สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

นาย ประเสริฐ อังกูรวัฒนะ
นางสาว วสี สุขวงศ์
นาย สุกิจ โพธิ์พิทักษ์กุล

ปฟ.
ป422ก
2536

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน.เดือน.ปี.....

ง12ง37662

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2536

Isolation of Lipase from Microorganisms

Mr. Prasert Angkoonwatthana

Miss Wasee Sukawong

Mr. Sukit Phopitakkul

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the

Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

1992

หัวข้อโครงงานพิเศษ การแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

โดย นาย ประเสริฐ อังกูรวัฒนะ

นางสาว วสี สุขวงศ์

นาย สุกิจ โพธิ์นิทักษ์กุล

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ อรไท สุขเจริญ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ลายเซ็น

_____

(อาจารย์ อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล) หัวหน้าภาควิชา

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

_____

(ผศ. เนาวรัตน์ ปานแย้ม) ประธานกรรมการ

_____

(รศ.ดร.ดุษฎี ธนะบริพัฒน์) กรรมการ

_____

(อาจารย์ อรไท สุขเจริญ) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส
นักศึกษา	นาย ประเสริฐ อังกูรวัฒนะ
	นางสาว วสี สุขวงศ์
	นาย สุกิจ โพธิ์พิทักษ์กุล
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ อรไท สุขเจริญ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2536

บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้เป็นการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส จากดิน 8 ตัวอย่าง ได้เชื้อบริสุทธิ์ 84 สายพันธุ์ แล้ววัดความสามารถของแบคทีเรียโดยการเปลี่ยนสีบรอมคริซอลเพอเพิล (bromcresol purple) ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน และทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่เชื้อผลิตขึ้น โดยการไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐาน NaOH สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด คือ เชื้อแบคทีเรียรหัส J7 (*Pseudomonas sp.*) อาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ประกอบด้วย กลูโคส 1.5 เปอร์เซ็นต์, K_2HPO_4 0.09 เปอร์เซ็นต์, $MgSO_4.7H_2O$ 0.02 เปอร์เซ็นต์, $(NH_4)_2SO_4$ 0.13 เปอร์เซ็นต์, yeast extract 0.02 เปอร์เซ็นต์ และ $CaCO_3$ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 8.0 อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส โดยเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ 16.81 ยูนิต/มล. ในเวลา 12 ชั่วโมง เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้เป็น extracellular enzyme มีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 35 องศาเซลเซียส และพีเอช 9.6 ตามลำดับ

Special Project Title	Isolation of Lipase from Microorganism
Name	Mr. Prasert Angkoonwatthana
	Miss Wasee Sukawong
	Mr. Sukit Phopitakkul
Special Project Adviser	Miss Oratai Sukchareon
Department	Applied Biology
Academic Year	1993

Abstract

This study is to isolate lipase from microorganism. From 8 soil samples, 84 strains are isolated. The efficiency of bacteria is indicated by a change of bromcresol purple added in media with olive oil as carbon source. The produced lipase activity is tested by titration with standard NaOH solution. The maximum lipase production strain is J7 bacteria (*Pseudomonas sp.*). Proper media for lipase production consists of glucose 1.5 %, K_2HPO_4 0.09 %, $MgSO_4.7H_2O$ 0.02%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.13 %, yeast extract 0.02 % and $CaCO_3$ 0.05 % at pH 8.0 at 27 °c which 16.81 unit/ml.is produced within 12 hours. The produced lipase is an extracellular enzyme with optimum temperature and pH for performance at 35 °c and 9.6 respectively.

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ ได้จัดทำขึ้น ตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ อาจารย์ อรไท สุขเจริญ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่ให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ รวมทั้งได้กรุณาตรวจแก้ทางด้านภาษา และให้คำแนะนำ ในด้านต่างๆ ในการจัดทำโครงงานพิเศษนี้ ผศ.เนาวรัตน์ ปานแย้ม ที่ได้กรุณาเรื่องสถานที่และเครื่องมือทดลอง รศ.ดร.ดุษฎี ธนะบริพัฒน์ กรรมการพิจารณาโครงงานพิเศษ

รวมทั้งคุณพยอม เกียรติกำจร เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ที่กรุณาให้ยืมอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ สำหรับทำการทดลอง

สุดท้ายขอขอบคุณ คุณบัณฑิต ศิลปเจริญ ที่ให้คำแนะนำ และช่วยเหลือในการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำหรับเขียนกราฟแสดงผลการทดลอง รวมทั้งน้องทุกคนที่ช่วยเหลือในด้านการพิมพ์เอกสาร และเพื่อน ๆ ที่ช่วยเหลือและให้กำลังใจในการจัดทำโครงงานพิเศษนี้

11 มีนาคม 2537

คณะผู้จัดทำ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อโครงงานพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
- วัตถุประสงค์	2
- ขอบเขต	2
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	23
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	33
บทที่ 5 บทสรุป	59
ภาคผนวก ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ	60
ข. การเตรียมสารเคมี	62
ค. วิธีการวิเคราะห์	65
เอกสารอ้างอิง	69

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงประเภทของเอนไซม์ไลเปสจากสัตว์ 5

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะดินจากแหล่งต่างๆ และจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ 33

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะของแบคทีเรียที่แยกได้ 35

ตารางที่ 4 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสภายในและภายนอกเซล 39

ตารางที่ 5 แสดงขั้นตอนการทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์บางส่วน 52

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียรหัส J7 58

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1	แสดงชนิดของเอนไซม์ไลเปส ตามแนวความคิดของ Macrae	8
รูปที่ 2	แสดงความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ไลเปส	11
รูปที่ 3	ตัวอย่างดินที่ใช้ในการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส	34
รูปที่ 4	การแยกเชื้อบริสุทธิ์	34
รูปที่ 5	การคัดเลือกแบคทีเรียโดยวิธีการเปลี่ยนสีบรอมครีซอลเพอเพิล	36
รูปที่ 6	การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส	36
รูปที่ 7	อาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นสำหรับผลิตเอนไซม์ไลเปส	37
รูปที่ 8	อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเอนไซม์ไลเปส	37
รูปที่ 9	การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ของแบคทีเรียรหัสต่างๆ	38
รูปที่ 10	การเจริญของแบคทีเรียรหัส J7	40
รูปที่ 11	การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสำหรับแบคทีเรียรหัส J7	42
รูปที่ 12	การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสำหรับแบคทีเรียรหัส J7	44
รูปที่ 13	การศึกษาอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสำหรับแบคทีเรียรหัส J7	45
รูปที่ 14	การศึกษาชนิดของแร่ธาตุที่เหมาะสำหรับแบคทีเรียรหัส J7	47
รูปที่ 15	การศึกษาพีเอชที่เหมาะสำหรับแบคทีเรียรหัส J7	48
รูปที่ 16	การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสำหรับแบคทีเรียรหัส J7	49
รูปที่ 17	การศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียรหัส J7	50
รูปที่ 18	การตกตะกอนโปรตีนด้วย $(NH_4)_2SO_4$	53
รูปที่ 19	การทำ dialysis	53
รูปที่ 20	การทำระเหิดแห้ง(Lyophilization)	54
รูปที่ 21	การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส	56
รูปที่ 22	การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส	57
รูปที่ 23	กราฟมาตรฐานของกรดโอเลอิก	66
รูปที่ 24	การวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีของ Lowry	67
รูปที่ 25	กราฟมาตรฐานของ bovine serum albumin	68

บทที่1

บทนำ

เอนไซม์ไลเปส เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมและสิ่งแวดล้อม เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้หลายอย่าง เช่น เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส (Hydrolysis)ของไขมัน และ/หรือ เอสเทอริฟิเคชัน (esterification) ของแอลกอฮอล์และกรดไขมัน หรือการแลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่างเอสเทอร์ชนิดต่างๆ, เร่งปฏิกิริยาทรานเอส-เทอริฟิเคชัน (Tranesterification ประกอบด้วยปฏิกิริยาย่อย 4 ปฏิกิริยา acidolysis, alcoholysis, ester exchange และ aminolysis) และการสังเคราะห์ เอสเทอร์ (ester) เป็นต้น (Yamane,1987)

ปัจจุบันมีการพัฒนาการใช้เอนไซม์ไลเปสอย่างมาก เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการไฮโดไลซีสไขมัน และ การสังเคราะห์กลีเซอไรด์และเอสเทอร์ต่าง ๆ แทนวิธีเดิม ข้อดีของการใช้เอนไซม์ไฮโดรไลซ์ไขมัน คือ ใช้พลังงานน้อยกว่าและได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสูงกว่าวิธีทางเคมี นอกจากนี้ยังมีการใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์สารอินทรีย์และในปฏิกิริยาย้อนกลับ กันอย่างแพร่หลาย เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ ยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในระบบที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ด้วย(ศศิธรและสุรีย์)

การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์ไลเปสมีมากมาย เช่น อุตสาหกรรมอาหารโดยเป็นตัวสร้างกลิ่นรส อุตสาหกรรมผงซักฟอก อุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมเครื่องหนัง ตลอดจนการบำบัดน้ำเสียในแหล่งชุมชน (Seitz,1974; Arnoldและคณะ,1975; Tataraและคณะ,1985) การแยกและคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสมีบทบาทสำคัญต่อการผลิตและการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ไลเปส (กิตติเดชและคณะ,2534) เอนไซม์ไลเปสนี้สามารถพบในราชนิดต่างๆ ยีสต์และแบคทีเรีย ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสอาจวัดได้โดยการไทเทรตกรดไขมันอิสระที่ได้จากปฏิกิริยาด้วยเบส หรือใช้เทคนิคทางโพลาริมิเตอร์ หรือโครมาโตกราฟี (กิตติเดชและคณะ,2534) ในโครงงานนี้เป็นการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยวัดจากการเปลี่ยนสี บรอมครีซอลเพอเพิล และหากิจกรรมของเอนไซม์ด้วยการไทเตรตกรดไขมันอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยากับเบส

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส
2. เพื่อศึกษาวิธีการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไลเปส ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้
3. เพื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์(enzyme activity)ที่ผลิตได้
4. เพื่อศึกษาวิธีการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ในขั้นต้น
5. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปส ที่ผลิตได้
6. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

ขอบเขต

เป็นการศึกษาหาเชื้อจุลินทรีย์ในประเทศไทยที่มีศักยภาพสูงในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ทั้งนี้รวมถึงการแยกและการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปส ที่ผลิตได้ ตลอดจนชนิดและลักษณะของเชื้อดังกล่าวด้วย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบชนิดและลักษณะของจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสตลอดจนวิธีการผลิต คุณสมบัติของเอนไซม์ที่ผลิตได้ซึ่งเป็นพื้นฐานที่อาจนำไปสู่การผลิตระดับอุตสาหกรรมในอนาคต

ขั้นตอนการดำเนินการ

1. เก็บตัวอย่างจากดินแหล่งต่าง ๆ และบันทึกลักษณะดิน
2. ทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ โดยวิธีวัดความสามารถในการเปลี่ยนสี บรอมครีซอลเพอเพิล(Bromcresol purple)ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งอาหาร
3. การศึกษาลักษณเอนไซม์ไลเปสที่เชื้อผลิต
4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส
5. การทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์
6. การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ที่ผลิตได้
7. การจำแนกเชื้อแบคทีเรีย

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

เอนไซม์ไลเปส มีชื่ออีกชื่อหนึ่งว่า glycerol ester hydrolase หรือacylglycerol hydrolase(E.C. 3.1.1.3)เป็นเอนไซม์ที่มีอยู่ทั่วไปในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride)ได้กลีเซอรอล(glycerol) กรดไขมัน และ partial glycerides โดยที่เอนไซม์ไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะ glycerol-ester ของกรดไขมันสายยาว(long chain aliphatic acid) ที่บริเวณพื้นผิวของน้ำมันที่สัมผัสกับน้ำ (fat water interface)

ในสารละลายอินทรีย์ (organic solvent) ที่ไม่ละลายน้ำ เอนไซม์นี้ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์, การย้ายหมู่ ester และการเปลี่ยนแปลงของ racemic mixture ให้เป็น active alcohol หรือกรด คุณสมบัติเหล่านี้เป็นคุณสมบัติที่สำคัญทางเทคโนโลยีชีวภาพ (Biotechnology) ของเอนไซม์ไลเปส

ความสนใจในเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ในระยะเวลา 20 ปีที่ผ่านมา โดยเกี่ยวข้องกับการหาเอนไซม์จากจุลินทรีย์จำนวนมาก ที่ได้จากกระบวนการทางชีววิทยาซึ่งมีการค้นคว้าอย่างกว้างขวาง สำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรมอย่างมีประสิทธิภาพ โดยใช้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย และเชื้อรา เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ มีคุณสมบัติและความจำเพาะต่อสับสเตรท (substrate specificity) ที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งทำให้เป็นที่สนใจสำหรับ นำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เอนไซม์ไลเปสจำนวนมากที่ถูกแยกได้ สามารถนำไปใช้เป็น food additives (flavour-modifying enzyme),industrial reagent (glyceride-hydrolysing enzyme) และ cleaners (เติมลงในผงซักฟอก) รวมทั้งในยา (digestive drugs, diagnostic enzyme)

วิธีการแยก และการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ ที่สำคัญ คือ จุลินทรีย์ และสัตว์ ได้มีการค้นคว้าและรายงานแล้วว่ากระบวนการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคพื้นฐานที่ไม่เฉพาะเจาะจงโดยทำเป็นลำดับขั้นตอน เช่น การตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$, gel filtration และ ion-exchange chromatography หรือเทคนิคใหม่ คือ affinity chromatography ซึ่งนิยมใช้กันมาก เนื่องจากสะดวกและทำให้ได้เอนไซม์ไลเปสที่บริสุทธิ์

แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสจากสัตว์ (Mammalian lipases)

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเอนไซม์ที่ย่อยไขมันถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม

1.เอนไซม์ไลเปส ที่ออกสู่ระบบการย่อยโดยอวัยวะพิเศษ

2.เอนไซม์ไลเปส ในเนื้อเยื่อ

3.เอนไซม์ไลเปส ในนม

Verger เป็นผู้จำแนกชนิด ของเอนไซม์ไลเปสที่พบตามระบบย่อยโดยดูจากบริเวณที่เกิดปฏิกิริยา , แหล่งกำเนิดของเอนไซม์ (เนื้อเยื่อ หรือจาก เซล) และความจำเพาะต่อสับสเตรท (Gargouri และคณะ.,1989) (ตารางที่ 1)

เอนไซม์ไลเปสจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ถูกทำให้บริสุทธิ์อย่างสมบูรณ์ทำให้สามารถหาลำดับของกรดอะมิโน (amino acid sequence) ได้ในเอนไซม์ไลเปสที่สำคัญหลายชนิด เช่น จากตับอ่อน กระเพาะ (Verger , 1984 ; Gargouri และคณะ.,1989)

การศึกษา Crystallo graphic และ x-ray ทำให้ทราบถึงโครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อน (pancreatic lipase) ในคน (Gubernator และคณะ.,1991; Chapus และคณะ., 1991) , porcine pancreatic lipase-colipase complex (Cambillau ,1991,Cambillau และ Bourne,1991) ในคน,กระต่าย และเอนไซม์ไลเปสจากกระเพาะชนิดอื่น ๆ (Abergelและคณะ.,1991,Cambillau,1991)

ตารางที่ 1 แสดงประเภทของเอนไซม์ไลเปสจากสัตว์

บริเวณสำคัญที่เกิดปฏิกิริยา	กระเพาะ (Stomach)	ลำไส้เล็ก (Small intestine)	
Generic name	Acid lipase	Colipase dependent lipase	Bile salt dependent lipase
Tissular	Tongue Pharyny Stomach	Exocrine Pancreas	Human milk Exocrine pancreas
Specific name	Lingual lipase Salivary lipase Pharyngeal lipase Gastric lipase Preduodenal	Pancreatic lipase	Bile salt-stimulated lipase Carboxyl-ester lipase

เอนไซม์ไลเปสจากพืช (Plant lipase)

ถึงแม้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจะมีอยู่ในเนื้อเยื่อของพืชหลายชนิด(ข้าวเจ้า ข้าวโอ๊ต ข้าวโพด และปาล์ม) แต่การศึกษาดังกล่าวยังมีรายงานอยู่เล็กน้อย โดยศึกษาเพียงการกระจายของเอนไซม์ไลเปสในพืชทั้งต้น ยกเว้นใน เมล็ด และ ผล

ตามปกติ เมล็ดจะประกอบด้วยไตรกลีเซอร์ไรด์อยู่ในปริมาณพอสมควร ซึ่งเกิดจากเอนไซม์ไลเปสพวก triglyceride hydrolase จะพบมากในเมล็ดละหุ่งซึ่งเป็นที่รู้จักมากที่สุดในเอนไซม์ไลเปสจากพืช ใน10 ปีที่ผ่านมา ยังมีรายงานเกี่ยวกับการทำเอนไซม์ไลเปสอยู่ไม่มาก แต่อย่างไรก็ตาม การเพาะเมล็ดที่ให้น้ำมันก็ได้ถูกทดสอบเพื่อเป็นแหล่งของเอนไซม์ไลเปส สามารถได้จาก การสกัดออกด้วยอะซิโตน , สารละลายบัฟเฟอร์จากพืชที่เจริญเติบโตได้ง่าย เช่นต้นอ่อนของ rape (*Brassica napus*), mustard (*Sinapis alba*)cotylidon ของ lupine (*Lupinus alba*)(Antonian,1988)

เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ (Microbial lipase)

เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ส่วนมากเป็น extracellular enzymeมีการหลั่งผ่านexter nal membrane เข้าไปยังอาหารเลี้ยงเชื้อ สภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์มีความสำคัญมาก เนื่องจากสภาวะในการเลี้ยงมีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ และ อัตราส่วนของ extracellular ต่อ intracellular lipase ปริมาณของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตขึ้นจะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น อุณหภูมิ , พีเอช , ส่วนประกอบของไนโตรเจน และ แหล่งคาร์บอน , ไขมัน , ปริมาณออกซิเจนที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การผลิตเอนไซม์ไลเปส ถูกกระตุ้นโดยไขมัน เช่น เนย , น้ำมันหมู , น้ำมันมะกอกและกรดไขมัน (Suzukiและคณะ.,1988; Omarและคณะ.,1987a)

หลังจากการหมักจะต้องมีการกำจัดเซลออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการปั่นเหวี่ยง หรือการกรอง สารละลายที่แยกเซลออกแล้ว จะนำมาทำให้เข้มข้นขึ้นโดย ultrafiltration , ตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ หรือสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์ วิธีการที่กล่าวมานี้ส่วนใหญ่ใช้เป็นขั้นตอนในการแยกเอนไซม์ เอนไซม์จะถูกทำให้เข้มข้นและในขณะเดียวกันก็เป็นการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น (3 เท่า) ถ้าเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส ในอาหารที่มีไขมันมาก การแยกเอนไซม์ขั้นแรกจะใช้การสกัด หรือตกตะกอน ด้วยสารละลายอินทรีย์ เช่น เอธานอล , อะซิโตน หรือบิวทานอล วิธีการแยกเป็นขั้นตอนที่สำคัญมากสำหรับการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

หลังจากทำให้เข้มข้นและแยกเอนไซม์อย่างคร่าว ๆ แล้ว เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ (extracellular enzyme) จะถูกทำให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นโดยการรวม วิธีการโครมาโตกราฟี หลาย ๆ แบบเข้าด้วยกัน

มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากการหมักโดยใช้จุลินทรีย์ต่างๆ เช่น *Aspergillus niger, Candida cylindracae , Mucor jarahihus ,Pseudomonas fluorescens* ซึ่งจะหลั่งเอนไซม์ผ่านผนังเซลออกสู่ภายนอก

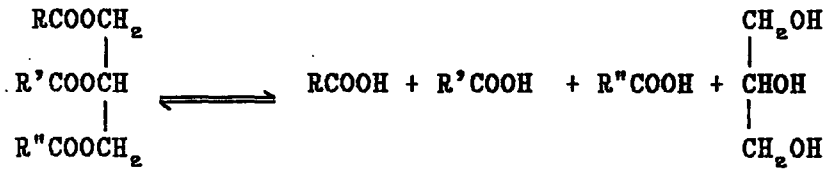
ชนิดของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์

Macrae (1983) แบ่งเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ ออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้คือ

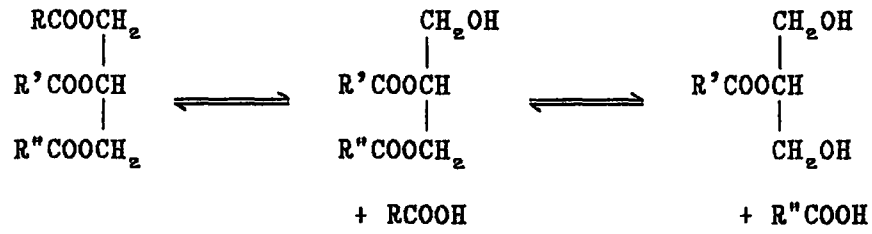
เอนไซม์ไลเปสกลุ่มที่ 1 เป็นเอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ เอนไซม์ไลเปสพวกนี้จะย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้สมบูรณ์ ดังนั้นจะได้กรดไขมันและกลีเซอรอล เป็นผลิตภัณฑ์ แต่อาจจะพบไดกลีเซอไรด์(diglyceride) และโมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) เป็นสารตัวกลาง (intermediate) ในปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracae , Corynebacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus* ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสกลุ่มนี้ได้แสดงในรูปที่ 1

เอนไซม์ไลเปสกลุ่มที่ 2 จะมีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ซึ่งไตรกลีเซอไรด์ที่ถูกเอนไซม์กลุ่มนี้ย่อยจะได้ผลิตภัณฑ์ คือกรดไขมัน 1,2,(2,3) diglyceride และ 2- monoglyceride แต่ 1,2,(2,3) diglyceride และ 2- monoglyceride นั้นเป็นพวกที่ไม่คงตัว (unstable) ถ้ามีการบ่มไว้เป็นเวลานานพอจะมีการเกิด acyl migration ทำให้ได้ 1,3-diglyceride และ 1(3)-monoglyceride ซึ่งจะถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ได้กรดไขมันกับกลีเซอรอล เอนไซม์ไลเปสที่อยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์พวก *Aspergillus niger, Mucor javanicus* และในพวก *Rhizopus* อีกหลายสปีชีส์ (species) ปฏิกิริยาของเอนไซม์กลุ่มนี้ ดังแสดงในรูปที่ 1

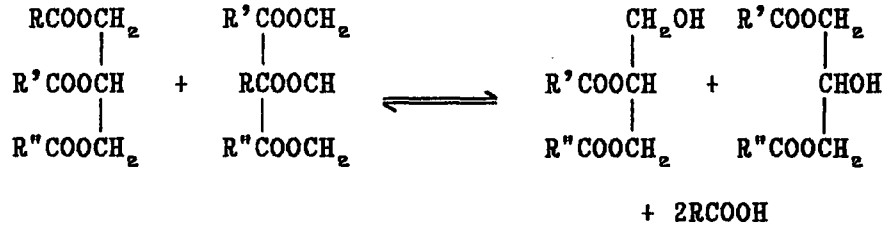
(I) เอนไซม์ไลเปส ที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์



(II) เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์



(III) เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์



รูปที่ 1 แสดงชนิดของเอนไซม์ไลเปส ตามแนวความคิดของ Macrae (1983)

เอนไซม์ไลเปสกลุ่มที่ 3 จะมีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุล ไตรกลีเซอไรด์ ซึ่ง เอนไซม์ไลเปส จากจุลินทรีย์ทั่วไปไม่มีคุณสมบัติข้อนี้ ยกเว้น เอนไซม์ไลเปส จากจุลินทรีย์บางพวก เช่นเอนไซม์ไลเปส จาก *Geotrichum candidum* ที่ย่อยไตรกลีเซอไรด์ที่มี cis double bond ตรงตำแหน่งที่ 9 ได้ดี แต่จะย่อยสลายกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) กับกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ที่ไม่มี double bond ตำแหน่งที่ 9 ได้ไม่ดี ปฏิกิริยาของเอนไซม์กลุ่มนี้ดังแสดงในรูปที่ 1

อย่างไรก็ตาม Yamane (1987) จะแบ่งเอนไซม์ไลเปส ออกเป็น 2 กลุ่มเท่านั้น คือ พวกที่มีคุณสมบัติจำเพาะต่อตำแหน่งที่ 1, 3 ของไตรกลีเซอไรด์ และพวกที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ โดยให้ความเห็นว่าคำว่า เอนไซม์ไลเปส มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันนั้น มีความหมายที่กว้างอยู่ เพราะรายงานส่วนใหญ่เมื่อกล่าวถึงความจำเพาะชนิดนี้ จะกล่าวในรูปของ relative hydrolysis rate ของ single triglyceride กับจำนวนคาร์บอนในกรดไขมัน นั่นคือ เอนไซม์ไลเปสทำหน้าที่ไฮโดรไลซ์ไตรกลีเซอไรด์อยู่ดี โดยไม่จำเป็นว่า จะเป็นชนิดไหนแต่จะทำงานด้วยอัตราเร็วที่ต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไลเปส ไม่มีความจำเพาะต่อกรดไขมันโดยแท้จริง ดังนั้น คำว่าเอนไซม์ไลเปส มีความจำเพาะต่อกรดไขมันนั้น จึงมีความหมายไม่ชัดเจน เพราะจากความจริงที่ว่า อัตราเร็วของการไฮโดรไลซีส จะสูงหรือไม่นั้น เป็นผลมาจากทั้ง สับสเตรต และ ปัจจัยทางกายภาพหลายปัจจัย เช่น กรดไขมันอยู่ในรูปที่เป็นของแข็งหรือของเหลว, ขนาดของ emulsion, อัตราการปั่นน้ำกับสับสเตรต (degree of turbulence) รวมทั้งความสามารถในการละลาย โดยเฉพาะของไตรกลีเซอไรด์ ที่มีคาร์บอนอยู่ในปริมาณน้อย ดังนั้น เอนไซม์ไลเปส จึงควรจะมีเพียง 2 กลุ่มเท่านั้นซึ่งYamane (1987)ได้ให้ความเห็นเพิ่มเติมด้วยว่า เอนไซม์ไลเปส ทั้ง 2 กลุ่มนี้จะไม่ถูกแบ่งออกจากกันโดยเด็ดขาด เพราะเอนไซม์ไลเปส พวกที่จำเพาะต่อตำแหน่ง 1,3 ก็คือ เอนไซม์ไลเปส ที่ไม่มีความจำเพาะ ที่มีความสามารถไฮโดรไลซ์ ได้น้อยกว่านั่นเอง Okumura และคณะ (1981) พบว่าเอนไซม์ไลเปสพวกที่มีความจำเพาะ จะมีการ esterify (reverse hydrolysis) ระหว่างที่มีการไฮโดรไลซ์ได้ดีกว่า และเชื่อว่าเพราะเหตุนี้จึงทำให้เอนไซม์ไลเปสพวกไม่มีความจำเพาะ สามารถย่อยสลายซับสเตรตได้รวดเร็วกว่าพวกที่มีความจำเพาะ

การทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์

เอนไซม์ไลเปสสามารถทำปฏิกิริยาได้ 3 ชนิด คือ ไฮโดรไลซีส , การสังเคราะห์เอสเทอร์ และ ทรานเอสเทอริฟิเคชั่น ดังแสดงในรูปที่ 2 ในบางครั้งผู้วิจัยบางคนเรียกปฏิกิริยา "Tranesterification"ว่าเป็น"interesterification" แต่ Yamane (1987)ให้เหตุผลว่า ในทางชีวเคมี ปฏิกิริยาที่มีการแลกเปลี่ยนสารชนิดหนึ่งไปยังอีกชนิดหนึ่ง(transfer group) ที่เป็น สารเคมีพวกเดียวกัน (chemical species) จะเรียกปฏิกิริยานั้นว่า "trans" ดังนั้นปฏิกิริยาที่มีการแลกเปลี่ยนสารเคมีพวกเดียวกัน จากการทำงานของเอนไซม์ไลเปส จึงน่าจะเรียกว่าปฏิกิริยา "tranesterification"มากกว่าที่จะเรียกว่า "interesterification"

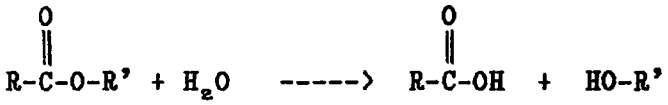
ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตเอนไซม์ไลเปส ในรูป extracellular enzyme ทั้งเชื้อรา พาก *Rhizopus japonicus* NR 400 (Suzuki และคณะ,1986) *Geotrichum candidum* Link (Tsujisaka และคณะ ,1973) *Humicola lanuginosa* No.3 (Omar และคณะ, 1987b) เชื้อยีสต์พาก *Candida deformans* (Zach) (Muderhwa และ Ratamahenina, 1985)เชื้อแบคทีเรียพาก *Pseudomonas aeruginosa* (Stuer และคณะ, 1986) *Pseudomonas fragi* 22.39 B (Nishio และคณะ,1987 b)และ *Alcaligenes sp.* strain No.679 (Kokusho และคณะ,1982 b) เป็นต้น แต่จุลินทรีย์บางพวกก็ผลิตเอนไซม์ไลเปสในรูปของ cell-bound lipase เช่นพาก *Saccharomycopsis lipolytica* (Ota และคณะ,1982) บางพวกก็ผลิต intracellular lipase เช่น *Alcaligenes denitrificans* (Odera และคณะ,1986) บางพวกก็ผลิตได้ทั้ง extracellular lipase และ cell-bound lipase ในจุลินทรีย์ชนิดเดียวกันเช่น *Rhizopus delemar* (Iwar และ Tsujusaka, 1974 a)

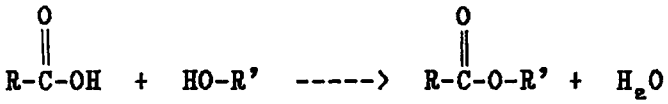
เมื่อพิจารณาถึงช่วงการเจริญ (growth phase) ที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ พบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ จะผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดในช่วงปลายของ logarithmic phase ทั้งแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* (Stuer และคณะ,1986) และยีสต์ *Candida deformans* (Zach) (Muderhwa และ Ratamahenina,1985) แต่จุลินทรีย์บางชนิดจะผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้สูงสุดเมื่อเลย logarithmic phase ไปแล้ว (อยู่ในช่าง stationary phase) เช่น *Alcaligenes sp.* No. 679 (Kokusho และคณะ, 1982 b) โดยที่ Suzukiและคณะ (1988) เชื่อว่าในการผลิต extracellular enzyme นั้น ถ้าเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในสภาพกึ่งอดอาหาร (semi-starved) จะเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสมาก เพราะ extracellular enzyme ส่วนมาก (รวมทั้งเอนไซม์ไลเปส) จะถูกปล่อยออกมามาก ที่สุดในช่วงปลาย หรือ post expotential growth phase ซึ่งสภาพขณะนั้นสับสเตรต ที่สำคัญจะเริ่มขาดแคลนแล้ว

จากรายงานหลายฉบับที่เกี่ยวข้องกับการคัดเลือกเชื้อ และการหาสภาพที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส พบว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะต้องการอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสแตกต่างกัน ซึ่งทุกสูตรจะประกอบไปด้วยส่วนสำคัญคือ แหล่งคาร์บอน, แหล่งไนโตรเจน และธาตุอาหาร พบว่า จุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต เอนไซม์

(1) Hydrolysis of ester

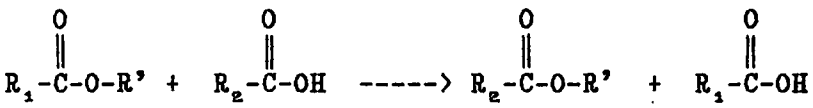


(2) Synthesis of ester

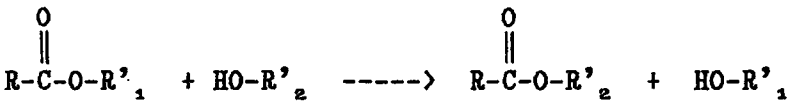


(3) Transesterification

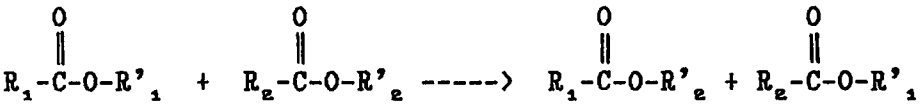
(3.1) Acidolysis



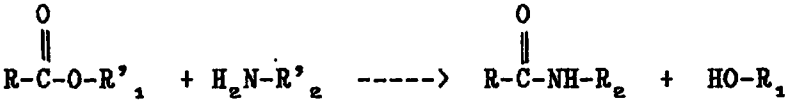
(3.2) Alcoholysis



(3.3) Ester exchange (interesrification)



(3.4) Aminolysis



รูปที่ 2 แสดงความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

ไลเปส ต่างกัน จุลินทรีย์บางชนิดต้องการแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว เช่น *P.fluorescens* ต้องการ defatted soy flour (Kosugi และคณะ,1988) ขณะที่ *Chromobacterium viscosum* ต้องการแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม 2 ชนิดคือsoluble starchและsoybean meal

ในทำนองเดียวกัน แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในจุลินทรีย์แต่ละชนิดก็แตกต่างกัน บางชนิดต้องการแหล่งไนโตรเจนเป็นสารอินทรีย์ เช่น *Chromobacterium viscosum* ต้องการยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจน (Yamaguchi และคณะ,1973) แต่ *Alcaligenes sp.* ต้องการ $NaNO_3$ ซึ่งเป็นสารอนินทรีย์ เป็นแหล่งไนโตรเจน (Kokusho และคณะ,1982 b) นอกจากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนแล้ว แร่ธาตุก็มีความสำคัญเช่นกัน พบว่า K_2HPO_4 และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ เป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด ทั้งใน *P.fluorescens* (Kosugi และคณะ,1988) *P.nitroreducens* nov.var. thermotolerances (Watanabe และคณะ,1977) และ *Chromobacterium viscosum* (Yamaguchi และคณะ,1973)

นอกจากแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุแล้ว สารเคมีที่สำคัญที่ถูกกล่าวถึงเสมอว่ามีบทบาทต่อการผลิต เอนไซม์ไลเปส ก็คือ ไตรกลีเซอไรด์ พบว่าบทบาทของ ไตรกลีเซอไรด์ ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสในจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน จะแตกต่างกันมาก Omar และคณะ (1987 b) พบว่าเชื้อรา *Humicola lanuginosa* จะผลิตเอนไซม์ไลเปสได้น้อยมากถ้าปราศจากไตรกลีเซอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพราะ ไตรกลีเซอไรด์ ปริมาณเล็กน้อยจะทำหน้าที่ เป็นสารชักนำ (inducer) ตัวสำคัญในการกระตุ้นให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง ซึ่งสอดคล้องกับ Kosugi และ Kamibayashi (1971) และ Suzuki และคณะ(1988) ที่พบว่าถ้าเติมไตรกลีเซอไรด์ปริมาณเล็กน้อย ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้มากกว่าการไม่เติมไตรกลีเซอไรด์เลย แต่ในทางตรงกันข้าม Watanabe และคณะ (1977) กลับรายงานว่า ไตรกลีเซอไรด์ จะไปยับยั้งการผลิต alkaline lipase จาก *P.fragi* นอกจากนี้ Chander และคณะ (1981) ก็พบว่า ไตรกลีเซอไรด์จะไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไลเปส จาก *R.stolonifer* ด้วย จากรายงานที่กล่าวมาแล้ว คาดว่าจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส จะแบ่งได้ 2 พวก พวกแรกคือจะผลิตเอนไซม์ไลเปสในรูป constitutive enzyme ที่ไม่จำเป็นต้องเติมไตรกลีเซอไรด์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อก็สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงและพวกที่สองจะผลิตได้ทั้ง constitutive lipase และ inducible lipase แต่ inducible lipase จะมีปริมาณมากกว่ามาก จึงจำเป็นต้องมี

ไตรกลีเซอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อชักนำการผลิตเอนไซม์ไลเปส อย่างไรก็ตาม Suzuki และคณะ (1988) พบว่าถ้ามีไตรกลีเซอไรด์ในปริมาณที่มากเกินไปก็จะยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เช่นกัน

แบคทีเรียส่วนใหญ่จะผลิตเอนไซม์ไลเปสในรูป inducible enzyme ซึ่งเอนไซม์จะถูกผลิตได้สูงสุดเมื่อมีการเจริญอยู่ในช่วงปลาย log phase ที่มีสภาพกึ่งอดอาหาร ถ้ามีการเลี้ยงในสภาพที่มีน้ำมันมากเกินไป จะไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์ได้ ถ้าต้องการจะเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเช่นนี้ Suzuki และคณะ (1988) ได้แนะนำให้ใช้ fed-batch fermentation เพราะวิธีการนี้จะค่อยๆ ปล่อยน้ำมันซึ่งเป็นสับสเตรต ทีละน้อย ทำให้มีการชักนำ ให้เกิดเอนไซม์ไลเปสพร้อมๆ กับเป็นการจำกัดปริมาณน้ำมันไม่ให้มีปริมาณมากเกินไป และในขณะเดียวกันจะเป็นการจำกัดเซล ให้อยู่ในสภาพกึ่งอดอาหาร ซึ่งเป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ด้วย

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

1. อุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง

เนื่องจากงานวิจัยแต่ละชิ้นมีวัตถุประสงค์แตกต่างกัน ทำให้มีวิธีการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน ดังนั้นเอนไซม์ไลเปสที่เป็นผลผลิตจากจุลินทรีย์เหล่านั้นจึงมีคุณสมบัติแตกต่างกัน (Yamane,1987) จุลินทรีย์บางชนิดผลิตเอนไซม์ไลเปส ที่มีพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วงเป็นกลาง เช่น *Humicola lanuginosa* (Omar และคณะ,1987 b) บางชนิดมี พีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วงเป็นกรด เช่น *Rhizopus japonicus* NR 400 (Suzukiและคณะ,1986) และบางชนิดมีพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วงเป็นด่าง เช่น *P.fragi* (Watanabe และคณะ,1977)

ในทำนองเดียวกันจุลินทรีย์ต่างชนิดกันก็จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่างกัน บางชนิดมีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่อุณหภูมิสูง เช่น *Humicola lanuginosa* (Omar และคณะ,1988) บางชนิดมีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่อุณหภูมิปานกลาง เช่น *Rhizopus delemar* (Iwai และ Tsujisaka,1974 a)

อุณหภูมิและพีเอชนอกจากจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แล้ว ยังมีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ด้วย โดยทั่วไปเอนไซม์ไลเปสถูกทำลายได้ง่ายเมื่อบ่มที่อุณหภูมิไม่สูงนักเช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Penicillium roqueforti* ถูกทำลายเมื่อบ่มไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที(Shahaniและคณะ,1975)และเอนไซม์ไลเปสจาก*Saccharomycopsis lipolytica*

ถูกทำลายเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (Ota และคณะ,1982) มีเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ไม่กี่ชนิดที่ทนความร้อนสูง เช่น เอนไซม์ไลเปส จาก *Humicola lanuginosa* (Omarและคณะ,1987b)แต่ในทางตรงกันข้าม เอนไซม์ไลเปส ส่วนใหญ่จะมีความคงทนในช่วงพีเอชกว้าง เอนไซม์ไลเปสจาก *Geotrichum candidum* มีเอนไซม์ไลเปสเหลือ 100% เมื่อบ่มที่พีเอช 4.2-9.8 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Tsujisakaและคณะ,1973) เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida rugosa* ก็มี เอนไซม์ไลเปสเหลือ 100% เมื่อบ่มที่พีเอช 4.8-7.2 (Kohr และคณะ,1986)

2. แคลเซียมไอออน

จากการศึกษาเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Candida deformans* (Zach) (Muderhhwa และ Ratamahenina,1985) เชื้อรา *Humicola lanuginosa* No.3 (Omar และคณะ, 1987b) แบคทีเรียพวก *Pseudomonas aeruginosa* (Stuerและคณะ,1986) พบว่า ถ้ามีการเติมแคลเซียมไอออนลงในปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ จะสามารถช่วยให้เอนไซม์ไลเปสเหล่านี้ทำงานได้ดีขึ้น ซึ่ง Shahami (1975) ได้อธิบายว่า กรดไขมันซึ่งเป็นผลผลิตจากการทำงานของเอนไซม์ไลเปส จะทำให้ส่วนผสมของปฏิกิริยา (reaction mixture) มีพีเอชลดลงทำให้เอนไซม์ไลเปส ทำงานได้ลดลง แต่แคลเซียมไอออนจะทำปฏิกิริยากับกรดไขมัน เกิดเป็นเกลือแคลเซียมในรูปสบู่ (insoluble calcium soap)แล้วตกตะกอนทำ ให้กรดไขมันลดลงพีเอชของ reaction mixture มีการสะสมของกรดโอเลอิค เพราะกรดโอเลอิคจะทำหน้าที่กระตุ้นให้แคลเซียมไอออน ทำงานแคลเซียมไอออนนี้จะทำงานได้ก็ต่อเมื่อ สับสเตรตเป็นไตรกลีเซอไรด์พวก lower fatty acid พบว่าแคลเซียมไอออนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แทนที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ และได้สรุปว่า แคลเซียมไอออนจะช่วยให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้นในบางกรณีเท่านั้น การที่แคลเซียมไอออน จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ได้นั้น ไม่ได้ขึ้นกับความคงตัวของเอนไซม์และไม่ได้ขึ้นกับการกำจัดกรดไขมันออกจาก reaction system รวมทั้งไม่ได้ขึ้นกับการเปลี่ยนรูปเป็นเกลือแคลเซียมด้วย แต่จะขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ emulsion state ของ reaction mixture ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้เนื่องมาจาก การทำงานของเกลือแคลเซียมที่มาจากการกระตุ้นของกรดไขมัน

Wang และคณะ (1988) ได้สรุปถึงสมมุติฐานความเป็นไปได้ของกลไกการทำงานของแคลเซียมไอออน ที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการทำงานของเอนไซม์ไลเปสได้ ว่า มี 3 ประการ คือ 1) แคลเซียมไอออน ช่วยเปลี่ยนรูปร่าง (conformation) ของเอนไซม์ ทำให้

ทำงานได้ดีขึ้น 2) แคลเซียมไอออน เพิ่มการดูดซึม (adsorption) ของเอนไซม์ไลเปส ที่ interface oil/water และ 3) แคลเซียมไอออน ช่วยขจัดกรดไขมันออกจากoil/water interface ทำให้เอนไซม์ไลเปสทำงานได้ดีขึ้น

อย่างไรก็ตาม พบว่าเกลือแคลเซียมไม่ได้ช่วยการทำงานของเอนไซม์ไลเปสเสมอไป Kohr และคณะ(1986) พบว่าแคลเซียมไอออนจะไปยังยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ *Candida rugosa* ขณะที่ Suzuki และคณะ (1986) รายงานว่า ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อรา *Rhizopus japonicus* NR 400 Wangและคณะ(1988) พบว่า ถ้าวิเคราะห์เอนไซม์ไลเปส โดยใช้ tributyrin และน้ำมะกอกเป็น สับสเตรต โดยไม่มีการเติม emulsifier แต่มีการกวนอย่างแรงพบว่า แคลเซียมไอออนจะไม่มีผลต่อการทำงาน ของเอนไซม์ไลเปสในสับสเตรตเหล่านี้เลย ถ้าใช้สมมติฐานที่ว่าแคลเซียมไอออนช่วยลดกรดไขมัน ออกจาก oil/water interface ก็จะอธิบายได้ว่ากรดบิวทิริก จากtributyrin สามารถ ละลายน้ำได้ดีอยู่แล้ว และกรดโอเลอิคจากน้ำมันมะกอกจะถูกขจัดออกจาก interfacial ด้วยแรงกวน (stirred oil pool) อยู่แล้ว ดังนั้นจึงไม่ต้องการ แคลเซียมไอออน ในระบบนี้

3. Emulsifying agent

Shahani (1975) รายงานว่า emulsifying agent พวกเกลือน้ำดี (bile salt) จากถุงน้ำดีจะช่วย emulsify น้ำมัน ทำให้ pancreatic lipase สามารถทำงานได้ดีขึ้น ขณะเดียวกัน Kokusho และคณะ (1982 b) พบว่าเกลือน้ำดี จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพ การทำงานของ alkaline lipase จากเชื้อ *Alcaligenes sp.* เช่นกัน ขณะที่ Tomizuka และคณะ (1966) รายงานว่าเกลือน้ำดีจะทำหน้าที่ได้ทั้งกระตุ้นและยับยั้งการ ทำงานของเอนไซม์ไลเปส แต่จะทำปฏิกิริยาชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับพีเอชของปฏิกิริยาและความ เข้มข้นของเกลือน้ำดี

นอกจากเกลือน้ำดีแล้ว การเติม emulsifying agent ตัวอื่นเช่น taurocholate และdetergent ทั้งที่เป็น cationic detergent(เช่น amin8-0)non-ionic detergent (เช่น Triton WR-1339) รวมทั้ง anionic detergent (เช่น triten X-220) จะช่วย เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไลเปสได้เช่นกัน และยังพบอีกด้วยว่า emulsifying agent จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์ไลเปส และทำให้อัตราเร็วของ ปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์กลีเซอไรด์เปลี่ยนแปลงได้ด้วย แต่อย่างไรก็ตาม emulsifier จะไม่ ไปช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ไลเปสเสมอไป Watanabe และคณะ (1977) พบว่าทั้ง

anionic surfactant และเกลือน้ำดี จะยับยั้ง alkaline lipase จาก *Pseudomonas fragi* และ *Pseudomonas nitroreducens* nov.var. thermotolerans

Wang และคณะ(1988) ได้ให้ความเห็นว่าไม่เหมาะที่จะใช้ emulsifier ในการเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสในระดับอุตสาหกรรม เพราะ emulsifier จะทำให้ค่าใช้จ่ายสูงขึ้นทั้งยังเป็นเอนไซม์ไลเปสจาก *C.cylindracea* มีพีเอชที่เหมาะสม เท่ากับ 7.0 ถ้ามี emulsifier ในปฏิกิริยา แต่จะมีพีเอชที่เหมาะสม เท่ากับ 5.0 ถ้าไม่มี emulsifier ในปฏิกิริยา และพบด้วยว่าในระบบที่ไม่มี emulsifier นั้น แคลเซียมไอออน จะไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสเลย ซึ่งต่างจากระบบที่มี emulsifier ที่ แคลเซียมไอออนจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของ เอนไซม์ไลเปส ได้

4. Physical state ของสับสเตรต (oil-water interface)

เอนไซม์ไลเปสจะทำการย่อยสับสเตรตก็ต่อเมื่ออยู่ในรูป emulsion (oil-water-interface) และเอนไซม์ไลเปส ถูกดูดซึมระหว่าง oil-water interface เนื่องจากสภาพสับสเตรต ต้องอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble water) ดังนั้นการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ไลเปสจะไม่อยู่ในรูปแบบของสมการ Michialis Meten เพราะอัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา (initial rate) จะขึ้นอยู่กับจำนวนโมเลกุลที่ถูกดูดซับไว้ใน interface และความเร็วของปฏิกิริยายังขึ้นกับพื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับสับสเตรตเป็นสิ่งสำคัญด้วย โดยพบว่า ถ้าพื้นผิวของน้ำกับสับสเตรต มีเพิ่มขึ้น (มีการ emulsify มาก) การทำงานของเอนไซม์ไลเปส จะดีขึ้นด้วย สับสเตรต ทั้ง triolein และ tribuyrin ถ้ามี area of interface เพิ่มขึ้น จะทำให้ lipolytic activity ทำงานเพิ่มขึ้นด้วย นอกจากนี้ยังพบด้วยว่า น้ำนมที่ผ่านการตีไขมัน(homogenization)จะช่วยให้เอนไซม์ไลเปสในนมทำงานได้ดีขึ้น และถ้าพิจารณาถึงการผลิต glycerol จะพบว่าถ้ามีการเพิ่ม interface ระหว่าง oil droplets กับ aqueous-glycerol จะทำให้สับสเตรตกับเอนไซม์ทำงานได้ดีกลีเซอรอลก็ผลิตได้มากขึ้น (Shahani,1975)

5. ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสบนสับสเตรต

เอนไซม์ไลเปส แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ดังที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ "ชนิดของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์" ดังนั้น ปฏิกิริยาจะช้าหรือเร็วจะขึ้นกับสับสเตรต ว่าสอดคล้องกับเอนไซม์ไลเปสหรือไม่ ถ้าสอดคล้องกันปฏิกิริยาก็จะดำเนินได้อย่างรวดเร็ว และในทางตรงกันข้าม ถ้าชนิดสับสเตรตไม่สอดคล้องกับเอนไซม์ไลเปส ปฏิกิริยาก็เกิดได้ช้า

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

6. Lipase activator

Uyeda และคณะ (1983) สามารถแยกเชื้อ *Streptomyces* No.NB.BR-1381 ซึ่งสามารถผลิตโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการเป็น activator ของ เอนไซม์ไลเปส ได้ ซึ่งโปรตีนชนิดนี้มีชื่อว่าLAV LAV สามารถทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นได้โดยผ่านกระบวนการตกตะกอน culture filtrate ด้วย $(NH_4)_2SO_4$ ตามด้วย DEAE-cellulose column chromatography และสุดท้ายใช้วิธี gel filtration บน Sephadex G-100 ซึ่งวิธีการข้างต้นทั้งหมดนี้จะทำให้ LAV มีความบริสุทธิ์ขึ้น 10 เท่า LAV ที่ได้มีคุณสมบัติคงตัวที่พีเอช 3.7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 ชั่วโมงและจะคงตัวที่พีเอชดังกล่าวที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน LAV ที่บริสุทธิ์จะทนความร้อนได้สูง แต่ LAV จะไม่มีผลต่อการทนความร้อนของเอนไซม์ไลเปสจาก *Phycomyces niten* LAV จะสามารถกระตุ้นเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Phycomyces niten*, *Chromobacterium viscosum* และ *Geotrichum candidum* ส่วนกลไกการทำงานของ LAV นั้น เชื่อว่าเป็นเพราะกรดโอเลอิคซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการทำงานของเอนไซม์ไลเปสนั้น จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสได้ เนื่องจากกรดโอเลอิคเป็นกรดจะทำให้พีเอชลดลง แต่ถ้ามี LAV ในระบบ LAV จะดูดซับ (adsorb) กรดโอเลอิคไว้ทำให้ไม่เกิดการยับยั้งผลิตภัณฑ์ขึ้น ดังนั้น LAV จึงป้องกันการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากกรดไขมันได้ ทำให้เอนไซม์มีการทำงานดีขึ้น

7. Lipase inactivator

Sugiura และคณะ (1975) พบว่า สารพวกกลีเซอรอลฟอสโฟลิปิด 3 ชนิด คือ phosphotidyl ethanolamine (PE) phosphotidyl choline (PC) และ phosphotidyl inositol (PI) ที่สร้างโดย *Candida paialipolytica* ที่อยู่ทั้งในเซล และอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่สร้างจากจุลินทรีย์ตัวเดียวกันได้ พบว่าที่พีเอช 8.2 ฟอสโฟลิปิดทั้ง 3 ชนิดสามารถทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสได้ แต่ที่พีเอช 6.0 ซึ่งเป็นพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์ไลเปส ชนิดนี้จะมีเพียง PE เท่านั้นที่ทำงานได้

8. ปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

นอกจากปัจจัยอื่น ๆ ที่กล่าวมาแล้ว ไอออนโลหะก็มีผลต่อการยับยั้งเอนไซม์ไลเปสเช่นกัน โดยทั่วไปแล้ว ไอออนของพวกโลหะหนักพวก Cu^{++} , Hg^{++}, Ni^{++}, Pb^{++}, Sn^{++} และCo^{++} จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปส ไม่ว่าจะมาจากแหล่งเชื้อ *Chromobacterium sp.* (Yamaguchi และคณะ,1973) หรือ *H.lanuginosa* (Omai และคณะ,1987 a) ขณะที่เอนไซม์ไลเปสจากบางแหล่ง อาจจะทนการยับยั้งการทำงานจากโลหะบางชนิดได้ แต่ก็ยังถูกยับยั้งจากไอออนของโลหะอีกหลายชนิด เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida deformans* (Zach) ทนต่อ Co^{++} แต่ถูกยับยั้งโดย Cu^{++} , Zn^{++} (Muderhwa และ Ratamahonina, 1985)หรือ เอนไซม์ไลเปส จาก *P.fragi* 22.39 B ถูกยับยั้งจาก Sn^{++} ,Pb^{++} ,Cu^{++} และ Hg^{++} น้อย แต่ถูกยับยั้งมากถ้าเป็น Zn^{++} ,Fe^{++} (Nishioและคณะ,1987b)แต่อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ไลเปส จาก *R.japonicus* NR 400 จะเป็นเอนไซม์ไลเปส ที่ทนโลหะหนักได้ทั้ง Co^{++} ,Cu^{++} ,Ni^{++} และ Sn^{++} (Suzuki และคณะ,1986) โดยยังไม่มีรายงานใดเลยที่พบว่า โลหะหนักจะช่วยเพิ่มการทำงานของ เอนไซม์ไลเปส

ในทางตรงกันข้ามกับไอออนของโลหะหนัก ไอออนของโลหะ (metal ion) จะสามารถช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ไลเปส จาก *Chromobacterium* ได้(Yamaguchi และคณะ, 1973) ทำนองเดียวกัน Li^{+} , K^{+} , Ca^{++} ช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจาก *H.lanuginosa* (Omar และคณะ,1987 a) แต่อย่างไรก็ตาม ไอออนโลหะอาจจะไม่เพิ่มของทำงานของเอนไซม์ไลเปสเสมอไป ดังที่ Muderhwa และ Ratamahenina (1985) ได้พบว่า Ca^{++} และ Mg^{++} ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจาก *C.deformans* (Zach)

การทดสอบการทำงานของเอนไซม์ไลเปส และการวัดประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

การทดสอบการทำงานของเอนไซม์ไลเปส และการวัดประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไลเปส นั้น ทำได้โดยการวัดกรดไขมันที่เพิ่มขึ้น หรือว่าวัดปริมาณสับสเตรตที่หายไป ในการตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ไลเปสในรูป quantitative ในตัวอย่างอาหาร หรือตัวอย่างที่เป็นสิ่งมีชีวิต (biological materials) อาจจะทำได้โดยใช้ Nile blue sulfate ย้อมสีเม็ดไขมัน ถ้าเป็นเม็ดไขมันจะติดสีชมพู แต่ถ้าไขมันบางส่วนถูกย่อย(partially hydrolyzed) เม็ดไขมันจะถูกเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

การทดสอบทาง quantitative นี้ สามารถทำได้อีกวิธี คือจะเตรียม emulsion ของ tributyrin agar แล้วเท emulsion นั้นให้กระจายบนพื้นที่ที่ต้องการใน microscope slide จากนั้นตัด agar ออกให้เป็นรู แล้วเติมสารละลายของเอนไซม์ไลเปสที่ต้องการทดสอบลงในรูดังกล่าว บ่มไว้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เพื่อให้เอนไซม์ทำงาน ถ้ามีเอนไซม์ไลเปสในสารละลาย ความขุ่นของ agar รอบๆ รูที่มีสารละลายเอนไซม์ไลเปสอยู่นั้นจะหายไป แล้วจะเกิดโซนใส (clear zone) ปรากฏขึ้นมาแทน วิธีนี้สามารถใช้ได้กว้างขวาง เพราะสามารถเปลี่ยนสับสเตรต ทำให้ทราบว่าเอนไซม์ไลเปสจะมีความไวต่อสับสเตรตตัวใด(Shahani,1975)

ส่วนการตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ไลเปส สามารถทำได้โดยใช้ 2 หลัก การใหญ่ ๆ คือ การวัดสับสเตรตที่หายไปและวัดปริมาณกรดไขมันที่เกิดขึ้นภายหลังการไฮโดรไลซ์เช่นกันซึ่งวิธีการวัดดังกล่าวมีหลายวิธี แต่สามารถสรุปได้ดังนี้(Shahani,1975;Jensen,1983)

1. วิธี Potention หรือ pH stat

วิธีนี้จะวัดปริมาณกรดไขมันที่ได้จากการไฮโดรไลซ์สับสเตรตของเอนไซม์ไลเปส โดยการไทเทรตกรดไขมันที่ได้กับสารละลายมาตรฐาน NaOH โดยคำนวณประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไลเปส โดย 1 หน่วยของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ 1 ไมโครโมลของกรดไขมันที่ผลิตออกมาได้ภายใน 1 นาที

วิธีการนี้ยังสามารถดัดแปลงได้ โดยจะแยกกรดไขมันที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ ออกจาก reaction mixture โดยผ่าน reaction mixture ลงใน silica gel columnกรดไขมันที่แยกออกมาได้จะนำมาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน NaOH ซึ่งวิธีการดัดแปลงนี้มีชื่อเฉพาะว่า silica gel method

2. วิธีลดแรงตึงผิว

เมื่อเอนไซม์ไลเปสทำปฏิกิริยาแล้วจะทำให้เกิดกรดไขมันขึ้น ซึ่งกรดไขมันที่เกิดขึ้นจะไปลดแรงตึงผิว ดังนั้น การวัดแรงตึงผิวที่ลดลงจะบอกความเข้มข้นของเอนไซม์ได้

3. เทคนิค Warburg monometric

เมื่อเอนไซม์ไลเปสทำปฏิกิริยาแล้วจะทำให้เกิดกรดไขมันขึ้น ซึ่งกรดไขมันที่ถูกผลิตขึ้นมาจะทำปฏิกิริยากับ $NaHCO_3$ ได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นจะวัดปริมาณของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ผลิตได้ เพื่อจะทราบการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

