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การคัดแยกลิโปไลติกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว	
	Isolation of lipolytic bacteria to digest used cooking oil	
ชื่อนักศึกษา	นางสาวน้ำฝน สุทน	รหัสนักศึกษา 62050612
	นางสาวนิตยา ประสาทเกษการณ	รหัสนักศึกษา 62050613
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)	
ภาควิชา	ชีววิทยา	
คณะ	วิทยาศาสตร์	
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)	
ปีการศึกษา	2565	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.นฤมล ตั้งธีระสุนันท์	
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา	

บทคัดย่อ

โครงการพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว โดยเชื้อลิโปไลติกแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินและน้ำเสียที่มีปนเปื้อนน้ำมันและไขมัน ทั้งหมด 3 ไอโซเลท คือ SBK02-2, WLB04-11 และ WLB04-13 เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการย่อยไขมันและน้ำมันในอนาคต โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Tributyrin และ Phenol red palm oil ในการคัดแยกเชื้อลิโปไลติกแบคทีเรีย และทดสอบยืนยันกิจกรรมลิโปไลติกของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Tween 80 และ Tween 20 เมื่อนำสารสกัดเอนไซม์หยาบของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท คือ SBK02-2, WLB04-11 และ WLB04-13 ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง มาทำการตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิ 30, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่อทำการทดสอบพบว่าเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท มีการแสดงออกของกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสมากที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งแสดงออกถึงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 24 คือ 0.011 ± 0.0011 , 0.0014 ± 0.0006 และ 0.0012 ± 0.002 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส เท่ากับ 0.0004 ± 0.0004 , 0.0006 ± 0.0003 และ 0.0005 ± 0.0001 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ต่ำมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำสำคัญ : เอนไซม์ไลเปส ลิโพลิติกแบคทีเรีย น้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว

Title Isolation of lipolytic bacteria to digest used cooking oil
Students Miss Student ID 62050612
Miss Student ID 62050613
Degree Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department Biology
School Science
University King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year 2022
Advisor Dr.Narumon Tangthirasunun
Co-advisor Asst.Prof.Dr. Somphit Sornyotha

Abstract

This special project aims to study the ability to degrade used cooking oil by lipolytic bacteria isolated from soil and wastewater contaminated with oil and fat. All of 3 isolates are SBK02-2, WLB04-11 and WLB04-13 used for fat and oil digestion processes. Tributyrin agar and Phenol red palm oil agar were used for isolation of lipolytic bacteria and using Tween 20 and Tween 80 agar plates was carried out to confirm lipolytic activity. After the 3 isolates of lipolytic bacteria, SBK02-2, WLB04-11 and WLB04-13 were cultured in the medium with used cooking oil under shaking conditions at 37 °C for 5 days. Lipase activity was tested at 30, 45 and 50 °C, and was found all 3 isolates showed the highest expression of lipase activity at 50 °C, which had the highest expression of lipase activity at the 24th hour were 0.011 ± 0.0011 , 0.0014 ± 0.0006 and 0.0012 ± 0.002 units/ml, respectively, which has a very low lipase activity value

Keywords : Lipase, Lipolytic bacteria, Used cooking oil

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องมาจากความกรุณา คำแนะนำ และข้อเสนอแนะของทุกท่าน

ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษา ดร.นฤมล ตั้งธีระสุนันท์ อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่คอยให้คำปรึกษา กำกับดูแล แนะนำแนวทางที่ดีในการปรับปรุงข้อบกพร่อง ตลอดจนช่วยอำนวยความสะดวกในด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำโครงการพิเศษ คณะผู้จัดทำจึงขอกราบขอพระคุณมา ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ประจำกรมการโครงการพิเศษ ดร. วิมลมาศ บุญมี และอาจารย์กรรมการและที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร. สมพิศ สอนโยธา อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้คำปรึกษา ตรวจสอบ รวมทั้งแนะนำแนวทางที่ดีในการปรับปรุงข้อบกพร่องในการทำโครงการพิเศษฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ เจ้าหน้าที่ฝ่ายอาคารและสถานที่ ตลอดจนแม่บ้าน ที่อำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์ สารเคมี การติดต่อประสานงาน และสถานที่ในการทำโครงการพิเศษฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอบพระคุณบิดา มารดา เพื่อน และบุคคลอื่น ๆ ทุกท่านที่คอยให้ให้ความกรุณา ความช่วยเหลือ และคอยสนับสนุนในทำโครงการพิเศษฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้คณะผู้จัดทำหวังเป็นอย่างยิ่งว่าโครงการพิเศษฉบับนี้จะมีประโยชน์สำหรับผู้สนใจศึกษาข้อมูลที่มีความเกี่ยวข้องกับโครงการพิเศษฉบับนี้ หากโครงการพิเศษฉบับนี้มีข้อผิดพลาดประการใด ทางคณะผู้จัดทำขออภัยมา ณ โอกาสนี้ด้วย

น้ำฝน สุทน
นิตยา ประสาทเกษการณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป.....	ฉ
คำย่อ/สัญลักษณ์	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขต	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 เอนไซม์ไลเปส	4
2.1.1 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส	5
2.2 ลิพิด (Lipid)	10
2.2.1 การจำแนกชนิดของลิพิตตามองค์ประกอบทางเคมี	11
2.3 ปาล์มน้ำมัน (Oil palm)	12
2.3.1 น้ำมันปาล์ม	13
2.4 การคัดกรองจุลินทรีย์ที่ผลิตไลเปสและปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง	14
2.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Tributyrin agar plate	15
2.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Phenol red palm oil agar	15
2.4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Tween 20 Agar และ Tween 80 Agar	15
2.5 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส	15
2.5.1 แหล่งคาร์บอน	15
2.5.2 แหล่งไนโตรเจน	16
2.5.3 ค่าพีเอช	17
2.5.4 อุณหภูมิ.....	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

2.5.5 ระยะเวลาการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย	17
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	20
3.1 เครื่องมือ.....	20
3.2 อุปกรณ์	20
3.3 สารเคมี	21
3.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน	22
3.5.1 การเก็บตัวอย่าง	22
3.5.2 การคัดกรองเชื้อลิวโพลิติกแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง	22
3.5.3 การทดสอบยืนยันความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสและเอสเทอเรส	23
3.5.4 ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการย่อยน้ำมันที่ใช้แล้ว	23
3.5.5 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Lipase Activity)	24
3.5.6 การตรวจสอบปริมาณโปรตีน	25
3.5.7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	25
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	26
4.1 ผลการคัดกรองแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง.....	26
4.2 การศึกษาผลการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหาร ที่ใช้แล้ว	32
4.3 การศึกษาผลการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเหลว	
ที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน	34
4.4 ผลการทดสอบปริมาณโปรตีน	35
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	38
5.1 สรุปผลการวิจัย	38
5.2 ข้อเสนอแนะ	38
เอกสารอ้างอิง	40
ภาคผนวก	48
ภาคผนวก ก	49
ภาคผนวก ข	52
ภาคผนวก ค	56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

ภาคผนวก ง	92
ภาคผนวก จ	94



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 สายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส	6
2.2 ชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันปาล์ม (Palm oil) และน้ำมันในปาล์ม (Palm kernel oil)	14
4.1 ผลการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง	26
4.2 ลักษณะโคโลนีและค่าดัชนีการแสดงออกของกิจกรรมลิโปไลติกของแบคทีเรีย	31
4.3 ผลการตรวจวัดการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีองค์ประกอบของน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตเอนไซม์ไลเปส	32



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นโดยการเร่งปฏิกริยาของเอนไซม์ไลเปส	4
2.2 โครงสร้างของกรดไขมันอิ่มตัว (a) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (b)	11
2.3 โครงสร้างโมโนกลีเซอไรด์ (a) ไดกลีเซอไรด์ (b) ไตรกลีเซอไรด์ (c)	11
2.4 ลักษณะลำต้น (a.) ทะลาย (b.) ใบ (c.) และลักษณะภายในผลของปาล์มน้ำมัน (d.)	13
2.5 ลักษณะของน้ำมันปาล์ม (Palm oil) (a) และน้ำมันเมล็ดในปาล์ม (Palm kernel oil) (b) ..	13
4.1 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในระหว่าง ชั่วโมงที่ 24 ถึง 120	33
4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและปริมาณโปรตีนหลังการเพาะเลี้ยง แบคทีเรียไอโซเลท WLB04-11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่ง คาร์บอน	36
4.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและปริมาณโปรตีนหลังการเพาะเลี้ยง แบคทีเรียไอโซเลท WLB04-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่ง คาร์บอน	36
4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและปริมาณโปรตีนหลังการเพาะเลี้ยง แบคทีเรียไอโซเลท SBK02-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่ง คาร์บอน	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
BSA	Bovine Serum Albumin
PHE	อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Phenol red palm oil
TRI	อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Tributyrin
TW80	อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Tween 80
TW20	อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Tween 20



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ไลเปส (E.C. 3.1.1.3) ถูกเรียกอีกอย่างว่าเอนไซม์แยกไขมัน กลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (Glycerol ester hydrolase) หรือไตรเอซิลกลีเซอรอลเอซิลไฮโดรเลส (Triacylglycerol acyl hydrolase) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ไฮโดรเลสที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพันธะเอสเทอร์ในไตรเอซิลกลีเซอรอลให้เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไลเปสเกิดขึ้นที่ผิวหน้าระหว่างไขมันกับน้ำ เนื่องจากไลเปสมีความสามารถในการละลายในน้ำต่ำมาก (Gupta และคณะ, 2004) เอนไซม์ไลเปสมี้อยู่อย่างแพร่หลายทั้งในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ไลเปสโดยเฉพาะจากแบคทีเรียมีประโยชน์มากกว่าต้นกำเนิดจากพืชและสัตว์ เนื่องจากมีกิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาที่หลากหลาย ง่ายต่อการจัดการทางพันธุกรรม และสามารถเติบโตอย่างรวดเร็วบนอาหารราคาถูก (Alhamdani และคณะ, 2016; Salvador และคณะ., 2021) ตัวอย่างของแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปส เช่น *Bacillus Pseudomonas* และ *Burkholderia* เป็นต้น เอนไซม์ไลเปสโดยทั่วไปผลิตขึ้นจากลิตีคาร์บอน เช่น น้ำมัน กรดไขมัน กลีเซอรอล หรือหิว ในพวกแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ (Gupta และคณะ, 2004) เอนไซม์ไลเปสถูกนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมาย เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมผงซักฟอก อุตสาหกรรมยา การผลิตไบโอดีเซล รวมไปถึงการบำบัดสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งถูกนำมาใช้ในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในระบบบำบัดน้ำเสีย น้ำมันประกอบอาหารเป็นของเหลวที่มีลักษณะข้น มัน สีน ที่ได้จากสัตว์หรือพืชเป็นสิ่งที่สามารถทำให้อาหารสุก เช่น เนื้อสัตว์ ผักต่าง ๆ สามารถรับประทานได้ ในขณะที่เดียวกันก็มีข้อเสียตามมาด้วยคือน้ำมันที่ใช้ประกอบอาหารแล้วเมื่อนำกลับมาทอดซ้ำใหม่มากกว่า 1 ครั้ง จะมีสารโพลาร์ (Polar Compounds) (นันทิธา, 2558) ซึ่งเป็นสารที่มีขั้วเกิดเนื่องจากน้ำมันได้รับความร้อนจากการทอดเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี โดยเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis reaction) ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation reaction) และปฏิกิริยาโพลิเมอไรเซชัน (Polymerization reaction) เป็นปฏิกิริยาเคมีพื้นฐาน ในน้ำมันทอดจะทำให้เกิดสารประกอบที่ระเหยได้และระเหยไม่ได้ ได้แก่ สารมีขั้ว (Polar Compound) และสารประกอบ

โพลิเมอริก (สุนิสสา, 2003) ในสถานการณ์ที่น้ำมันประกอบอาหารราคาปกติและไม่ขาดแคลนพบว่ามีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า การนำน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วมาใช้ซ้ำ ร้อยละ 34 ในช่วงเวลาที่น้ำมันทอดอาหารมีราคาแพงไม่ต่ำกว่าครึ่งหนึ่ง ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีกรนำไปใช้

หรือขาดตลาด เช่น ในเดือนกุมภาพันธ์ 2554 พบว่ามีการใช้ไขมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วทอดซ้ำมากกว่า ร้อยละ 60 (สุกัญญา และคณะ, 2555) ซึ่งสารโพลาร์ (Polar Compounds) ในน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วมีความเสี่ยงทำให้เกิดโรคความดันโลหิต โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคสมองตีบ โรคอัมพาต โรคหัวใจและเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งลำไส้และกระเพาะอาหาร (Soriquer และคณะ., 2003; วิไลภรณ์ และคณะ, 2555) การเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างต่อเนื่องของประชากรได้กระตุ้นการเติบโตในด้านอุตสาหกรรมอาหารและส่งผลทำให้ขยะอาหาร เช่น เศษอาหารเหลือทิ้ง อาหารที่เกิดการเน่าเสียหรือหมดอายุ รวมถึงน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามไปด้วย น้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นของเสียในครัวเรือนชนิดหนึ่ง ที่เกิดจากการปรุงอาหารและทอดอาหารด้วยน้ำมันจากพืชหรือสัตว์ที่บริโภคได้ซ้ำ ๆ หลายครั้ง ซึ่งส่งผลให้เกิดของเสียจากน้ำมัน และไขมันในปี 2560 ระบุว่าน้ำมันพืชประกอบอาหารที่ใช้แล้วในประเทศไทยมีปริมาณราว 74 ล้านลิตร ซึ่งหากพิจารณาถึงอัตราการบริโภคน้ำมันพืชต่อปีและจำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้นจนถึงปัจจุบัน (2565) อาจประมาณการได้ว่าในปัจจุบันอาจจะมีปริมาณน้ำมันพืชใช้แล้วในประเทศเพิ่มขึ้นถึงราว 115 ล้านลิตรต่อปี (ขนิษฐา, 2565) ซึ่งในหลาย ๆ ประเทศรวมถึงประเทศไทย น้ำมันปาล์มเป็นน้ำพืชที่ได้รับคามนิยมสูงสุด และเป็นน้ำมันที่ถูกที่สุดสำหรับการประกอบอาหาร (Keogh-Brown และคณะ, 2019)

ดังนั้นน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วจึงกลายเป็นขยะอาหารที่ต้องมีการกำจัดอย่างเหมาะสมเพื่อไม่ให้เ็นปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมหรือถูกนำกลับมาใช้ใหม่ให้เกิดประโยชน์ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพจากดินและน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันและไขมันเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการย่อยน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

- 1.1.1 เพื่อคัดแยกเชื้อโพลิติกแบคทีเรียเพื่อนำมาย่อยน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว
- 1.1.2 เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว

1.3 ขอบเขตของโครงการพิเศษ

- 1.2.1 การเก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำเสียและดินที่มีการปนเปื้อนไขมัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2.2 การคัดกรองเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยน้ำมันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar (Ramnath และคณะ, 2017) และ Phenol red palm oil agar (Ramnath และคณะ, 2017)

1.2.3 การทดสอบยืนยันความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสและเอสเทอเรสโดยทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tween 80 Agar และ Tween 20 Agar (Ramnath และคณะ, 2017) ตามลำดับ

1.2.4 ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการย่อยน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วโดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว

1.2.5 ทำการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อหลังเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ทราบถึงความสามารถในการย่อยน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยก

1.3.2 พบเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว

1.3.3 พบเชื้อแบคทีเรียพบที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งหรือมีบทบาทสำคัญในด้านอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอนไซม์ไลเปส (Lipase)

ไลเปส เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของไฮโดรเลส (Hydrolase) มีชื่อตามระบบ International Union of Biochemistry ว่า กลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (Glycerol ester hydrolase) หรือ ไตรเอซิลกลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (Triacylglycerol acylhydrolase) และมีชื่อตามรหัส คือ E.C.3.1.1.3 เอนไซม์ไลเปสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสพันธะเอสเทอร์ (Ester bond) ของโมเลกุลของน้ำมันและไขมันตรงผิวร่วมระหว่างน้ำและน้ำมัน ได้ผลผลิตเป็น โมโนกลีเซอไรด์ (Monoglyceride) ไดกลีเซอไรด์ (Diglyceride) และกรดไขมันอิสระ (Free fatty acid) และยังมีคุณสมบัติในการย้อนกลับปฏิกิริยานี้ในตัวกลางที่เป็นน้ำและไม่ใช่น้ำ นอกจากนี้ไลเปสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาสังเคราะห์เอสเทอร์ และเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ได้ (Casas-Godoy และคณะ, 2012; มาริสสา, 2560)

I. Hydrolysis



II. Synthesis

a Esterification

Esterification



Amidation



Thioesterification



b Transesterification

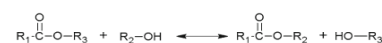
Acidolysis reaction



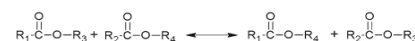
Aminolysis reaction



Alcoholysis reaction



Interesterification reaction



รูปที่ 2.1 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ที่มา: Casas-Godoy และคณะ, 2012

2.1.1 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

แหล่งของเอนไซม์ไลเปส โดยทั่วไปพบได้ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ได้แก่ พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ดังต่อไปนี้

2.1.1.1 เอนไซม์ไลเปสจากสัตว์ (Animal lipase)

เอนไซม์ไลเปสมีอยู่ทั่วไปในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ ของสัตว์ เช่น หัวใจ ไต สมอง กล้ามเนื้อ ซีรัม และที่สำคัญ คือ ตับอ่อน โดยเฉพาะในตับอ่อนของสุกรเนื่องจากมีความเข้มข้นสูง เอนไซม์ไลเปสจากตับ (Pancreatic lipase) เป็นชนิดแรกที่พบว่าทำหน้าที่เร่งการย่อยสลาย โมเลกุลไขมันในระบบการย่อยอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (สุรอรทด และคณะ, มปป.; กุสุมา วดี, 2557) ไลเปสจากตับอ่อนของสัตว์ตระกูล Canine (สุนัข) เป็นแหล่งของเอนไซม์ไลเปสที่น่าสนใจ ทั้งนี้ยังมีลำดับกรดอะมิโน (Amino acid sequence) คล้ายกับเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากตับอ่อนของ สัตว์สายพันธุ์อื่น ๆ ได้แก่ *Sus scrofa* (หมู), *Bos taurus* (ม้า) และโดยเฉพาะใน *Homo sapiens* (มนุษย์) ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจไลเปสจากสัตว์ตระกูล Canine (สุนัข) มากขึ้น เนื่องจากสามารถใช้เป็นสารทดแทนเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของมนุษย์ได้ อีกทั้งแมลงเป็นแหล่ง ของเอนไซม์ไลเปสอีกแหล่งหนึ่ง โดยเฉพาะ *Cephaloleia presignis* ซึ่งผลิตไลเปสชนิดใหม่ที่ทำงาน ได้ดีในพีเอชเป็นกลาง (Neutral lipase) และได้รับความสนใจอย่างมากในการนำมาใช้เป็นสาร ทดแทนของเอนไซม์พรีแกสติกไลเปส (Pregastric lipase) ที่ถูกใช้เป็นยารักษาภาวะน้ำหนักเกิน และ การทำงานผิดปกติของกระบวนการย่อยและสังเคราะห์สารต่างๆ (Metabolic disorder) ในมนุษย์ (Steiner และ Williams, 2002; Arreguin-Espinosa และคณะ, 2000)

2.1.1.2 เอนไซม์ไลเปสจากพืช (Plant lipases)

เอนไซม์ไลเปสจากพืชมีความจำเพาะต่อสับสเตรตสูงและมีสมบัติเฉพาะ ซึ่งจะไม่พบในไลเปส จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมและจุลินทรีย์ โดยธรรมชาติเมล็ดพืช (Seed) จะสะสมไขมันไว้ใน Lipid bodies และ Glyoxysomes อันเป็นเนื้อเยื่อที่สามารถพบไลเปสได้ ขณะที่ไลเปสของเมล็ดธัญพืช (Grain lipase) พบได้ในรำ (Bran) เช่น รำข้าวสาลี และรำข้าวเจ้า ยางมะละกอ (*Carica papaya latex*) ซึ่งทราบกันว่าเป็นแหล่งของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (Proteases) ได้แก่ Papain และ Thiol protease อื่นๆ อย่างไรก็ตาม (Huang, 1984; Shahani, 1975) นอกจากนี้ยัง พบว่ามีเอนไซม์ไลเปสในยางมะละกอด้วย นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ไลเปสในพืชตระกูลหญ้า (Gramineae) ที่มีราคาไม่แพง (Magoset และคณะ, 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1.3 เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์

เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์มีข้อดีเหนือกว่าไลเปสที่ได้จากพืชและจากสัตว์ เนื่องจากเลี้ยงง่ายกว่าพืชและสัตว์ จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในอาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูก มีความคงทนต่อตัวทำลายอินทรีย์ ไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ในการทำงาน และมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นหลายชนิด (ณกัญภัทร, 2547) เอนไซม์ไลเปสสามารถผลิตได้โดยจุลินทรีย์ทั้งในกลุ่มเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียจะมีความได้เปรียบกว่าเชื้อราเนื่องจากแบคทีเรียมีอัตราการเจริญเติบโตเร็วกว่าเชื้อรา ดังนั้นจึงสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในเวลาอันสั้น เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียมีความสำคัญที่สุดในตลาดเอนไซม์และการวิจัยทางด้านเอนไซม์ เนื่องจากไม่เพียงสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก ๆ แต่ยังมี ความคงทนต่อความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิสูง และตัวทำลายอินทรีย์ (Lee และคณะ, 2001) สามารถพบแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสในแหล่งที่หลากหลาย เช่น กากอุตสาหกรรม โรงงานแปรรูปน้ำมันพืช โรงงานนม น้ำหรือดินที่ปนเปื้อนน้ำมันและไขมัน เป็นต้น สภาพแวดล้อมที่มีการปนเปื้อนน้ำมันเป็นแหล่งที่ดีสำหรับการแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส (Alhamdani และ Alkabbani, 2016.; Sirisha และคณะ, 2010; Boonmahome และ Mongkolthanaruk, 2013)

ตารางที่ 2.1 สายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส

แบคทีเรีย	อ้างอิง
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Bunmadee et al, 2022
<i>A. indicus</i>	Kondwani et al, 2022
<i>Aeromonas caviae</i>	Bunmadee et al, 2022
<i>Bacillus cereus</i> strain AK6	Kondwani et al, 2022
<i>B. cereus</i> strain MD152	Kondwani et al, 2022
<i>B. cereus</i> strain PR62	Kondwani et al, 2022
<i>B. cereus</i> strain S8	Kondwani et al, 2022
<i>B. nakamurai</i> strain AB214	Kondwani et al, 2022
<i>B. nakamurai</i> strain NRRL B-41091	Kondwani et al, 2022

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำหรือเผยแพร่ในเชิงพาณิชย์ การค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) สายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส

แบคทีเรีย	อ้างอิง
<i>B. proteolyticus</i> strain SUF05.1LB	Kondwani et al, 2022
<i>B. cereus</i> strain 4446	Kondwani et al, 2022
<i>B. subtilis</i> strain CEDI-2	Kondwani et al, 2022
<i>B. subtilis</i> strain HFBP08	Kondwani et al, 2022
<i>B. subtilis</i> strain soilG2B	Kondwani et al, 2022
<i>B. tropicus</i> strain ISP161A	Kondwani et al, 2022
<i>B. velezensis</i> strain B1-6	Kondwani et al, 2022
<i>B. velezensis</i> strain IIPRDSCP-9	Kondwani et al, 2022
<i>B. toyonensis</i> strain WS2-2	Kondwani et al, 2022
<i>Burkholderia thailandensis</i>	Bunmadee et al, 2022
<i>Enterobacter</i> sp. strain MFM	Kondwani et al, 2022
<i>E. cloacae</i>	Bunmadee et al, 2022
<i>Enterococcus gallinarum</i> strain 1880	Kondwani et al, 2022
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain GCC-SO3	Kondwani et al, 2022
<i>P. aeruginosa</i> strain MLTBM2	Kondwani et al, 2022
<i>P. aeruginosa</i> strain OIS 4.8.1	Kondwani et al, 2022
<i>P. aeruginosa</i> strain VITBS7	Kondwani et al, 2022
<i>P. mendocina</i> strain ATCC 25,411	Kondwani et al, 2022
<i>Sphingomonas</i> sp.	Bunmadee et al, 2022

จากการศึกษาของ Boonmahome และคณะ (2013) ที่คัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์

ไลเปสจากตัวอย่างดินที่ปนเปื้อนน้ำมันปรุงอาหารในพื้นที่จังหวัดขอนแก่น ไอโซเลทที่มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีประสิทธิภาพสูงสุดถูกระบุว่าเป็น *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าชนิดอื่น ๆ ที่ศึกษา นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้มีความทนทานต่อสารต้านจุลชีพได้เป็นอย่างดี ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้แบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในสภาพแวดล้อมที่มีสารต้านจุลชีพอยู่

ของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 190 mU/ml โดยใช้ p-nitrophenyl palmitate เป็นสารตั้งต้น และมีสถานะในการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสมคือที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่าพีเอช เท่ากับ 9 สำหรับการใช้น้ำมันปาล์มปรุงอาหารที่ใช้แล้วสำหรับการผลิตเอนไซม์ไลเปสมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 481 mU/mL

Fischer และคณะ (1993) ได้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำทิ้งจากบ่อดักไขมันของร้านอาหารโดยการบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิสูง จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยไขมันในระดับดีมากได้จำนวน 6 ไอโซเลท โดยมีแบคทีเรียเพียง 4 ไอโซเลท ที่มีกิจกรรมเอนไซม์มากกว่า 70 Unit/mL ซึ่งไม่มีระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรีย

กุลธิดา และคณะ (2559) ทดสอบประสิทธิภาพในการบำบัดน้ำเสียโดย *Pseudomonas* sp. เทียบกับผงจุลินทรีย์สำเร็จรูป โดยทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปสเบื้องต้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tween 80 เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการย่อยไขมันในน้ำเสียจากร้านหมูกระทะพบว่า *Pseudomonas* sp. สามารถกำจัดไขมันได้สูงกว่าผงจุลินทรีย์สำเร็จรูป โดยคิดเป็นร้อยละ 59.50 และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด เท่ากับ 87 Unit/mL ณ ชั่วโมงที่ 42 ของการเพาะเลี้ยง

ทิพวรรณ และคณะ (2555) ได้ทำการศึกษาจุลินทรีย์ *Bacillus* spp. ที่คัดแยกได้ พบว่ามี 4 ไอโซเลท ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการย่อยสลายกากไขมันผ่านกระบวนการหมักทำปุ๋ยแบบเติมอากาศ ในสถานะที่เหมาะสมพบว่า *Bacillus* spp. จะผลิตไลเปสได้สูงสุดและทำให้ประสิทธิภาพการกำจัดกากไขมันเกิดขึ้นสูงสุดอีกด้วย โดยจากสถานะดังกล่าว พบว่า *Bacillus* spp. มีประสิทธิภาพการกำจัดไขมันสูงสุด โดยมีประสิทธิภาพในการกำจัดไขมันเท่ากับ 98.29% ที่ปริมาณไขมันเริ่มต้นเท่ากับ 73.60% และลดลงเหลือ 1.25% ส่วนค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสมีค่าเท่ากับ 295.20 Unit/mL

สิรินาถและคณะ (2560) ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำเสียในกระบวนการผลิตปลาสดในพื้นที่จังหวัดพะเยา เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar พบว่าแบคทีเรียที่สามารถย่อยสลาย Tributyrin และปรากฏโซนใสรอบโคโลนี คือเชื้อ *Staphylococcus wamer* ซึ่งมีค่าดัชนีเอนไซม์ไลเปสและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดเท่ากับ 2.86 และ 151.45 Unit/mL ตามลำดับ

สุชญญา (2561) ได้ทำการคัดแยกและศึกษาแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในตัวอย่างน้ำเสียจากร้านอาหาร พบว่าแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุด มีค่าดัชนีเอนไซม์ไลเปสและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเฉลี่ยเท่ากับ 1.25 ± 0.05 และ

157,66 \pm 4.60 Unit/mL ตามลำดับ จากนั้นเมื่อนำมาศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์ พบว่าที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์

เท่ากับ 250 มิลลิกรัมต่อลิตร ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันสูงสุดที่เฉลี่ยร้อยละ 92.93 แต่เมื่อความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำมันและไขมันเพิ่มขึ้นไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมันและไขมันมีแนวโน้มลดลง

Maytham และ Hanaa (2016) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากดินที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันจากแหล่งที่แตกต่างกัน พบว่าแบคทีเรียที่มีการสร้างของไซนไฮรอปโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Tween80 agar โดยมีความกว้างของไซนไฮรอปอยู่ที่ช่วง 28.6-29.1 มิลลิเมตร โดยสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้ คือ *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus pumilus* ATCC 7061, *Aeromonas caviae*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus pumilus* YHH-, *Bacillus pumilus* NRC2, *Staphylococcus epidermidis* และ *Bacillus pumilus* Tolr-FT โดยแบคทีเรียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่สูงที่สุดคือ *Pseudomonas aeruginosa*

Mobarak และคณะ (2011) ได้ทำการคัดแยก ระบุชนิดแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสและปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสที่คัดแยกได้เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ คือ *Pseudomonas aeruginosa* KM110 ผลการผลิตไลเปสที่ได้รับมีปริมาณเพิ่มขึ้นโดยรวม 3 เท่า (0.76 Unit/mL) หลังจากการปรับปรุงสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตไลเปส และพบว่าน้ำมันมะกอกและเปปโตเนเป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุด นอกจากนี้ยังแสดงกิจกรรมเอนไซม์โพลีติกสูงสุดที่อุณหภูมิ 45°C โดยที่เอนไซม์ยังคงสภาพได้ และที่ pH 8.0 ในสภาวะนี้เอนไซม์ไลเปสจะมีความคงตัวสูงสุดแต่ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์เกิดขึ้น แต่จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ในช่วง pH 7.0-10.0 อีกทั้งเอนไซม์ไลเปสยังถูกยับยั้งโดย Zn^{2+} และ Cu^{2+}

จากการศึกษาการแยกแบคทีเรียโพลีติกออกจากของเสียดินที่ปนเปื้อนและการเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ Kalpana และคณะ (2013) โดยแบคทีเรียที่แยกได้จากดินที่ปนเปื้อนของเสียทั้งหมด พบว่าลักษณะโดยรวมของทั้งสองไอโซเลท (TU-L1 และ TU-L2) ที่คัดแยกได้มีลักษณะคล้ายกับเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus* เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมี แบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทเป็นแกรมบวก มีรูปร่างเป็นกลม และเมื่อทำการปรับปรุงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยง (อุณหภูมิ, pH, เวลาในการเพาะเลี้ยง, ความเร็วในการกวน, ความจำเพาะของสารตั้งต้นการผลิตไขมันส่วนเกิน, ผลกระทบของแหล่งคาร์บอน, ไนโตรเจน และแหล่งกำเนิดของโลหะไอออน) เพื่อให้ได้รับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองไอ

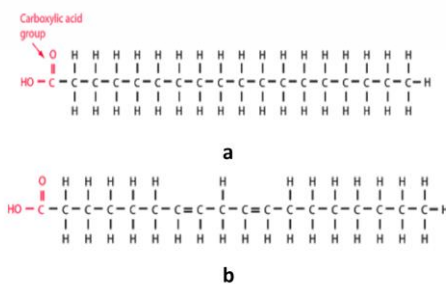
โซเลทที่คัดแยกได้มีกิจกรรมเพิ่มขึ้นในการเพาะเลี้ยงในตัวแปรที่ดีที่สุด โดยไอโซเลท TU-L1 ไม่มีการผลิต และ TU-L2 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดหลังครบเวลาบ่มที่เวลา 18 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง

ตามลำดับ หลังจากนั้นการทำงานของเอนไซม์ค่อย ๆ ลดลง กิจกรรมไลเปสและความคงตัวในตัวกลางที่มีความเป็นด่างมี pH ที่เหมาะสมที่สุดที่ pH 10.0 และมีความคงตัวในช่วง pH 6.0-10.0 สำหรับการเลือกแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin broth แบบที่เรียโอโซเลท TU-L1 แสดงกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเมื่อใส่ซูโครส 0.5% เป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนแบบที่เรียโอโซเลท TU-L2 แสดงกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเมื่อใส่แลคโตส 0.5% เป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งแบบที่เรียโอโซเลท TU-L1 และ TU-L2 แสดงกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเมื่อใส่เปปโตน 1% เป็นแหล่งไนโตรเจน ผลของไอออนโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในแบบที่เรียโอโซเลท TU-L1 และ TU-L2 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อมี Cu^{2+} เช่นเดียวกับ Mg^{2+}

2.2 ลิพิด (Lipid)

ลิพิด (Lipids) คือ สารประกอบอินทรีย์ที่ประกอบด้วยธาตุหลัก 3 ชนิด คือ คาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และออกซิเจน (O) เป็นกลุ่มของสารที่ไม่ชอบน้ำ จึงมีสมบัติทางกายภาพที่สำคัญคือ ไม่ละลายน้ำ หรือละลายน้ำได้ไม่ดี แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว หรือตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อีเทอร์ คลอโรฟอร์ม เป็นต้น โคเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ และกรดไขมันเป็นลิพิดในกลุ่มที่เป็นที่รู้จักมากที่สุด (พัชราภรณ์, 2558; Lammers และ Noels, 2020)

กรดไขมัน เป็น กรดอินทรีย์ประเภทหนึ่งที่มีหมู่คาร์บอกซิล ($-\text{COOH}$) เชื่อมต่อกับไฮโดรคาร์บอนสายยาวซึ่งเป็นส่วนที่ไม่มีขั้วที่ปลายสาย มีสูตรทั่วไปคือ $\text{R}-\text{COOH}$ และจำนวนอะตอมของคาร์บอนในโมเลกุลมากจะทำให้การละลายน้ำยิ่งไม่ดี (มาริสสา, 2560; วรวัฒน์, ม.ป.ป.; Fazili และคณะ, 2022; Butler และคณะ, 2021) กรดไขมันแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty acid) เป็นกรดไขมันที่โมเลกุลมักเป็นโซ่ตรงไม่มีแขนงพันธะระหว่างคาร์บอนมีพันธะระหว่าง C-C เป็นพันธะเดี่ยวทั้งหมดไม่มีพันธะคู่อยู่ในโมเลกุล และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid) โดยโมเลกุลของกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะมีพันธะระหว่าง C-C บางตำแหน่งเป็นพันธะคู่อยู่ในโมเลกุลตั้งแต่หนึ่งพันธะไปจนถึงหลาย ๆ พันธะคู่ (วรวัฒน์, ม.ป.ป.)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของกรดไขมันอิ่มตัว (a) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (b)

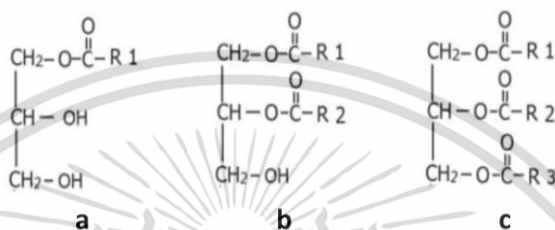
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ยืมเห็นหน้าเว็บไซต์ระบบขอสงวนสิทธิ์ในการดำเนินการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและข้อมูลของเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มา: นันทนา, (ม.ป.ป.)

2.2.1 การจำแนกชนิดของลิพิดตามองค์ประกอบทางเคมี

2.2.1.1 ลิพิดอย่างง่าย (Simple lipids)

สารประกอบเอสเทอร์ที่มีคุณสมบัติเป็นกลางเกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างกรดไขมันกับแอลกอฮอล์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งกลีเซอรอลจัดเป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับกรดไขมันแล้วได้เป็น โมโนกลีเซอไรด์ (Monoglyceride) ไดกลีเซอไรด์ (Diglyceride) หรือไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) และกรดไขมันอิสระ



รูปที่ 2.3 โครงสร้างโมโนกลีเซอไรด์ (a) ไดกลีเซอไรด์ (b) ไตรกลีเซอไรด์ (c)

ที่มา: พิมม์เพ็ญ และคณะ, ม.ป.ป.

โดยที่ไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) เป็นสารประกอบเอสเทอร์ (ester) จากการที่กลีเซอรอลใช้หมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ทำปฏิกิริยากับหมู่คาร์บอกซิลิก (-COOH) ของกรดไขมัน ไตรกลีเซอไรด์เป็นรูปแบบของลิพิดที่พบมากในธรรมชาติและใช้บริโภคในชีวิตประจำวัน (วรวิวัฒน์, ม.ป.ป.) โดยทั่วไป ไตรกลีเซอไรด์จะมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสถานะของสาร หากมีสถานะเป็นของแข็งเรียกว่า ไขมัน (Fat) แต่หากมีสถานะเป็นของเหลวจะเรียกว่า น้ำมัน (Oil) และหากเป็นแอลกอฮอล์ที่มีน้ำหนักมากกว่ากลีเซอรอลทำปฏิกิริยากับกรดไขมันจะ เรียกว่า ไข (Wax) (มาริสสา, 2560) ซึ่งไตรกลีเซอไรด์ที่พบมากในธรรมชาติ และใช้บริโภคในชีวิตประจำวัน คือ น้ำมันพืช (Babayan, 1987) โดยวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตน้ำมันพืชในประเทศไทยมีหลายชนิดได้แก่ ถั่วเหลือง ปาล์ม น้ำมันรำข้าว ข้าวโพด และเมล็ดทานตะวัน เป็นต้น น้ำมันพืชบริโภคโดยทั่วไปประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์ประมาณร้อยละ 95-98 และสารประกอบชนิดอื่น ๆ ที่อยู่ในไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งจะมีความแตกต่างกันตามชนิดของน้ำมัน โดยเฉพาะปริมาณกรดไขมันจำเป็น (essential fatty acids) ในน้ำมันพืชชนิดนั้น ๆ ได้แก่ กรดไลโนลีนิก (C 18:2) กรดไลโนลินิก (C 18:3) และอะราคิโดนิก (C 20:4) ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) สารปนเปื้อนในน้ำมันพืชที่สำคัญ

คือ กรดไขมันอิสระ ซึ่งเป็นสารที่เกิดจากการไฮโดรไลซิสไตรกลีเซอไรด์โดยมีไดกลีเซอไรด์และเอกลีเซอไรด์เป็นสารตัวกลาง กรดไขมันอิสระเป็นตัวบ่งบอกคุณภาพของน้ำมันที่ดีเพราะหากมีกรดไขมันอิสระสูงเกินไป จะทำให้รสชาติของน้ำมันเปลี่ยนไปและมีกลิ่นเหม็นหืน นอกจากนี้ กรดไขมันอิสระยังอาจทำให้เกิดการเกิดอนุมูลอิสระและก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้

ไขมันอิสระสูงจะทำให้เกิดกลิ่นหืนง่าย เนื่องจากกรดไขมันในรูปอิสระสามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ง่ายกว่ารูปเอสเทอร์ของไตรกลีเซอไรด์ (คณิศา และคณะ, 2552; ปราณี, 2540)

2.2.1.2 ลิพิดเชิงประกอบ (Compound lipids)

เป็นสารประกอบที่เกิดจากเอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์และมีสารประกอบอื่น ๆ รวมอยู่ด้วย มี 3 ประเภท ได้แก่ ฟอสโฟลิพิด (Phospholipids) ไกลโคลิพิด (Glycolipids) และไลโปโปรตีน (Lipoprotein)

2.2.1.3 อนุพันธ์ของลิพิด (Derivative of lipids)

เป็นสารที่เมื่อทำปฏิกิริยาเคมีกันแล้วได้เป็นลิพิดอย่างง่าย (Simple lipids) หรือลิพิดเชิงประกอบ (Compound lipids) ในทางกลับกันเมื่อไฮโดรไลซ์ลิพิดธรรมดาหรือลิพิดเชิงประกอบก็จะได้อนุพันธ์ของลิพิดกลับคืนมาโดยที่สารเหล่านี้ยังคงมีสมบัติของลิพิดอยู่ อนุพันธ์ของลิพิดที่สำคัญ คือ มอนอกลิเซอไรด์ ไดกลีเซอไรด์ ไตรกลีเซอไรด์ กรดไขมัน และแอลกอฮอล์ ซึ่งแอลกอฮอล์ที่พบได้บ่อย คือ กลีเซอรอล (มารีสา, 2560)

2.3 ปาล์มน้ำมัน (Oil palm)

ปาล์มน้ำมัน (Oil palm) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Elaeis guineensis* Jacq. อยู่ในวงศ์ *Arecaceae* หรือ *Palmae* เป็นพืชยืนต้นที่เติบโตได้ดีในป่าฝนเขตร้อนชื้น มีลักษณะคล้ายมะพร้าว ผลปาล์มออกรวมกันเป็นกลุ่มเรียกว่า ทะลาย ผลปาล์มมีลักษณะคล้ายลูกมะพร้าวแต่เล็กกว่ามาก เมื่อสุกเต็มที่มีสีแดงจัดหรือสีส้ม (รูปที่ 2.4)



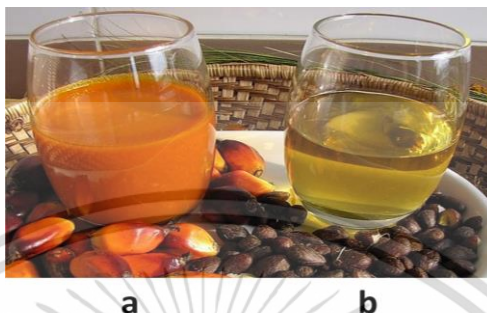
รูปที่ 2.4 ลักษณะลำต้น (a.) ทะลาย (b.) ใบ (c.) และลักษณะภายในผลของปาล์มน้ำมัน (d.)

ที่มา: <https://www.flickr.com/photos/adaduitokla/48119335808>, <https://www.amazon.com/African-Palm-Seeds-Elaeis-guineensis/dp/B07VG2X6KX>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 น้ำมันปาล์ม

น้ำมันปาล์ม คือ เป็นลิพิดอย่างง่ายประเภทไตรกลีเซอไรด์ชนิดหนึ่งและเป็นน้ำมันพืชที่ผลิตจากปาล์มน้ำมัน ซึ่งน้ำมันที่สกัดได้จากปาล์มน้ำมันแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท เนื่องจากสกัดได้จากเนื้อเยื่อหลักของผลปาล์ม 2 ส่วนที่แตกต่างกัน



รูปที่ 2.5 ลักษณะของน้ำมันปาล์ม (Palm oil) (a) และน้ำมันเมล็ดในปาล์ม (Palm kernel oil) (b)

ที่มา: Wikimedia Commons, 2020

2.3.1.1 น้ำมันปาล์ม (Palm oil)

สกัดจากเปลือกหุ้มภายนอกของผลปาล์ม (Mesocarp) มีลักษณะเป็นของเหลวกึ่งแข็งสีแดงส้มที่อุณหภูมิห้อง (Murphy และคณะ)

2.3.1.2 น้ำมันเมล็ดในปาล์ม (Palm kernel oil)

สกัดจากเนื้อในของเมล็ด (Palm kernel) มีลักษณะเป็นน้ำมันใส สีขาวเหลือง (Murphy และคณะ) โดยน้ำมันทั้งสองชนิดนี้มีองค์ประกอบของกรดไขมันดังที่ได้แสดงใน ตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลักของน้ำมันปาล์ม (Palm oil) และน้ำมันในปาล์ม (Palm kernel oil)

ชนิดของน้ำมันปาล์ม	กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบหลัก						
	12:0 ลอริก	14:0 ไมริสติก	16:0 ปาลมิติก	18:0 สเตียริก	18:1 โอเลอิก	18:2 ลิโนเลอิก	18:3 แอลฟาไลโนเลนิก
น้ำมันปาล์ม (Palm oil)	0.2	1-1.1	43-44	4-4.5	40	10-10.1	0.3-0.4
น้ำมันเมล็ดในปาล์ม (Palm kernel oil)	47.8-48	16-16.3	8-8.5	2-2.4	15	2.4-2.5	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ที่มา: Murphy และคณะ, 2021., Mancini และคณะ, 2015.
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งสำหรับประเทศไทยอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มเป็นตัวขับเคลื่อนเศรษฐกิจที่สำคัญ เนื่องจากมีการใช้อย่างหลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับการผลิตน้ำมันบริโภคและไบโอดีเซล ในประเทศ ปาล์มน้ำมันส่วนใหญ่มีการเพาะปลูกมากในภาคใต้ของประเทศไทย โดยการผลิตปาล์ม น้ำมันของไทยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ระหว่างปี พ.ศ. 2550 ถึง 2554 โดยมีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันเพิ่มขึ้น จาก 2.66 ล้านไร่ เป็น 3.75 ล้านไร่ และมีผลผลิตของปาล์มน้ำมันเพิ่มขึ้นจาก 6.39 ล้านตัน เป็น 9.88 ล้านตัน (โครงการพัฒนาและปรับปรุงข้อมูลด้านเศรษฐกิจการค้าการลงทุน, 2555)

2.4 การคัดกรองจุลินทรีย์ที่ผลิตไลเปสและปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

การคัดกรองจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลเปสดำเนินการโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นแบบแข็ง หากใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวจะมีความยากลำบากในการกำหนดกิจกรรมของลิโปไลติก

2.4.1 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Tributyrin agar plate

การแสดงออกของกิจกรรมลิโปไลติกเกิดจากการไฮโดรไลซิสพันธะเอสเทอร์ของ ไตรกลีเซอไรด์ด้วยเอนไซม์ไลเปส (Boonmahome และคณะ, 2013)

2.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Phenol red palm oil agar

โดยฟีนอลเรด (Phenol red) มีจุดสีสิ้นสุดที่ pH 7.3-7.4 ซึ่งค่า pH ที่ลดลงจะทำให้มีการเปลี่ยนสีจากสีชมพูเป็นสีเหลือง การเปลี่ยนแปลงสีของฟีนอลเรดจึงถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจะเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ของฟีนอลเรดจากสีชมพูให้เป็นสีเหลือง เนื่องจากในปฏิกิริยาลย่อยสลายไขมันของเอนไซม์ไลเปสจะทำให้เกิดกรดไขมันอิสระ ซึ่งมีผลทำให้ค่า pH มีค่าลดลง (Lee และคณะ, 2015; Singh และคณะ, 2006)

2.4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Tween 20 Agar และ Tween 80 Agar

การแสดงออกของกิจกรรมลิโปไลติกถูกระบุโดยการเกิดการตกตะกอนที่มองเห็นได้ ซึ่งเป็นผลมาจากเกลือแคลเซียมที่เกิดจากกรดไขมันจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสหรือโซนไฮรอลิซิส โคลินี เนื่องจากการย่อยสลายเกลือของกรดไขมันอย่างสมบูรณ์ (Lee และคณะ, 2015)

2.5 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

การผลิตไลเปสนอกเซลล์จากแบคทีเรียได้รับอิทธิพลอย่างมากจากองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะในการเพาะเลี้ยง เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ค่าความเป็นกรด-ด่าง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิจนระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ยังรวมถึงออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Abdul-Hammid และคณะ, 2013; Sagar และคณะ, 2013)

2.5.1 แหล่งคาร์บอน

ปัจจัยหลักสำหรับการแสดงออกของกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส คือ แหล่งคาร์บอนเสมอ เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่เหนียวน้ำได้ ดังนั้นโดยทั่วไปจึงผลิตขึ้นในที่ที่มีไขมัน เช่น น้ำมันหรือตัวเหนียวน้ำอื่น ๆ เช่น ไตรเอซิลกลีเซอรอล กรดไขมัน เอสเทอร์ ทวีน และกลีเซอรอล แต่อย่างไรก็ตามการผลิตเอนไซม์ไลเปสก็สามารถได้รับอิทธิพลอย่างมากจากแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ เช่น น้ำตาล โพลีแซคคาไรด์ เวย์ และแหล่งคาร์บอนที่ซับซ้อนอื่น ๆ (Mobarak และคณะ, 2011; Veerapagu และคณะ, 2013)

จากการศึกษาของ Ertugrul และคณะ (2007) พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* แสดงกิจกรรมสูงสุดต่อไตรกลีเซอไรด์สายยาว Trimyristin (C14) ที่ pH 6 แต่อย่างไรก็ตาม ที่ pH 9 เมื่อใช้ไตรกลีเซอไรด์สายสั้น เช่น Tributyrin (C4) และ Triacetin (C2) เป็นสารตั้งต้นพบว่ากิจกรรมของไลเปสมีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับไตรกลีเซอไรด์สายโซ่ที่ยาวกว่า (C8-C14) จากการศึกษา กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ไขมันพืชที่แตกต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน คือ น้ำมันมะกอก น้ำมันคาโนลา และน้ำมันเมล็ดองุ่น ของ Furini และคณะ (2018) พบว่าเชื้อแบคทีเรียแสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดกับน้ำมันสามชนิดในสภาวะที่ทดสอบ ถูกพบที่ชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ไม่แตกต่างกัน คือมีค่าเท่ากับ 0.141, 0.113 และ 0.079 U/mL.min⁻¹ ตามลำดับ ซึ่งมีการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ต่ำกว่าการใช้ Tween 80 เป็นแหล่งคาร์บอนมาก ตามมาด้วยการศึกษาของ Mobarak และคณะ (2011) พบว่าในบรรดาแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ได้แก่ ไทโรบิวไทรีน กลูโคส และน้ำมันมะกอก พบว่าน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด เนื่องพบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสมีค่าสูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของน้ำมันมะกอก ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตรต่อปริมาตร และจากข้อมูลการทดลองส่วนใหญ่แสดงให้เห็นว่าแหล่งคาร์บอนจากไขมันโดยเฉพาะน้ำมันจากธรรมชาติสามารถกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ไลเปส ในขณะที่การมีกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้มีเชื้อแบคทีเรียมีการผลิตเอนไซม์ไลเปสลดลง ซึ่งอาจเนื่องมาจากการยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่เกิดจากการกดแคแทบอลิต์ (Catabolite repression) เพราะโดยทั่วไปจุลินทรีย์มักใช้แหล่งคาร์บอนหรือสารอาหารที่นำไปใช้ได้เลยหรือย่อยได้ง่ายที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อก่อน ซึ่งมีการรายงานแบบเดียวกันในสิ่งมีชีวิตที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสอื่น ๆ คือ ความเข้มข้นของกลูโคสที่สูงขึ้นทำให้มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ลดลง (Mobarak และคณะ, 2011) รวมถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2 แหล่งไนโตรเจน

นอกจากแหล่งคาร์บอนแล้ว แหล่งไนโตรเจนและธาตุอาหารรองที่จำเป็นก็ควรได้รับเช่นกัน เพื่อการเติบโตและการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต (Veerapagu และคณะ, 2013) โดยทั่วไปจุลินทรีย์จะให้ผลผลิตของเอนไซม์ไลเปสสูงเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ เช่น สารสกัดจากเปปโตเนและยีสต์จากแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษาเพปโทเนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ก็มีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในจุลินทรีย์บางชนิด (Mobarak, และคณะ 2011; Sharma และคณะ, 2002; Sugihara และคณะ, 1991)

2.5.3 ค่าพีเอช (pH)

ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อให้เจริญเติบโตมีอิทธิพลต่ออัตราการผลิตเอนไซม์ จากการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสของ Gupta และคณะ (2004) ระบุว่าจากไลโปไลติกแบคทีเรียทั้งหมดที่ได้ทำการศึกษา มีการแสดงออกของค่ากิจกรรมของไลเปสสูงสุดที่ค่า pH สูงกว่า 7 และในหลายกรณีการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียมีค่า pH ที่เหมาะสมคือ ค่า pH ที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง

จากการศึกษาของ Murtius และคณะ (2022) เพื่อหาผลของเวลาเพาะเลี้ยงเชื้อต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* บนกากมะพร้าว โดยทำการสังเกตที่ชั่วโมงที่ 15, 20, 25, 30 และ 35 ชั่วโมง ในสภาวะที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ pH 7 ผลปรากฏว่าระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่ชั่วโมงที่ 15, 20, 25, 30 และ 35 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 2, 2.16, 2.33, 2.66 และ 2.5 U/ml ตามลำดับ ในขณะที่ค่าโปรตีนของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส 0.504166, 0.582083, 0.652083, 0.703750 และ 0.5322915 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งค่าโปรตีนที่เหมาะสมที่สุดคือหลังจากบ่ม 30 ชั่วโมง

2.5.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นตัวแปรสำคัญที่ต้องมีการควบคุมและแตกต่างกันไปในแต่ละสิ่งมีชีวิต อุณหภูมิมีผลต่อการหลั่งของเอนไซม์ Extracellular โดยการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ (Veerapagu และคณะ, 2013)