4. วิธีวัดความขุ่น

เมื่อ fat emulsion ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไลเปสแล้วสารละลายจะใสขึ้น ถ้าสามารถวัดความขุ่นที่ลดลงได้ ก็จะทราบการทำงานของเอนไซม์ได้

5. วิธี Photometric

วิธีนี้จะใช้สับสเตรตพวกที่เมื่อถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ไลเปส เช่น การใช้ acylglycerol ester ของ trinitrophenylaminouric acid เป็นสับสเตรตเมื่อถูกไฮโดรไลซ์

6. การเปลี่ยนเป็นเกลือ

เมื่อเอนไซม์ไลเปสทำปฏิกิริยาแล้วจะทำให้เกิดกรดไขมันขึ้น ซึ่งกรดไขมันจะถูกเปลี่ยนรูปไปอยู่ในรูป Cu soap Cu soap จะถูกทำปฏิกิริยาต่อได้สารที่มีสีเกิดขึ้น แล้ววัดความเข้มข้นของสีโดยใช้ spectrophotometer

7. การใช้ Radioactive fatty acid

วิธีนี้จะใช้ Oleoylglycerols ที่มี label ของ ^{14}C หรือ ^{3}H เป็นสับสเตรตแล้ววัดปริมาณผลิตภัณฑ์ในรูปของ radio assays เพื่อวัดการทำงานของเอนไซม์ วิธีนี้ใช้กับเอนไซม์ไลเปส จาก plasma ของ pastheparin เนื้อเยื่อไขมันของหนู

8. การใช้ Gas liquid chromatography

วิธีนี้จะใช้ 15:0 หรือ 17:0 เป็น internal standard เพื่อหาปริมาณกรดไขมันและปริมาณของอนุพันธ์ของกรดไขมันที่มีการ methylation เกิดขึ้น วิธีนี้จะใช้หากรดไขมันจากเซรุ่ม พลาสมา และน้ำมันพืช

9. วิธีทางอิมมูนวิทยา

วิธีนี้ใช้ได้กับ pancreatic lipase ของคน วิธีการคือใช้ hydrophilic beads ที่มีเอนไซม์ไลเปส เกาะคู่กับ antilipoprotien lipase immunoglobulin เป็นตัวหลัก จากนั้นจะเติม immunoglobulins ที่ label ด้วย ^{125}I ลงไป immunoglobulin ที่มี label นี้ จะทำปฏิกิริยาเกาะติดกับเอนไซม์ไลเปสที่อยู่บน immunosorbent ดังนั้นเราสามารถตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ไลเปสได้ เพราะปริมาณ lipoprotein lipase ในตัวอย่างจะเป็นสัดส่วนกับ radioactivity ที่เกาะกับ solid phase immunoabsorbent

10. การผ่านกรรมวิธีด้วยเอนไซม์

วิธีนี้มีข้อดี คือ สามารถใช้ได้ดีกับเอนไซม์ที่ผลิตกรดไขมันอิสระได้น้อย วิธีการคือ จะใช้ mutant ของแบคทีเรียพวกที่เป็น luminous bacterium ซึ่งแบคทีเรียพวกนี้จะมีเอนไซม์ luciferase เอนไซม์นี้จะทำปฏิกิริยากับกรดไขมันแล้วเรืองแสงได้ โดยถ้าเป็นกรดไขมันพวก

14:0 ปริมาณ 1 พิโคโมล (pmol) ก็ตรวจสอบได้แล้ว ปริมาณของ luminescence จะวัดโดยใช้ photomultiplier photometer แต่วิธีนี้มีข้อเสีย คือ มีความไวสูงมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้จุลินทรีย์ที่มี luciference หรือต้องใช้ commercial luciference ซึ่งหาได้ยาก

การทำให้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์

การศึกษาถึงคุณสมบัติต่างๆ ของเอนไซม์ จำเป็นต้องทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์สูงก่อน จึงจะนำไปทดสอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่แม่นยำ ซึ่งการทำให้เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นนั้น ได้มีผู้รายงานแล้วเป็นจำนวนมาก

การนำเอนไซม์ไลเปสไปใช้ประโยชน์

เอนไซม์ไลเปสถูกนำไปใช้ให้เป็นประโยชน์ในหลายทางด้วยกัน เช่น ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารหมักเพราะเอนไซม์ไลเปสจะเป็นตัวผลิตกลิ่นรส (flavor) ให้อาหารชนิดนั้นๆ มีกลิ่นรสเฉพาะตัวและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค รูปแบบการใช้เอนไซม์ไลเปสในอุตสาหกรรมอาหารหมักนั้นมีทั้งจงใจเติมเอนไซม์ไลเปสลงไปเพื่อให้ได้ตามวัตถุประสงค์ที่ต้องการ ซึ่งผลิตภัณฑ์เหล่านี้ได้แก่ โยเกิร์ต, blue cheese, Italian cheese, เค้ก และ cookie mixes, sweet dough และ milk chocolate เป็นต้น (Arnoldและคณะ,1975) หรืออาจใช้เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหารเหล่านั้นเป็นตัวให้กลิ่นรสก็ได้ เช่น lactic acid bacteria จะผลิตเอนไซม์ไลเปส ทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะในอาหารเนื้อหมัก พวกไส้กรอกอิตาเลียนและในผักดองพวกแตงกวาดอง และกะหล่ำปลีดอง (Seitz,1974)

นอกจากนี้ยังมีการนำเอนไซม์ไลเปส เพื่อใช้ในกระบวนการผลิตกรดไขมันด้วยเพราะกรดไขมันที่ได้จากกระบวนการผลิตทางเคมี ต้องใช้ความร้อนสูง 480 องศาฟาเรนไฮท์ และความดันสูงถึง 70 ปอรด์/ตร.นิ้ว ทำให้มีข้อเสีย คือ ต้องใช้อุปกรณ์ราคาแพงที่สามารถทนความร้อนสูงได้ รวมทั้งวิธีสิ้นเปลืองพลังงาน ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีคล้ำ และมีการสลายตัวของสารที่ต้องการด้วย ซึ่งถ้าใช้เอนไซม์ไลเปสทำงานแทนแล้วข้อเสียต่างๆเหล่านี้จะหมดไป (Linfieldและคณะ, 1984)

นอกจากนี้ alkaline lipaseยังสามารถนำไปใช้ให้เป็นประโยชน์ได้ 2 ทางสำคัญ คือ หนึ่งเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก (Tatara และคณะ,1985;Fujii และคณะ,1986) และสองเพื่อใช้แทน pancreatic lipase ในทางการแพทย์ (Kokusho และคณะ,1982 a)

และในปัจจุบันมีรายงานมากมายที่กล่าวถึงความเป็นไปได้ในการนำเอนไซม์ไลเปสไปใช้ในระบบ microaqueous พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่อยู่ในระบบดังกล่าว สามารถทำปฏิกิริยาได้ทั้ง ไฮโดรไลซีส , ทรานเอสเทอริฟิเคชั่น และการสังเคราะห์ ester (Yamane,1987) ซึ่งคุณสมบัตินี้เองทำให้สามารถนำเอนไซม์ไลเปส มาใช้สังเคราะห์สารต่างๆ ได้มากมาย เช่น สังเคราะห์กรดไขมัน และกลีเซอรอล (Hoq และคณะ,1985) สังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ (Morita และคณะ,1984) สังเคราะห์ terpene alcohol (Nishio และคณะ,1987 a) สังเคราะห์ flavor ester (Gilliesและคณะ,1984) สังเคราะห์ peptide (Matos และคณะ,1987) สังเคราะห์ biosurfactant (Chopineau และคณะ,1988) นอกจากนี้ยังสามารถใช้แยก (resolution) สาร active molecule ออกจาก racemic mixture ซึ่งเป็นสารที่แยกออกจากกันยากด้วยวิธีปกติได้ด้วย(Cambou และ Klibanov,1984;Kirchner และคณะ,1985;Dahod และ Siuto-Mangano,1987;Makita และคณะ,1987)

Seitz(1974) ได้รวบรวมการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ไลเปสที่มีการจดลิขสิทธิ์แล้ว พบว่าเอนไซม์ไลเปสถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ผงซักฟอก ยา เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์เครื่องหนัง การผลิต aliphatic acid การผลิตหมากฝรั่ง และยาสีฟัน รวมทั้งการบำบัดน้ำเสียจากแหล่งชุมชน

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์ที่ใช้

1. เครื่องแก้ว
   - หลอดทดลอง
   - บีกเกอร์
   - ฟลาสก์
   - จานเพาะเชื้อ
   - ปิเปตต์
   - บิวเรตต์
2. ตะเกียงแอลกอฮอล์
3. แท่งแก้ว,แท่งแก้วรูปตัวแอล
4. ลูปเขี่ยเชื้อ
5. กระดาษฟอล์ย และสำลี
6. อุปกรณ์จับบิวเรตต์ พร้อมขาตั้ง
7. cuvette
8. ตู้บ่มเชื้อ
9. หม้อนึ่งความดัน
10. เครื่องเขย่า(shaker)
11. เครื่องปั่นแยก(centrifuge)
12. เครื่องวัด พีเอช(pH meter)
13. เครื่องระเหิดแห้ง(Freeze dryer)
14. เครื่องผสม(mixer)
15. เครื่องชั่ง
16. spectophotometer
17. กล้องจุลทรรศน์

วิธีทดลอง

1. การแยกเชื้อบริสุทธิ์จากตัวอย่างดิน

ตัวอย่างดินที่ใช้ในการแยกเชื้อในการทดลองนี้ เก็บดินจากแหล่งต่างๆมีจำนวน 8 ตัวอย่าง ทำการแยกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ดังนี้

1.1 นำตัวอย่างดินจำนวน 1 กรัมใส่ลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 10 มล. เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม จากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว (ภาคผนวก ก ข้อ 1) ซึ่งบรรจุในหลอดทดลองหลอดละ 5 มล. บ่มหลอดอาหาร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 เมื่อมีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 1.1 (โดยสังเกตจากความขุ่นและสีที่เกิดขึ้น) ทำการถ่ายเชื้อลงสู่หลอดอาหารใหม่ที่มีองค์ประกอบเหมือนอาหารในข้อ 1.1 และทำการบ่มในลักษณะเดียวกันอีกครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าจุลินทรีย์ที่เจริญได้สามารถใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงานได้

1.3 นำเชื้อที่ได้จากข้อ 1.2 มาทำเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ให้มีความเจือจางระดับต่าง ๆ กันตามที่ต้องการ spread บนอาหารแข็ง (ภาคผนวก ก.ข้อ 2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง

1.4 แยกเชื้อโคโลนีเดี่ยวมา streak บน NA slant (ภาคผนวก ก ข้อ 3) บ่ม 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง เก็บไว้ทดลองในขั้นต่อไป

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

2.1 ใช้วิธีการเปลี่ยนสีบรอมครีซอลเพอเพิล เป็นวิธีการคัดเลือกโดยวัดความสามารถในการผลิตกรดในอาหารที่มีน้ำมันมะกอก โดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงสีบรอมครีซอลเพอเพิลเป็นเกณฑ์ (ตามวิธีของ Okuda และ Ito,1987)

เตรียมเชื้อเริ่มต้น โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้ในอาหารเหลว (ภาคผนวก ก ข้อ 4) ซึ่งบรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร 5 มล. บ่มหลอดอาหารที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมงปรับความขุ่นของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ด้วยเครื่อง spectrophotometer ให้มีความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 ดูดเชื้อเริ่มต้นแต่ละสายพันธุ์ปริมาตร 0.5 มล. ลงในหลอดอาหารที่มีองค์ประกอบ บรอมครีซอลเพอเพิล ความเข้มข้น 0.064 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งบรรจุในหลอดทดลอง หลอดละ 5 มล. บ่มหลอดอาหารในลักษณะ

เลี้ยง 45 องศา บนเครื่องเขย่าแบบ rotary ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนสี BCP ได้รวดเร็วเพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสต่อไป โดยการตรวจผลทุก 2 ชั่วโมง

2.2. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัส ต่างๆ

2.2.1 การเลี้ยงเชื้อและการเตรียม crude enzyme

นำสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในข้อ 2.1ซึ่งมีจำนวน 6 สายพันธุ์ คือ แบคทีเรียรหัส B10,C1,C7,F4,F7,J7 มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ด้วยการตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) เตรียมเชื้อเริ่มต้นของแต่ละสายพันธุ์ในลักษณะเช่นเดียวกับข้อ 2.1 โดยใส่อาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นสำหรับหากิจกรรมของเอนไซม์ (ภาคผนวก ก ข้อ 6) ลงในอาหารที่มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับอาหารที่เตรียมเชื้อเริ่มต้นที่เติม $CaCO_3$ 0.05 เปอร์เซ็นต์(ภาคผนวก ก.ข้อ 7)บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล.บ่มฟลาสก์อาหารบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30องศาเซลเซียส เมื่อครบ 48 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

2.2.2 การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

โดยวิเคราะห์ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไลเปสโดยอาศัยหลักการวัดปริมาณกรดไขมัน ที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันมะกอก โดยการไตเตรตกับสารละลายด่าง (Odera และคณะ,1986)

<u>การเตรียม สับสเตรท</u>

สับสเตรท ประกอบด้วย	polyvinyl alcohol	0.09 เปอร์เซ็นต์
	น้ำมันมะกอก	10 เปอร์เซ็นต์
	น้ำกลั่น	100 มล.

เตรียม 0.09 เปอร์เซ็นต์ polyvinyl alcohol โดยชั่งมา 0.09 กรัม ใส่ในน้ำอุ่นที่ 75-85 องศาเซลเซียส 100 มล. ผสมกันด้วย Magnetic stirrer ที่ความเร็วรอบสูง พร้อมกับมีการอุ่นสารละลายให้ร้อนตลอดเวลาจนกว่า polyvinyl alcohol จะละลายหมด

สำหรับสับสเตรท นั้นวิธีใช้ในการทดสอบจะใช้ สับสเตรท 2 มล. มีวิธีใช้ดังนี้ ใส่ polyvinyl alcohol 1.8 มล. และใส่น้ำมันมะกอก 0.2 มล. ลงในฟลาสก์ ผสมกับ

- 0.2 M ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 (ภาคผนวก ข ข้อ 1.1)
- เอนไซม์ไลเปส ที่เตรียมได้

- สารละลายมาตรฐาน 0.01 N NaOH (ภาคผนวก ข ข้อ 2)

- สารละลาย ฟีนอล์ฟทาลีน (phenolphthalein)ชั่ง 1 กรัม ฟีนอล์ฟทาลีน ลงใน แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 100 มล.

- อะซีโตน (acetone) : แอลกอฮอล์ = 1:1 ผสม อะซีโตน ปริมาณเท่ากับ แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เตรียมเฉพาะก่อนใช้เท่านั้น

วิธีการทดสอบ

ผสมสับสเตรท 2 มล. 0.2 M ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช-7.0 2 มล.และเอนไซม์ ไลเปส4 มล.ในฟลาสก์ ขนาด 250 มล. แล้วบ่มใน incubator shaker ที่อุณหภูมิ 35 องศา เซลเซียส

เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลาแล้วจะเติม อะซีโตน : แอลกอฮอล์ ปริมาณ 20 มล. ลงในฟลาสก์ เพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้น เติมฟีนอล์ฟทาลีน ปริมาณ 1 มล. แล้วจึงนำไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน 0.01 N NaOH ส่วน blank ทำโดยเติม อะซีโตน : แอลกอฮอล์ ก่อนเติมเอนไซม์

การคำนวณปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นหน่วยเอนไซม์

1 หน่วยของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อย สลายน้ำมันมะกอก ให้ได้กรดไขมันที่อยู่ในรูปของกรดโอเลอิก (oleic acid) 1 ไมโครโมล (umole) ในเวลา 20 นาที

$$\text{unit of enzyme} = \frac{(M - M_o)}{\text{slope}}$$

โดยที่ M = โมล ของ NaOH ที่ถูกใช้ในการทำปฏิกิริยา
คำนวณจาก ปริมาณ NaOH x Molar NaOH / 1000

M_o = โมล ของ NaOH ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยากับ blank
คำนวณจาก ปริมาณ NaOH x Molar NaOH /1000

slope = slope ของกราฟมาตรฐาน กรดโอเลอิก (ภาคผนวก ค ข้อ 2)
$= 1.1 \times 10^{-6}$

3. การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียรหัสJ7และลักษณะของเอนไซม์ไลเปสที่เชื้อผลิต

3.1การเจริญของเชื้อรหัสJ7

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในอาหารที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน(ภาคผนวก ก ข้อ 6) ที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ปริมาณ 50 มล. นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปรับความขุ่นด้วยเครื่อง spectophotometer ที่มีความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.1 ถ่ายลงในอาหารชนิดที่เติม 0.05 เปอร์เซ็นต์ $CaCO_3$ (ภาคผนวก ก ข้อ7) ในฟลาสก์ ขนาด 250 มล. นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2การทดสอบ intracellular และ extracellular enzyme

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียลักษณะเดียวกับข้อที่ 3.1 เป็นเวลา 8 และ 16 ชั่วโมงนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มาทำการแยกเซลออก โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียสแยกเอาส่วนใสและเซลมาทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ส่วนเซลที่ได้นำมาล้างด้วย ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 แล้วเหวี่ยงแยกด้วยความเร็ว 11,000 รอบ/นาที 5 นาที 40 องศาเซลเซียส นำไปทำให้เซลแตกโดยบดด้วย sea sand แล้วเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 นำไปปั่นเหวี่ยงเอา sea sand ออก นำส่วนใสที่ได้มาหากิจกรรมของเอนไซม์

4.การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

4.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยเลี้ยงเชื้อ ในอาหารที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน (ภาคผนวก ก ข้อ 6) ที่บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาณ 5 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาปรับความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่มีความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.1 ถ่ายเชื้อ 2.5 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มล. เขย่าในเครื่องเขย่าแบบ rotary ด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มครบ 48 ชั่วโมง นำส่วนของเหลวที่ได้ไปหาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

4.2 ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารและวิธีเดียวกับข้อ 4.1 แต่เปลี่ยนชนิดของแหล่งคาร์บอนจากน้ำมันมะกอก เป็น 1 เปอร์เซ็นต์ ของกลูโคส, ซูโครส, เคซีน, แล็กโทส, เด็กซโตส, ฟรุ๊กโทส, กลีเซอรอล, แมนิทอล, แป้ง และ ซอบิทอล รวมทั้งใช้น้ำมันมะกอกเป็นตัวควบคุม (control) วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ที่ 6,12 และ 24 ชั่วโมง

4.3 ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมตาม ข้อ 4.2 ที่มีแหล่งไนโตรเจน 0.15 เปอร์เซ็นต์ ของ$(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3, NH_4Cl, malt extract, beef extract, yeast extract, peptone และ tryptone ใช้ $(NH_4)_2SO_4$ 0.13 เปอร์เซ็นต์ กับ yeast extract 0.02 เปอร์เซ็นต์ เป็นcontrol วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ที่ 6,12 และ 24 ชั่วโมง

4.4 ศึกษาสัดส่วนของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม โดยเลี้ยงเชื้อ ในอาหารและวิธีที่เหมาะสม ซึ่งใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเป็น 0.5 เปอร์เซ็นต์, 1.0 เปอร์เซ็นต์, 1.5 เปอร์เซ็นต์ และใช้ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเป็น 0.1 เปอร์เซ็นต์, 0.15เปอร์เซ็นต์, 0.2 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ที่ 6,12 และ 24 ชั่วโมง

4.5 ศึกษาชนิดของแร่ธาตุที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่เหมาะสมตามข้อ 4.4 แต่ใช้แร่ธาตุ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ของ $FeSO_4.7H_2O$, $ZnCl_2$, $CoCl_2.6H_2O$, $AlCl_3.6H_2O$, $FeCl_3$, $CuSO_4$, $CaCl_2$, LiCl , $MnCl_2.4H_2O$, $HgCl_2$ และ $CaCO_3$ โดยตัวควบคุม ไม่ได้ใส่แร่ธาตุ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ที่ 6,12 และ 24 ชั่วโมง

4.6 ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารและวิธีที่เหมาะสมตามข้อ 4.5 แต่ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 5, 6, 7 และ 8 ด้วย 1N HCl หรือ 1N NaOH วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ที่ 12 ชั่วโมง

4.7 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารและวิธีที่เหมาะสมตามข้อ4.6 แต่บ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ 27, 30 และ 35 องศาเซลเซียส วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ที่ 12 ชั่วโมง

4.8 ศึกษาผลของความเร็วรอบของเครื่องเขย่าที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยเลี้ยงในอาหารและวิธีที่เหมาะสมตามข้อ 4.7 แต่บ่มเชื้อที่ความเร็วของเครื่องเขย่าต่างกันที่ 100, 150 และ 200 รอบ/นาที วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ที่ 12 ชั่วโมง

5. การทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้โดยเลี้ยงในอาหารและวิธีที่เหมาะสมตามข้อ 4เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แยกเซลแบคทีเรียออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยเครื่องเหวี่ยงแรงสูง10,000 รอบ/นาที สารละลายในที่ได้นำมาตกตะกอนโปรตีนโดยปรับให้สารละลายดังกล่าวมีความเป็นกรดเท่ากับ 4.0 นำตะกอนที่ได้มาละลายใน 0.2 M ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ใช้ปริมาตรน้อยที่สุด ที่จะทำให้ตะกอนละลายได้หมด แล้วทำการตกตะกอนโปรตีนด้วย$(NH_4)_2SO_4$อิ่มตัวที่ 20 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทั้งหมด ซึ่งโปรตีนโมเลกุลใหญ่จะตกลงมา แยกสารละลายส่วนใสมาตกตะกอนซ้ำด้วย $(NH_4)_2SO_4$ อิ่มตัว ที่ 40 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรทั้งหมด ซึ่งเป็นช่วงที่เอนไซม์ไลเปสสามารถตกตะกอนออกมาได้สูง โดยมีการกวนตลอดเวลา เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำไปปั่นตกตะกอนเอนไซม์ ที่ 10,000 รอบ/นาที

ส่วนตะกอนที่ได้นำมาละลายใน 0.2 M ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ปริมาตรน้อยที่สุด นำสารละลายที่ได้ไปทำ dialysis ในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน เพื่อกำจัดแอมโมเนียมซัลเฟต และนำสารละลายที่ได้ไปทำการ lyophilize ด้วยเครื่อง Freeze dry ในแต่ละขั้นตอนจะมีการตรวจวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีของLowry (Lowry's method ภาคผนวก ค ข้อ 1) และมีการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

6. การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรียรหัส J7

เตรียม crude enzyme โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารและวิธีการที่เหมาะสมดังที่ศึกษาในข้อ 4.8

6.1 ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ไลเปส โดยให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสับสเตรทในบัฟเฟอร์ ที่พีเอช 5.0-10.6 โดยพีเอช 5.0 ใช้อะซีเตตบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 1.2),พีเอช 6.0,7.0,8.0 ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์(ภาคผนวก ข ข้อ 1.1), พีเอช 9.6, 10.6 ใช้ไกลซีนบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข ข้อ 1.3) จากนั้นนำไปตรวจวัดประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

6.2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส ให้เอนไซม์ไลเปสทำปฏิกิริยากับสับสเตรท ที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปตรวจหาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

7. การจำแนกเชื้อแบคทีเรีย

7.1 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา

7.1.1 สังเกตลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ สังเกตรูปร่าง ลักษณะ และสีของโคโลนี

7.1.2 ศึกษาการติดสีแกรม โดยนำเชื้อที่แยกบริสุทธิ์ มาเขี่ยให้กระจายลงบนสไลด์ ปล่อยทิ้งไว้ให้รอยที่เขี่ยไว้แห้งแล้วตรึงด้วยความร้อนจากเปลวไฟ นำไปย้อมสีคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำ ล้างสีด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลา 10-20 วินาที ล้างด้วยน้ำอีกครั้ง แล้วย้อมด้วยสีซับฟานิน โอ(safranin O)เป็นเวลา 20-30 วินาที ล้างด้วยน้ำและซับให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดูการติดสี ถ้าติดสีม่วงเป็นแกรมบวก ติดสีแดงเป็นแกรมลบ

7.1.3 ทดสอบการเคลื่อนที่ของเซล โดยเลี้ยงเชื้อลงบนอาหาร motility test medium โดยแทงเข็มเขี่ยเชื้อลงไปจนสุดหลอดทดสอบ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ถ้าเชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้ จะมีรอยการเจริญจากรอยที่แทงไว้ ให้บันทึกผลเป็นบวก ถ้าแสดงผลเป็นลบ บ่มเชื้อไว้ 5 วัน แล้วนำมาตรวจผลซ้ำ

7.2 การศึกษาลักษณะทางชีวเคมี

7.2.1 การทดสอบคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease) ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย อายุ 24 ชั่วโมง จุดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Christensen's urea agar slant ซึ่งมียูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจน มีphenol redเป็นอินดิเคเตอร์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องนาน 1-7 วัน ตรวจผลทุกวัน ถ้าผลเป็นบวก อาหารจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีแดงชมพู เนื่องจากแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ยูรีเอส ย่อยยูเรียเกิดเป็นแอมโมเนีย ทำให้อาหารมีสภาพเป็นด่าง

7.2.2 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารอินโดล นำเชื้อแบคทีเรียเลี้ยงในอาหาร tryptone broth บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดสอบโดยการหยด Kovacs solution 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้นาน 5-10 นาที ถ้าเกิดสีแดงลอยอยู่ในชั้นของแอลกอฮอล์ภายในเวลาดังกล่าว แสดงว่าแบคทีเรียนั้นมีความสามารถในการสร้างอินโดล บันทึกเป็นผลบวก

7.2.3 การทดสอบ methyl red และ acetyl methyl carbinol เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ ในอาหารทดสอบ MR-VP medium บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลทุกวันจนครบ 4 วัน สารทดสอบใช้ methyl red Voges-Proskauer test reagent

ซึ่งเป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคสได้ในปริมาณมากพอที่ จะทำให้พีเอชลดลง ถึง 4.2 หรือต่ำกว่า โดยหยดน้ำยา methyl red 2-3 หยด ลงในอาหารที่แบ่งออกมาทดสอบประมาณ 2-3 มล. ถ้าเกิดสีแดงรายงานผลเป็นบวก ถ้าเกิดสีเหลืองรายงานผลเป็นลบ ส่วนการทดสอบ acetyl methyl carbinol เป็นการทดสอบความสามารถในการใช้กลูโคสของแบคทีเรียโดยเปลี่ยนเป็นกรด และสามารถเปลี่ยนต่อเป็นสาร acetyl methyl carbinol เมื่อบ่มนาน 48 ชั่วโมง ทดสอบโดยแบ่งอาหารที่เลี้ยงเชื้อมา 3 มล. ใส่หลอดที่สะอาดเติม α-napthol 6 เปอร์เซ็นต์ ในแอลกอฮอล์ที่เตรียมใหม่ ๆ ลงไป 1 มล. เขย่าแล้วเติม KOH 16 เปอร์เซ็นต์ 1 มล. เขย่าให้เข้ากัน ถ้าผลเป็นบวกจะเกิดสีแดงเชอรี่ภายในเวลา 4 ชั่วโมง ถ้าไม่มีสีแดงเกิดขึ้น ให้ผลเป็นลบ

7.2.4 การทดสอบความสามารถในการใช้สารซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอน ความสามารถในการใช้สารซิเตรตเพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน สามารถบอกถึงความแตกต่างระหว่าง พวกแกรมลบที่เป็นแท่ง (rod)ได้ใน simmon's citrate agar มีซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงานเพียงอย่างเดียว แบคทีเรียพวกที่ใช้ซิเตรตจะทำให้พีเอชสูงขึ้น และเปลี่ยนสีบรอมไทมอลบลูอินดิเคเตอร์ (brom-thymol-blue indicator) ในอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน วิธีทดสอบโดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์อายุ 24 ชั่วโมง จุดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ simmon's citrate agar ที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อไว้ 1-2 วัน ตรวจผลทุกวัน ถ้าสีบรอมไทมอลบลูอินดิเคเตอร์ เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียนั้นสามารถใช้ซิเตรตเป็นแหล่งคาร์บอน ให้ผลเป็นบวก ถ้าเชื้อไม่สามารถเจริญได้ อาหารจะคงมีสีเดิม

7.2.5 การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง นำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงใน starch agar ที่อยู่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1-2 วัน ตรวจผลโดยหยดสารละลายไอโอดีน (iodine solution) ให้ทั่วจานเลี้ยงเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใสรอบโคโลนี เนื่องจากแป้งถูกใช้ไป จะไม่เกิดไอโอดีนคอมเพล็กซ์ (iodine complex) ส่วนบริเวณที่แป้งไม่ถูกย่อยจะทำปฏิกิริยากับไอโอดีน เกิดสีน้ำเงินเข้ม

7.2.6 การทดสอบลักษณะของโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB agar (Eosin methylene blue agar) เขี่ยเชื้อลงบนอาหาร EMB agar บนจานเลี้ยงเชื้อ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ถ้าโคโลนีที่ได้มีลักษณะเป็นสีรอยตัดโลหะ (metallic sheen) เป็น *Eschesrichia coli* และโคโลนีเป็นสีชมพูเข้มเป็น *Enterobacter*

7.2.7 การทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ คาร์โบไฮเดรตที่ใช้ทดสอบได้แก่ กลูโคส,ซูโครส,แล็กโตส,แมนนิทอล โดยมี nutrient broth เป็นอาหารหลัก มีบรอมไทมอลบลูเป็น อินดิเคเตอร์ โดยเติมคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆอย่างละ 1 เปอร์เซ็นต์ บรรจุอาหารที่เตรียมเรียบร้อยแล้ว ลงในหลอดทดสอบที่มีหลอดดักก๊าซอยู่ภายในหลอดละ 6 มล. (หลอดทดสอบที่ใช้ต้องทำให้ปราศจากเชื้อ โดยการอบด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 180 °ซ. นาน 3 ชั่วโมง) หลอดอาหารที่บรรจุอาหารทดสอบเรียบร้อยแล้ว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอ 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 10 นาที แล้วนำออกมาแช่น้ำเย็นทันที ก่อนใช้ทดสอบควรตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 วัน เพื่อดูว่าอาหารปราศจากเชื้อหรือไม่

การทดสอบทำโดยใส่เชื้ออายุ 1-2 วัน เป็นเชื้อเริ่มต้น ลงไป 0.05 มล. (1 ลูป) บ่มนาน 24-48 ชั่วโมงตรวจดูการเกิดก๊าซจากหลอดดักก๊าซและการเกิดกรดจากการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์จากสีเขียวเป็นสีเหลือง แสดงว่าเชื้อนี้สามารถสร้างกรดจากน้ำตาลชนิดนั้นได้

7.2.8 การทดสอบความสามารถในการสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ แทง(stab)เชื้อลงในหลอดอาหาร TSI agar (triple sugar iron agar) จากรอยแทง ที่ผิวอาหารใช้ลูป streak บนผิว slant ด้วย บ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลทุกวันจนครบ 5 วันเชื้อที่ผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์จะให้สีดำของเฟอรัสซัลไฟด์ ตามรอยที่ปลูกเชื้อให้ผลเป็นบวก

TSI agar มีน้ำตาล 3 ตัวคือ กลูโคส 1 ส่วน แล็กโตส 10 ส่วน มี phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ แบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลโดยกระบวนการหมักที่ก้นหลอด แต่ที่ผิว slant จะใช้กระบวนการrespirationส่วนการใช้สารประกอบไนโตรเจนในอาหารทำให้ได้สารที่มีสภาพเป็นด่าง ดังนั้นแบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียวจึงเกิดกรดจำนวนน้อย ทำให้เกิดสีเหลืองเฉพาะที่ก้นหลอด ส่วนที่ผิว slant จะมีสีแดงเนื่องจากมีสภาพเป็นด่าง แบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลแล็กโตสหรือซูโครสด้วย จะมีสีเหลืองเกิดขึ้นที่ผิว slant ด้วย เพราะกรดที่เกิดขึ้นมีจำนวนมาก ถ้าเกิดก๊าซจากการใช้น้ำตาล จะมีฟองอากาศแทรกอยู่ในอาหาร บางครั้งถ้าก๊าซมากก็จะดันให้อาหารลอยขึ้นจากก้นหลอด

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

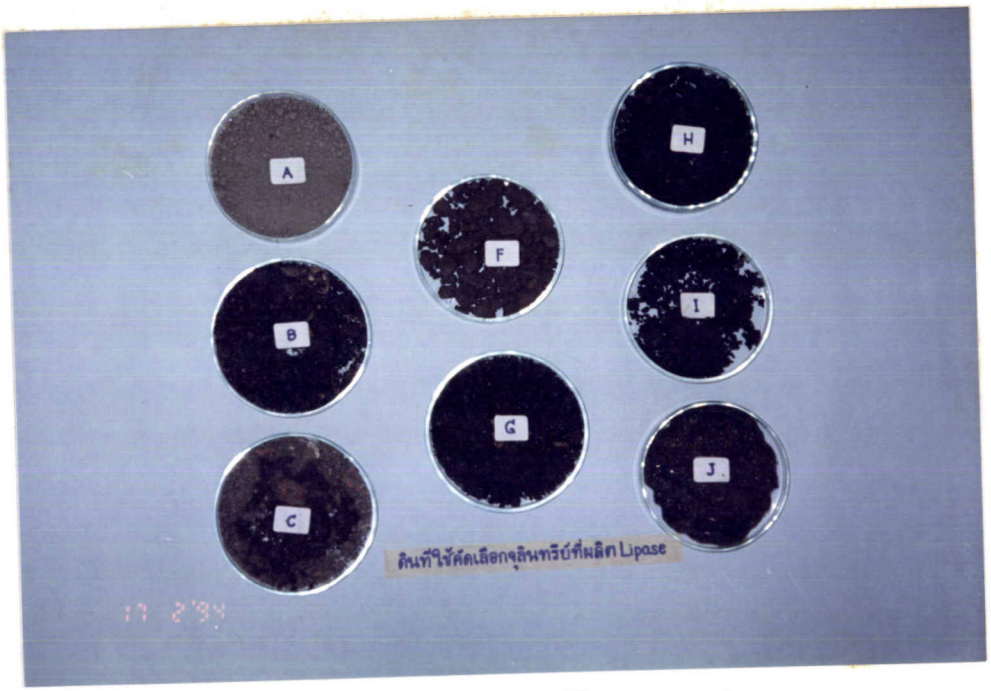
1. การแยกเชื้อบริสุทธิ์จากตัวอย่างดิน

จากตัวอย่างดินที่เก็บได้ในแหล่งต่างๆจำนวน 8 แหล่ง ดังแสดงในตารางที่ 2 และรูปที่ 3 พบว่าสามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ทั้งหมด 84 สายพันธุ์ โดยเชื้อทั้งหมดที่ได้เป็นเชื้อแบคทีเรีย

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะดินจากแหล่งต่าง ๆ และจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้

รหัสดิน	สถานที่	ลักษณะดิน	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้
A	สาธร	ดินร่วน แห้ง สีน้ำตาลปนเทา	-
B	มักกะสัน	ดินร่วนปนทราย เปียก สีน้ำตาลเกือบดำ	12
C	สมุทรปราการ	ดินปนทราย ร่วนซุย เปียก สีน้ำตาล	12
F	ตลิ่งชัน ธนบุรี	ค่อนข้างเหนียว จับเป็นก้อน สีน้ำตาล	12
G	คลองเตย	ดินร่วน เปียกชื้น สีดำเข้ม	12
H	คลองเตย	ดินร่วนปนทราย เปียกชื้น สีดำ	12
I	ลาดกระบัง	ดินปนทราย เปียกแฉะ สีดำเข้ม	12
J	ลาดกระบัง	ดินเหนียว เปียกแฉะ สีดำ	12

การแยกเชื้อบริสุทธิ์(รูปที่ 4)จะใช้สูตรอาหารแข็งที่มีน้ำมันมะกอก(olive oil)เป็นแหล่งคาร์บอน โดยไม่มีแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น เพื่อให้แน่ใจว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ โดยการศึกษาประสิทธิภาพของการย่อยสลายน้ำมันมะกอกเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน หลังจากที่แยกและทำให้เชื้อที่ได้บริสุทธิ์ แล้วเก็บเชื้อไว้ในอาหาร nutrient agar slantและกำหนดรหัสของแบคทีเรียโดยใช้รหัสของดิน ตามด้วยตัวเลขที่กำหนดขึ้นเอง



รูปที่ 3 ตัวอย่างดินที่ใช้ในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

รูปที่ 4 การแยกเชื้อจุลินทรีย์

2.การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

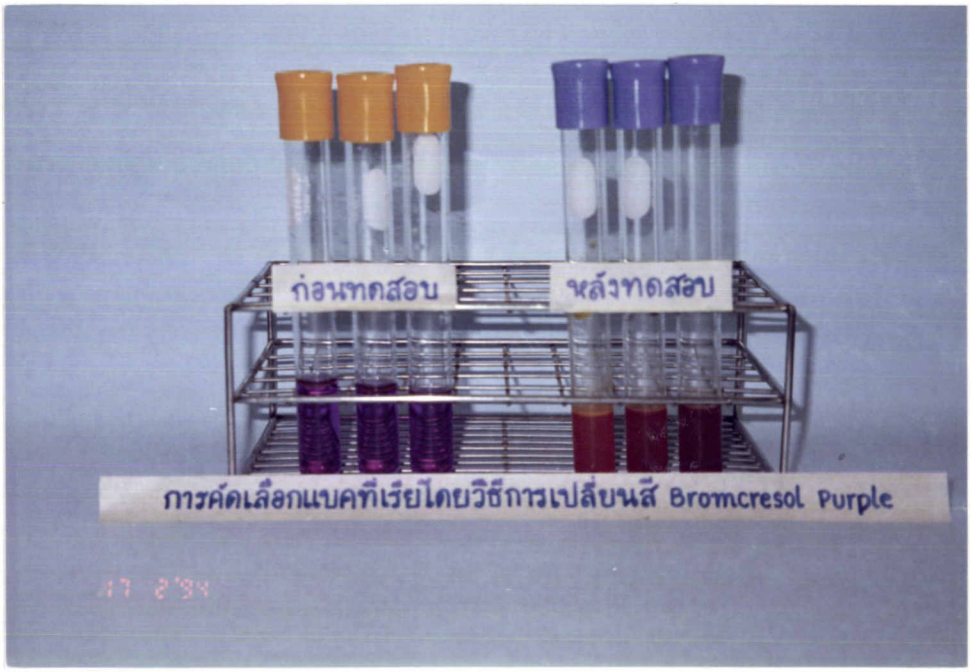
เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์ของแต่ละสายพันธุ์แล้ว จะคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณสูง โดยศึกษาจากการเปลี่ยนสีของบรอมครีซอลเพอเพิล(รูปที่ 5) ซึ่งพบว่าสามารถแบ่งลักษณะของแบคทีเรียที่แยกออกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงลักษณะของแบคทีเรียที่แยกได้