2.5.5 ระยะเวลาการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

ระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสำหรับการผลิตเอนไซม์ขึ้นอยู่กับลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อและอัตราการเติบโต (Veerapagu และคณะ, 2013) โดยลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย (growth curve of bacteria) แบ่งออกเป็น 4 ระยะ ได้แก่

2.5.5.1 ระยะเวลาพัก (lag phase)

เป็นระยะที่แบคทีเรียจะปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ จำนวนแบคทีเรียจึงยังไม่เพิ่มขึ้น เพราะยังไม่มี การแบ่งเซลล์ เป็นช่วงที่แบคทีเรียมีกิจกรรมทางสรีรวิทยาสูง ขนาดของเซลล์จะเพิ่มขึ้น ส่วนใหญ่เป็นการเพิ่มความยาว การเพิ่มโปรตีนและน้ำหนักรวม ในตอนปลายของระยะนี้แบคทีเรียจะแบ่งตัวแต่เนื่องจากแบคทีเรียทุกตัวไม่ได้แบ่งตัวพร้อมกัน ดังนั้นจำนวนประชากรจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้น ความยาวของระยะพักจะยาวนานเพียงใดขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและชนิดของเชื้อแบคทีเรีย เช่น หากนำแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารชนิดหนึ่งไปเพราะเลี้ยงในอาหารชนิดเดิมระยะพักจะใช้ระยะเวลาสั้น หรือหากใส่เชื้อแบคทีเรียที่พร้อมจะแบ่งตัว (อยู่ในช่วงปลายระยะพัก หรือระยะแบ่งตัวทวีคูณ) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ ระยะพักจะสั้น แต่ถ้าเชื่อนั้นมีความผิดปกติหรือเป็นเชื้อที่เก็บไว้นาน ดังนั้นจะใช้เวลานานในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่

2.5.5.2 ระยะแบ่งตัวทวีคูณ (exponential phase หรือ log phase)

เป็นระยะที่แบคทีเรียแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ คือ การแบ่งเซลล์แต่ละครั้งจะใช้เวลาเท่า ๆ กัน ระยะนี้มีอัตราการเจริญมากที่สุด เซลล์ว่องไวที่สุด สารอาหารจะถูกนำไปใช้อย่างมาก และรวดเร็ว การแบ่งเซลล์จะสัมพันธ์กับการสังเคราะห์โพรโทพลาสซึม และกิจกรรมทางเคมีของแบคทีเรีย จำนวนแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าจึงทำให้ลักษณะของกราฟเป็นแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล

2.5.5.3 ระยะคงจำนวนเซลล์ (stationary phase)

ระยะนี้แบคทีเรียจะมีจำนวนสูงสุดและคงที่ เพราะถึงแม้จะมีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นแต่อัตราการแบ่งตัวจะเท่ากับอัตราการตาย ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหารถูกใช้ไปเกือบหมด และอาจมีการขับของเสียที่เป็นพิษออกมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึม

2.5.5.4 ระยะเซลล์ตาย (death phase หรือ decline phase)

เป็นระยะที่แบคทีเรียจะตายอย่างรวดเร็วและตายมากขึ้นจนสม่ำเสมอเป็นเอ็กซ์โพเนนเชียลหรือลอการิทึม สาเหตุการตายอาจเนื่องมาจากสารอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์หมดไปและเกิดการสะสมของเสียและสารพิษที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึม แบคทีเรียจะมีอัตราการตายที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย เช่น พวกทรงกลม แกรมลบ จะตายอย่างรวดเร็วมากภายใน 2-3 วัน และเหลือเซลล์ที่มีชีวิตอยู่น้อยมาก เชื้อบางชนิดตายช้าจึงทำให้มีแบคทีเรียมีชีวิตเหลืออยู่เป็นเวลานานหลายเดือน (นงลักษณ์ และปรีชา, 2552)

จากการศึกษาผลกระทบของปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ
 เอกลีน่าเป็นเอกลีน่าที่เลี้ยงในสิ่งแวดล้อมที่ต่างกันเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออยู่ภายใต้เงื่อนไขที่เหมาะสม
 ไม่ว่าการ *Pseudomonas gessardii* ของ Veerapagu และคณะ (2013) พบว่าการผลิตเอนไซม์ไลเปส

จะเริ่มขึ้นหลังเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเท่านั้น ซึ่ง *Pseudomonas gessardii* ไม่ได้ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ระหว่างระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 8 ชั่วโมงและ 16 ชั่วโมง และมีการผลิตเอนไซม์ไลเปสจะลดลงหลังจาก 48 ชั่วโมง ซึ่งโดยรวมแล้วสภาวะที่เหมาะสมคือสภาวะที่ pH 7 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลาในการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง และเมื่อมีการได้รับการเสริมด้วย โปรตีนเอสเพปโตน ความเข้มข้น 1% ในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Pseudomonas gessardii* มีการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้น และมีรายงานว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสภาพแวดล้อมทางกายภาพเหมาะสมที่สุด พบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดของเชื้อ *Pseudomonas* ณ ชั่วโมงที่ 67 ในขณะที่เชื้อ *Pseudomonas* spp. และ *Bacillus coagulans* มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 72 และ 48 ชั่วโมง สำหรับ *Staphylococcus* และ *Trichoderma viride* (Yu และคณะ, 2009; Tembhurkar และคณะ, 2012; Kumar และคณะ, 2007; Sirisha และคณะ, 2010; Kashmiri และคณะ, 2006)

การศึกษาระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของไอโซเลท NJS54 ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ ญักฐวี และจิรัฐดา, (2558) โดยเปรียบเทียบระยะเวลาเพาะเลี้ยง 4 ระยะ ได้แก่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ผลการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและปริมาณเชื้อของแต่ละระยะเวลาเพาะเลี้ยงโดยสรุปพบว่าที่ระยะเวลาเพาะเลี้ยง 96 ชั่วโมง มีค่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส 0.08 ± 0.00 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่สูงที่สุด และมีปริมาณเชื้อ 9.8×10^7 CFU/ml โดยปริมาณเซลล์ของไอโซเลท NJS54 มีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่เวลาเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง และ ณ เวลา 48 ชั่วโมง มีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นสูงสุด หลังจากนั้นเมื่อเวลาผ่านไป ปริมาณเซลล์เริ่มลดลง ในขณะที่ปริมาณผลผลิตเอนไซม์ไลเปสเป็นผลผลิตสะสมในลักษณะของเอนไซม์ที่ปล่อยออกภายนอกเซลล์เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ตามระยะเวลาเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น

จากการศึกษาของ อภิขญาและคณะ ในปี 2663 ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมัน 4 ชนิด ได้แก่ น้ำมันมะกอก น้ำมันปาล์ม น้ำมันงา และน้ำมันถั่วเหลืองของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่คัดแยกได้จากบ่อตกไขมัน พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มได้ดีที่สุด โดยมีการย่อยสลาย ณ เวลาที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 13.98 ± 1.93 , 26.98 ± 6.7 , 33.94 ± 2.91 และ 64.04 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันที่ย่อยสลายได้ตรงลงมาได้แก่ น้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันงา ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือ

3.1.1 กล้องจุลทรรศน์ 2 กระบอกตา บริษัท Olympus รุ่น CX23 ประเทศไทย

3.1.2 ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker) บริษัท NEW BRUNSWICK รุ่น innova42 ประเทศแคนาดา

3.1.3 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) บริษัท NEW BRUNSWICK รุ่น innova42 ประเทศแคนาดา

3.1.4 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบส (pH Meter) บริษัท METTLERTOLEDO รุ่น S220 ประเทศสวีตเซอร์แลนด์

3.1.5 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) บริษัท HIRAYAMA รุ่น HV-25/50/85/110 ประเทศญี่ปุ่น

3.1.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับตกตะกอนตัวอย่าง (Centrifuge) บริษัท HERMLE Labortechnik GmbH รุ่น Z326K ประเทศเยอรมัน

3.1.7 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer) บริษัท Scientific Industries รุ่น G560E ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.8 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) บริษัท Shimadzu รุ่น UV-1800 ประเทศญี่ปุ่น

3.1.9 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) บริษัท BINDER รุ่น BD 115 ประเทศเยอรมัน

3.1.10 ตู้ลามินาร์ (Laminar Air Flow Cabinet) Thermo Scientific รุ่น MSC-Advantage ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.11 ตู้บ่มเพาะเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)

3.1.12 เครื่องดูดสาร (Micropipette) บริษัท Vivantis Technologies ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.13 เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง ยี่ห้อ AND รุ่น GF-800 ประเทศญี่ปุ่น

3.1.14 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Denver Instrument รุ่น SI-234 ประเทศเยอรมัน

3.2 อุปกรณ์

3.2.1 ปีกเกอร์ ขนาด 100 , 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.2.2 หลอดทดลอง 50 หลอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
3.2.3 งานเพาะเชื้อ
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.4 ปิเปตแก้ว ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
- 3.2.5 ขวดขวดบรรจุอาหาร (Duran) ขนาด 100 , 250 และ 500 มิลลิลิตร
- 3.2.6 ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร
- 3.2.7 ลวดเย็บเชือก (loop)
- 3.2.8 เข็มเย็บเชือก (needle)
- 3.2.9 กระจกสไลด์
- 3.2.10 แท่งแก้วคนสาร
- 3.2.11 ที่วางหลอดทดลอง (Rack)
- 3.2.12 ซ้อนตักสาร
- 3.2.13 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.2.14 ลูกยาง
- 3.2.15 หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง (Centrifuge Tube)
- 3.2.16 ทิปสำหรับเครื่องดูดสาร (Micropipette Tip) ขนาด 1,000 ไมโครลิตร
- 3.2.17 ฝาปิดหลอดทดลอง
- 3.2.18 คิวเวท (Cuvette)

3.3 สารเคมี

- 3.3.1 ผงวุ้น (Agar powder)
- 3.3.2 แบรียรัม คลอไรด์ ไดไฮเดรต (Barium chloride dihydrate)
- 3.3.3 โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin: BSA)
- 3.3.4 แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride)
- 3.3.5 แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต (Calcium chloride dihydrate)
- 3.3.6 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต (Copper(II)sulfate pentahydrate)
- 3.3.7 เพปไทน์ (Peptone)
- 3.3.8 ฟีนอลเรด (Phenol red)
- 3.3.9 โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรตเตตระไฮเดรต (Sodium potassium tartrate tetrahydrate)
- 3.3.10 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate)
- 3.3.11 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)
- 3.3.12 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)
- 3.3.13 ตรีบิวทีริน (Tributyrin)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการอื่นเพื่อการค้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใด 3.3.13 ตรีบิวทีริน (Tributyrin) นี้ขอหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.14 ทวีน 80 (Tween 80)
- 3.3.15 ทวีน 20 (Tween 20)
- 3.3.16 ยีสต์สกัด (Yeast extract)
- 3.3.17 น้ำมันมะกอก (Olive oil)
- 3.3.19 ฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalein)
- 3.3.20 สารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 95
- 3.3.21 สารละลายซีโอแคลทู ความเข้มข้น 2 นอร์มอล (2N Folin-Ciocalteu reagent)
- 3.3.22 ไดโซเดียมฟอสเฟตไดไฮเดรต (Disodium phosphate dihydrate)
- 3.3.23 โมโนโซเดียมฟอสเฟตไดไฮเดรต (Mono sodium phosphate)
- 3.3.24 สารละลายกรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid)

3.4 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

3.4.1 การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหรือดินที่มีการปนเปื้อนของไขมันใส่ลงในถุงพลาสติกปิดสนิท และตัวอย่างถูกนำไปที่ห้องปฏิบัติการ โดยตัวอย่างจะถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.2 การคัดกรองเชื้อโพลิดิกแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

นำตัวอย่างมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อโดยทำเจือจางตัวอย่างลดลงแบบลำดับส่วน ครึ่งละ 10 เท่า (ten-fold serial dilution) จนได้ตัวอย่างที่ระดับความเจือจางที่ 10^{-6} จากนั้นใช้เทคนิค Spread Plate โดยปิเปตตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร จากระดับความเจือจาง 3 ระดับความเจือจางที่สูงที่สุด (ระดับความเจือจาง 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6}) ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar และ Phenol-red palm oil agar ตัวอย่างละ 2 งานอาหาร และเกลี่ยด้วยแท่งแก้วที่ผ่านการจุ่มแอลกอฮอล์และลนไฟและพักไว้จนเย็น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาบ่มสังเกตโคโลนีของเชื้อบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่มีลักษณะต้องสงสัยอย่างใดอย่างหนึ่งดังนี้ คือ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar เป็นโคโลนีที่มีโซนใสรอบโคโลนี ส่วนบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Phenol-red palm oil agar เป็นโคโลนีที่มีโซนการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีแดงเป็นสีเหลือง (Ramnath และคณะ, 2017)

ทำการถ่ายเชื้อจากโคโลนีที่ให้ผลบวกด้วยเทคนิคการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (Cross-streak technique) ลงบนอาหารชนิดเดิม และไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เพื่อให้ได้

โคโลนีเดี่ยว (Single colony) หลังจากครบเวลาป่ม นำเชื้อที่ได้เป็นโคโลนีเดี่ยวไปทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้ออีกชนิดหนึ่ง คือ หากเชื้อให้ผลบวกบนอาหารอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar ให้ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Phenol-red palm oil agar ในกรณีกลับกัน หากเชื้อให้ผลบวกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Phenol-red palm oil agar ให้ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar และนำไปป่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง จากนั้นวัดความกว้างของโคโลนีที่มีโซนใสรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar ด้วย Vernier Caliper และดูการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ Phenol-red palm oil agar ของเชื้อ โดยเชื้อที่มีการเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อ Phenol-red palm oil agar จากสีแดงเป็นสีเหลืองให้ผลเป็นบวก

3.4.3 การทดสอบยืนยันความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสและเอสเทอเรส

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่มีการสร้างโซนรอบโคโลนีที่กว้างที่สุดบนอาหาร Tributyrin agar หรือ Phenol-red palm oil agar มาถ่ายลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tween 20 agar และ Tween 80 agar เพื่อเป็นการทดสอบยืนยันว่าเชื้อที่สงสัยมีกิจกรรมลิโปไลติก (Lipolytic activity) โดยใช้เทคนิคการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ (Cross-streak technique) และนำไปป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง สังเกตและบันทึกผล โดยโคโลนีของเชื้อที่มีโซนหรือการตกตะกอนสีขาวรอบโคโลนีให้ผลเป็นบวกและโคโลนีของเชื้อที่ไม่มีโซนใสหรือการตกตะกอนสีขาวรอบโคโลนีให้ผลเป็นลบ จากนั้นวัดความกว้างของโคโลนีที่มีโซนใสรอบโคโลนีด้วย Vernier caliper โดยเลือกโคโลนีที่มีโซนใสรอบโคโลนีบนทั้ง 2 อาหารเลี้ยงเชื้อ คือ Tween 20 agar และ Tween 80 agar มาถ่ายลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar และนำไปป่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง (Ramnath และคณะ, 2017) จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเป็นการเก็บรักษาเชื้อไว้เพื่อใช้ทำขั้นตอนอื่นต่อไป

3.4.4 ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการย่อยน้ำมันที่ใช้แล้ว

3.4.4.1 การเตรียมน้ำประกอบอาหารที่ใช้แล้ว

นำน้ำมันเก่าที่ใช้แล้วนำมากรองเศษอาหารออกด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำไประเหยน้ำออกโดยใช้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.4.4.2 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยใช้ลูป (Loop) เชี่ยวเชื้อจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ในข้อ 3.4.3 มาถ่ายใส่หลอดทดลองที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 10 มิลลิลิตร โดยปรับความขุ่นให้เท่ากับ

0.5 McFarland turbidity standard

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว

ถ่ายเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของน้ำมันเก่าปริมาตร 25 มิลลิลิตร (Ramnath และคณะ, 2017) โดยวิธีการเตรียมแสดงดังในภาคผนวก ก.6 จากนั้นนำไปบ่มแบบเขย่าด้วยตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Shaker Incubator) ที่ 150 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง และทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง คือเก็บตัวอย่างที่ ชั่วโมงที่ 24, 48, 72, 96 และ 120 โดยนำตัวอย่าง ณ ชั่วโมงที่ 24 ไปทำการตรวจวัดค่าความดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบว่าการเจริญเชื้อแบคทีเรีย (Qurrat และคณะ, 2018) จากนั้นนำตัวอย่างที่ ชั่วโมงที่ 24, 48, 72, 96 และ 120 ที่ทำการเก็บทั้งหมดจากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วแต่ละตัวอย่างมาทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 4500 rpm อุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกเอาตะกอนของเซลล์ออก จากนั้นเก็บส่วนใส (Supernatant) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสต่อไป

3.4.5 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Lipase Activity)

เติมส่วนใส (Supernatant) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงในข้อ 3.5.4.3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในฟลาสก์ที่มีสารผสมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7) 3 มิลลิลิตรและน้ำมันมะกอก 3 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมัน และเติมฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalein) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จำนวน 2 หยด จากนั้นนำไปไทเทรตด้วยด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (Sharma และคณะ, 2017; Ugochukwu และคณะ, 2008) ในขณะที่ชุดควบคุม (Control) ใช้เป็นเอนไซม์ไลเปสที่สูญเสียสภาพแล้วแทนส่วนใส (Supernatant) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง โดยเตรียมเอนไซม์ไลเปสที่สูญเสียสภาพได้โดยนำเอนไซม์ไลเปสไปต้มเป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำมาใช้งาน

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิต/มิลลิลิตร)} = \frac{\text{ปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ใช้} \times \text{ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)}}{\text{เวลาที่ใช้บ่ม} \times \text{ปริมาตรของตัวอย่าง}}$$

ที่มา: Faia และคณะ, 2021

กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 1 ยูนิต สามารถอธิบายได้ว่าเป็นปริมาณของเอนไซม์ที่ปลดปล่อย

กรดไขมันอิสระ 1 โมล ในระยะเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะการทดลอง (Faiz และคณะ, 2021) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.6 การตรวจสอบปริมาณโปรตีน

นำสารละลายส่วนใส (Supernatant) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงในข้อ 3.5.4.3 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร มาทำการเติมสารละลายอัลคาไลคอปเปอร์ (Alkaline copper) ปริมาตร 2,500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาทำการเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันทีด้วยเครื่อง Vortex mixer แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดสีอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร สำหรับแบลนค์ (Blank) จะใช้น้ำกลั่นและโปรตีน Bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐานแทนส่วนใส (Supernatant) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง โดยใช้สารละลายโปรตีน Bovine serum albumin ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และทำขั้นตอนอื่นๆตามเดิม (Lowry และคณะ, 1951) และคำนวณค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ดังสมการต่อไปนี้

$$\text{ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)}}{\text{ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม)}}$$

ที่มา: Lowry และคณะ, 1951

3.4.7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ผลของค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจะนำไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) การประมวลผลข้อมูล และการวิเคราะห์ทางสถิติโดยซอฟต์แวร์ Minitab version 19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการคัดกรองแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

จากการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำเสียที่ปนเปื้อนน้ำมันจำนวน 8 แห่ง โดยทำการคัดกรองเบื้องต้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Tribuyn agar (TRI) และ Phenol red palm oil agar (PHE) จากนั้นทำการทดสอบยืนยันกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและเอสเทอร์บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Tween 80 agar (TW80) และ Tween 20 agar (TW20) พบว่ามีแบคทีเรียเพียง 3 ไอโซเลท จากทั้งหมด 79 ไอโซเลท ที่มีการแสดงออกของกิจกรรมลิโปลิติกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tween 80 agar และ Tween 20 agar ดังที่แสดงใน ตารางที่ 4.1 (ภาคผนวก ค, ตารางที่ ค.1) โดยกำหนดรหัสแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ดังนี้ คือ ไอโซเลท SBK02-2, WL04-11 และ WLB04-13 โดยแบคทีเรียไอโซเลท SBK02-2 คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนไขมันของร้านอาหารตามสั่งในเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร ในขณะที่ไอโซเลท WL04-11 และ WLB04-13 คัดแยกได้จากบ่อดักไขมันบริเวณโรงอาหารคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทนี้จะถูกนำไปทำการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วต่อไป

ตารางที่ 4.1 ผลการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

ลำดับ	รหัสไอโซเลท	ผลบนอาหารเลี้ยงเชื้อ			
		TRI	PHE	TW80	TW20
1	WMB01-1	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
2	WMB01-2	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
3	WMB01-3	+	ไม่เปลี่ยนสี	+	-
4	WMB01-4	+	ไม่เปลี่ยนสี	+	+
5	WMB01-5	+	ไม่เปลี่ยนสี	+	+
6	WMB01-2	-	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
7	WMB01-3	+	ไม่เปลี่ยนสี	+	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น มิอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ผลการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

ลำดับ	รหัสไอโซเลท	ผลบนอาหารเลี้ยงเชื้อ			
		TRI	PHE	TW80	TW20
8	WLB02-1	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
9	WLB02-2	+	เปลี่ยนสี	-	-
10	WLB02-3	+	เปลี่ยนสี	+	+
11	WLB02-4	+	ไม่เปลี่ยนสี	+	+
12	WLB02-5	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	+
13	WLB02-6	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
14	WLB02-7	+	ไม่เปลี่ยนสี	+	+
15	WLB02-8	-	ไม่เปลี่ยนสี	+	-
16	WLB02-9	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
17	WLB02-10	-	ไม่เปลี่ยนสี	+	+
18	WLB02-11	-	ไม่เปลี่ยนสี	+	+
19	WLB02-12	+	ไม่เปลี่ยนสี	+	-
20	WLB02-13	-	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
21	WLB02-14	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
22	WLB02-15	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	+
23	WLB02-16	+	ไม่เปลี่ยนสี	+	-
24	WLB02-17	+	ไม่เปลี่ยนสี	+	-
25	WLB02-18	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
26	WLB02-19	-	เปลี่ยนสี	-	-
27	WLB03-1	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
28	WLB03-2	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
29	WLB03-3	+	ไม่เปลี่ยนสี	+	-
30	WLB03-4	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น และอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ผลการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

ลำดับ	รหัสไอโซเลท	ผลบนอาหารเลี้ยงเชื้อ			
		TRI	PHE	TW80	TW20
31	WLB03-5	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
32	WLB03-6	+	เปลี่ยนสี	-	-
33	WLB03-7	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	+
34	WLB03-8	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	+
35	WLB03-9	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
36	WLB04-1	+	เปลี่ยนสี	-	-
37	WLB04 -2	+	เปลี่ยนสี	-	+
38	WLB04-3	+	เปลี่ยนสี	-	-
39	WLB04-4	+	เปลี่ยนสี	-	+
40	WLB04-5	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
41	WLB04-6	-	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
42	WLB04-7	+	ไม่เปลี่ยนสี	+	-
43	WLB04-8	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
44	WLB04-9	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
45	WLB04-10	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
46	WLB04-11	+	เปลี่ยนสี	+	+
47	WLB04-12	+	ไม่เปลี่ยนสี	+	-
48	WLB04-13	+	ไม่เปลี่ยนสี	+	+
49	WLB04-14	-	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
50	SLB01-1	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
51	SLB01-2	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
52	SLB01-3	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	+
53	SLB01-4	+	ไม่เปลี่ยนสี	+	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น และผู้จัดทำไม่รับผิดชอบต่อการใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ผลการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

ลำดับ	รหัสไอโซเลข	ผลบนอาหารเลี้ยงเชื้อ			
		TRI	PHE	TW80	TW20
54	SLB01-5	+	เปลี่ยนสี	-	-
55	SSM01-1	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	+
56	SSM02-2	+	ไม่เปลี่ยนสี	+	+
57	SSM02-3	-	ไม่เปลี่ยนสี	+	-
58	SSM02-4	-	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
59	SSM02-5	-	เปลี่ยนสี	-	+
60	SSM02-6	-	ไม่เปลี่ยนสี	+	-
61	SSM02-7	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
62	SBK01-1	-	เปลี่ยนสี	-	+
63	SBK02-2	+	เปลี่ยนสี	+	+
64	SBK02-3	+	ไม่เปลี่ยนสี	+	+
65	SBK02-4	-	ไม่เปลี่ยนสี	+	-
66	SBK02-5	+	เปลี่ยนสี	-	-
67	SBK02-6	+	ไม่เปลี่ยนสี	+	-
68	SBK02-7	-	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
69	SBK02-8	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
70	SBK03-1	-	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
71	BSM02-1	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
72	BSM02-2	+	เปลี่ยนสี	+	-
73	BSM02-3	+	ไม่เปลี่ยนสี	+	+
74	BBK02-1	-	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
75	BBK02-2	+	ไม่เปลี่ยนสี	+	-
76	BBK02-3	+	ไม่เปลี่ยนสี	+	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ผลการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

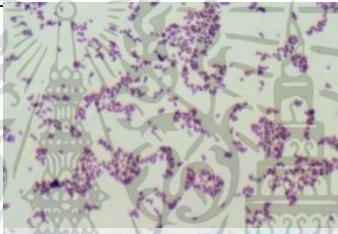


ลำดับ	รหัสไอโซเลท	ผลบนอาหารเลี้ยงเชื้อ			
		TRI	PHE	TW80	TW20
77	BBK02-4	+	ไม่เปลี่ยนสี	+	-
78	BBK02-5	+	ไม่เปลี่ยนสี	-	-
79	BBK02-6	+	เปลี่ยนสี	+	-

หมายเหตุ: ผลบวก (+) หมายถึง มีกิจกรรมลิโปไลติก, ผลลบ (-) หมายถึง ไม่มีกิจกรรมลิโปไลติก

ลักษณะโคโลนีของเชื้อไอโซเลท SBK02-2 ที่คัดแยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนไขมันมีลักษณะดังนี้ คือ โคโลนีรูปร่างโคโลนีกลม (Circular) ขอบแบบเรียบ (Entire) สีครีม ขนาดปานกลาง การยกตัวของโคโลนีเป็นแบบนูน (Convex) ขอบแบบเรียบ (Entire) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่เซลล์มีลักษณะกลม (Coccus) และมีค่าดัชนีการแสดงออกของกิจกรรมลิโปไลติกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar และ Tween 80 agar สูงที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.09 ± 0.15 และ 3.46 ± 1.62 มิลลิเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลท WLB04-11 และ WLB04-13 ที่คัดแยกได้จากน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนไขมัน มีลักษณะโคโลนีรูปร่าง แหลมหัวแหลมท้าย (Spindle) สีเขียวใส ขนาดใหญ่ ขอบโคโลนีเรียบ (Entire) การยกตัวของโคโลนีเป็นแบบแบน (flat) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีลักษณะเซลล์เป็นท่อนสั้น (Short rod) ดังที่แสดงใน ตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีและค่าดัชนีการแสดงออกของกิจกรรมลิโปไลติกของแบคทีเรีย

รหัส ไอโซเลท	ลักษณะโคโลนี	ลักษณะเซลล์และ การติดสีย้อมแกรม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	ดัชนีการแสดงออกถึงกิจกรรมลิโปไลติกของแบคทีเรีย บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (mm)			
			TRI	PHE	TW80	TW20
SBK02-6	โคโลนีสีครีม ขนาดปานกลาง รูปร่างโคโลนีกลม (Circular) การยกตัวของโคโลนีเป็นแบบนูน (Convex) ขอบแบบเรียบ (Entire)		2.09±0.15	ไม่มีการ เปลี่ยนสี	3.46±1.62	1.51±0.20
WLB01-11	โคโลนีสีเขียวใส ขนาดใหญ่ รูปร่างโคโลนี แหลมหัวแหลมท้าย (Spindle) ขอบโคโลนีเรียบ (Entire) การยกตัวของโคโลนีเป็นแบบแบน (flat)		1.57±0.14	ไม่มีการ เปลี่ยนสี	1.43±0.11	1.55±0.33
WLB01-13	โคโลนีสีเขียวใส ขนาดใหญ่ รูปร่างโคโลนี แหลมหัวแหลมท้าย (Spindle) ขอบโคโลนีเรียบ (Entire) การยกตัวของโคโลนีเป็นแบบแบน (flat)		1.40±0.24	ไม่มีการ เปลี่ยนสี	1.26±0.23	1.46±0.23

หมายเหตุ: ค่าดัชนีกิจกรรมไลเปสแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) โดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar (TRI), อาหารเลี้ยงเชื้อ Phenol red palm oil agar (PHE), อาหารเลี้ยงเชื้อ Tween 80 agar (TW80), อาหารเลี้ยงเชื้อ Tween 20 agar (TW20)

4.2 ผลการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว

จากการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีส่วนประกอบของน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้ง 3 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท SBK02-2, WL04-11 และ WLB04-13 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน และเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าด้วย Shaker incubator ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 24 ชั่วโมง จึงทำการตรวจดูผลการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท คือ SBK02-2, WL04-11 และ WLB04-13 มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาว 600 นาโนเมตร ณ ชั่วโมง 24 เท่ากับ 2.8666 ± 0.2892 , 2.8801 ± 0.3650 และ 2.9097 ± 0.0572 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ ณ ชั่วโมงที่ 0 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.2150 ± 0.0218 , 0.1553 ± 0.0176 และ 0.1917 ± 0.0211 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) ซึ่งจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ณ ชั่วโมงที่ 24 ที่มีค่าเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 สามารถบ่งบอกได้โดยที่เชื้อทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถใช้น้ำมันประกอบอาหารเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตได้ โดยจากการนำข้อมูลไปทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธีของ Tukey ที่ความเชื่อมั่น 95% สรุปได้ว่าการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ณ ชั่วโมงที่ 24 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีองค์ประกอบของน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ 4.3 ผลการตรวจวัดการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีองค์ประกอบของน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตเอนไซม์ไลเปส

ไอโซเลท	ค่าความดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร	
	ชั่วโมงที่ 0	ชั่วโมงที่ 24
SBK02-2	0.2150 ± 0.0218^a	2.8666 ± 0.2892^a
WLB04-11	0.1553 ± 0.0176^b	2.8801 ± 0.3650^a
WLB04-13	0.1917 ± 0.0211^{ab}	2.9097 ± 0.0572^a

หมายเหตุ: ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยบ่มเป็นเวลา 30 นาที ของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท คือ SBK02-2, WL04-11 และ WLB04-13 ด้วยวิธีการนำไปไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยใช้ไขมันมะกอกเป็นสารตั้งต้น และฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalein) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นอินดิเคเตอร์ (Sharma และคณะ, 2017; Ugochukwu และคณะ, 2008) พบว่าแบคทีเรียไอโซเลททั้ง 3 ไอโซเลท คือ SBK02-2, WL04-11 และ WLB04-13 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.011 ± 0.0011 , 0.0014 ± 0.0006 และ 0.0012 ± 0.002 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และหลังจากชั่วโมงที่ 24 แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท มีค่าลดลงเรื่อยๆ จนมีค่าเท่ากับ 0.0006 ± 0.0004 , 0.0001 ± 0.0007 และ 0.0001 ± 0.0007 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ณ ชั่วโมงที่ 120 แสดงดังรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสในระหว่าง ชั่วโมงที่ 24 ถึง 120

จากการศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำประกอบอาหารที่ใช้แล้วของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ของ Haba และคณะ (2000) โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วแตกต่างกัน 3 ชนิด คือ น้ำมันมะกอกประกอบอาหารที่ใช้แล้ว, น้ำมันทานตะวันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว และน้ำมันสุตรผสมระหว่างน้ำมันมะกอกและน้ำมันทานตะวันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว (อัตราส่วน 1:1) และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า แบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมดมี 28 สายพันธุ์ เป็น *Pseudomonas* 13 สายพันธุ์ *Bacillus* 6 สายพันธุ์ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พันธุ์ และ *Staphylococcus* 6 สายพันธุ์ ผลปรากฏว่าเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่แสดงกิจกรรมของ เอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุดในน้ำมันสูตรผสมระหว่างน้ำมันมะกอกและน้ำมันทานตะวันประกอบอาหารที่ใช้แล้วรองลงมา คือ น้ำมันมะกอกประกอบอาหารที่ใช้แล้ว และน้ำมันทานตะวันประกอบอาหารที่ใช้แล้วตามลำดับ แบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas* sp. 3AT มีการแสดงออกถึงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุดในชุดการทดลองน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว 2 ชนิด คือ น้ำมันมะกอกประกอบอาหารที่ใช้แล้ว และ น้ำมันผสมระหว่างน้ำมันมะกอกและน้ำมันทานตะวันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1982.32 Unit/L และ 2748.3 Unit/L ตามลำดับ ในขณะที่ชุดการทดลองน้ำมันทานตะวันประกอบอาหารที่ใช้แล้วพบแบคทีเรียที่มีการแสดงออกถึงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด คือ สายพันธุ์ *P. aeruginosa* 44T1 ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 121.16 Unit/L และมีแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas* sp. 25A3 สามารถเจริญได้ดีชุดการทดสอบน้ำมันมะกอกประกอบอาหารที่ใช้แล้วแต่ไม่มีการแสดงออกของกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส *Pseudomonas* sp. 25A3 ต่อมาการศึกษาความสามารถของเชื้อไลโปไลติกแบคทีเรียในการย่อยสลายน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วของ Suci และคณะ (2018) ที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus subtilis* ด้วยการเพาะเลี้ยงในสภาวะอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยใช้น้ำมันมะกอกประกอบอาหารที่ใช้แล้วแหล่งคาร์บอน เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีความเหมาะสมที่สุดต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส คือ มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5% โดยปริมาตร, น้ำมันมะกอกประกอบอาหารที่ใช้แล้ว 4% โดยปริมาตร, Yeast extract 0.5% โดยปริมาตร, น้ำมันมะกอก 0.25% โดยปริมาตร สำหรับเป็นสารช่วยเหนียวน้ำในการสร้างไลเปส และแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ความเข้มข้น 10 mM ผลปรากฏว่า *B. subtilis* มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดเท่ากับ 4.96 U/mL และมีค่าความหนาแน่นของเชิงแสงหรือค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 2.452 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ณ ชั่วโมงที่ 84 ของการเพาะเลี้ยง จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาอื่นในปัจจุบันที่มีการรายงาน พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ที่คัดแยก คือ SBK02-2, WL04-11 และ WL04-13 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสต่ำกว่า อาจเป็นไปได้หลายประการด้วยกัน ดังนี้

ประการแรกเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ไม่มีการสร้างเอนไซม์ไลเปสเนื่องมีการดัดไขมันอิสระอยู่ในน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว โดยสัดส่วนและความหลากหลายของกรดไขมันที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว ขึ้นอยู่กับความหลากหลายของอาหารที่ถูกทอด (Haba และคณะ, 2000) ซึ่งการมีอยู่ของกรดไขมันอิสระอาจส่งผลเสียต่อการเหนียวน้ำในการผลิต

เอกสารนี้เอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียสามารถใช้กรดไขมันอิสระที่มีในไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วได้ทันที จึงไม่จำเป็นต้องสร้างเอนไซม์ไลเปสออกมาเพื่อย่อย
น้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว

ประการที่สอง คาดว่าเนื่องจากขั้นตอนการเตรียมเชื้อเริ่มต้นที่เลือกใช้ในการศึกษาในครั้งนี้
ของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้คือ SBK02-2, WLB04-11 และ WLB04-13 มีขั้นตอนการ
เพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrien agar ทำให้เชื้อเริ่มต้นที่ทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยง
เชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วมีอายุของเชื้อเท่ากับ 48 ชั่วโมง และเมื่อเปลี่ยนอาหาร
เลี้ยงเชื้อเชื้อแบคทีเรียจึงต้องใช้เวลาในการปรับตัวในสภาพแวดล้อมใหม่ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรีย
ทั้ง 3 ไอโซเลท อาจอยู่ในระยะการเจริญเติบโตที่ไม่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ไลเปสแล้ว
ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Willerding และคณะ (2011) ที่ทำการศึกษากิจกรรมของ
เอนไซม์ไลเปสในแบคทีเรียที่แยกได้จากดินอเมริกาเหนือ ทั้งหมด 72 ไอโซเลท จาก 440 ไอโซเลทที่
คัดแยกได้ พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ทำการศึกษาริเริ่มสังเคราะห์ไลเปสภายใน 24 ชั่วโมง แต่สามารถ
สังเกตการเพิ่มขึ้นของปริมาณเอนไซม์ไลเปสเชิงปริมาณได้จนถึง 72 ชั่วโมง และหลังจากชั่วโมงที่ 72
กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสมีค่าลดลง

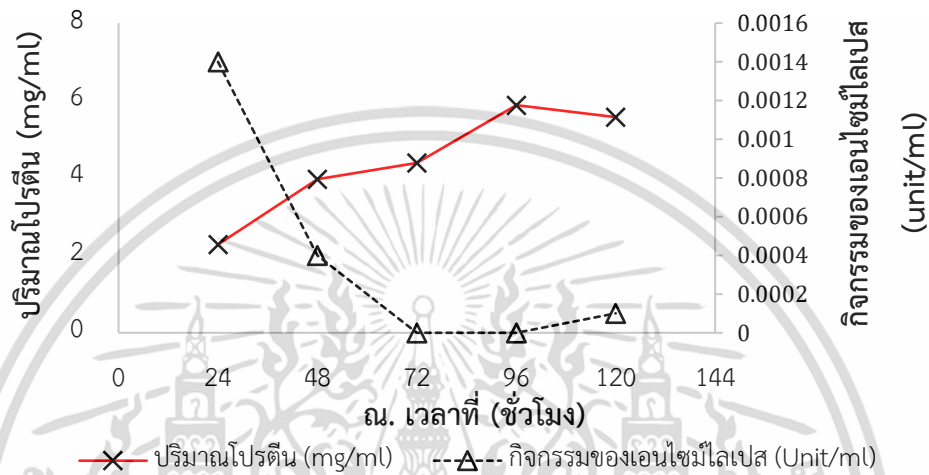
ประการที่สาม เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากแบคทีเรียที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง อาจจะแสดง
สมบัติเป็นเอนไซม์ทนร้อนได้ แต่อย่างไรก็ตามก็มีความคงตัวน้อยกว่าเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากแบคทีเรีย
ที่ชอบอุณหภูมิสูง ด้วยเหตุเหตุนี้อาจเป็นไปได้ว่าเมื่อทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส
ในสภาวะที่ใช้ทดสอบคืออุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อาจทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพในการเร่งปฏิกิริยา

4.4 ผลการทดสอบปริมาณโปรตีน

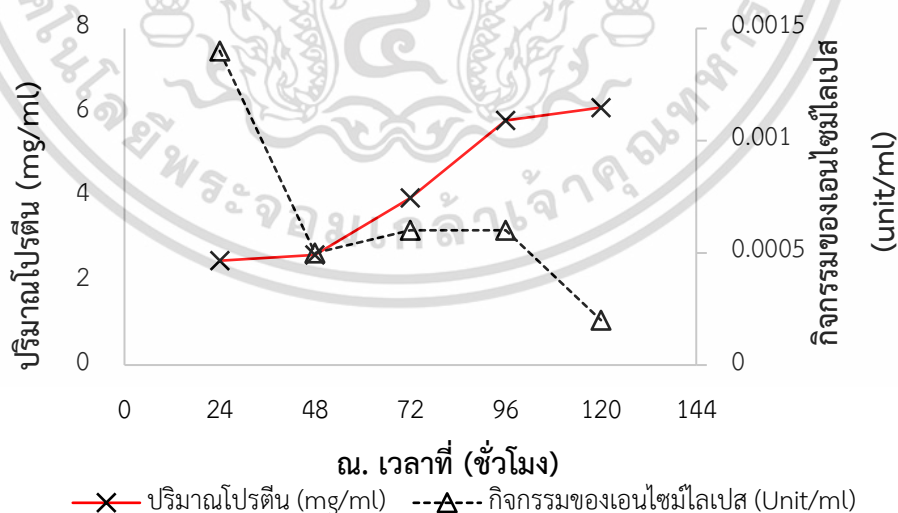
จากการทดสอบปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry และคณะ (1951) โดยการนำ
สารละลายส่วนใส (Supernatant) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ในอาหารเลี้ยงเชื้อ
ที่มีส่วนประกอบของน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะเขย่า
ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ปรากฏว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท คือ
WL04-11 และ WLB04-13 มีปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมงที่ 0 ถึง
120) โดยไอโซเลท WL04-11 มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 2.28 ± 0.06 เป็น 5.57 ± 0.01
มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และไอโซเลท WL04-13 มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นจาก 2.48 ± 0.22 เป็น

เอกสารนี้ (6.12 \pm 0.36 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ (รูปที่ 4.2 และ 4.3) ส่วนแบคทีเรียไอโซเลท SBK02-2
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้นในช่วง 24-96 ชั่วโมง และหลังจากชั่วโมงที่ 96 มีปริมาณโปรตีนลดลงเหลือ 2.87 ± 0.13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ณ ชั่วโมงที่ 120 (รูปที่ 4.4) เป็นได้ว่ากรณีนี้อาจเกี่ยวข้องกับการที่เชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์โปรตีเอสไปพร้อมกันภายในการเพาะเลี้ยงเดียวกัน ซึ่งเป็นผลทำให้ปริมาณโปรตีนมีค่าลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 96 เนื่องจากเอนไซม์โปรตีเอสมีความสามารถในการย่อยสลายสารประเภทโปรตีน



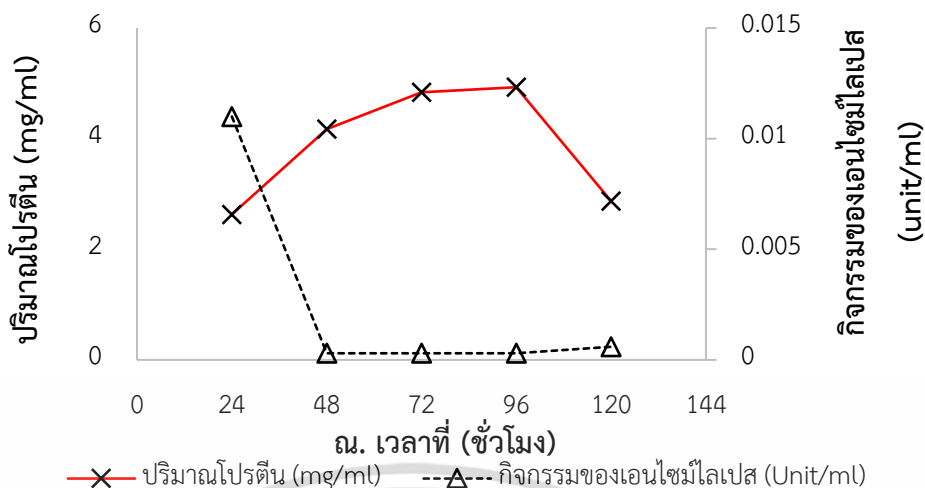
รูปที่ 4.2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและปริมาณโปรตีนหลังการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท WLB04-11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและปริมาณโปรตีนหลังการ

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท WLB04-13 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ยืมได้เห็นว่าเอกสารนี้มีความสำคัญและไม่ควรเผยแพร่ให้ผู้อื่นได้โปรดแจ้งให้ทราบและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสและปริมาณโปรตีนหลังการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท SBK02-2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

ซึ่งเมื่อนำปริมาณโปรตีนได้ตรวจวัดได้ไปทำการคำนวณหาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส พบว่าพบว่าแบคทีเรียไอโซเลททั้ง 3 ไอโซเลท คือ SBK02-2, WL04-11 และ WLB04-13 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 0.0004 ± 0.0004 , 0.0006 ± 0.0003 และ 0.0005 ± 0.0001 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาความสามารถในการย่อยน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วของเชื้อไลโปไลติกแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท คือ SBK02-2, WLB04-11 และ WLB04-13 ที่โดยแบคทีเรียไอโซเลท SBK02-2 คัดแยกได้จากดินที่ปนเปื้อนไขมันของร้านอาหารตามสั่งในเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร ในขณะที่ไอโซเลท WL04-11 และ WLB04-13 คัดแยกได้จากบ่อดักไขมันบริเวณโรงอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ณ ชั่วโมงที่ 24 แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท คือ SBK02-2, WL04-11 และ WLB04-13 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่สูงที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.011 ± 0.0011 , 0.0014 ± 0.0006 และ 0.0012 ± 0.002 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 0.0004 ± 0.0004 , 0.0006 ± 0.0003 และ 0.0005 ± 0.0001 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ และหลังจากชั่วโมงที่ 24 แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสลดลงเรื่อย ๆ จนถึงชั่วโมงที่ 120 ในขณะที่ปริมาณโปรตีนมีกลับมีปริมาณเพิ่มขึ้นซึ่งแปรผกผันกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรีย

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรทำการตรวจวัดปริมาณน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วที่เหลือแทนการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยตรง

5.2.2 ควรทำการทดสอบการความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันปาล์มสำหรับประกอบอาหารโดยการใช้ไขมันปาล์มประกอบอาหารเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวควบคู่ไปด้วย เพื่อจะได้ทราบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีความสามารถในการย่อยสลายน้ำมันพืชชนิดนี้ได้หรือไม่

5.2.3 ควรมีการวิเคราะห์ความเป็นพิษและองค์ประกอบของน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว

5.2.4 ควรทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 600 นาโนเมตรหรือตรวจเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ปริมาณเซลล์แห้งควบคู่ไปกับการรบกวนตัวอย่าง เพื่อให้ทราบว่าเชื้อแบคทีเรียมีปริมาณเซลล์เพิ่มไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีเหตุตบแต่งสิ่งเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีกรนำไปใช้

หรือไม่ ซึ่งอาจบ่งบอกได้ว่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ตรวจวัดได้เป็นโปรตีนจำพวกใดเช่น เอนไซม์หรือสารพิษ เป็นต้น

5.2.5 ควรทำการวางแผนระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงและช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างให้ สอดคล้องกับระยะการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย. 2532. การคัดเลือกแบคทีเรียจากดินเพื่อผลิตไลเปสและศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิต. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยา, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กุลธิดา เฉลิมแสน, กัญญารัตน์ ปุโหม, พิมพ์ชนก มูลสินทร และมุจลินทร์ ผลจันทร์. 2559. การบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมันจากร้านหมูกระทะด้วย *Pseudomonas* sp. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- กุสุมาวดี ฐานเจริญ. 2557. ความหลากหลายของยีสต์ที่สร้างเอนไซม์ไลเปสย่อยไขมันในน้ำทิ้ง โรงอาหารมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม. สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ขจีนาฏ
- โพธิเวชกุล, สุมาลี เหลืองสกุล และสมใจ ศิริโชค. 2545. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ เพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส. กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- ชนิษฐา จันทร์เจริญ. 2565. สบู่เหลวโฟแทสเชื่อมจากน้ำมันพีซีใช้แล้ว นักวิจัยจุฬาฯ หนุนชุมชน ผลิตลดวิกฤตสิ่งแวดล้อม สร้างเศรษฐกิจหมุนเวียน [Online]. เข้าถึงได้จาก <https://www.chula.ac.th/highlight/88238/>
- โครงการพัฒนาและปรับปรุงข้อมูลด้านเศรษฐกิจการค้าการลงทุน. 2555. วันที่ค้นข้อมูล 26 มกราคม 2566, เข้าถึงได้จาก <http://www.tpsa.moc.go.th/sites/default/files/1022-img.pdf>
- คณิตา กิตติรัตน์ไพบูลย์, จินดารัตน์ โดกมลธรรม และคณิต กฤษณังกูร. 2552. การหาค่าประกอบรองต่างๆในน้ำมันพีซีบริโภคที่วางจำหน่ายในประเทศไทยโดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวแรงดันสูงแบบแยกตามขนาด. วารสารวิจัยและพัฒนา มจร, 32(2-3), 241-251.
- ณกัญภัทร จินดา. 2547. เอนไซม์ไลเปส 1 แหล่งประโยชน์ระดับอุตสาหกรรม. วารสารมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย, 24(3), 114-131.
- ณัฐวี ชั่งชัยม และจิรัฐดา สันธศิริ. 2558. การคัดแยกและการหาสภาวะเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมของการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมัน. สมุทรปราการ: มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ.
- ทิพวรรณ ประพันธ์, เนติยา กรีธาชาติ, พิลานี ไวยถนอมสัจย์ และต่อพงศ์ กรีธาชาติ. 2555. บทความวิจัยเรื่องนี้ได้นำเสนอการประชุมวิชาการพะเยาวิจัย. พะเยา: มหาวิทยาลัยพะเยา.
- ธมลวรรณ เพชรภา. 2562. การศึกษากลไกการเร่งปฏิกิริยาและสมบัติความจำเพาะต่อสับสเตรตของเอนไซม์ เบต้า-อะลานีนซินเทสจากยีสต์ด้วยระเบียบวิธี ONIOM. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยพะเยา.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2552. จุลชีววิทยาทั่วไป. โรงพิมพ์แห่ง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร.

นันทิรา หงษ์ศรีสุวรรณ. 2558. อันตรายจากน้ำมันทอดซ้ำ Hazards of Reused Cooking Oil. วารสารวิชาการและวิจัย มทร.พระนคร, 9: 164-175.

ปราณี แซ่โค้ว. 2540. การศึกษาส่วนประกอบของกรดไขมันในน้ำมันปาล์ม. กรุงเทพมหานคร: กรมวิทยาศาสตร์บริการ.

พัชรภรณ์ ไชยศรี. 2558. เอกสารประกอบการสอน ชีวเคมีในการสาธารณสุข. [Online]. เข้าถึงได้จาก <http://portal5.udru.ac.th/ebook/pdf/upload/179GH9Z7M8R555GAP710.pdf>

ภัทรภร พิกุลขวัญ, อรอนงค์ พริ้งสุลกะ, ณิชฎีกา สุวรรณาศรัย, วัลลภา หล่อเหลี่ยม, สิริรักษ์ ทรวงนี ยารักษ์, วิเชียร กิจปรีชาวนิช และ สุขุมภรณ์ กระจ่างสังข์. 2559. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus safensis* สายพันธุ์ PSR5631 ที่แยกได้จากดิน. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 32(1), 116-129.

มาริสา อັตถาพงศ์. 2560. การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์. วิทยาสตรบัณฑิตและปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม. มหาวิทยาลัยพะเยา

สิรินาถ ปลอดภัย, สุชัยญา ทองเครือ และชญาณันท์ จิตมณี. 2560. การคัดแยกและระบุสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำเสียการผลิตปลาส้ม. พะเยา: มหาวิทยาลัยพะเยา.

สุรอรรด ศุภจัตรัส, วีระสิทธิ์ กัลป์ยากฤต, วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน และศุภพงษ์ ภูวพัฒนะพันธ์. มปป. การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสประสิทธิภาพสูงจากตะกอนเร่งของโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 712-718.

สุชัยญา พวงมณี, สรรพพร แก้วทอง และวรรณ ศรีวิริยานุภาพ (บรรณาธิการ). 2555. พลิกปุม “ปฏิวัติ น้ำมันทอดซ้ำ” จากกันกระแทกสู่ วาระแห่งชาติ. 1. กรุงเทพมหานคร. ศูนย์พัฒนาวิชาการและกลไกคุ้มครองผู้บริโภคด้านสุขภาพ (คคส.) คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุชัยญา ทองเครือ, มารีสา อັตถาพงศ์ และศิริลักษณ์ สันพา. 2561. ประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการย่อยสลายน้ำมันและไขมันในน้ำเสียสังเคราะห์. วารสารวิชาการ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์. 10(11). 76-87.

สุนิสา วิชาชูเชิด. 2553. ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อคุณภาพน้ำมันทอดไก่. วิทยาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารหลวงในเล่มหรือการเขียนเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น เมื่อผู้ยืมได้เห็นว่าใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วรวัฒน์ พรหมเด่น. ม.ป.ป.. ชีวเคมีพื้นฐาน. วันที่ค้นข้อมูล 10 ธันวาคม 2565. เข้าถึงได้จาก <http://blog.bru.ac.th/document/%E0%B9%80%E0%B8%AD%E0%B8%81%E0%B8%AA%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B8%9B%E0%B8%A3%E0%B8%B0%E0%B8%81%E0%B8%AD%E0%B8%9A%E0%B8%81%E0%B8%B2%E0%B8%A3%E0%B8%AA%E0%B8%AD%E0%B8%99-2/>

วิไลภรณ์ ดวงประทุม และดาภิรพรรณ เศรษฐีธรรม. 2555. การเปรียบเทียบปริมาณสารโพลาร์ในน้ำมันปรุงอาหารและน้ำมันผสมที่ใช้ทอดซ้ำที่ระยะเวลาต่างกัน. วารสารวิจัย มข. (บศ.). 12(4): 40-52.