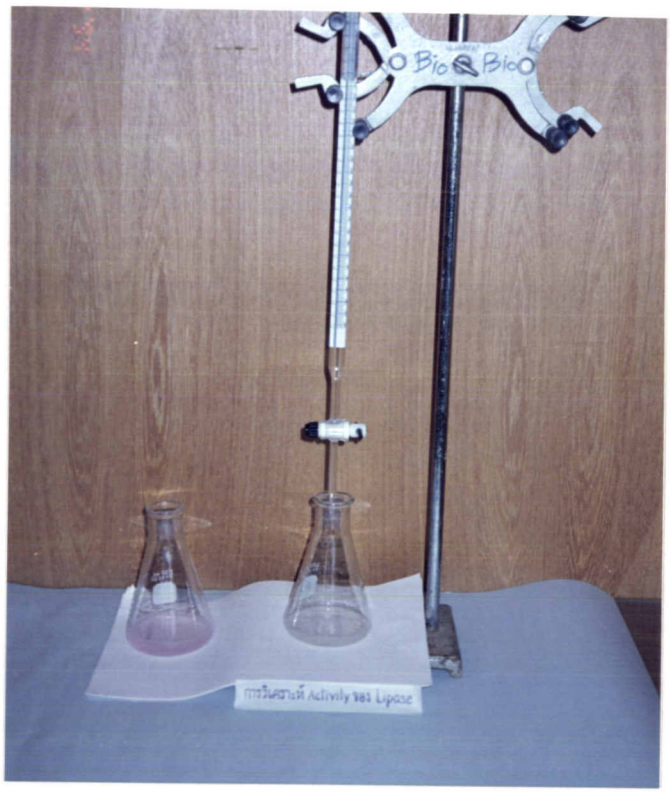
กลุ่มที่	เวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนสี Bormcresol purple (ชั่วโมง)	จำนวนสายพันธุ์
1	มากกว่า 12	22
2	8-12	14
3	4-8	38

วิธีการที่ใช้ในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่นิยม มี 2 วิธี คือ การวัดความกว้างบริเวณใสบน emulsion tributyrin agar ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้กันอยู่ทั่วไป และวิธีการเปลี่ยนสีบรอมครีเซอเพอเพิล ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งวิธีหลังเป็นวิธีใหม่ โดยกิตติเดชและคณะ(2534)ได้ทำการทดสอบแล้วว่า วิธีนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับวิธีที่ใช้กันทั่วไป แต่ใช้เวลาน้อยกว่าโดยแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนสีของบรอมครีซอลเพอเพิลได้รวดเร็วนั้น จะเป็นสายพันธุ์ที่มีแนวโน้มของการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง วิธีการนี้อาศัยหลักการว่า อัตราการเปลี่ยนสีบรอมครีซอลเพอเพิล ขึ้นอยู่กับปริมาณกรดไขมันที่เกิดจากการย่อยสลายไขมัน ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตขึ้น

เมื่อได้เชื้อแบคทีเรียที่คาดว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง จำนวน 6 สายพันธุ์ คือ เชื้อแบคทีเรียรหัส B10, C1, C7, F4, F7 และ J7 แบคทีเรียทั้ง 6 สายพันธุ์นี้ จะถูกนำมาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Lipase Activity;รูปที่ 6) ซึ่งอาศัยหลักการวัดปริมาณกรดไขมันที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันมะกอก โดยการไทเทรตกับสารละลายด่าง แล้วนำค่าที่ได้มาหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส จากรูปที่ 9 พบว่า สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีกิจกรรมสูงที่สุด คือ เชื้อแบคทีเรียรหัส J7 ดังนั้นจึงนำแบคทีเรียรหัส J7 มาศึกษาต่อไป



รูปที่ 5 การคัดเลือกแบคทีเรียโดยวิธีการเปลี่ยนสีบรอมครีซอลเพอเพิล

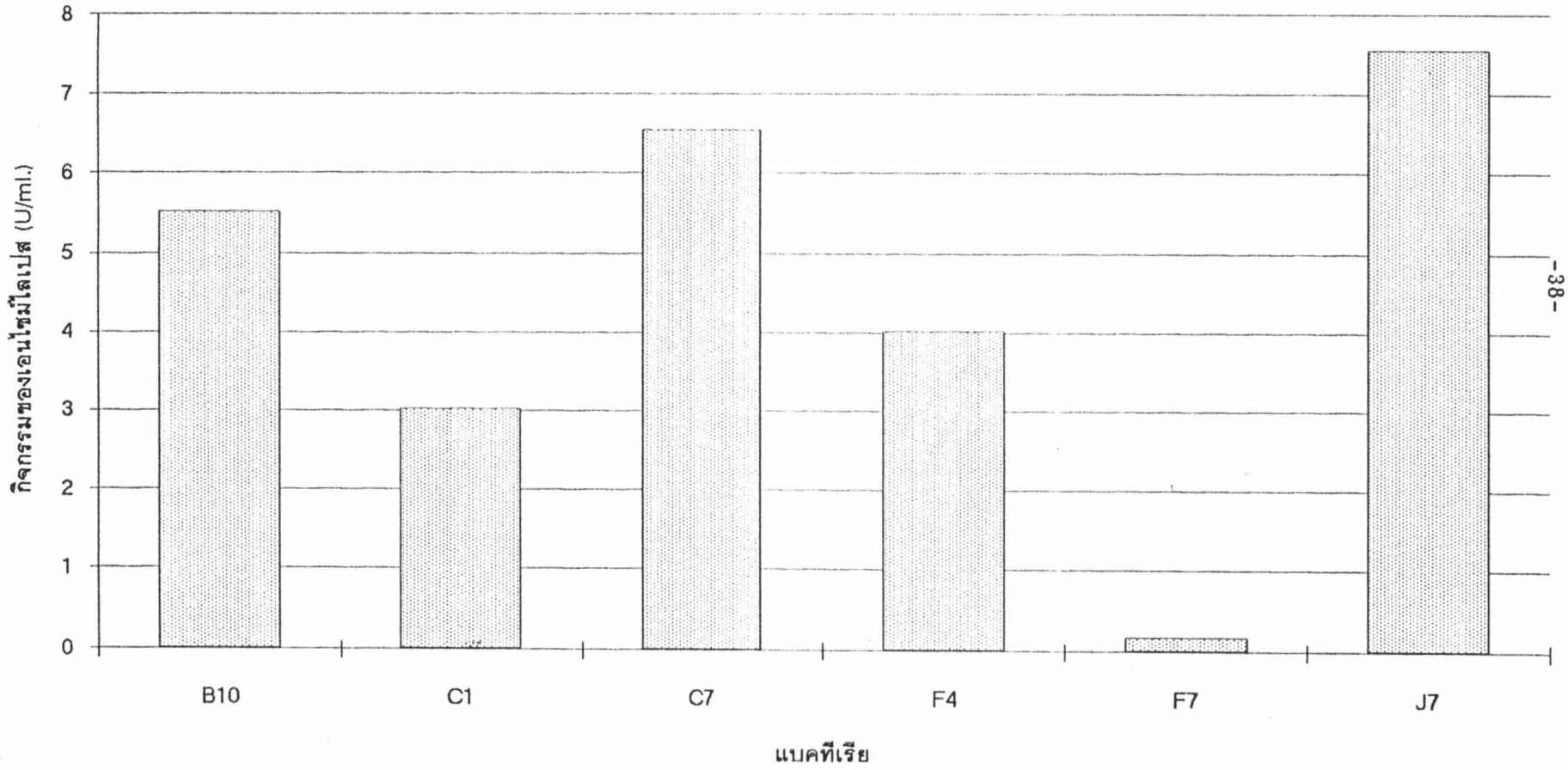


รูปที่ 6 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

รูปที่ 7 อาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นสำหรับผลิตเอนไซม์ไลเปส

รูปที่ 8 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเอนไซม์ไลเปส

รูปที่ 9 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียรหัสต่าง ๆ



3.การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียรหัส J7 และลักษณะของเอนไซม์ไลเปสที่เชื้อผลิต

จากลักษณะการเจริญของแบคทีเรียรหัส J7 ดังแสดงในรูปที่ 10 และจากการนำเอาน้ำหมักในช่วงที่เชื้อมีการเจริญเติบโตในระยะขยาย (exponential phase) และระยะคงที่ (stationary phase) เพื่อศึกษาลักษณะของเอนไซม์ไลเปส โดยการแยกเซลออกจากน้ำหมักโดยการหมุนเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที ส่วนน้ำใส (supernatant) นำไปหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส และส่วนของเซลเปียกจะนำไปแขวนลอยใน 0.2 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 จากนั้นทำให้เซลแตกโดยบดด้วย sea sand ต่อจากนั้นจึงนำไปปั่นแยกเซลออกด้วยความเร็วรอบ 11,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาตรวจสอบหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

จากผลการทดลองที่ได้ ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่เชื้อแบคทีเรียรหัสJ7 สร้างขึ้นนั้นเป็นเอนไซม์ไลเปสประเภท extracellular enzyme

ตารางที่ 4 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสภายในและภายนอกเซล

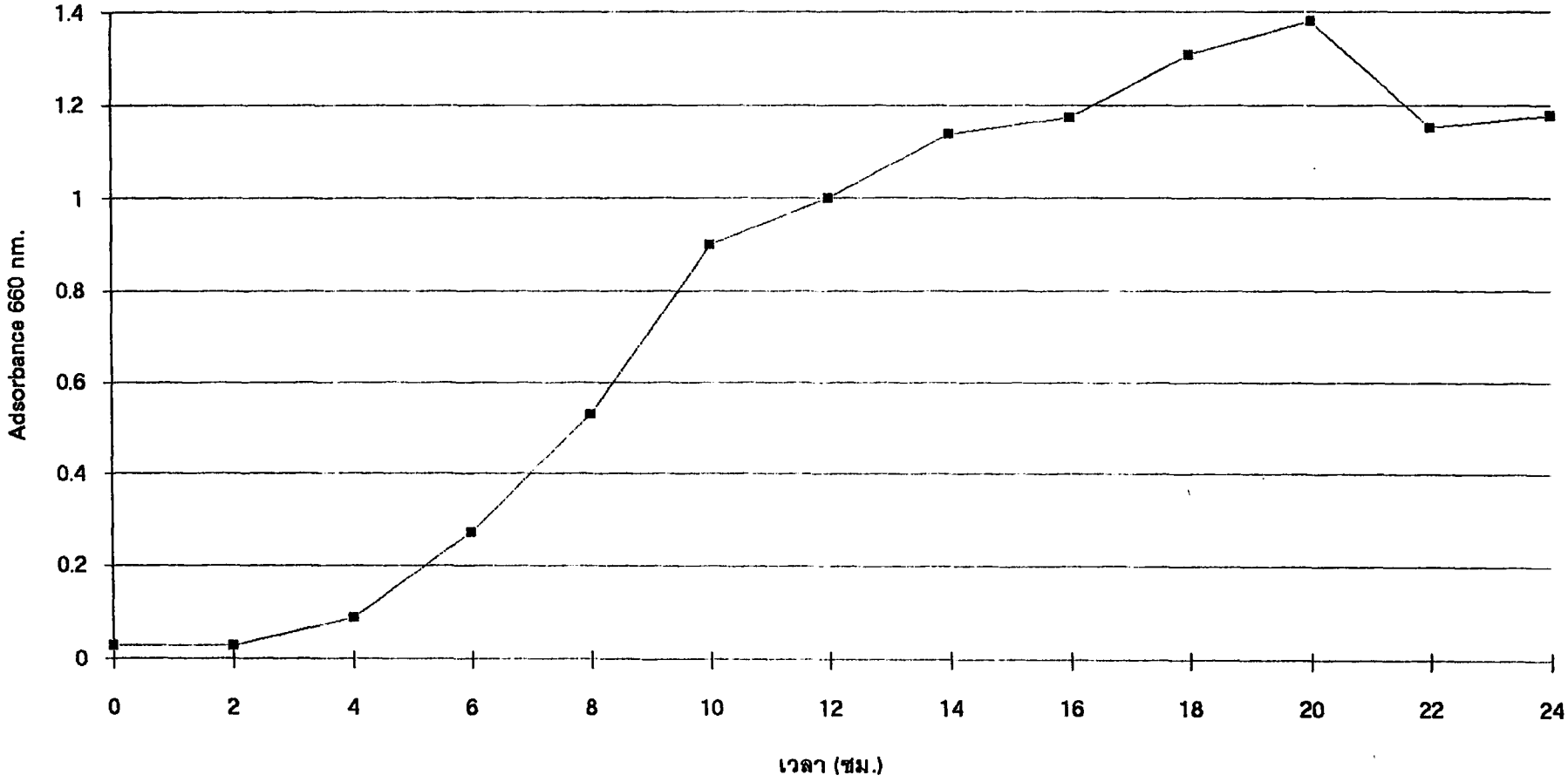
ระยะ	กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งหมด (U) (Total Activity)	
	นอกเซล	ในเซล
ระยะขยาย	346	-
ระยะคงที่	329	60

4.การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

4.1 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

ในขั้นต้นที่ผ่านมาแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์ไลเปส คือ น้ำมันมะกอก ซึ่งสามารถเป็นตัวเหนี่ยวนำ (inducer) ทำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ขึ้น แต่การใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนมีข้อจำกัด คือ น้ำมันไม่ละลายน้ำ ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ถ้าเลี้ยงเชื้อได้ระยะเวลาเหมาะสมแล้วจะทำการเก็บเกี่ยว (harvest) ยาก

รูปที่ 10 การเจริญของแบคทีเรียรหัส J7



นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสจะย่อยสลายน้ำมันมะกอกได้เป็นกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) มีผลทำให้พีเอชของอาหารลดลง ซึ่งอาจมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้

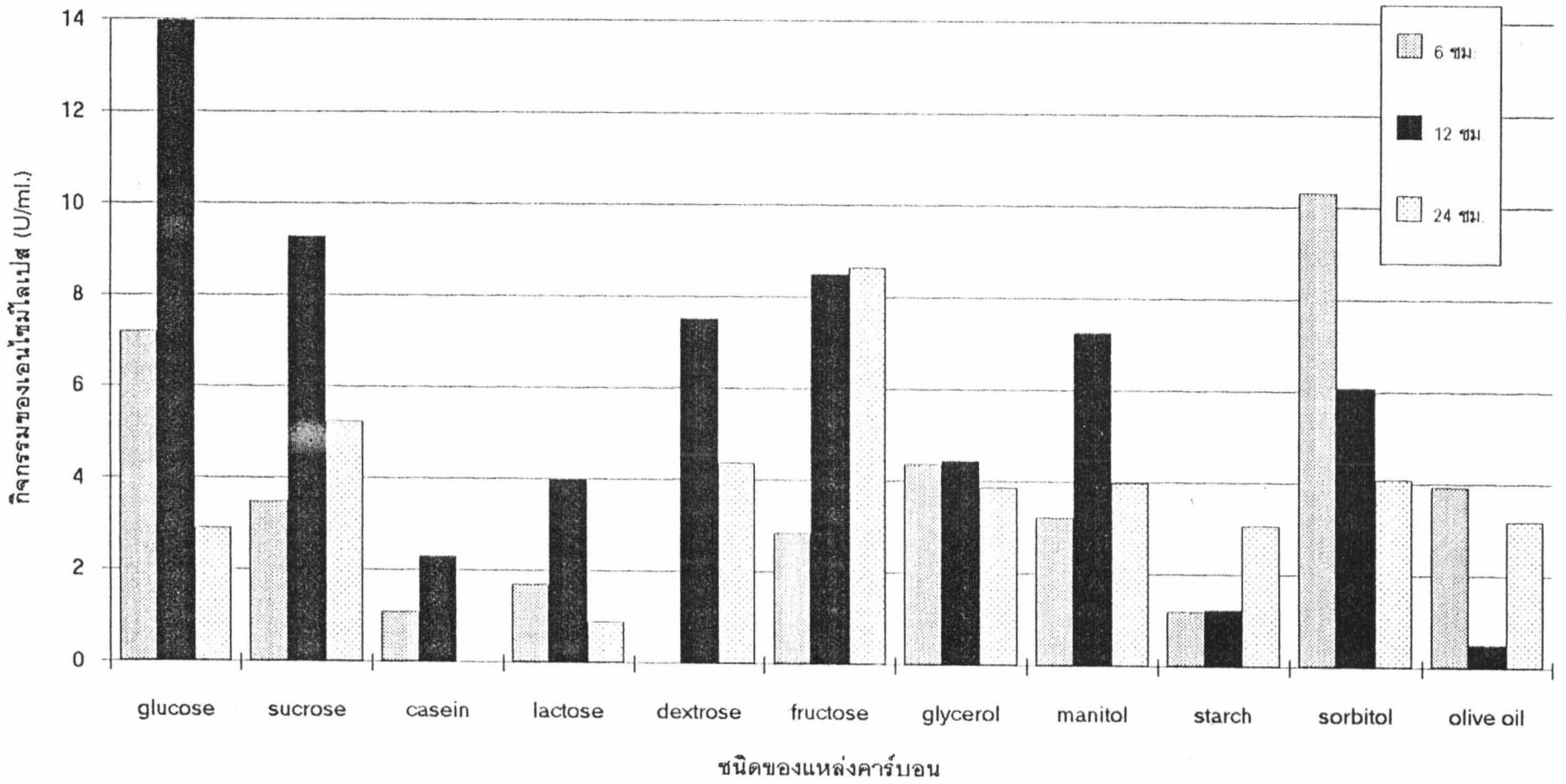
ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ตามวิธีการข้อ 4.2) และวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Complete Randomized Design) โดยผันแปรชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ คือ กลูโคส,ซูโครส,เคซีน,แล็กโทส,เด็กซ์โทส,ฟรุ๊กโทส,กลีเซอรอล,แมนิทอล,แป้ง และ ซอบิทอล โดยใช้น้ำมันมะกอก 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้เปรียบเทียบ

จากผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมเพื่อการสผลิตเอนไซม์ไลเปส ดังแสดงในรูปที่ 11 เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (analysis of varience) ของชนิดแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส พบว่าเชื้อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ให้ปริมาณเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดเป็น 14.11 ยูนิต/มล. ที่เวลา 12 ชม. และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณเอนไซม์ที่ได้ ในแต่ละสภาพการทดลองโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ปริมาณสูงกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ การที่แบคทีเรียสามารถใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีที่สุดอาจเป็นเพราะ กลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) ซึ่งเชื้อสามารถนำไปใช้ง่ายกว่าน้ำตาลหรือแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ยังมีน้ำตาลบางตัว คือ ฟรุ๊กโตส ซึ่งเชื้อสามารถนำไปใช้ในการผลิตเอนไซม์ได้ดีที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งใช้เวลามากกว่ากลูโคส ดังนั้นจึงเลือกใช้กลูโคส 1เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการศึกษาขั้นต่อไป

4.2 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากผลการทดลองตามข้อ 4.1 พบว่าชนิดของคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส คือ กลูโคส ดังนั้นการทดสอบนี้จะได้ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ทั้งในรูปของสารประกอบอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจน เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสและวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ โดยแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการศึกษา คือ NH_4Cl, NH_4NO_3 ,$(NH_4)_2SO_4$, malt extract, meat extract, yeast extract, beef extract, peptone, tryptone และ $(NH_4)_2SO_4$กับ yeast extract จากผลการทดลองชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม เพื่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส ดังแสดงในรูปที่ 12เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของชนิดของแหล่งไนโตรเจน พบว่าเชื้อ