อภิชญา พัฒพิน, พิมประไพ ขาวขำ และพิทักษ์ ปอกสอน. 2663. การคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำเสียในบ่อดักไขมันโรงอาหารมหาวิทยาลัยราชภัฏกำแพงเพชร. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 7(1), 69-79

อุณ ตะสิงห์, กาญจนา ครอบธรรมชาติ และประสพ โพธิ์นิ่มแดง. 2560. ประสิทธิภาพของแบคทีเรียกลุ่มย่อยสลาย ศักยภาพระดับชาติและนานาชาติ 2560. (627-638). ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Alhamdani, M.A. and Alkabb, H.J.J. 2016. Isolation and identification of lipase producing bacteria from oil-contaminant soil. Journal of biology, agriculture and healthcare. 6(20): 1-7.

Amoozegar, M. A., Salehghamari, E., Khajeh, K., Kabiri, M. and Naddaf, S. 2008. Production of an extracellular thermohalophilic lipase from a moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. strain SA-2. Journal of basic microbiology, 48(3), 160-167.

Arreguín-Espinosa, R., Arreguín, B. and González, C. 2000. Purification and properties of a lipase from *Cephaloleia presignis* (Coleoptera, Chrysomelidae). Biotechnology and applied biochemistry, 31(3), 239-244.

Aryal, S. 2021. McFarland standards- principle, preparation, uses, limitations. [Online]. <https://microbenotes.com/mcfarland-standards/>

Babayan, V. K. 1987. Medium chain triglycerides and structured lipids. Lipids, 22(6), 417-420.

Boonmahome, P. and Mongkolthanaruk, W. 2013. Lipase-producing bacterium and its enzyme characterization. Journal life Science technology, 1(4), 196-200.

Butler, L.M., Perone, Y., Dehairs, J., Lupien, L.E., de Laat, V., Talebi, A., Loda, M.,

Kinlaw, W.B. and Swinnen, J.V. 2021. Lipids and cancer: emerging roles in

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ผู้ดูแลเนื้อหาที่นำเข้าไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- pathogenesis, diagnosis and therapeutic intervention. *Advanced drug delivery reviews*. 159: 245-293.
- Casas-Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G. and Marty, A. 2012. Lipases: an overview. *Lipases and phospholipases: methods and protocols*, 3-30.
- Ertuğrul, S., Dönmez, G. and Takaç, S. 2007. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of hazardous materials*, 149(3), 720-724.
- Faiz, S., Nasreen, Z., Sharif, A. and Naz, S. 2021. Isolation, screening and characterization of lipase from bacterial isolates and its application in detergents and oily wastewater degradation. *Pure and applied biology*. 10(1): 209-224.
- Fazili, A.B.A., Shah, A.M., Zan, X., Naz, T., Nosheen, S., Nazir, Y., Ullah, S., Zhang, H. and Song, Y. 2022. *Mucor circinelloides*: a model organism for oleaginous fungi and its potential applications in bioactive lipid production. *Microbial cell factories*. 21: 29. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01758-9>
- Fischer, K., Puchinger, L., Schloffer, K., Kreiner, W. and Messner, K. 1993. Enzymatic pitch control of sulfite pulp on pilot scale. *Journal of Biotechnology*. 27: 341.
- Furini, G., Berger, J. S., Campos, J. A., SAND, S. T. and Germani, J. C. 2018. Production of lipolytic enzymes by bacteria isolated from biological effluent treatment systems. *Anais da academia brasileira de ciências*, 90, 2955-2965.
- Guncheva, M. and Zhiryakova, D. 2011. Catalytic properties and potential applications of *Bacillus* lipases. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic*, 68(1), 1-21.
- Gupta, R., Gupta, N. and Rathi, P. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Microbiology and biotechnology*, 64(6): 763-781.
- Haba, E., Bresco, O., Ferrer, C., Marques, A., Busquets, M. and Manresa, A. 2000. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. *Enzyme and microbial technology*, 26(1), 40-44.
- Huang, A.H.C. and Brockman, B. H. L. 1984. *Plant lipases*. Elsevier science publishers, Amsterdam, 65, 897-899.
- Huang, A. H. C., Lin Y. H. and Wang, S. 1988. Characteristics and biosynthesis of seed lipases in maize and other plant species. *Journal of the american oil chemists' society*, 65, 897-899.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อเผยแพร่บนเว็บไซต์ของสถาบันฯ
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ขอสงวนสิทธิ์ในการเปลี่ยนแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Javed, S., Azeem, F., Hussain, S., Rasul, I., Siddique, M. H., Riaz, M., ... and Nadeem, H. 2018. Bacterial lipases: a review on purification and characterization. *Progress in biophysics and molecular biology*, 132, 23-34.
- Kalpana S., Yasir B., Mayur M P. and Konwar B. K. 2013. Isolation of lipolytic bacteria from waste contaminated soil a study with regard to process optimization for lipase. *Journal of scientific & technology resercch*, 2(10): 214-218.
- Kambourova, M., Kirilova, N., Mandeva, R. and Derekova, A. 2003. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, 22(5-6), 307-313.
- Kashmiri, M. A., Adnan, A. and Butt, B. W. (2006). Production, purification and partial characterization of lipase from *Trichoderma viride*. *African Journal of Biotechnology*, 5(10).
- Keogh-Brown, M.R., Jensen, H.T., Basu, S., Aekplakorn, W., Cuevas, S., Dangour, A.D., Gheewala, S.H., Green, R., Joy, E.J.M., Rojroongwasinkul, N., Thaiprasert, N., Shankar, B. and Smith, R.D. 2019. Evidence on the magnitude of the economic, health and population effects of palm cooking oil consumption: an integrated modelling approach with Thailand as a case study. *Population health metrics*, 17(1): 1-14.
- Kohno, M., Kugimiya, W., Hashimoto, Y. and Morita, Y. 1994. Purification, characterization and crystallization of two types of lipases from *Rhizopus niveus*. *Bioscience biotechnology and biochemistry*, 58, 1007-1012.
- Kumar, M. P. and Valsa, A. K. 2007. Optimization of culture media and cultural conditions for the production of extracellular lipase by *Bacillus coagulans*. *Indian Journal of biotechnology*, 6, 114-117.
- Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S. S. and Gupta, R. 2005. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein expression and purification*, 41(1), 38-44.
- Lammers, T. and Noels, H. 2020. Lipids in disease pathology, diagnosis & therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 159: 1-3.
- Lee, L. P., Karbul, H. M., Citartan, M., Gopinath, S. C., LakshmiPriya, T. and Tang, T. H. 2015. Lipase-secreting *Bacillus* species in an oil contaminated habitat: promising strains to alleviate oil pollution. *BioMed research international*, 2015.

- Lee, S. Y. and Rhee, J. S. 1993. Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. *Enzyme and microbial technology*, 15, 617-623.
- Liu, W. H., Beppu, T. and Arima, K. 1973. Purification and general properties of the lipase of thermophilic fungus *Humicola lanuginosa* S-38. *Agricultural and biological chemistry*, 37(1), 157-163.
- Lowry, O.H., Rosebrongh, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.L. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 193: 265-275.
- Magos, T.J., Jones, K.C. and Foglia, T.A. 1999. Lipase-catalyzed synthesis of structured low-calorie triacylglycerols. *Journal of the american oil chemists' society*, 76, 1127-1132.
- Mancini, A., Imperlini, E., Nigro, E., Montagnese, C., Daniele, A., Orrù, S. and Buono, P. 2015. Biological and nutritional properties of palm oil and palmitic acid: effects on health. *Molecules*, 20(9), 17339-17361.
- Maytham, A. A. and Hanaa Jaffer, J. A., 2016. Isolation and Identification of Lipase producing Bacteria from oil-contaminant soil. *Journal of biology agriculture and healthcare*, 20(6), 1-7.
- Mobarak, Q., Kasra, K. and Moosavi, N., 2011. Isolation and identification of a novel, lipase producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* KM110. *Iranian journal of microbiology*, 3(2), 92-98.
- Mohamed, M. A., Mohamed, T. M., Mohamed S. A. and Fahmy, A. S. 2000. Distribution of lipases in the *Gramineae* partial purification and characterization of esterase from *Avena fatua*. *Bioresorchn thechnology*, 11, 227-234.
- Murphy, D. J., Goggin, K. and Paterson, R.R.M. 2021. Oil palm in the 2020s and beyond: challenges and solutions. *CABI agriculture and bioscience*, 2(1), 1-22.
- Murtius, W. S., Hari, P. D. and Putri, I. N. 2022. The Effect of incubation time to the activity of lipase produced by *Bacillus thuringiensis* on coconut (*Cocos nucifera* L.) dregs. San francisco: IOP Publishing.
- Purkan P., Indah T. L., Rizky A., Retno R. P. N., Wiwin A., Hamidah N., Sri S., Sofijan H., Wiwin R. and Seung W. K. 2020. Isolation of lipolyic bacteria from domestic waste compost and its application to biodiesel production. *Isolation of lipolyic bacteria*. 13(4), 2074-2084.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Ramnath, L., Sithole, B. and Govinden, R. 2017. Identification of lipolytic enzymes isolated from bacteria indigenous to Eucalyptus wood species for application in the pulping industry. *Biotechnology reports*. 15: 114-124
- Rana, Q.U.A., Rehman, M.L.U., Irfan, M., Ahmed, S., Hasan, F., Shah, A.A., Khan, S. and Badshah, M. 2018. Lipolytic bacterial strains mediated transesterification of non-edible plant oils for generation of high-quality biodiesel. *Journal of bioscience and bioengineering*. 127(5): 609-617.
- Sagar, K., Bashir, Y., Phukan, M. M. and Konwar, B. K. 2013. Isolation of lipolytic bacteria from waste contaminated soil: a study with regard to process optimization for lipase. *International journal of scientific & technology reseach*, 2(10), 214-218.
- Salvador, L.J.M. and Van Bogaert, I.N.A. 2021. Microbial fatty acid transport proteins and their biotechnological potential. *Biotechnology and bioengineering*. 118(6): 2184-2201.
- Schmidt-Dannert, C., Rua, M. L., Atomi, H. and Schmid, R. D. 1996. Thermoalkaliphilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochimica et biophysica acta*, 1301, 105-114.
- Shahani, K.W. 1975. Lipase and esterases. *Enzyme in food processing*. 181 – 217
- Sharma, R., Soni, S. K., Vohra, R. M., Jolly, R. S., Gupta, L. K. and Gupta, J. K. 2002. Production of an extracellular alkaline lipase from a new *Bacillus* sp. RSJ1 and its application in ester hydrolysis. *Indian journal of microbiology*, 42(1), 49-54.
- Singh, R., Gupta, N., Goswami, V. K. and Gupta, R. 2006. A simple activity staining protocol for lipases and esterases. *microbiology and biotechnology*, 70, 679-682.
- Sirisha, E., Rajasekar, N. and Narasu, M. L. 2010. Isolation and optimization of lipase producing bacteria from oil contaminated soils. *Advances in biological research*, 4(5), 249-252.
- Soriguer, F., Rojo-Martínez, G., Dobarganes, M.C., García Almeida, J. M., Esteve, I., Beltrán, M., Adana, M.S.R., Tinahones, F., Gómez-Zumaquero, J.M., García-Fuentes, E. and González-Romero, S. 2003. Hypertension is related to the degradation of dietary frying oils. *American journal of clinical nutrition*. 78(6): 1092-1097.

- Steiner, J.M. and Williams, D.A. 2002. Purification of classical pancreatic lipase from dog pancreas. *Biochimistry*, 84, 1243-1251.
- Sugihara, A., Shimada, Y., Nakamura, M., Nagao, T. and Tominaga Y. 1994. Positional and fatty acid specificities of geotrichum lipases. *Protein engineering*, 7, 585-588.
- Sugihara, A., Tani, T. and Tominaga, Y. 1991. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. *The Journal of biochemistry*, 109(2), 211-216.
- Tembhurkar, V. R., Kulkarni, M. B. and Peshwe, S. A. 2012. Optimization of Lipase Production by *Pseudomonas* spp. in submerged batch process in shake flask culture. *Science research reporter*, 2(1), 46-50.
- Ugochukwu, K.C, Agha, N.C. and Ogbulie, J.N. 2008. Lipase activities of microbial isolates from soil contaminated with crude oil after bioremediation. *African journal of biotechnology*. 7(16): 2881-2884.
- Veerapagu, M., Narayanan, A. S., Ponmurugan, K. and Jeya, K. R. 2013. Screening selection identification production and optimization of bacterial lipase from oil spilled soil. *Asian journal of pharmaceutical and clinical research*, 6(3), 62-67.
- Wikimedia Commons. 2020. Palm oils - outer pulp vs kernel from African oil palm- *Elaeis guineensis*. Retrieved January 26, 2020, from https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Palm_Oils_-_outer_pulp_vs_kernel_from_African_Oil_Palm_-_Elaeis_guineensis.jpg
- Willerding, A. L., Oliveira, L. A. D., Moreira, F. W., Germano, M. G. and Chagas, A. F. 2011. Lipase activity among bacteria isolated from Amazonian soils. *Enzyme research*, 2011.
- YU, H. W., Jun, H., Ning, L. I., QIE, X. S. and JIA, Y. M. 2009. Fermentation performance and characterization of cold-adapted lipase produced with *Pseudomonas* Lip35. *Agricultural sciences in China*, 8(8), 956-962.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar plates

Peptone	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Tributyrin	10	กรัม
Agar	15	กรัม

ทำการชั่งสารตามรายละเอียดที่ได้แสดงและนำไปละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร และนำไปละลายในเครื่องไมโครเวฟจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Phenol-red palm oil agar

Phenol red	0.1	กรัม
Palm oil	1.0	กรัม
CaCl ₂	1.0	กรัม
Agar	20	กรัม

ทำการชั่งสารตามรายละเอียดที่ได้แสดงและนำไปละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่า pH เท่ากับ 7.4 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 % และนำไปละลายในเครื่องไมโครเวฟ จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tween 20 agar (สำหรับการเตรียม 1000 มิลลิลิตร)

Peptone	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.1	กรัม
Agar	20	กรัม
Tween 20	10	ปริมาตรต่อปริมาตร

ทำการชั่งสารตามรายละเอียดที่ได้แสดงและนำไปละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร และนำไปละลายในเครื่องไมโครเวฟจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ

121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์หรือการขงนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.4. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Tween 80 agar (สำหรับการเตรียม 1000 มิลลิลิตร)

Peptone	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.1	กรัม
Agar	20	กรัม
Tween 80	10	มิลลิลิตร

ทำการชั่งสารตามรายละเอียดที่ได้แสดงและนำไปละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร และนำไปละลายในเครื่องไมโครเวฟจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.5. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (สำหรับการเตรียม 1000 มิลลิลิตร)

Peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

ทำการชั่งสารตามรายละเอียดที่ได้แสดงและนำไปละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร และนำไปละลายในเครื่องไมโครเวฟจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.6 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ส่วนประกอบของน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว (Ramnath et al., 2017)

Peptone	ร้อยละ 0.5	โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
Yeast extract	ร้อยละ 0.3	โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
น้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว	ร้อยละ 1	โดยปริมาตรต่อปริมาตร

ทำการชั่ง Pepton และ Yeast extract ตามรายละเอียดที่ได้แสดงนำไปละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร จากนั้นทำการปิเปตลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์ และทำการเติมน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วลงไป ฟลาสก์ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์ ทำการปิดขวดฟลาสก์ด้วยจุกสำลีและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

ข.1 การเตรียม 0.5 MCFarland standard

ข.1.1 สารละลายแบเรียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 1 %

แบเรียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 1.1728 กรัม

ชั่งแบเรียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 1.1728 กรัม นำไปละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

ข.1.2 สารละลายกรดซัลฟริก ความเข้มข้น 1 %

กรดซัลฟริก (H_2SO_4) ความเข้มข้นร้อยละ 95 1.05 มิลลิลิตร

ปิเปตกรดซัลฟริก (H_2SO_4) ความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร ปริมาตร 1.05 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 มิลลิลิตร

จากนั้นปิเปตสารละลายแบเรียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 % ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร กับสารละลายกรดซัลฟริก ความเข้มข้น 1 % ปริมาตร 9.95 มิลลิลิตร ใส่ลงหลอดทดลองและผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนิ่งมาเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในหม้อหุงต้มอัตโนมัติ

ข.2. สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ฟีนอล์ฟทาลีน 1 กรัม

เอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตรต่อปริมาตร 60 มิลลิลิตร

ละลายฟีนอล์ฟทาลีน 1 กรัม ในเอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ปริมาตร 60 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตร

ข.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 4.0 กรัม

น้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

นำโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH ; มวลโมเลกุล = 40 กรัม/โมล) 4.0 กรัม มาค่อย ละลายในน้ำ

กลั่น จากนั้นทำการปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร ใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.4 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

สารละลาย ก : สารละลายของโมโนโซเดียมฟอสเฟตไดไฮเดรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ทำการละลายโมโนโซเดียมฟอสเฟตไดไฮเดรต ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; มวลโมเลกุล = 156.0 กรัม/โมล) 15.6 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

สารละลาย ข : สารละลายของไดโซเดียมฟอสเฟตไดไฮเดรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ทำการละลายสารไดโซเดียมฟอสเฟตไดไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; มวลโมเลกุล = 178.0 กรัม/โมล) 17.8 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ทำการเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยทำการผสมสารละลาย ก กับสารละลาย ข ตามสัดส่วนที่แสดงใน ตารางที่ ข.2 (Gomori, 1955)

ตาราง ข.2 แสดงการเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate Buffer) ที่พีเอชต่าง ๆ

พีเอช	สารละลาย ก (มิลลิลิตร)	สารละลาย ข (มิลลิลิตร)
6.0	87.7	12.3
6.1	85.0	15.0
6.2	81.5	18.5
6.3	77.5	22.5
6.4	73.5	26.5
6.5	68.5	31.5
6.6	62.5	37.5
6.7	56.5	43.5
6.8	51.0	49.0
6.9	45.0	55.0
7.0	39.0	61.0
7.1	33.0	67.0
7.2	23.0	72.0
7.3	23.0	77.0
7.4	19.0	81.0
7.5	16.0	84.0
7.6	13.0	87.0

ที่มา : Gomori, 1995

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.5 สารละลายมาตรฐานโปรตีน ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

Bovine serum albumin (BSA)	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย Bovine serum albumin (BSA) 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร และเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (อารี, 2559)

ข.6 สารละลาย Folin-Clocalteu ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

สารละลาย Folin-Clocalteu ความเข้มข้น 2 นอร์มอล

นำสารละลาย Folin-Clocalteu ความเข้มข้น 2 นอร์มอล มาทำเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 (เตรียมเมื่อต้องการใช้) (อารี, 2559)

ข.7 สารละลายอัลคาไลคอปเปอร์ (Alkali copper)

สารละลาย ก

โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	20	กรัม
สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์	1000	มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยทำการชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (มวลโมเลกุลของ NaOH = 39.997) 3.9997 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 20 กรัม ลงในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

สารละลาย ข

คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	5	กรัม
โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตเตตระไฮเดรต ($\text{KNa}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	10	กรัม

นำโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตเตตระไฮเดรต ($\text{KNa}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นเติมคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 5 กรัม ลงไปแล้วผสมให้เข้ากัน

จากนั้นนำสารละลาย ก และ สารละลาย ข มาผสมกันในสัดส่วน ดังนี้

สารละลาย ก	50	มิลลิลิตร
------------	----	-----------

สารละลาย ข	1	มิลลิลิตร
------------	---	-----------

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

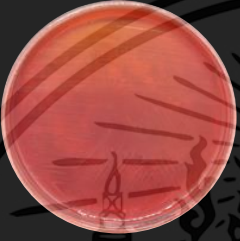


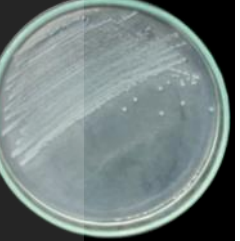



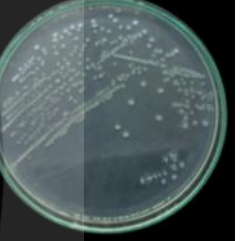



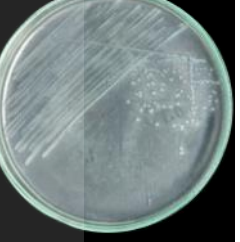


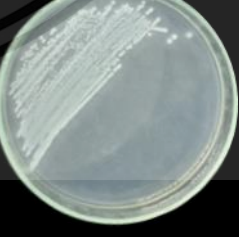
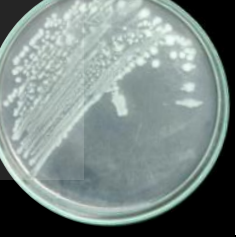


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง

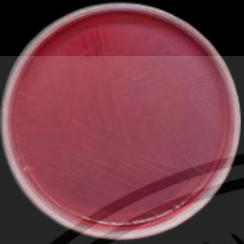
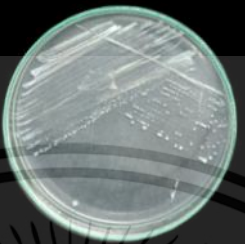
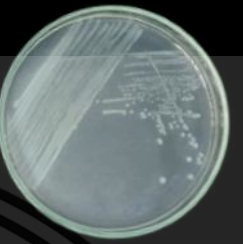
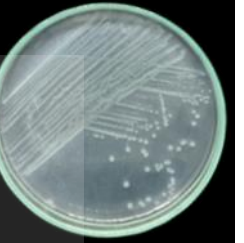



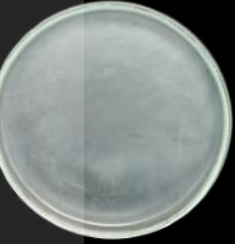






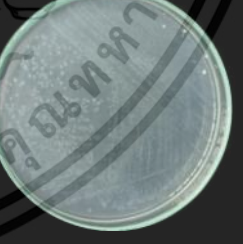
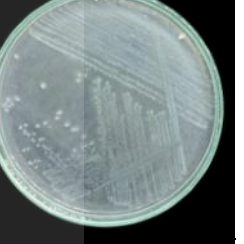


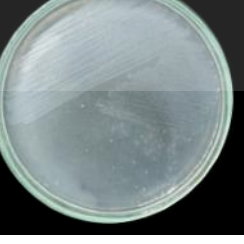
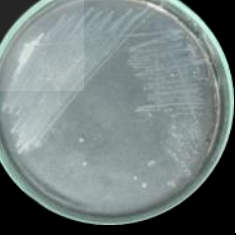
ตารางที่ ค.1 ผลการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Phenol red palm oil agar, Tributyrine agar, Tween 80 agar และ Tween 20 agar

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ผลการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง			
		Phenol red palm oil agar	Tributyrine agar	Tween 80 agar	Tween 20 agar
1	WMB01-1				
2	WMB01-2				
3	WMB01-3				
4	WMB01-4				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

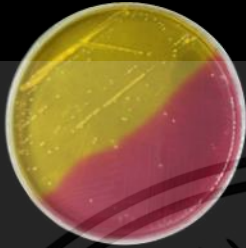















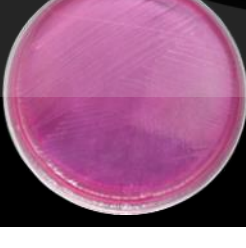



ตารางที่ ค.1 (ต่อ) ผลการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Phenol red palm oil agar, Tributyrine agar, Tween 80 agar และ Tween 20 agar

ผลการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

ลำดับ	รหัสเชื้อ	Phenol red palm oil agar	Tributyrine agar	Tween 80 agar	Tween 20 agar
5	WMB01-5				
6	WMB01-6				
7	WMB01-7				
8	WLB02-1				
9	WLB02-2				

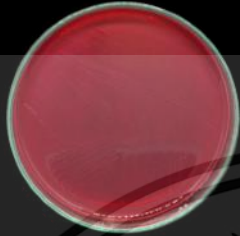





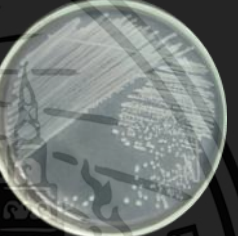







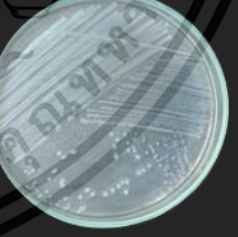





เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) ผลการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Phenol red palm oil agar, Tributyrine agar, Tween 80 agar และ Tween 20 agar

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ผลการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง			
		Phenol red palm oil agar	Tributyrine agar	Tween 80 agar	Tween 20 agar
10	WLB02-3				
11	WLB02-4				
12	WLB02-5				
13	WLB02-6				
14	WLB02-7				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) ผลการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Phenol red palm oil agar, Tributyrine agar, Tween 80 agar และ Tween 20 agar

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ผลการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง			
		Phenol red palm oil agar	Tributyrine agar	Tween 80 agar	Tween 20 agar
15	WLB02-8				
16	WLB02-9				
17	WLB02-10				
18	WLB02-11				
19	WLB02-12				


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) ผลการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Phenol red palm oil agar, Tributyrine agar, Tween 80 agar และ Tween 20 agar

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ผลการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง			
		Phenol red palm oil agar	Tributyrine agar	Tween 80 agar	Tween 20 agar
20	WLB02-13				
21	WLB02-14				
22	WLB02-15				
23	WLB02-16				
24	WLB02-17				


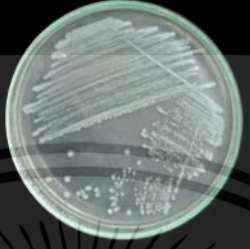

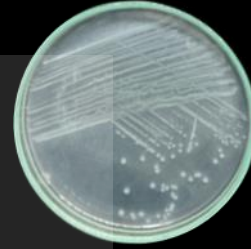



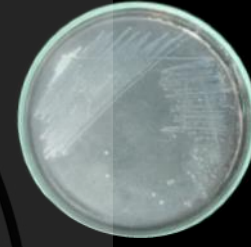



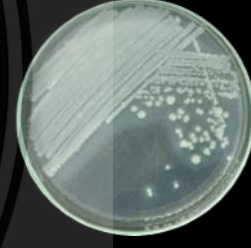



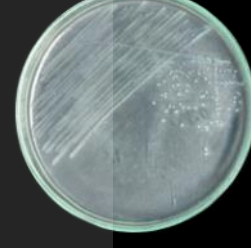
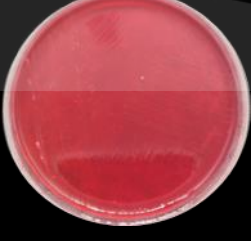



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) ผลการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Phenol red palm oil agar, Tributyrine agar, Tween 80 agar และ Tween 20 agar