รูปที่ 11 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียรหัส J7



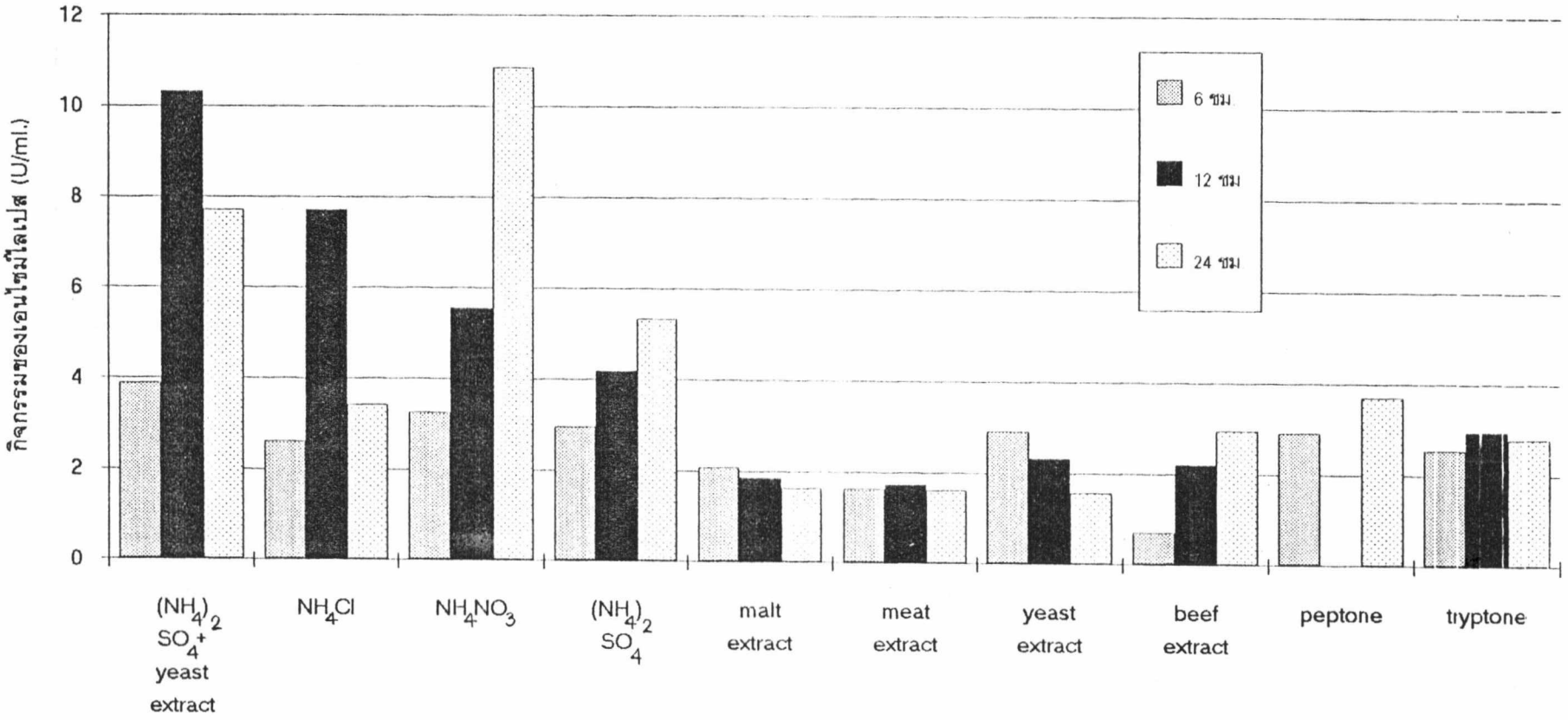
ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนที่ประกอบด้วย$(NH_4)_2SO_4$กับ yeast extractให้ปริมาณเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดเป็น 10.31 ยูนิต/มล. ที่เวลา 12 ชั่วโมงและให้ปริมาณเอนไซม์ที่สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

4.3 การศึกษาสัดส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

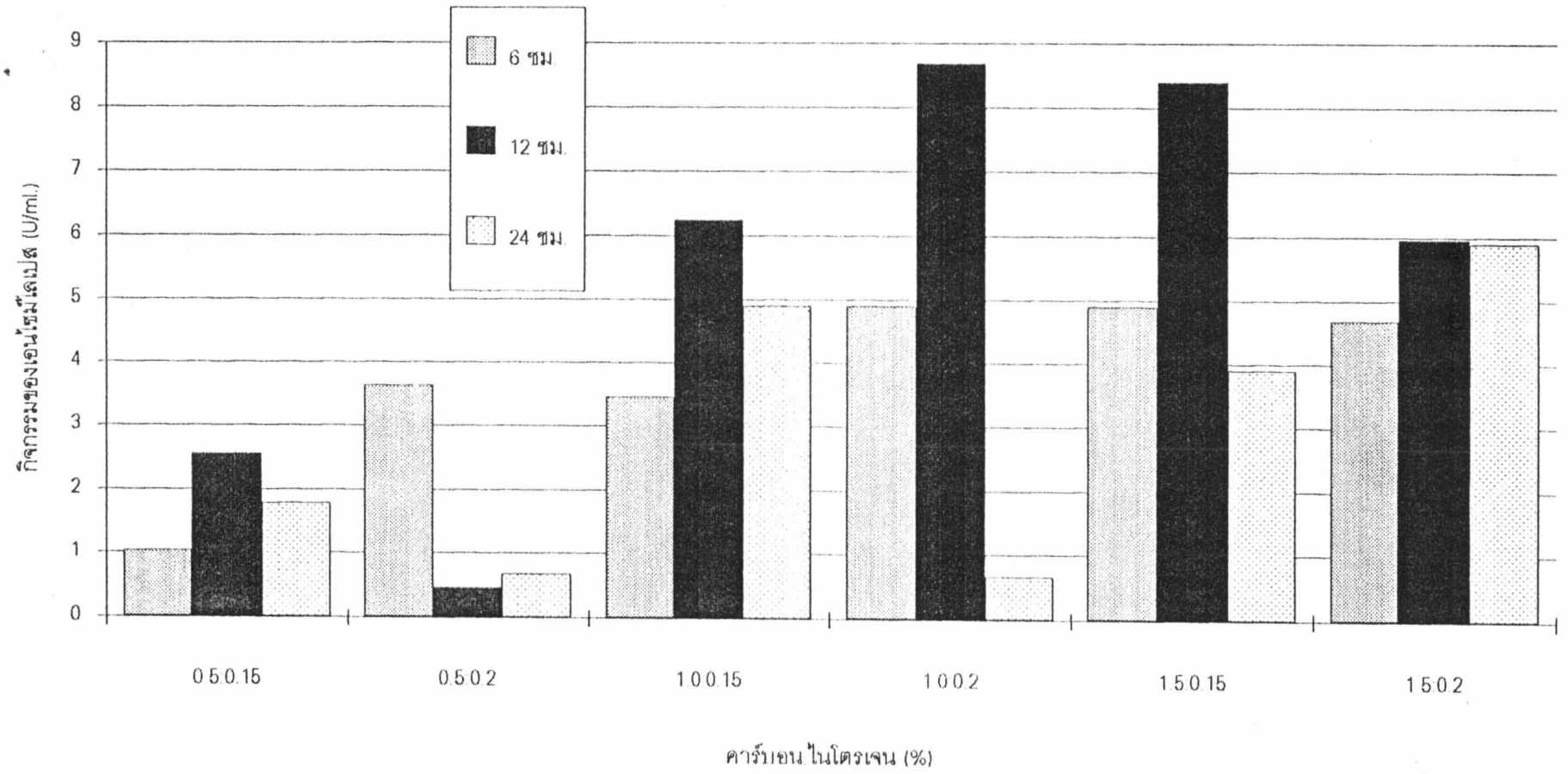
จากผลการทดลองตามข้อ 4.2 พบว่าชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือ กลูโคส ส่วนชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส คือ $(NH_4)_2SO_4$ และ yeast extract ดังนั้นในการทดลองนี้จะศึกษาสัดส่วนของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (Factorial Experiment) ซึ่งปริมาณของแหล่งคาร์บอน กลูโคส ที่ใช้ศึกษามี 3 ระดับ คือ ที่ 0.5, 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาณของแหล่งไนโตรเจน $(NH_4)_2SO_4$ กับ yeast extract ในอัตราส่วน 0.13 เปอร์เซ็นต์ ต่อ 0.02 เปอร์เซ็นต์ มี 2 ระดับคือที่ 0.15 เปอร์เซ็นต์ และ 0.2 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดลองแสดงได้ดังรูปที่ 13พบว่าเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีสัดส่วนของคาร์บอนในปริมาณที่คงที่ ที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ แล้ว การเพิ่มสัดส่วนของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะมีแนวโน้มที่ทำให้ปริมาณการผลิตเอนไซม์ไลเปสลดลง ในขณะที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสัดส่วนของไนโตรเจน ในปริมาณคงที่ ที่ 0.15 เปอร์เซ็นต์ และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ นั้น การเพิ่มสัดส่วนของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีแนวโน้มที่ทำให้ปริมาณการผลิตเอนไซม์ไลเปสเพิ่มขึ้น โดยสัดส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส คือ สัดส่วนที่ประกอบด้วยสัดส่วนระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจนอยู่ในช่วงระหว่าง 1.0 ต่อ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ถึง 1.5 ต่อ 0.15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นสัดส่วนระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ โดยเชื้อแบคทีเรียรหัส J7 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ 17.38 ยูนิต/มล.และ 16.81 ยูนิต/มล.ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าสัดส่วนระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจนอื่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงเลือกใช้สัดส่วนระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจนระหว่าง 1.5 ต่อ 0.15เปอร์เซ็นต์ ในการศึกษาต่อไป

รูปที่ 12 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อแบคทีเรียรหัส J7



รูปที่ 13 การศึกษาอัตราส่วนของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียรหัส J7



4.4 การศึกษาชนิดของแร่ธาตุที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

แร่ธาตุก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย ถึงแม้ว่าเชื้อมีความต้องการในปริมาณน้อยก็ตาม ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาชนิดของแร่ธาตุที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ โดยชนิดของแร่ธาตุที่ศึกษา คือ $FeSO_4.7H_2O$, $ZnCl_2$, $CoCl_2.6H_2O$, $AlCl_3.6H_2O$, $FeCl_3$, $CuSo_4$, LiCl, $CaCl_2$, $MnCl_2.4H_2O$, $HgCl_2$ และ $CaCO_3$

จากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 14 พบว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส J7 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี $CaCO_3$ เป็นแร่ธาตุ โดยผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ 9.89 ยูนิต/มล. ในชั่วโมงที่ 24 และมีปริมาณสูงกว่าแร่ธาตุชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

4.5 ความเป็นกรด ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

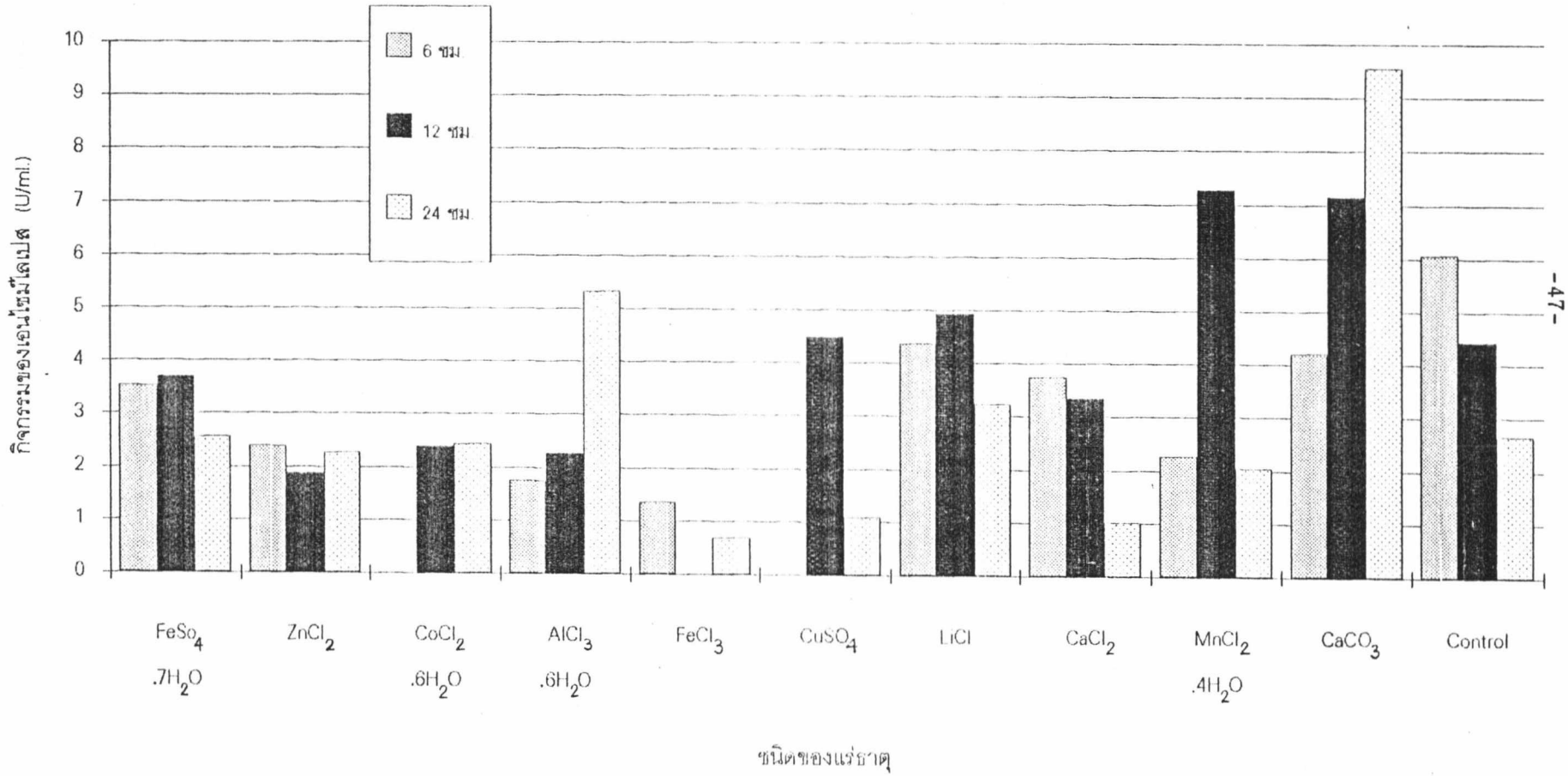
ศึกษาความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับ การผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ โดยการผันแปรความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0

จากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 15 พบว่า พีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย J7 คือ พีเอชที่ 8.0 โดย พีเอชเริ่มต้น ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 7.53 ยูนิต/มล. ซึ่งสูงกว่าพีเอชอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95เปอร์เซ็นต์

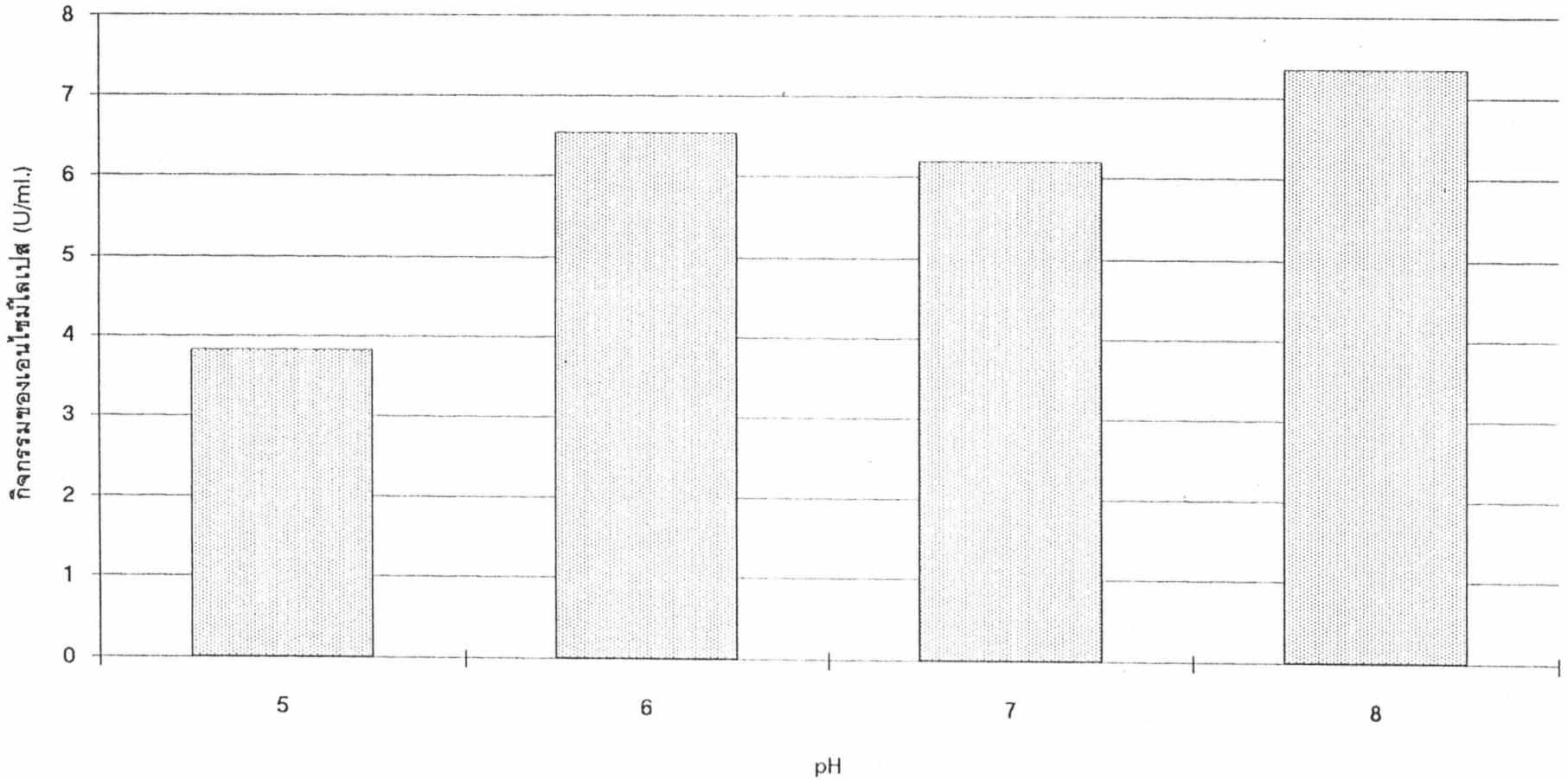
4.6 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษา คือ 27, 30 และ 35 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองแสดงในรูปที่ 16 พบว่าที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดเท่ากับ 12.76 ยูนิต/มล. ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเชื้อที่แยกได้เป็นเชื้อจากธรรมชาติ ซึ่งเจริญได้ที่อุณหภูมิดังกล่าวอยู่แล้ว