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ผลการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง			
		Phenol red palm oil agar	Tributyrine agar	Tween 80 agar	Tween 20 agar
25	WLB02-18				
26	WLB02-19				
27	WLB03-1				
28	WLB03-2				
29	WLB03-3				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้


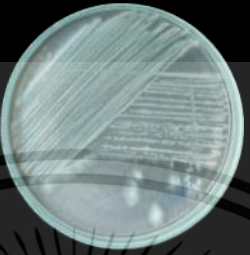
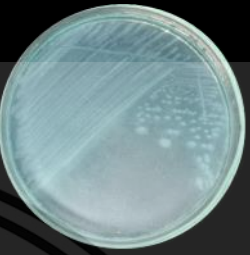
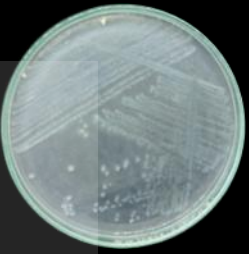


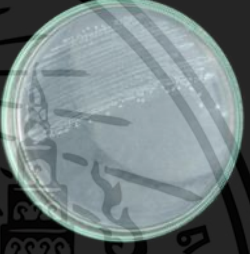
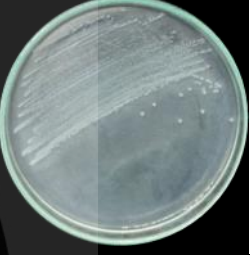



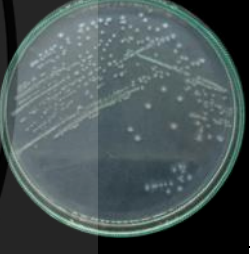



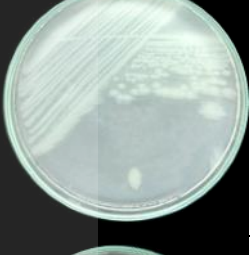




ตารางที่ ค.1 (ต่อ) ผลการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Phenol red palm oil agar, Tributyrine agar, Tween 80 agar และ Tween 20 agar

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ผลการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง			
		Phenol red palm oil agar	Tributyrine agar	Tween 80 agar	Tween 20 agar
30	WLB03-4				
31	WLB03-5				
32	WLB03-6				
33	WLB03-7				
34	WLB03-8				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้


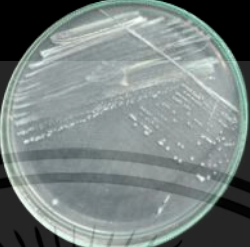

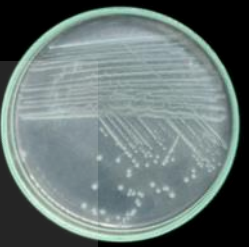


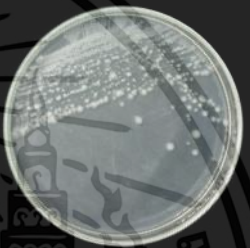
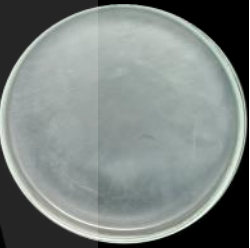







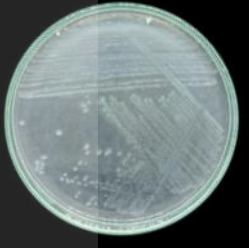

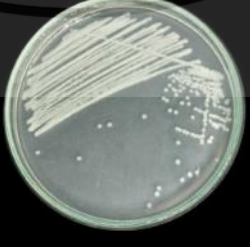
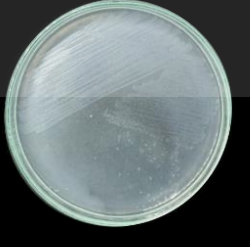
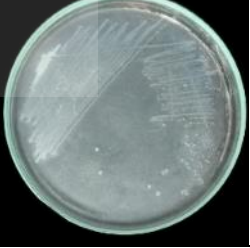
ตารางที่ ค.1 (ต่อ) ผลการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Phenol red palm oil agar, Tributyrine agar, Tween 80 agar และ Tween 20 agar

ผลการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

ลำดับ	รหัสเชื้อ	Phenol red palm oil agar	Tributyrine agar	Tween 80 agar	Tween 20 agar
35	WLB03-9				
36	WLB04-1				
37	WLB04 -2				
38	WLB04-3				
39	WLB04-4				



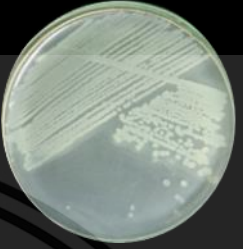
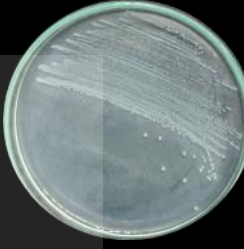










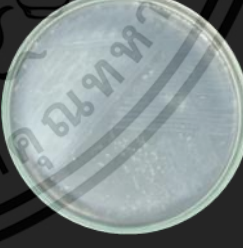

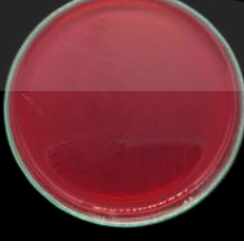

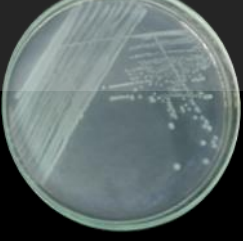

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) ผลการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Phenol red palm oil agar, Tributyrine agar, Tween 80 agar และ Tween 20 agar

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ผลการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง			
		Phenol red palm oil agar	Tributyrine agar	Tween 80 agar	Tween 20 agar
40	WLB04-5				
41	WLB04-6				
42	WLB04-7				
43	WLB04-8				
44	WLB04-9				








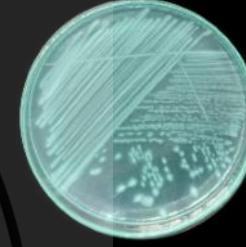






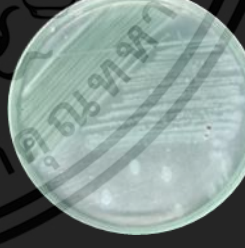
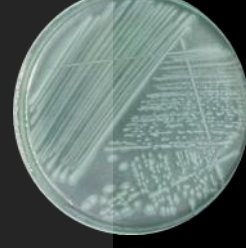
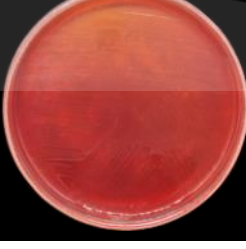


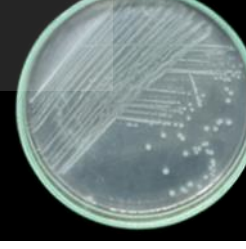
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) ผลการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Phenol red palm oil agar, Tributyrine agar, Tween 80 agar และ Tween 20 agar

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ผลการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง			
		Phenol red palm oil agar	Tributyrine agar	Tween 80 agar	Tween 20 agar
45	WLB04-10				
46	WLB04-11				
47	WLB04-12				
48	WLB04-13				
49	WLB04-14				


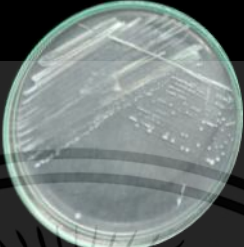





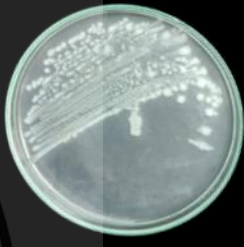






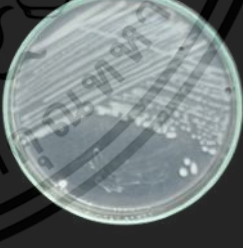
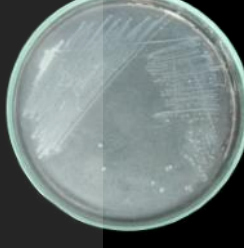
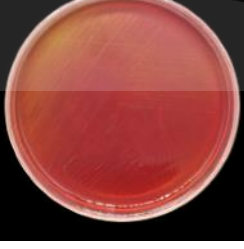



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) ผลการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Phenol red palm oil agar, Tributyrine agar, Tween 80 agar และ Tween 20 agar

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ผลการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง			
		Phenol red palm oil agar	Tributyrine agar	Tween 80 agar	Tween 20 agar
50	SLB01-1				
51	SLB01-2				
52	SLB01-3				
53	SLB01-4				
54	SLB01-5				


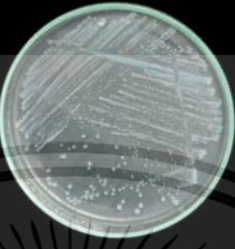













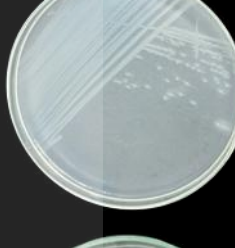
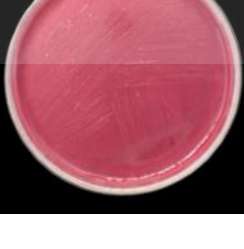

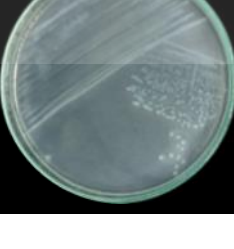

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) ผลการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Phenol red palm oil agar, Tributyrine agar, Tween 80 agar และ Tween 20 agar

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ผลการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง			
		Phenol red palm oil agar	Tributyrine agar	Tween 80 agar	Tween 20 agar
55	SSM01-1				
56	SSM02-2				
57	SSM02-3				
58	SSM02-4				
59	SSM02-5				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) ผลการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Phenol red palm oil agar, Tributyrine agar, Tween 80 agar และ Tween 20 agar

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ผลการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง			
		Phenol red palm oil agar	Tributyrine agar	Tween 80 agar	Tween 20 agar
60	SSM02-6				
61	SSM02-7				
62	SBK01-1				
63	SBK02-2				
64	SBK02-3				

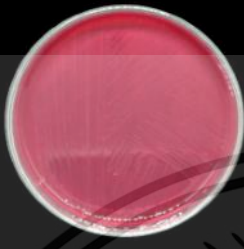
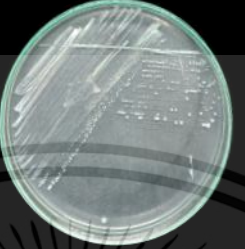
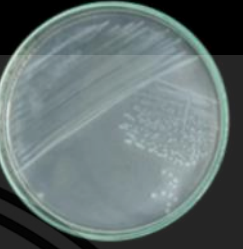
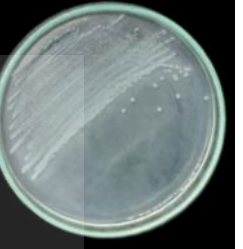



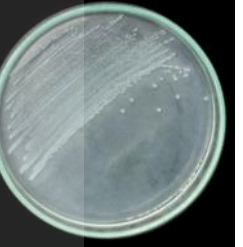







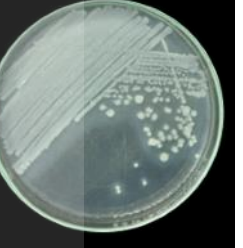
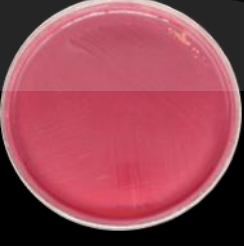

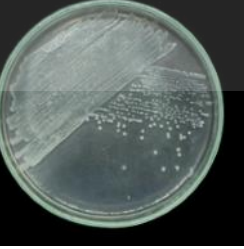
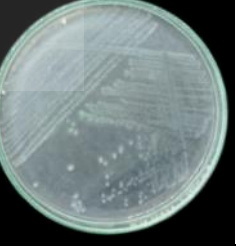
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) ผลการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Phenol red palm oil agar, Tributyrine agar, Tween 80 agar และ Tween 20 agar

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ผลการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง			
		Phenol red palm oil agar	Tributyrine agar	Tween 80 agar	Tween 20 agar
65	SBK02-4				
66	SBK02-5				
67	SBK02-6				
68	SBK02-7				
69	SBK02-8				


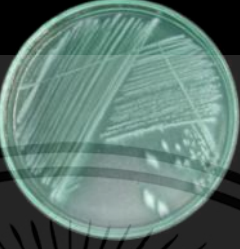
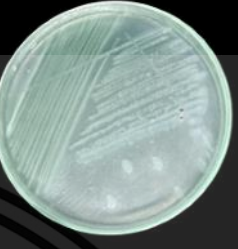
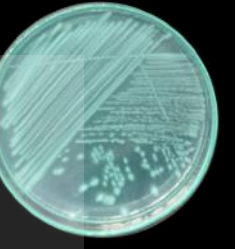







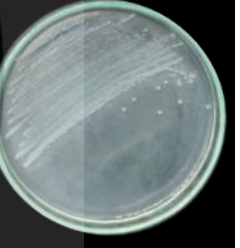



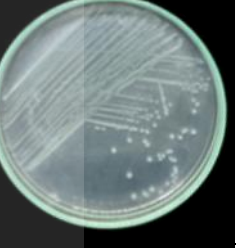


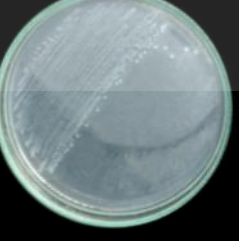
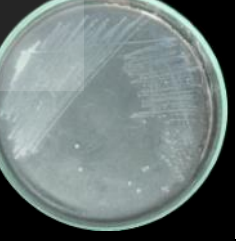
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) ผลการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Phenol red palm oil agar, Tributyrine agar, Tween 80 agar และ Tween 20 agar

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ผลการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง			
		Phenol red palm oil agar	Tributyrine agar	Tween 80 agar	Tween 20 agar
70	SBK03-1				
71	BSM02-1				
72	BSM02-2				
73	BSM02-3				
74	BBK02-1				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) ผลการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Phenol red palm oil agar, Tributyrine agar, Tween 80 agar และ Tween 20 agar

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ผลการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง			
		Phenol red palm oil agar	Tributyrine agar	Tween 80 agar	Tween 20 agar
75	BBK02-2				
76	BBK02-3				
77	BBK02-4				
78	BBK02-5				
79	BBK02-6				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.2 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Phenol red palm oil agar

ลำดับ	รหัสไอโซเลท	ผลการแสดงออก
1	WMB01-1	ไม่เปลี่ยนสี
2	WMB01-2	ไม่เปลี่ยนสี
3	WMB01-3	ไม่เปลี่ยนสี
4	WMB01-4	ไม่เปลี่ยนสี
5	WMB01-5	ไม่เปลี่ยนสี
6	WMB01-6	ไม่เปลี่ยนสี
7	WMB01-7	ไม่เปลี่ยนสี
8	WLB02-1	ไม่เปลี่ยนสี
9	WLB02-2	เปลี่ยนสี
10	WLB02-3	เปลี่ยนสี
11	WLB02-4	ไม่เปลี่ยนสี
12	WLB02-5	ไม่เปลี่ยนสี
13	WLB02-6	ไม่เปลี่ยนสี
14	WLB02-7	ไม่เปลี่ยนสี
15	WLB02-8	ไม่เปลี่ยนสี
16	WLB02-9	ไม่เปลี่ยนสี
17	WLB02-10	ไม่เปลี่ยนสี
18	WLB02-11	ไม่เปลี่ยนสี
19	WLB02-12	ไม่เปลี่ยนสี
20	WLB02-13	ไม่เปลี่ยนสี
21	WLB02-14	ไม่เปลี่ยนสี
22	WLB02-15	ไม่เปลี่ยนสี
23	WLB02-16	ไม่เปลี่ยนสี
24	WLB02-17	ไม่เปลี่ยนสี
25	WLB02-18	ไม่เปลี่ยนสี
26	WLB02-19	เปลี่ยนสี
27	WLB03-1	ไม่เปลี่ยนสี
28	WLB03-2	ไม่เปลี่ยนสี
28	WLB03-2	ไม่เปลี่ยนสี
29	WLB03-3	ไม่เปลี่ยนสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.2 (ต่อ) ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Phenol red palm oil agar

ลำดับ	รหัสไอโซเลท	ผลการแสดงออก
30	WLB03-4	ไม่เปลี่ยนสี
31	WLB03-5	ไม่เปลี่ยนสี
32	WLB03-6	เปลี่ยนสี
33	WLB03-7	ไม่เปลี่ยนสี
34	WLB03-8	ไม่เปลี่ยนสี
35	WLB03-9	ไม่เปลี่ยนสี
36	WLB04-1	เปลี่ยนสี
37	WLB04 -2	เปลี่ยนสี
38	WLB04-3	เปลี่ยนสี
39	WLB04-4	เปลี่ยนสี
40	WLB04-5	ไม่เปลี่ยนสี
41	WLB04-6	ไม่เปลี่ยนสี
42	WLB04-7	ไม่เปลี่ยนสี
43	WLB04-8	ไม่เปลี่ยนสี
44	WLB04-9	ไม่เปลี่ยนสี
45	WLB04-10	ไม่เปลี่ยนสี
46	WLB04-11	เปลี่ยนสี
47	WLB04-12	ไม่เปลี่ยนสี
48	WLB04-13	ไม่เปลี่ยนสี
49	WLB04-14	ไม่เปลี่ยนสี
50	SLB01-1	ไม่เปลี่ยนสี
51	SLB01-2	ไม่เปลี่ยนสี
52	SLB01-3	ไม่เปลี่ยนสี
53	SLB01-4	ไม่เปลี่ยนสี
54	SLB01-5	เปลี่ยนสี
55	SSM01-1	ไม่เปลี่ยนสี
56	SSM02-1	ไม่เปลี่ยนสี
57	SSM02-2	ไม่เปลี่ยนสี
58	SSM02-3	ไม่เปลี่ยนสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งหากนำไปใช้

ตารางที่ ค.2 (ต่อ) ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Phenol red palm oil agar

ลำดับ	รหัสไอโซเลท	ผลการแสดงออก
59	SSM02-4	เปลี่ยนสี
60	SSM02-5	ไม่เปลี่ยนสี
61	SSM02-6	ไม่เปลี่ยนสี
62	SBK01-1	เปลี่ยนสี
63	SBK02-2	เปลี่ยนสี
64	SBK02-3	ไม่เปลี่ยนสี
65	SBK02-4	ไม่เปลี่ยนสี
66	SBK02-5	เปลี่ยนสี
67	SBK02-6	ไม่เปลี่ยนสี
68	SBK02-7	ไม่เปลี่ยนสี
69	SBK02-8	ไม่เปลี่ยนสี
70	SBK03-1	ไม่เปลี่ยนสี
71	BSM02-1	ไม่เปลี่ยนสี
72	BSM02-2	เปลี่ยนสี
73	BSM02-3	ไม่เปลี่ยนสี
74	BBK02-1	ไม่เปลี่ยนสี
75	BBK02-2	ไม่เปลี่ยนสี
76	BBK02-3	ไม่เปลี่ยนสี
77	BBK02-4	ไม่เปลี่ยนสี
78	BBK02-5	ไม่เปลี่ยนสี
79	BBK02-6	เปลี่ยนสี

หมายเหตุ : ไม่มีการเปลี่ยนสี (ผลลบ) มีการเปลี่ยนสีอาหาร (ผลบวก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3 ผลการวัดขนาดของโคโลนีและความกว้างของโซนใส (Clear zone) ที่ล้อมรอบโคโลนีของเชื้อ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar (ต่อ)

ลำดับ	รหัสไอโซเลท	ขนาดโคโลนี (mm)								ขนาดเคลียร์โซน (mm)								หมายเหตุ
		แกน X				แกน Y				แกน X				แกน Y				
		1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
1	WMB01-1	1.58	1.74	1.58	1.63±0.09	1.94	1.54	1.78	1.75±0.20	4.92	4.86	5.06	4.95±0.10	6.08	5.60	5.62	5.77±0.27	
2	WMB01-2	2.92	2.96	1.48	2.45±0.84	2.82	2.64	1.68	2.38±0.61	3.6	3.64	3.66	3.63±0.33	4.34	4.4	4.56	4.43±0.11	
3	WMB01-3	2.16	2.02	1.50	1.89±0.35	2.04	1.50	1.50	1.68±0.31	3.42	3.46	3.4	3.43±0.03	4.92	4.70	5.06	4.89±0.18	
4	WMB01-4	2.42	2.5	2.34	2.42±0.08	2.5	2.42	2.54	2.49±0.06	4.06	4.24	4.18	4.16±0.09	4.52	4.66	4.84	4.67±0.16	
5	WMB01-5	2.02	2.14	2.26	2.14±0.12	2.32	2.24	2.3	2.29±0.04	3.22	3.34	3.46	3.34±0.12	4.08	4.12	4.2	4.13±0.06	
6	WMB01-6	2.30	2.26	2.12	2.23±0.09	1.98	2.14	2.28	2.13±0.15	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
7	WMB01-7	2.32	1.78	1.92	2.01±0.28	2.76	1.88	2.10	2.25±0.46	4.22	4.34	4.4	4.32±0.09	5	5.02	5.24	5.09±0.13	
8	WLB02-1	2.16	1.98	2.28	2.14±0.15	1.58	1.32	2.32	1.74±0.52	3.24	3.34	3.4	3.33±0.08	3.66	3.52	3.92	3.70±0.20	
9	WLB02-2	2.46	2.30	1.98	2.25±0.24	2.40	2.10	2.06	2.19±0.19	3.64	3.42	3.58	3.55±0.11	4.02	4.12	4.24	4.13±0.11	
10	WLB02-3	2.50	2.96	2.20	2.55±0.38	2.52	2.80	2.02	2.45±0.40	3.5	3.42	3.34	3.42±0.08	3.62	3.74	3.68	3.68±0.06	
11	WLB02-4	2.50	3.20	2.46	2.72±0.42	2.56	2.92	2.44	2.64±0.25	4.12	4.22	4.06	4.13±0.08	4.66	4.52	4.6	4.59±0.07	
12	WLB02-5	2.42	3.02	2.76	2.73±0.30	2.56	2.50	2.70	2.59±0.10	3.02	3.16	3.12	3.10±0.07	3.42	3.34	3.22	3.33±0.10	
13	WLB02-6	2.98	1.86	1.84	2.23±0.65	1.92	1.48	2.20	1.87±0.36	2.52	2.5	2.56	2.53±0.03	2.66	2.82	2.94	2.81±0.14	
14	WLB02-7	6.10	8.96	8.74	7.93±1.59	4.90	6.78	8.62	6.77±1.86	3.12	3.24	3.36	3.24±0.12	3.6	3.64	3.62	3.26±0.02	
15	WLB02-8	2.12	2.05	2.32	2.16±0.14	2.20	2.24	2.4	2.28±0.11	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
16	WLB02-9	3.70	3.02	4.20	3.64±0.59	3.20	2.90	3.28	3.13±0.20	3.2	3.36	3.42	3.33±0.11	3.66	3.82	4.02	3.83±0.18	

ตารางที่ ค.3 (ต่อ) ผลการวัดขนาดของโคโลนีและความกว้างของโซนใส (Clear zone) ที่ล้อมรอบโคโลนีของเชื้อ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar (ต่อ)

ลำดับ	รหัสไอโซเลท	ขนาดโคโลนี (mm)								ขนาดเคลียร์โซน (mm)								หมายเหตุ
		แกน X				แกน Y				แกน X				แกน Y				
		1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
17	WLB02-10	2.24	2.06	2.80	2.37±0.39	1.78	2.38	2.8	2.32±0.51	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
18	WLB02-11	2.12	2.16	2.40	2.23±0.15	1.80	1.24	1.98	1.67±0.39	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
19	WLB02-12	2.48	2.96	1.70	2.38±0.64	2.48	2.32	2.26	2.35±0.11	4.14	4.2	4.46	4.27±0.17	7.06	7.66	6.80	7.17±0.44	
20	WLB02-13	3.70	3.54	4.76	4.00±0.66	3.44	2.98	2.86	3.09±0.31	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
21	WLB02-14	8.92	6.42	5.80	7.05±1.65	6.66	6.52	6.4	6.65±0.13	13.3	10.30	9.20	10.93±2.12	9.62	7.46	6.20	7.76±1.73	
22	WLB02-15	5.26	5.66	5.42	5.54±0.20	4.44	4.26	4.5	4.40±0.12	6.64	8.02	6.40	7.02±0.87	5.30	6.58	6.72	6.20±0.78	
23	WLB02-16	3.74	3.92	3.82	3.83±0.09	3.5	3.66	3.8	3.65±0.15	8.04	7.42	8.14	7.87±0.39	7.20	7.56	6.58	7.11±0.50	
24	WLB02-17	5.70	8.28	9.38	7.79±1.89	3.38	3.60	4.46	3.81±0.57	10.34	12.64	14.42	12.47±2.05	9.48	9.50	10.9	9.96±0.81	
25	WLB02-18	1.94	2.46	1.34	1.91±0.56	1.60	2.00	1.30	1.63±0.35	5.64	4.60	5.10	5.11±0.52	4.82	4.92	6.47	5.40±0.93	
26	WLB02-19	1.54	1.68	2.80	2.01±0.69	2.20	2.46	1.94	2.20±0.26	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
27	WLB03-1	3.42	3.5	3.44	3.45±0.04	3.52	3.6	3.54	3.55±0.04	5.66	5.72	5.9	5.76±0.12	6.3	6.22	6.5	6.34±0.14	
28	WLB03-2	2.50	3.46	3.28	3.08±0.51	2.16	2.20	3.48	2.61±0.75	5.22	6.18	5.86	5.75±0.46	6.22	6.32	6.2	6.25±0.06	
29	WLB03-3	2.55	3.06	2.28	2.63±0.40	1.98	2.58	2.76	2.44±0.41	4.86	5.56	5.56	5.33±0.40	4.98	5.12	5.90	5.33±0.50	
30	WLB03-4	3.00	2.50	3.15	2.88±0.34	3.60	3.02	2.96	3.19±0.35	3.64	3.66	3.72	3.67±0.04	4.98	6.46	5.76	5.73±0.74	
31	WLB03-5	2.00	3.02	1.56	2.19±0.75	3.64	2.58	2.82	3.01±0.56	3.62	3.42	3.5	3.51±0.10	4	4.26	4.74	4.33±0.38	
32	WLB03-6	2.00	2.82	2.97	2.60±0.52	1.88	2.68	2.94	2.50±0.55	4.76	5.80	4.48	5.01±0.70	4.56	6.16	5.70	5.47±0.82	

ตารางที่ ค.3 (ต่อ) ผลการวัดขนาดของโคโลนีและความกว้างของโซนใส (Clear zone) ที่ล้อมรอบโคโลนีของเชื้อ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar (ต่อ)

ลำดับ	รหัสไอโซเลท	ขนาดโคโลนี (mm)								ขนาดเคลียร์โซน (mm)								หมายเหตุ
		แกน X				แกน Y				แกน X				แกน Y				
		1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
33	WLB03-7	3.10	3.84	4.66	3.87±0.78	2.88	2.90	3.60	3.13±0.41	7.40	6.68	6.89	6.99±0.37	5.58	6.02	7.22	6.27±0.85	
34	WLB03-8	1.94	1.56	2.24	1.91±0.34	1.74	1.50	2.34	1.86±0.43	2.4	2.62	2.5	2.51±0.11	2.66	2.8	3	2.82±0.17	
35	WLB03-9	3.62	3.5	3.46	3.53±0.08	3.34	3.22	3.42	3.33±0.10	5.48	5.44	5.76	5.56±0.17	4.86	5.98	4.78	5.21±0.67	
36	WLB04-1	1.76	2.06	2.64	2.15±0.45	1.98	1.86	2.24	2.03±0.19	3.14	3.22	3.2	3.19±0.04	3.42	3.34	3.4	3.39±0.04	
37	WLB04 -2	5.02	3.76	3.64	4.14±0.76	4.90	3.42	4.90	4.41±0.85	7.28	7.02	8.48	7.59±0.78	8.18	7.68	8.56	8.14±0.44	
38	WLB04-3	2.08	3.14	1.90	2.37±0.67	2.66	2.78	2.48	2.64±0.15	3.02	3.14	3.22	3.13±0.10	3.5	3.42	3.38	3.43±0.06	
39	WLB04-4	1.42	1.98	1.22	1.54±0.39	1.48	1.84	1.48	1.60±0.21	4.66	3.44	3.76	3.95±0.63	3.56	3.16	4.56	3.76±0.72	
40	WLB04-5	1.38	1.56	1.56	1.50±0.10	1.54	1.72	1.68	1.65±0.09	3.50	3.88	4.30	3.89±0.40	4.26	4.80	4.46	4.51±0.27	
41	WLB04-6	3.52	4.08	3.66	3.75±0.29	3.48	3.64	3.32	3.48±0.16	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
42	WLB04-7	2.56	2.34	2.44	2.45±0.11	2.98	3.7	2.68	3.12±0.52	3.02	3.22	3.12	3.12±0.10	3.42	3.44	3.46	3.44±0.02	
43	WLB04-8	1.56	1.7	2.16	1.81±0.31	1.32	2.02	2.36	1.90±0.53	3.92	4.82	4.22	4.32±0.46	4.32	5.02	5.74	5.03±0.71	
44	WLB04-9	2.22	2.16	1.98	2.12±0.12	2.46	2	1.82	2.09±0.33	5.64	5.02	4.32	4.99±0.66	6.04	5.9	4.98	5.64±0.58	
45	WLB04-10	1.62	2.04	2.12	1.93±0.27	2.02	2.36	2.28	2.22±0.18	4.44	5.68	6.12	5.41±0.87	5.14	5.68	5.98	5.60±0.43	
46	WLB04-11	5.46	3.92	4.08	4.49±0.85	1.86	1.94	1.92	1.91±0.04	7.76	6.18	6.96	6.97±0.79	4.32	4.38	3.8	4.17±0.32	
47	WLB04-12	2.18	2.5	2.82	2.50±0.32	2.6	2.76	3.16	2.84±0.29	4.88	5.68	4.9	5.15±0.46	5.84	6.96	5.1	5.97±0.94	
48	WLB04-13	7.4	4.64	4.74	5.59±1.57	2.96	2	2.1	2.35±0.53	8.44	6.84	7.58	7.62±0.80	5.52	4.84	3.92	4.76±0.80	

ตารางที่ ค.3 (ต่อ) ผลการวัดขนาดของโคโลนีและความกว้างของโซนใส (Clear zone) ที่ล้อมรอบโคโลนีของเชื้อ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar (ต่อ)

ลำดับ	รหัสไอโซเลท	ขนาดโคโลนี (mm)								ขนาดเคลียร์โซน (mm)								หมายเหตุ
		แกน X				แกน Y				แกน X				แกน Y				
		1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
49	WLB04-14	2.56	2.6	2.38	2.51±0.12	3.08	3.2	3.12	3.13±0.06	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
50	SLB01-1	3	3.06	3.42	3.16±0.23	4.6	4.28	4.8	4.56±0.26	4.02	4.38	4.96	4.45±0.47	5.00	5.68	5.32	5.33±0.34	
51	SLB01-2	3.44	3.52	3.3	3.42±0.11	2.06	2.48	3.02	2.52±0.48	2.38	2.6	2.98	2.65±0.30	3.06	3.54	3.8	3.47±0.38	
52	SLB01-3	3.66	3.52	3.4	3.53±0.13	2	2.56	2.48	2.35±0.30	3.08	3.00	3.56	3.21±0.30	4.06	4.28	4.44	4.26±0.19	
53	SLB01-4	3.26	3.18	3.02	3.15±0.12	2.58	2.62	3	2.73±0.23	3.5	3.68	3.74	3.64±0.12	4.50	4.68	4.24	4.47±0.22	
54	SLB01-5	1.32	1.02	1.22	1.19±0.15	2.04	2.6	2.84	2.49±0.41	2.02	2.00	2.30	2.11±0.17	2.09	2.2	3.0	2.43±0.50	
55	SSM01-1	2.9	2.66	2.82	2.79±0.12	3.02	3.14	3.18	3.11±0.08	2.42	2.4	2.5	2.44±0.05	2.92	3.02	3.1	3.01±0.09	
56	SSM02-1	2.34	2.6	2.5	2.48±0.13	2.58	2.72	2.66	2.65±0.07	3.08	3.42	3.5	3.33±0.22	4.2	4.68	4.56	4.48±0.25	
57	SSM02-2	2.86	2.56	2.1	2.51±0.38	2.76	2.22	2.96	2.65±0.38	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
58	SSM02-3	2.52	3.2	3.42	3.05±0.47	2	2.96	2.8	2.59±0.51	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
59	SSM02-4	2	2.44	2.66	2.37±0.34	1.8	2	2.64	2.15±0.44	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
60	SSM02-5	5.76	4.26	4.62	4.88±0.78	3.24	2.98	3.22	3.15±0.14	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
61	SSM02-6	1.42	1.2	1.02	1.21±0.2	2.48	2.00	2.56	2.35±0.30	3.5	3.62	3.38	3.50±0.12	3.74	3.6	3.44	3.59±0.15	
62	SBK01-1	2.52	2.43	2.34	2.45±0.09	2.68	2.66	2.56	2.63±0.06	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
63	SBK02-2	3.18	2.56	2.46	2.73±0.39	3.16	2.2	2.44	2.60±0.50	3.48	3.82	3.66	3.65±0.17	3.8	3.42	3.64	3.62±0.19	
64	SBK02-3	2.06	1.88	2.48	2.14±0.31	1.84	1.48	2.1	1.81±0.31	2.52	2.8	2.34	2.55±0.23	2.46	2.8	2.68	2.65±0.17	

ตารางที่ ค.3 (ต่อ) ผลการวัดขนาดของโคโลนีและความกว้างของโซนใส (Clear zone) ที่ล้อมรอบโคโลนีของเชื้อ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar (ต่อ)

ลำดับ	รหัส ไอโซเลท	ขนาดโคโลนี (mm)								ขนาดเคลียร์โซน (mm)								หมายเหตุ
		แกน X				แกน Y				แกน X				แกน Y				
		1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
65	SBK02-4	3.52	2.98	3.1	3.20±0.28	2.76	2.52	2.6	2.63±0.12	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
66	SBK02-5	3.7	3.62	3.12	3.48±0.31	4.12	2.78	3.44	3.45±0.67	6.66	5.62	6.9	6.39±0.68	6.98	6.08	6.92	6.66±0.50	
67	SBK02-6	3.34	3.22	3.26	3.27±0.06	2.24	2.04	2.12	2.13±0.10	3.44	3.24	3.68	3.45±0.22	4.02	4.22	4.64	4.29±0.32	
68	SBK02-7	2.82	1.22	1.18	1.74±0.94	2.22	1.1	1.28	1.53±0.60	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
69	SBK02-8	3.02	3.1	3.24	3.12±0.11	2.54	2.32	2.08	2.31±0.23	3.08	3.2	3.04	3.11±0.08	4	4.82	4.64	4.49±0.43	
70	SBK03-1	4.78	4.66	4.34	4.59±0.23	2.98	2.64	2.78	2.80±0.17	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
71	BSM02-1	2.04	2.96	2.64	2.55±0.47	1.82	1.68	1.9	1.80±0.11	2.2	2.32	2.24	2.25±0.06	2.02	2.38	2.74	2.38±0.36	
72	BSM02-2	1.98	2.02	1.56	1.85±0.25	2	1.98	1.78	1.92±0.12	2.58	2.3	2.42	2.43±0.14	2.6	2.66	2.84	2.70±0.12	
73	BSM02-3	5.44	5.6	4.82	5.29±0.41	4.08	4.62	4.72	4.47±0.34	6.82	6.32	6.8	6.65±0.28	7.42	7.02	6.98	7.14±0.24	
74	BBK02-1	3.28	3.82	4.02	3.71±0.38	2.56	2.78	2.8	2.71±0.13	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
75	BBK02-2	2.32	2.8	2.64	2.59±0.24	2.01	2.42	2.3	2.24±0.21	4.52	4.98	4.66	4.72±0.24	5.80	5.46	5.04	5.43±0.38	
76	BBK02-3	1.6	1.84	2	1.81±0.20	2.94	2.62	2.32	2.63±0.31	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
77	BBK02-4	2.66	2.32	2.48	2.49±0.17	2.88	2.64	2.8	2.77±0.12	2.02	2.98	2.5	2.50±0.48	2.56	2.72	2.3	2.53±0.21	
78	BBK02-5	2.58	2.46	2.32	2.45±0.13	1.98	1.68	1.86	1.84±0.15	3.88	3.52	2.98	3.46±0.045	4.52	4.92	4.6	4.68±0.21	
79	BBK02-6	4.56	4.02	4.38	4.32±0.27	2.62	2.34	2.76	2.57±0.21	6.20	4.32	4.60	5.04±1.01	6.76	4.56	4.66	5.33±1.24	

ตารางที่ ค.4 ผลการวัดขนาดของโคโลนีและความกว้างของโซนที่ล้อมรอบโคโลนีของเชื้อ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tween 80 agar

ลำดับ	รหัส ไอโซเลท	ขนาดโคโลนี (mm)								ขนาดเคลียร์โซน (mm)								หมายเหตุ
		แกน X				แกน Y				แกน X				แกน Y				
		1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
1	WMB01-1	1.18	2.78	2.60	2.19±0.88	1.32	2.60	2.58	2.17±0.73	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
2	WMB01-2	2.76	3.02	3.24	3.01±0.24	3.00	3.44	3.04	3.16±0.24	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
3	WMB01-3	2.36	2.28	2.00	2.21±0.19	2.15	2.48	2.20	2.28±0.18	3.20	3.32	3.40	3.31±0.10	3.12	3.26	3.00	3.13±0.13	
4	WMB01-4	2.98	2.80	2.30	2.69±0.35	2.72	2.66	1.98	2.45±0.41	3.42	3.40	3.46	3.43±0.03	3.44	3.52	3.38	3.45±0.07	
5	WMB01-5	3.10	2.62	2.74	2.82±0.25	2.98	2.84	3.14	2.99±0.15	6.92	6.16	5.60	6.23±0.66	5.82	8.86	5.94	6.87±1.72	
6	WMB01-6	3.20	3.30	2.40	2.97±0.49	3.24	3.14	2.46	2.95±0.42	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
7	WMB01-7	3.02	1.76	2.46	2.41±0.63	3.26	2.14	1.88	2.43±0.73	2.74	2.90	3.00	2.88±0.13	2.62	3.00	2.28	2.63±0.36	
8	WLB02-1	2.16	2.08	2.30	2.18±0.11	2.98	1.46	1.36	1.93±0.91	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
9	WLB02-2	1.48	1.16	1.14	1.26±0.19	1.50	1.10	1.28	1.29±0.20	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
10	WLB02-3	1.50	1.98	1.46	1.65±0.29	1.88	1.62	1.32	1.61±0.28	5.14	4.10	4.44	4.56±0.53	5.44	4.60	3.84	4.63±0.80	
11	WLB02-4	1.48	1.56	2.10	1.71±0.34	1.20	1.48	1.76	1.48±0.28	6.06	6.80	6.20	6.35±0.39	6.34	7.06	6.32	6.57±0.42	
12	WLB02-5	3.22	3.00	2.92	3.05±0.16	2.76	3.04	2.50	2.77±0.27	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
13	WLB02-6	1.28	1.30	1.44	1.34±0.09	1.28	1.28	1.14	1.23±0.08	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
14	WLB02-7	2.26	2.28	2.68	2.41±0.24	1.80	2.08	2.38	2.09±0.29	4.56	3.46	4.22	4.08±0.56	4.22	4.14	4.36	4.24±0.11	
15	WLB02-8	1.38	1.44	1.72	1.51±0.18	1.20	1.38	2.02	1.53±0.43	4.10	4.46	4.60	4.39±0.26	4.20	4.54	5.06	4.60±0.43	
16	WLB02-9	2.04	2.06	2.10	2.07±0.03	2.16	2.30	1.88	2.11±0.21	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	

ตารางที่ ค.4 (ต่อ) ผลการวัดขนาดของโคโลนีและความกว้างของโซนที่ล้อมรอบโคโลนีของเชื้อ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tween 80 agar

ลำดับ	รหัสไอโซเลท	ขนาดโคโลนี (mm)								ขนาดเคลียร์โซน (mm)								หมายเหตุ
		แกน X				แกน Y				แกน X				แกน Y				
		1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
17	WLB02-10	3.54	3.06	2.70	3.10±0.42	3.24	2.94	2.34	2.84±0.46	9.48	11.92	8.10	9.83±1.93	9.80	11.80	7.92	9.84±1.94	
18	WLB02-11	3.98	2.54	3.02	3.18±0.73	2.98	1.98	2.00	2.32±0.57	7.28	6.42	6.26	6.65±0.55	4.82	4.12	6.70	5.21±1.33	
19	WLB02-12	2.70	3.98	2.70	3.13±0.74	2.82	3.48	2.76	3.02±0.40	10.94	10.98	10.20	10.71±0.44	10.34	9.22	10.20	9.92±0.61	
20	WLB02-13	3.62	3.44	3.76	3.61±0.16	3.96	2.92	3.10	3.33±0.56	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
21	WLB02-14	2.76	1.98	3.74	2.83±0.88	1.44	1.40	1.82	1.55±0.23	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
22	WLB02-15	4.92	6.22	4.50	5.21±0.90	4.80	5.02	2.76	4.19±1.25	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
23	WLB02-16	2.06	1.94	1.86	1.95±0.10	1.80	1.68	1.62	1.70±0.09	5.70	5.70	4.46	5.29±0.72	5.06	5.40	4.70	5.05±0.35	
24	WLB02-17	5.30	5.02	5.50	5.27±0.24	2.90	2.66	2.76	2.77±0.12	11.18	12.10	10.98	11.42±0.60	9.36	9.80	8.86	9.31±0.47	
25	WLB02-18	2.06	2.56	1.90	2.17±0.34	2.42	2.36	2.36	2.38±0.03	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
26	WLB02-19	2.38	2.36	1.56	2.10±0.47	2.88	2.02	1.68	2.19±0.62	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
27	WLB03-1	1.28	2.86	2.46	2.20±0.82	1.56	2.36	2.30	2.07±0.45	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
28	WLB03-2	2.30	2.50	1.88	2.23±0.32	1.98	2.86	2.44	2.43±0.44	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
29	WLB03-3	3.02	3.14	2.98	3.05±0.08	2.94	3.44	3.18	3.19±0.25	3.22	3.40	3.52	3.38±0.15	3.98	4.02	4.20	4.07±0.12	
30	WLB03-4	1.60	1.98	2.26	1.95±0.33	2.02	1.66	2.08	1.92±0.23	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
31	WLB03-5	2.66	2.36	2.42	2.48±0.16	2.50	2.12	2.68	2.43±0.29	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
32	WLB03-6	2.32	2.04	1.40	1.92±0.47	2.02	1.62	1.86	1.83±0.20	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	

ตารางที่ ค.4 (ต่อ) ผลการวัดขนาดของโคโลนีและความกว้างของโซนที่ล้อมรอบโคโลนีของเชื้อ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tween 80 agar

ลำดับ	รหัสไอโซเลท	ขนาดโคโลนี (mm)								ขนาดเคลียร์โซน (mm)								หมายเหตุ
		แกน X				แกน Y				แกน X				แกน Y				
		1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
33	WLB03-7	2.38	2.14	1.86	2.13±0.26	2.60	1.90	2.00	2.17±0.38	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
34	WLB03-8	1.66	1.16	1.73	1.52±0.31	1.66	1.66	2.00	1.77±0.20	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
35	WLB03-9	2.66	1.98	2.00	2.21±0.39	2.46	1.76	1.72	1.98±0.42	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
36	WLB04-1	2.88	2.70	2.98	2.85±0.14	3.02	2.52	3.08	2.87±0.31	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
37	WLB04-2	2.90	2.36	2.68	2.65±0.27	2.56	2.50	2.70	2.59±0.10	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
38	WLB04-3	1.50	2.20	2.42	2.04±0.48	2.30	2.42	2.62	2.45±0.16	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
39	WLB04-4	1.94	2.00	1.66	1.87±0.18	2.00	2.00	2.14	2.05±0.08	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
40	WLB04-5	2.30	1.80	1.16	1.75±0.57	2.64	1.62	1.44	1.90±0.65	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
41	WLB04-6	3.06	1.90	2.00	2.32±0.64	3.14	1.84	2.46	2.48±0.65	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
42	WLB04-7	2.94	2.62	2.66	2.74±0.17	3.18	2.84	2.66	2.89±0.26	3.04	3.26	3.30	3.20±0.14	3.56	3.60	3.72	3.63±0.08	
43	WLB04-8	2.34	2.02	2.16	2.17±0.16	3.02	2.58	2.76	2.79±0.22	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
44	WLB04-9	1.66	1.12	1.26	1.35±0.28	1.90	1.46	1.56	1.64±0.23	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
45	WLB04-10	2.96	2.34	2.22	2.51±0.40	2.20	2.64	2.40	2.41±0.22	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
46	WLB04-11	5.16	4.88	3.72	4.59±0.76	2.60	3.44	1.62	2.55±0.91	7.76	7.30	4.84	6.63±1.57	6.40	6.42	3.72	5.51±1.55	
47	WLB04-12	3.42	3.56	3.66	3.55±0.12	2.48	2.18	2.44	2.37±0.16	3.80	3.72	3.42	3.65±0.20	4.34	4.08	4.52	4.31±0.22	
48	WLB04-13	4.78	6.94	6.02	5.91±1.08	2.16	1.70	2.56	2.14±0.43	7.26	7.46	7.12	7.28±0.17	4.12	4.14	3.70	3.99±0.25	

ตารางที่ ค.4 (ต่อ) ผลการวัดขนาดของโคโลนีและความกว้างของโซนที่ล้อมรอบโคโลนีของเชื้อ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tween 80 agar

ลำดับ	รหัสไอโซเลท	ขนาดโคโลนี (mm)								ขนาดเคลียร์โซน (mm)								หมายเหตุ
		แกน X				แกน Y				แกน X				แกน Y				
		1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
49	WLB04-14	2.46	2.60	4.52	3.19±1.15	2.46	2.06	2.30	2.27±0.20	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
50	SLB01-1	1.48	1.60	1.80	1.63±0.16	2.00	2.16	2.20	2.12±0.11	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
51	SLB01-2	4.28	4.60	4.38	4.42±0.16	4.60	4.28	4.56	4.48±0.17	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
52	SLB01-3	5.28	5.40	5.62	5.43±0.17	6.02	6.32	6.44	6.26±0.22	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
53	SLB01-4	3.60	3.58	3.34	3.51±0.14	3.68	3.66	3.48	3.61±0.11	3.20	3.46	3.32	3.33±0.13	4.32	4.58	4.62	4.51±0.16	
54	SLB01-5	2.24	2.48	2.62	2.45±0.19	3.00	3.26	3.44	3.23±0.22	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
55	SSM01-1	2.32	2.20	2.14	2.22±0.09	2.02	2.08	2.12	2.07±0.05	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
56	SSM02-1	3.08	3.32	3.22	3.21±0.12	3.60	3.46	3.82	3.63±0.18	3.06	3.48	3.62	3.39±0.29	4.08	4.22	4.34	4.21±0.13	
57	SSM02-2	4.24	4.32	4.75	4.44±0.27	3.66	3.54	3.82	3.67±0.14	5.02	5.24	5.16	5.14±0.11	5.60	5.72	5.98	5.77±0.19	
58	SSM02-3	1.66	1.84	1.76	1.75±0.09	1.42	1.38	1.88	1.56±0.28	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
59	SSM02-4	2.76	2.34	2.58	2.56±0.21	2.62	2.22	2.34	2.39±0.21	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
60	SSM02-5	3.56	3.44	3.02	3.34±0.28	3.12	3.22	2.98	3.11±0.12	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
61	SSM02-6	1.56	2.00	1.98	1.85±0.25	2.52	2.04	2.76	2.44±0.37	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
62	SBK01-1	2.66	2.46	2.38	2.50±0.14	2.80	2.54	2.62	2.65±0.13	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
63	SBK02-2	2.42	1.18	0.80	1.47±0.85	2.06	2.66	1.02	1.91±0.83	4.32	4.20	4.02	4.18±0.15	5.34	4.68	4.22	4.75±0.56	
64	SBK02-3	6.54	5.34	5.82	5.90±0.60	2.10	2.26	2.40	2.25±0.15	5.48	9.56	10.04	8.36±2.51	10.58	5.04	4.08	6.57±3.51	

ตารางที่ ค.4 (ต่อ) ผลการวัดขนาดของโคโลนีและความกว้างของโซนที่ล้อมรอบโคโลนีของเชื้อ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tween 80 agar

ลำดับ	รหัส ไอโซเลท	ขนาดโคโลนี (mm)								ขนาดเคลียร์โซน (mm)								หมายเหตุ
		แกน X				แกน Y				แกน X				แกน Y				
		1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
65	SBK02-4	3.22	3.42	3.84	3.49±0.32	3.30	3.58	3.64	3.51±0.18	2.08	2.68	2.54	2.43±0.31	3.28	3.40	3.62	3.43±0.17	
66	SBK02-5	2.36	2.46	2.10	2.31±0.19	2.52	2.16	2.34	2.34±0.18	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
67	SBK02-6	3.88	3.62	3.66	3.72±0.14	3.80	3.64	3.62	3.69±0.10	6.26	6.18	5.76	6.07±0.27	6.20	6.58	5.58	6.12±0.50	
68	SBK02-7	2.68	2.42	2.46	2.52±0.14	2.60	2.92	3.06	2.86±0.24	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
69	SBK02-8	2.52	2.66	2.48	2.55±0.09	2.36	2.16	2.18	2.23±0.11	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
70	SBK03-1	2.80	2.98	2.76	2.85±0.12	3.00	3.62	3.48	3.37±0.33	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
71	BSM02-1	2.35	2.80	2.48	2.54±0.23	3.50	3.86	3.40	3.59±0.24	6.00	5.98	6.23	6.07±0.14	6.02	6.45	6.32	6.26±0.22	
72	BSM02-2	2.06	2.28	2.66	2.33±0.30	3.20	3.32	3.44	3.32±0.12	3.26	3.34	3.40	3.33±0.07	3.52	3.60	3.82	3.65±0.16	
73	BSM02-3	2.90	2.06	2.88	2.61±0.48	2.22	2.50	2.34	2.35±0.14	3.20	3.46	3.62	3.43±0.21	3.44	3.26	3.42	3.37±0.10	
74	BBK02-1	1.84	1.92	2.00	1.92±0.08	2.00	2.04	2.16	2.07±0.08	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
75	BBK02-2	2.22	2.34	2.06	2.21±0.14	2.06	2.20	2.18	2.15±0.08	3.18	3.22	3.46	3.29±0.15	3.66	3.42	3.80	3.63±0.19	
76	BBK02-3	3.28	3.30	3.58	3.39±0.17	3.40	3.86	3.80	3.69±0.25	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
77	BBK02-4	3.50	3.32	3.44	3.43±0.09	3.06	3.84	3.66	3.52±0.41	4.82	4.50	4.26	4.53±0.28	5.01	4.68	4.80	4.48±0.17	
78	BBK02-5	2.50	2.48	2.34	2.44±0.09	2.58	2.50	2.48	2.52±0.05	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
79	BBK02-6	3.06	2.98	3.12	3.05±0.07	4.08	4.62	4.82	4.51±0.38	5.08	5.26	5.48	5.27±0.20	6.00	6.82	6.98	6.60±0.53	

ตารางที่ ค.5 ผลการวัดขนาดของโคโลนีและความกว้างของโซนที่ล้อมรอบโคโลนีของเชื้อ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tween 20 agar

ลำดับ	รหัส ไอโซเลท	ขนาดโคโลนี (mm)								ขนาดเคลียร์โซน (mm)								หมายเหตุ
		แกน X				แกน Y				แกน X				แกน Y				
		1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
1	WMB01-1	2.58	2.46	2.78	2.61±0.16	2.34	2.32	2.06	2.24±0.16	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
2	WMB01-2	1.10	1.86	1.88	1.61±0.44	1.46	1.78	1.90	1.71±0.23	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
3	WMB01-3	2.50	2.68	2.06	2.41±0.32	2.44	2.72	2.86	2.67±0.21	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
4	WMB01-4	3.86	3.54	3.66	3.86±0.16	3.80	3.82	3.90	3.84±0.05	4.06	4.22	4.18	4.15±0.08	4.16	4.24	4.20	4.20±0.04	
5	WMB01-5	2.42	2.12	1.68	2.07±0.37	2.14	2.46	1.52	2.04±0.48	5.08	6.00	4.78	5.29±0.64	5.30	6.28	5.02	5.53±0.66	
6	WMB01-6	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
7	WMB01-7	2.82	2.56	2.92	2.77±0.19	2.56	2.76	3.32	2.88±0.39	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
8	WLB02-1	2.60	2.52	2.72	2.61±0.10	2.52	2.88	2.78	2.73±0.19	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
9	WLB02-2	2.10	2.22	2.06	2.13±0.08	2.08	2.42	2.52	2.34±0.23	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
10	WLB02-3	2.16	1.92	3.92	2.67±1.09	2.30	2.30	3.80	2.80±0.87	3.08	3.24	3.40	3.24±0.16	3.60	3.52	3.44	3.52±0.08	
11	WLB02-4	2.22	2.64	2.32	2.39±0.22	2.90	2.50	2.54	2.65±0.22	3.62	3.44	3.82	3.63±0.12	3.80	3.92	4.00	3.91±0.10	
12	WLB02-5	2.38	3.44	3.10	2.97±0.54	2.16	3.64	2.90	2.90±0.74	3.12	3.26	3.38	3.25±0.13	3.44	3.52	3.66	3.54±0.11	
13	WLB02-6	1.38	1.40	1.26	1.35±0.08	1.40	1.66	1.24	1.43±0.21	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
14	WLB02-7	4.36	4.38	5.10	4.61±0.42	4.26	4.32	5.30	4.63±0.58	8.92	9.72	11.68	10.11±1.42	8.20	8.68	12.00	9.63±2.07	
15	WLB02-8	3.78	3.54	3.70	3.67±0.12	3.40	3.42	2.52	3.11±0.51	8.24	7.58	7.26	7.69±0.50	8.02	7.56	6.76	7.45±0.64	
16	WLB02-9	2.06	1.78	1.62	1.82±0.22	2.70	2.66	2.54	2.36±0.08	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	

ตารางที่ ค.5 (ต่อ) ผลการวัดขนาดของโคโลนีและความกว้างของโซนที่ล้อมรอบโคโลนีของเชื้อ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tween 20 agar

ลำดับ	รหัส ไอโซเลท	ขนาดโคโลนี (mm)								ขนาดเคลียร์โซน (mm)								หมายเหตุ
		แกน X				แกน Y				แกน X				แกน Y				
		1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
17	WLB02-10	4.86	4.66	4.72	4.75±0.10	4.40	4.60	4.68	4.56±0.14	4.66	4.82	4.74	4.47±0.08	4.92	5.02	5.18	5.04±0.13	
18	WLB02-11	3.28	3.04	3.66	3.33±0.31	3.30	3.52	4.00	3.61±0.36	4.56	4.66	4.82	4.68±0.13	4.68	4.72	4.82	4.74±0.07	
19	WLB02-12	2.98	2.26	2.54	2.59±0.36	2.90	2.06	2.54	2.50±0.42	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
20	WLB02-13	3.20	3.82	2.80	3.27±0.51	2.96	3.70	2.28	2.98±0.71	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
21	WLB02-14	6.68	5.70	4.80	5.73±0.94	3.54	3.82	2.76	3.37±0.55	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
22	WLB02-15	4.10	6.06	4.30	4.82±1.08	5.50	5.02	4.10	4.87±0.71	5.04	5.22	5.34	5.20±0.15	5.66	5.48	5.82	5.65±0.17	
23	WLB02-16	4.32	5.10	4.30	4.57±0.46	4.30	4.80	4.50	4.53±0.25	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
24	WLB02-17	3.10	3.24	3.64	3.33±0.28	2.90	2.42	2.20	2.51±0.36	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
25	WLB02-18	1.26	2.42	2.68	2.12±0.76	2.06	2.18	2.20	2.15±0.08	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
26	WLB02-19	2.80	1.78	1.74	2.11±0.60	2.66	3.06	1.58	2.43±0.77	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
27	WLB03-1	3.70	3.80	4.00	3.83±0.15	3.70	3.80	4.00	3.79±0.27	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
28	WLB03-2	3.30	3.42	3.66	3.46±0.40	3.76	3.66	3.90	3.77±0.12	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
29	WLB03-3	3.02	2.86	2.50	2.79±0.27	4.22	3.50	3.66	3.79±0.38	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
30	WLB03-4	2.48	2.74	2.80	2.67±0.17	2.80	2.30	2.48	2.53±0.25	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
31	WLB03-5	2.26	2.50	2.00	2.25±0.25	2.64	2.74	2.60	2.66±0.07	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
32	WLB03-6	1.90	1.36	2.56	1.94±0.60	2.44	2.74	1.54	2.24±0.62	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	

ตารางที่ ค.5 (ต่อ) ผลการวัดขนาดของโคโลนีและความกว้างของโซนที่ล้อมรอบโคโลนีของเชื้อ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tween 20 agar

ลำดับ	รหัส ไอโซเลท	ขนาดโคโลนี (mm)								ขนาดเคลียร์โซน (mm)								หมายเหตุ
		แกน X				แกน Y				แกน X				แกน Y				
		1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
33	WLB03-7	2.32	2.42	2.00	2.25±0.22	3.20	3.06	3.24	3.17±0.09	3.42	3.50	3.34	3.42±0.08	3.66	3.72	3.80	3.73±0.07	
34	WLB03-8	1.76	2.28	2.32	2.12±0.31	1.50	2.68	3.02	2.40±0.80	2.50	2.66	2.78	2.65±0.14	2.72	2.80	3.02	2.85±0.16	
35	WLB03-9	2.04	2.98	1.56	2.19±0.72	2.14	2.76	1.18	2.03±0.80	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
36	WLB04-1	1.98	1.24	2.16	1.79±0.49	2.32	1.62	2.44	2.13±0.44	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
37	WLB04-2	2.68	2.30	2.70	2.56±0.23	2.50	2.76	2.88	2.71±0.19	3.18	3.20	3.34	3.24±0.09	3.52	3.40	3.60	3.51±0.10	
38	WLB04-3	2.16	1.82	2.00	1.99±0.17	2.40	2.00	1.98	2.13±0.24	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
39	WLB04-4	2.10	2.80	2.32	2.41±0.36	2.32	2.54	2.22	2.36±0.16	3.04	3.16	3.22	3.14±0.09	3.30	3.48	3.56	3.45±0.13	
40	WLB04-5	1.50	2.90	1.78	2.06±0.74	1.76	2.48	1.56	1.93±0.48	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
41	WLB04-6	2.56	1.90	2.30	2.25±0.33	3.02	1.98	2.68	2.56±0.53	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
42	WLB04-7	2.96	1.36	2.16	2.16±0.80	2.32	1.20	2.50	2.01±0.70	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
43	WLB04-8	2.16	2.18	3.20	2.51±0.59	1.80	2.62	2.98	2.47±0.60	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
44	WLB04-9	2.30	1.80	2.30	2.13±0.29	2.40	1.68	2.46	2.18±0.43	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
45	WLB04-10	1.38	1.64	1.94	1.65±0.28	1.28	2.01	1.76	1.68±0.37	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
46	WLB04-11	5.24	5.38	4.02	4.88±0.75	3.22	2.26	2.66	2.71±0.48	7.12	7.32	7.76	7.40±0.33	6.36	7.26	6.36	6.66±0.52	
47	WLB04-12	2.24	1.78	2.62	2.21±0.42	2.90	1.68	2.84	2.47±0.69	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
48	WLB04-13	4.38	3.46	3.34	3.73±0.57	2.00	2.52	1.90	2.14±0.33	6.46	5.84	4.08	5.46±1.23	4.98	4.16	2.90	4.01±1.05	

ตารางที่ ค.5 (ต่อ) ผลการวัดขนาดของโคโลนีและความกว้างของโซนที่ล้อมรอบโคโลนีของเชื้อ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tween 20 agar

ลำดับ	รหัส ไอโซเลท	ขนาดโคโลนี (mm)								ขนาดเคลียร์โซน (mm)								หมายเหตุ
		แกน X				แกน Y				แกน X				แกน Y				
		1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
49	WLB04-14	2.06	1.34	2.28	1.89±0.49	1.90	1.02	2.16	1.69±0.60	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
50	SLB01-1	2.94	3.02	3.42	3.13±0.26	3.00	3.20	3.68	3.29±0.35	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
51	SLB01-2	2.62	2.78	2.98	2.79±0.18	2.74	2.82	3.22	2.93±0.26	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
52	SLB01-3	3.62	3.78	4.00	3.80±0.19	4.24	4.46	4.60	4.43±0.18	4.36	4.60	4.82	4.59±0.23	5.20	5.42	5.66	5.43±0.23	
53	SLB01-4	3.54	3.60	3.82	3.65±0.15	3.62	3.80	4.32	3.91±0.36	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
54	SLB01-5	2.66	2.80	2.98	2.81±0.16	2.80	2.98	3.02	2.93±0.12	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
55	SSM01-1	2.66	2.82	2.72	2.73±0.08	2.52	2.44	2.62	2.53±0.09	3.06	3.22	3.16	3.15±0.08	3.26	3.40	3.52	3.39±0.13	
56	SSM02-1	3.80	3.46	3.52	3.59±0.18	3.44	3.28	3.30	3.34±0.09	3.00	3.42	3.22	3.21±0.21	3.42	3.50	3.66	3.53±0.12	
57	SSM02-2	2.62	2.54	2.02	2.39±0.33	2.86	2.74	2.56	2.72±0.15	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
58	SSM02-3	1.66	1.78	1.54	1.66±0.12	1.30	1.56	1.38	1.41±0.13	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
59	SSM02-4	2.04	2.38	2.22	2.21±0.17	1.56	1.78	1.60	1.65±0.12	3.44	3.52	3.86	3.61±0.22	3.26	3.18	3.04	3.16±0.11	
60	SSM02-5	2.56	2.48	2.30	2.45±0.13	1.66	1.82	1.92	1.80±0.13	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
61	SSM02-6	1.98	2.08	2.14	2.07±0.08	2.00	2.20	2.68	2.29±0.35	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
62	SBK01-1	2.32	2.48	2.60	2.47±0.14	2.56	2.78	2.92	2.75±0.18	3.12	3.08	3.26	3.15±0.09	3.42	3.56	3.66	3.55±0.12	
63	SBK02-2	1.82	2.02	2.42	2.09±0.31	1.98	2.22	2.50	2.23±0.26	2.42	3.48	3.56	3.15±0.64	3.00	4.22	4.48	3.90±0.79	
64	SBK02-3	2.80	2.62	2.88	2.77±0.13	2.32	2.46	2.62	2.47±0.15	2.98	3.08	3.24	3.10±0.13	3.04	3.16	3.28	3.16±0.12	

ตารางที่ ค.5 (ต่อ) ผลการวัดขนาดของโคโลนีและความกว้างของโซนที่ล้อมรอบโคโลนีของเชื้อ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tween 20 agar

ลำดับ	รหัส ไอโซเลข	ขนาดโคโลนี (mm)								ขนาดเคลียร์โซน (mm)								หมายเหตุ
		แกน X				แกน Y				แกน X				แกน Y				
		1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	1	2	3	เฉลี่ย	
65	SBK02-4	3.20	3.46	3.82	3.49±0.31	3.32	3.50	3.98	3.74±0.34	4.52	4.60	4.84	4.65±0.17	5.26	5.30	5.32	5.29±0.03	
66	SBK02-5	3.50	3.46	3.22	3.39±0.15	2.46	2.64	2.98	2.69±0.26	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
67	SBK02-6	4.12	3.92	5.12	4.39±0.64	1.18	1.48	1.14	1.27±0.19	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
68	SBK02-7	2.36	2.04	2.18	2.19±0.16	2.56	2.56	2.32	2.48±0.14	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
69	SBK02-8	2.12	2.38	2.46	2.32±0.18	2.60	2.60	2.84	2.68±0.14	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
70	SBK03-1	1.98	2.42	2.62	2.34±0.33	2.04	2.68	2.80	2.51±0.41	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
71	BSM02-1	2.00	2.36	2.40	2.25±0.22	2.24	2.80	2.98	2.67±0.39	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
72	BSM02-2	1.68	1.90	2.00	1.86±0.16	1.72	2.00	2.20	1.97±0.24	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
73	BSM02-3	3.02	2.64	2.42	2.69±0.30	3.00	2.50	2.64	2.71±0.26	3.12	3.24	3.36	3.24±0.12	3.42	3.50	3.66	3.54±0.12	
74	BBK02-1	1.64	1.80	1.98	1.81±0.17	2.06	2.24	2.60	2.30±0.27	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
75	BBK02-2	2.66	2.14	2.60	2.47±0.28	2.50	2.82	2.42	2.58±0.21	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
76	BBK02-3	2.42	2.30	2.44	2.39±0.08	2.82	2.64	2.84	2.77±0.11	4.22	4.38	4.60	4.40±0.19	5.60	5.42	5.02	5.35±0.30	
77	BBK02-4	2.02	1.98	2.64	2.21±0.37	2.06	2.48	2.66	2.40±0.31	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
78	BBK02-5	1.56	1.66	1.80	1.67±0.12	1.98	2.20	2.48	2.22±0.25	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	
79	BBK02-6	2.50	2.34	2.40	2.41±0.08	2.32	2.44	2.56	2.44±0.12	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	0.00	0.00	0.00	0.00±0.00	

ตารางที่ ค.6 ผลการทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการแสดงออกถึงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด

รหัสไอโซเลท	อุณหภูมิที่ใช้ทดสอบ (องศาเซลเซียส)	กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Unit/ml)
SBK02-2	30	0.0002
	45	0.005
	50	0.0057
WLB04-11	30	0.0003
	45	0.0013
	50	0.001
WLB04-13	30	0.0003
	45	0.002
	50	0.0003

ตารางที่ ค.7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์ที่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมจำของเอนไซม์ไลเปส

รหัสไอโซ เลข	เวลา บ่ม (hr)	กิจกรรมของเอนไซม์ไล เปส (Unit/ml)	ปริมาณโปรตีน (mg/ml)	กิจกรรมจำเพาะ (Unit/ml)
SBK02-2	24	0.011±0.0011	2.63±0.12	0.0004±0.0004
	48	0.0003±0.0004	4.17±0.14	0.0001±0.0001
	72	0.0003±0.0004	4.84±0.14	0.0001±0.0001
	96	0.0003±0.0004	4.93±0.12	0.0001±0.0001
	120	0.0006±0.0004	2.87±0.13	0.0002±0.0001
WLB04-11	24	0.0014±0.0006	2.28±0.06	0.0006±0.0003
	48	0.0004±0.0005	3.97±0.08	0.0001±0.0001
	72	0.0000±0.0006	4.39±0.37	0.0000±0.0001
	96	0.0000±0.0006	5.88±0.31	0.0000±0.0001
	120	0.0001±0.0007	5.57±0.10	0.0000±0.0001
WLB04-13	24	0.0012±0.002	2.48±0.22	0.0005±0.0001
	48	0.0005±0.0004	2.62±0.14	0.0002±0.0001
	72	0.0006±0.000	3.97±0.11	0.0002±0.0000
	96	0.0006±0.0000	5.81±0.08	0.0001±0.0000
	120	0.0002±0.0004	6.12±0.36	0.0000±0.0001

หมายเหตุ: ค่าปริมาณโปรตีนและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสแสดงเป็นค่า แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



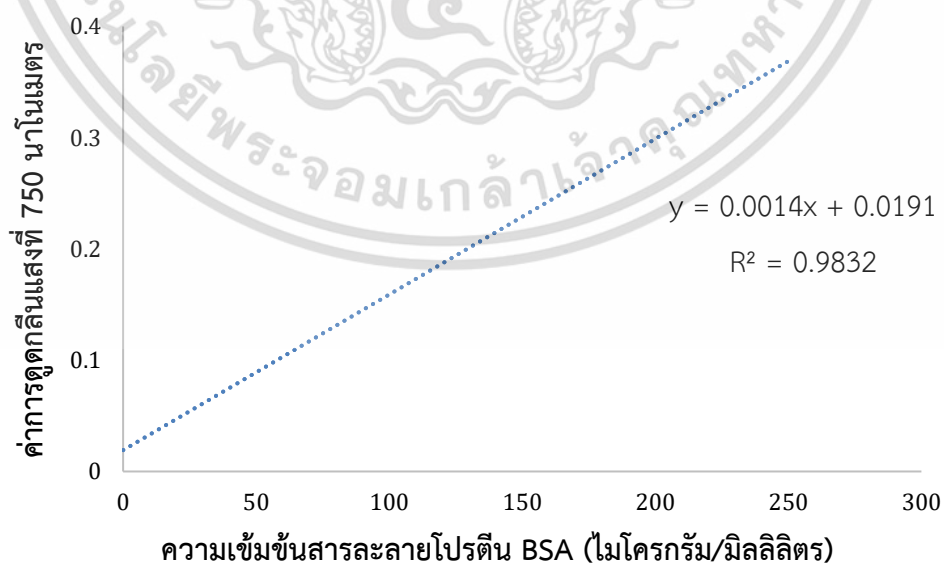
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

กราฟมาตรฐาน

ง.1 กราฟมาตรฐานโปรตีน Bovine serum albumin (BSA)

นำสารละลายโปรตีน Bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (เตรียมสารตามวิธีใน ภาคผนวก ข.5) มาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน Bovine serum albumin (BSA) เท่ากับ 0, 50, 100, 150, 200, และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้น ปิเปตสารละลายโปรตีน Bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายอัลคาไลคอปเปอร์ (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.3) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer) และบ่มเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการปิเปตสารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 1 นอร์มัล (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ข.6) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer) แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer และสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน Bovine serum albumin (BSA) และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร แสดงดัง รูปที่ ง.1



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีให้ตีแบบสงวนลิขสิทธิ์และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ง.1 กราฟมาตรฐานโปรตีนของสารละลายโปรตีน BSA



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

จ.1 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติจากการทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

จ.1.1 การตรวจสอบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ณ ชั่วโมงที่ 0

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
ไอโซเลท	2	0.005425	0.002712	6.61	0.030
Error	6	0.002460	0.000410		
Total	8	0.007885			

รูปที่ จ.1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ในการอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ณ ชั่วโมงที่ 0

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

รหัสไอโซเลท	N	Mean	Grouping	
SBK02-2	3	0.2150	A	
WLB04-11	3	0.1917	A	B
WLB04-13	3	0.1553		B

Means that do not share a letter are significantly different.

รูปที่ จ.2 ผลการจัดกลุ่มข้อมูลโดยการวิเคราะห์ทางสถิติของการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ในการอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ณ ชั่วโมงที่ 0 ด้วยวิธีของ Tukey ที่ความเชื่อมั่น 95% ซึ่งมีระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tukey Simultaneous Tests for Differences of Means

Difference of Levels	Difference of Means	SE of Difference	95% CI	T-Value	Adjusted P-Value
WLB04-11 - SBK02-2	-0.0597	0.0165	(-0.1104, -0.0089)	-3.61	0.026
WLB04-13 - SBK02-2	-0.0233	0.0165	(-0.0741, 0.0274)	-1.41	0.394
WLB04-13 - WLB04-11	0.0363	0.0165	(-0.0144, 0.0871)	2.20	0.150

Individual confidence level = 97.80%

รูปที่ จ.3 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ในการอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ณ ชั่วโมงที่ 0 ด้วยวิธีของ Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จ.1.2 การตรวจสอบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ณ ชั่วโมงที่ 24

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
ไอโซเลท	2	0.002919	0.001459	0.02	0.980
Error	6	0.440288	0.073381		
Total	8	0.443207			

รูปที่ จ.4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ในการอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ณ ชั่วโมงที่ 24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

รหัสไอโซเลท	N	Mean	Grouping
SBK02-2	3	2.9097	A
WLB04-11	3	2.880	A
WLB04-13	3	2.867	A

Means that do not share a letter are significantly different.

รูปที่ จ.5 ผลการจัดกลุ่มข้อมูลโดยการวิเคราะห์ทางสถิติของการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ในการอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ณ ชั่วโมงที่ 24 ด้วยวิธีของ Tukey ที่ความเชื่อมั่น 95% ซึ่งมีระดับนัยสำคัญ 0.05

Tukey Simultaneous Tests for Differences of Means

Difference of Levels	Difference of Means	SE of Difference	95% CI	T-Value	Adjusted P-Value
WLB04-11 - SBK02-2	0.014	0.221	(-0.665, 0.692)	0.06	0.998
WLB04-13 - SBK02-2	0.043	0.221	(-0.636, 0.722)	0.20	0.979
WLB04-13 - WLB04-11	0.030	0.221	(-0.649, 0.708)	0.13	0.990

Individual confidence level = 97.80%

รูปที่ จ.6 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ในการอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ณ ชั่วโมงที่ 24 ด้วยวิธีของ Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.1.3 แบบที่เรียไอโซเลท SBK02-2

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
ณ เวลาที่ (ชั่วโมง)	1	10.5459	10.5459	250.60	0.000
Error	4	0.1683	0.0421		
Total	5	10.7143			

รูปที่ จ.7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของการเจริญของเชื้อในการอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

ณ เวลาที่ (ชั่วโมง)	N	Mean	Grouping
24	3	2.867	A
0	3	0.2150	B

Means that do not share a letter are significantly different.

รูปที่ จ.8 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการเจริญของเชื้อในการอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยวิธีของ Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จ.1.4 แบบที่เรียไอโซเลท WLB04-11

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
ณ เวลาที่ (ชั่วโมง)	1	11.1365	11.1365	166.85	0.000
Error	4	0.2670	0.0667		
Total	5	11.4035			

รูปที่ จ.9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของการเจริญของเชื้อในการอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

ณ เวลาที่ (ชั่วโมง)	N	Mean	Grouping
24	3	2.880	A
0	3	0.1553	B

Means that do not share a letter are significantly different.

รูปที่ จ.10 ผลการจัดกลุ่มข้อมูลของการเจริญของเชื้อในการอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธีของ Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จ.1.5 แบบที่เรียไอโซเลท WLB04-13

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
ณ เวลาที่ (ชั่วโมง)	1	11.0813	11.0813	5968.84	0.000
Error	4	0.0074	0.0019		
Total	5	11.0887			

รูปที่ จ.11 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการเจริญของเชื้อในการอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

ณ เวลาที่ (ชั่วโมง)	N	Mean	Grouping
24	3	2.9097	A
0	3	0.1917	B

Means that do not share a letter are significantly different.

รูปที่ จ.12 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการเจริญของเชื้อในการอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยวิธีของ Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.2 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติจากค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน

จ.2.1 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ณ ชั่วโมงที่ 24

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
ไอโซเลท	2	0.000001	0.000001	1.00	0.423
Error	6	0.000003	0.000001		
Total	8	0.000004			

รูปที่ จ.13 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสหลังเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ณ ชั่วโมง 24

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

รหัสไอโซเลท	N	Mean	Grouping
SBK02-2	3	0.007333	A
WLB04-11	3	0.007100	A
WLB04-13	3	0.006533	A

Means that do not share a letter are significantly different.

รูปที่ จ.14 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อในการอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยวิธีของ Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จ.2.2 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ณ ชั่วโมงที่ 48

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
ไอโซเลท	2	0.000000	0.000000	0.09	0.914
Error	6	0.000001	0.000000		
Total	8	0.000001			

รูปที่ จ.15 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสหลังเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ณ ชั่วโมง 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

รหัสไอโซเลท	N	Mean	Grouping
WLB04-13	3	0.000500	A
WLB04-11	3	0.000433	A
SBK02-2	3	0.000367	A

Means that do not share a letter are significantly different.

รูปที่ จ.16 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อในการอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยวิธีของ Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จ.2.3 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ณ ชั่วโมงที่ 72

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
ไอโซเลท	2	0.000000	0.000000	1.85	0.237
Error	6	0.000000	0.000000		
Total	8	0.000000			

รูปที่ จ.17 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสหลังเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ณ ชั่วโมง 72

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

รหัสไอโซเลท	N	Mean	Grouping
WLB04-13	3	0.000600	A
WLB04-11	3	0.000467	A
SBK02-2	3	0.000367	A

Means that do not share a letter are significantly different.

รูปที่ จ.18 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อในการอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยวิธีของ Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จ.2.4 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ณ ชั่วโมงที่ 96

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
ไอโซเลท	2	0.000000	0.000000	1.85	0.237
Error	6	0.000000	0.000000		
Total	8	0.000000			

รูปที่ จ.19 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสหลังเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ณ ชั่วโมง 96

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

รหัสไอโซเลท	N	Mean	Grouping
WLB04-13	3	0.000600	A
WLB04-11	3	0.000467	A
SBK02-2	3	0.000367	A

Means that do not share a letter are significantly different.

รูปที่ จ.20 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อในการอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยวิธีของ Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จ.1.5 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ณ ชั่วโมงที่ 120

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
รหัสไอโซเลท	2	0.000000	0.000000	0.40	0.689
Error	6	0.000000	0.000000		
Total	8	0.000000			

รูปที่ จ.21 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสหลังเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ณ ชั่วโมง 120

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

รหัสไอโซเลท	N	Mean	Grouping
WLB04-11	3	0.000533	A
SBK02-2	3	0.000533	A
WLB04-13	3	0.000367	A

Means that do not share a letter are significantly different.

รูปที่ จ.22 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของการผลิตเอมไซม์ไลเปสของเชื้อในการอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยวิธีของ Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



งานทะเบียนคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
คำรับรองเล่มโครงการพิเศษ

วันที่ 12 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2566

ข้าพเจ้า นางสาวน้ำฝน สุทน รหัสประจำตัว 62050612

นางสาวนิตยา ประสาทเกษการณ์ รหัสประจำตัว 62050613

นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา
ขอรับรองว่าโครงการพิเศษ เรื่อง

การคัดแยกไลโปไลติกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้ว

Isolation of lipolytic bacteria to digest used cooking oil

ปีการศึกษา 2565

เป็นผลงานวิจัยที่ได้คัดลอกหรือละเมิดลิขสิทธิ์ของผู้อื่นและได้ผ่านการตรวจสอบความซ้ำซ้อน
เรียบร้อยแล้ว และได้แนบเอกสารการตรวจสอบการลอกเลียนงานวรรณกรรมที่ตรวจสอบจากเล่ม
โครงการพิเศษฉบับสมบูรณ์แล้วโปรแกรมอักขรวิสุทธิ 1.74%

ลงชื่อ น้ำฝน สุทน

(นางสาวน้ำฝน สุทน)

นักศึกษา

ลงชื่อ นิตยา ประสาทเกษการณ์

(นางสาวนิตยา ประสาทเกษการณ์)

นักศึกษา

ข้าพเจ้า ดร.นฤมล ตั้งธีระสุนันท์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ และ ผศ.ดร. สมพิศ สอนโยธา
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ได้ตรวจสอบโครงการพิเศษของนักศึกษาข้างต้นแล้ว ขอรับรองว่าเป็นผลงานวิจัย
ของนักศึกษาจริงและมีเนื้อหาสมบูรณ์ จึงลงชื่อไว้เป็นหลักฐาน

ลงชื่อ นฤมล ตั้งธีระสุนันท์

(ดร.นฤมล ตั้งธีระสุนันท์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ลงชื่อ สมพิศ สอนโยธา

(ผศ.ดร. สมพิศ สอนโยธา)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้