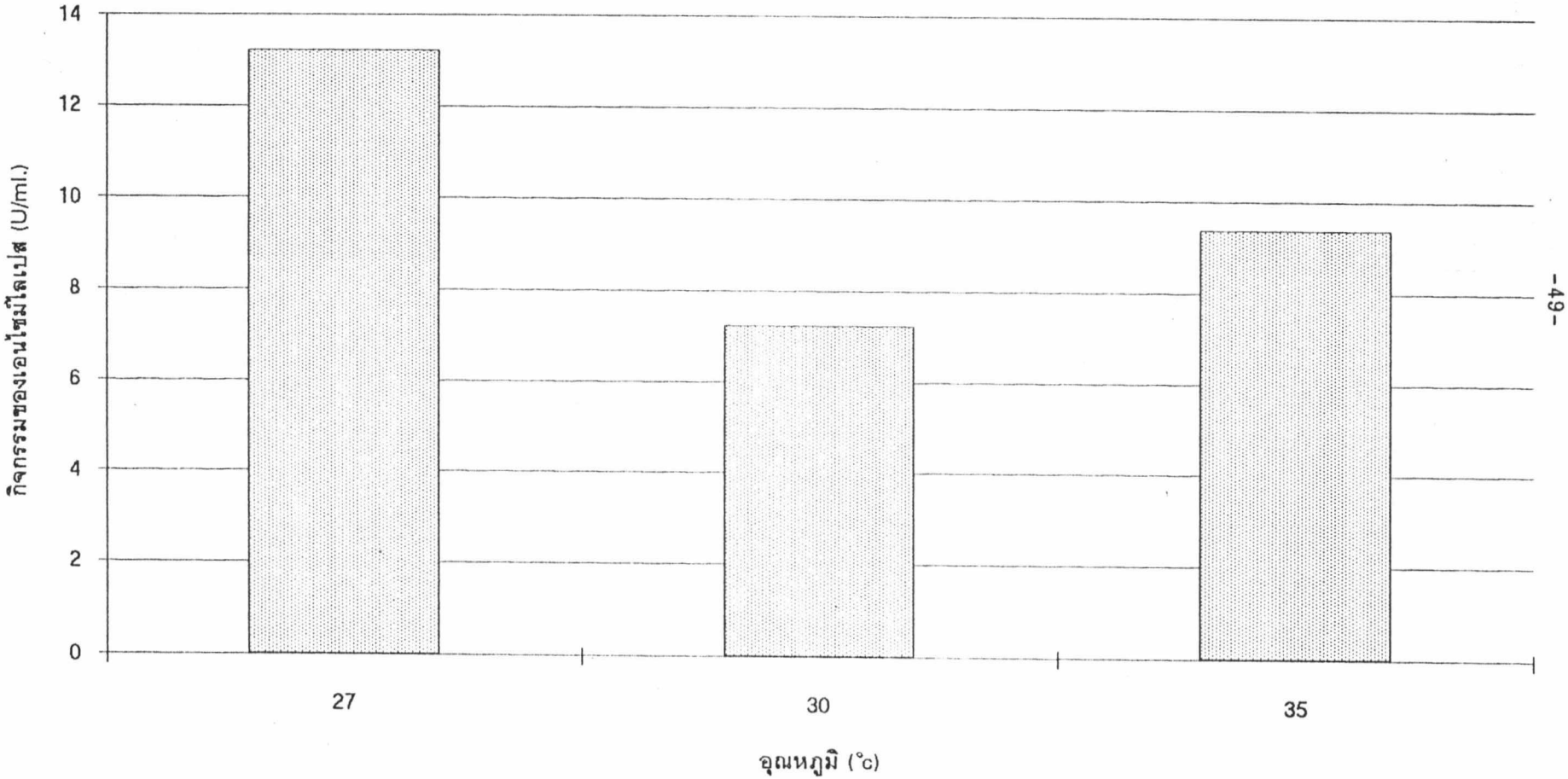
รูปที่ 14 การศึกษาชนิดของแร่ธาตุที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียรหัส J7



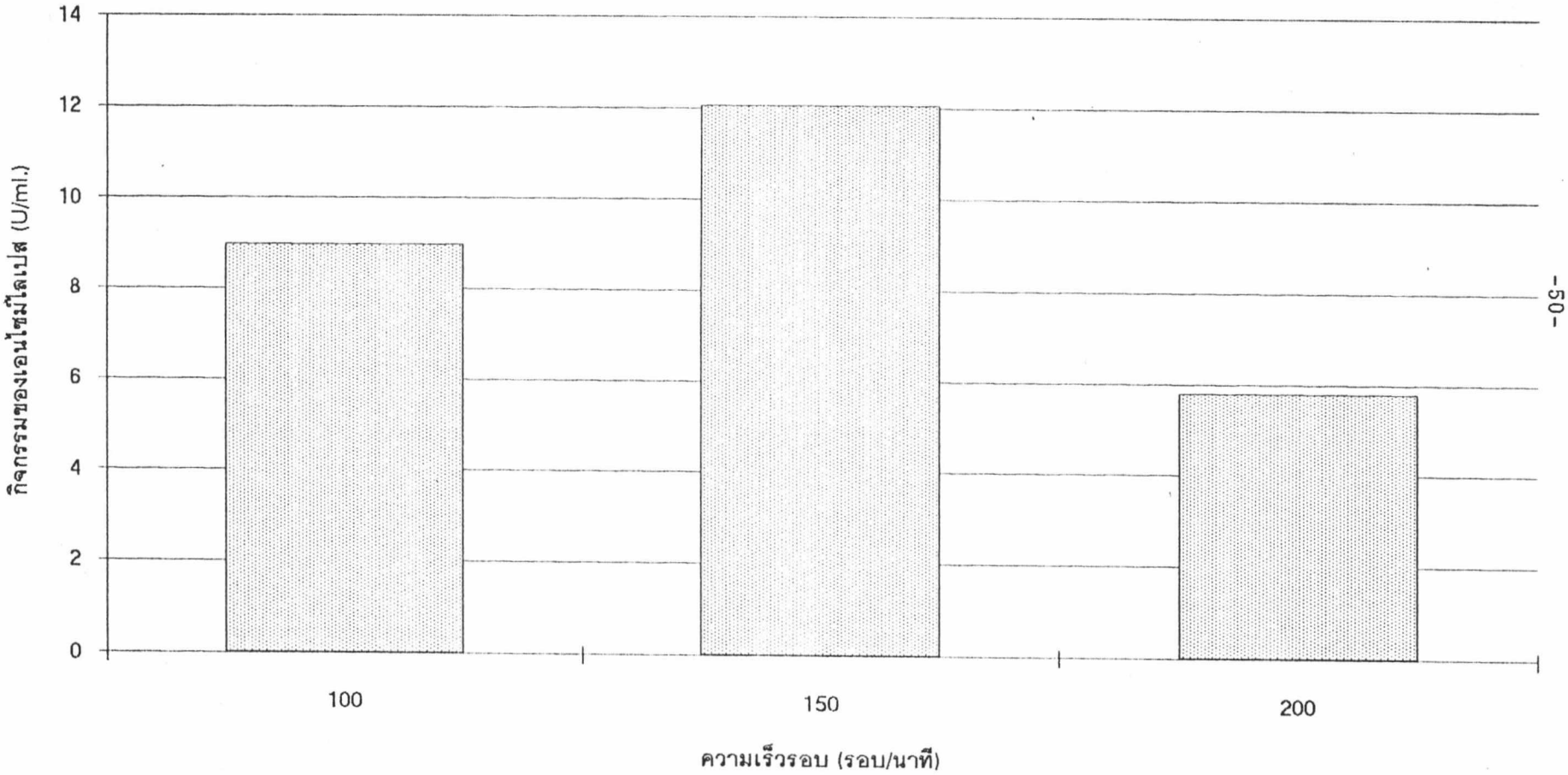
รูปที่ 15 การศึกษา pH ที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรีย J7



รูปที่ 16 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียรหัส J7



รูปที่ 17 การศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียรหัส J7



4.7 ศึกษาความเร็วรอบที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

ความเร็วรอบที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย มีผลกับปริมาณอากาศและการถ่ายเทมวลสารและความร้อนในระหว่างการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ เพื่อศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยความเร็วรอบที่ใช้ในการศึกษา คือ 100,150 และ 200 รอบ/นาที จากผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 17 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไลเปส คือ ที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที โดยสภาวะดังกล่าว เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง 12.05 ยูนิต/มล. และสูงกว่าสภาวะที่ใช้ความเร็วรอบที่ 100 และ 200 รอบ/นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

5.การทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์

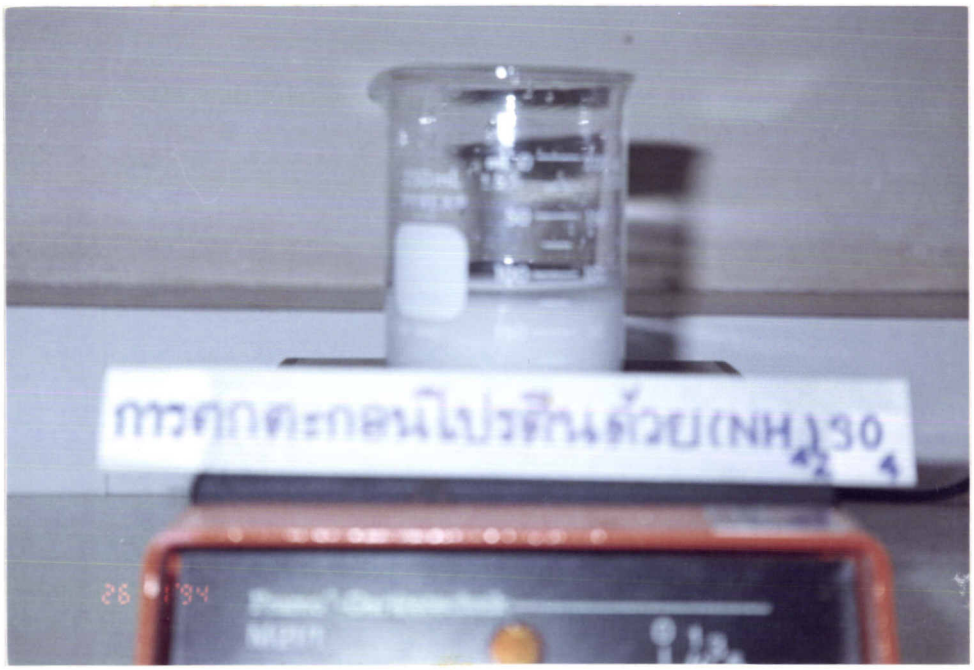
เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย J7 ในอาหารเหลว (ภาคผนวก ก ข้อ 8) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แยกเซลแบคทีเรียออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องเหวี่ยงแรงสูง 10,000 รอบ/นาที สารละลายใสที่ได้นำมาตกตะกอนโปรตีน โดยปรับให้สารละลายดังกล่าวมีความเป็นกรดเท่ากับ 4.00 นำตะกอนที่ได้มาละลายใน 0.2 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ปริมาตรน้อยที่สุดที่จะทำให้ตะกอนละลายได้หมด แล้วนำไปตกตะกอนโปรตีนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ อิ่มตัวที่ 20 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรทั้งหมด ซึ่งเป็นช่วงที่โปรตีนโมเลกุลใหญ่ ๆจะตกตะกอนลงมา แยกสารละลายส่วนใสมาตกตะกอนซ้ำด้วย $(NH_4)_2SO_4$ อิ่มตัวที่ 40 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรทั้งหมด ซึ่งเป็นช่วงที่เอนไซม์ไลเปสสามารถตกตะกอนออกมาได้สูงที่สุด โดยมีการกวนตลอดเวลาเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนเอนไซม์ที่ 10,000 รอบ/นาที

ส่วนตะกอนที่ได้นำมาละลายใน 0.2 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 7.0 ปริมาตรน้อยที่สุดนำสารละลายที่ได้ไปไดอะไลซ์ (dialize) ในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน เพื่อกำจัด $(NH_4)_2SO_4$ และนำสารละลายที่ได้ไประเหิดแห้ง (Lyophilize)

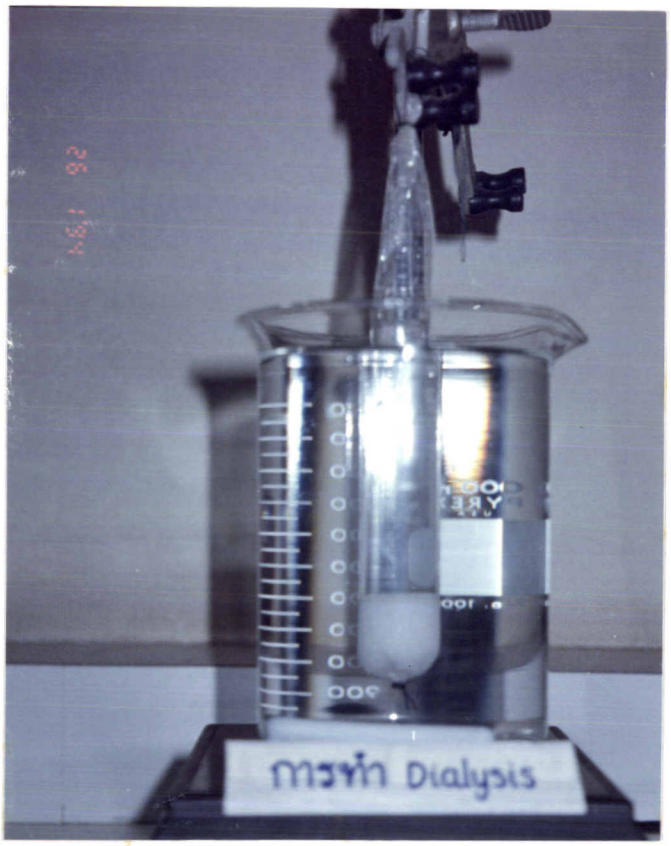
จากขั้นตอนต่าง ๆในการทำให้เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียรหัส J7 บริสุทธิ์ขึ้นแสดงได้ดังตารางที่ 5 และพบว่าในขั้นตอนสุดท้ายจะทำให้ได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น15.62 เท่า

ตารางที่ 5 แสดงขั้นตอนการทำเอนไซม์ไลเปสให้บริสุทธิ์บางส่วน

Purification Step	Total activity (U)	Total Protein (mg.)	Specific activity (U/mg.)	Purification	Yeild (%)
Crude filtrate	950.73	460.80	2.06	1	100
Acidicfication	241.45	41.60	5.80	2.82	25.40
$(NH_4)_2SO_4$	160.50	9.60	16.72	8.12	16.88
Lyophilize	64.70	2.01	32.19	15.62	6.81



รูปที่ 18 การตกตะกอนโปรตีนด้วย $(NH_4)_2SO_4$



รูปที่ 19 การทำ dialysis

รูปที่ 20 การทำระเหิดแห้ง (Lyophylization)

6.การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรียรหัส J7

6.1 การหาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

นำเอนไซม์ไลเปสมา 4 มล. ทำปฏิกิริยากับน้ำมันมะกอกที่ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่มีช่วงของพีเอชต่างๆ กัน ตั้งแต่ 5-10.6 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วนำมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์

บัฟเฟอร์ ที่ใช้ได้แก่ - อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0

- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0, 7.0, 8.0
- ไกลซีนบัฟเฟอร์ พีเอช 9.6, 10.6

จากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 21 พบว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส อยู่ในช่วง 7-10.6 ของ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และไกลซีนบัฟเฟอร์ โดยกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่พีเอช 9.6 ของ ไกลซีนบัฟเฟอร์ เมื่อพีเอชต่ำกว่านี้ จะพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างมาก

6.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

นำสารละลายเอนไซม์ 4 มล. มาทำปฏิกิริยากับน้ำมันมะกอกใน 0.2 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ตั้งแต่ 30-45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงนำมาหากิจกรรมของเอนไซม์

จากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 22 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่านี้ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างมาก

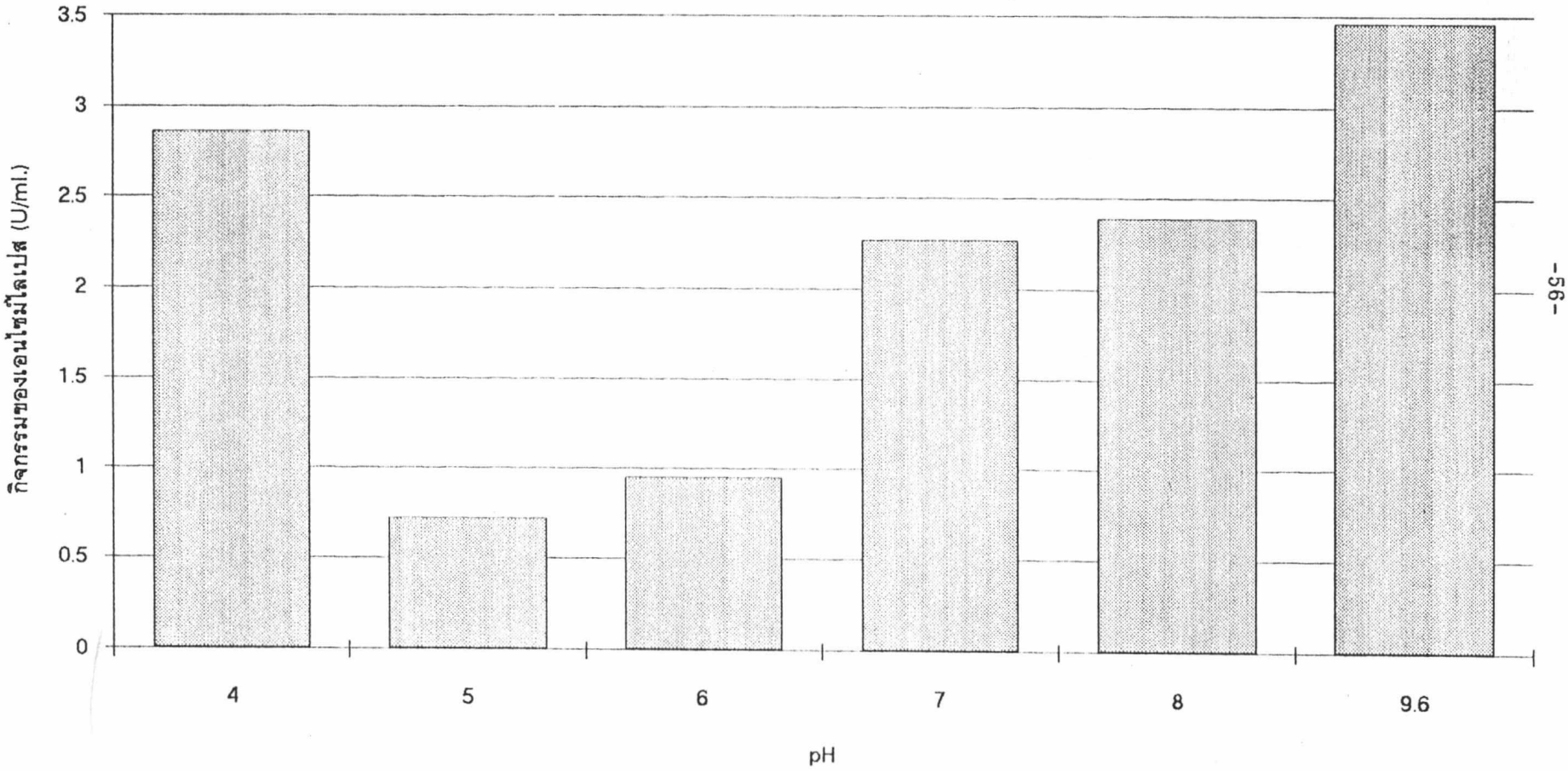
7.การจำแนกเชื้อแบคทีเรีย

จากการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียโดยการศึกษาลักษณะเฉพาะตัวทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมี

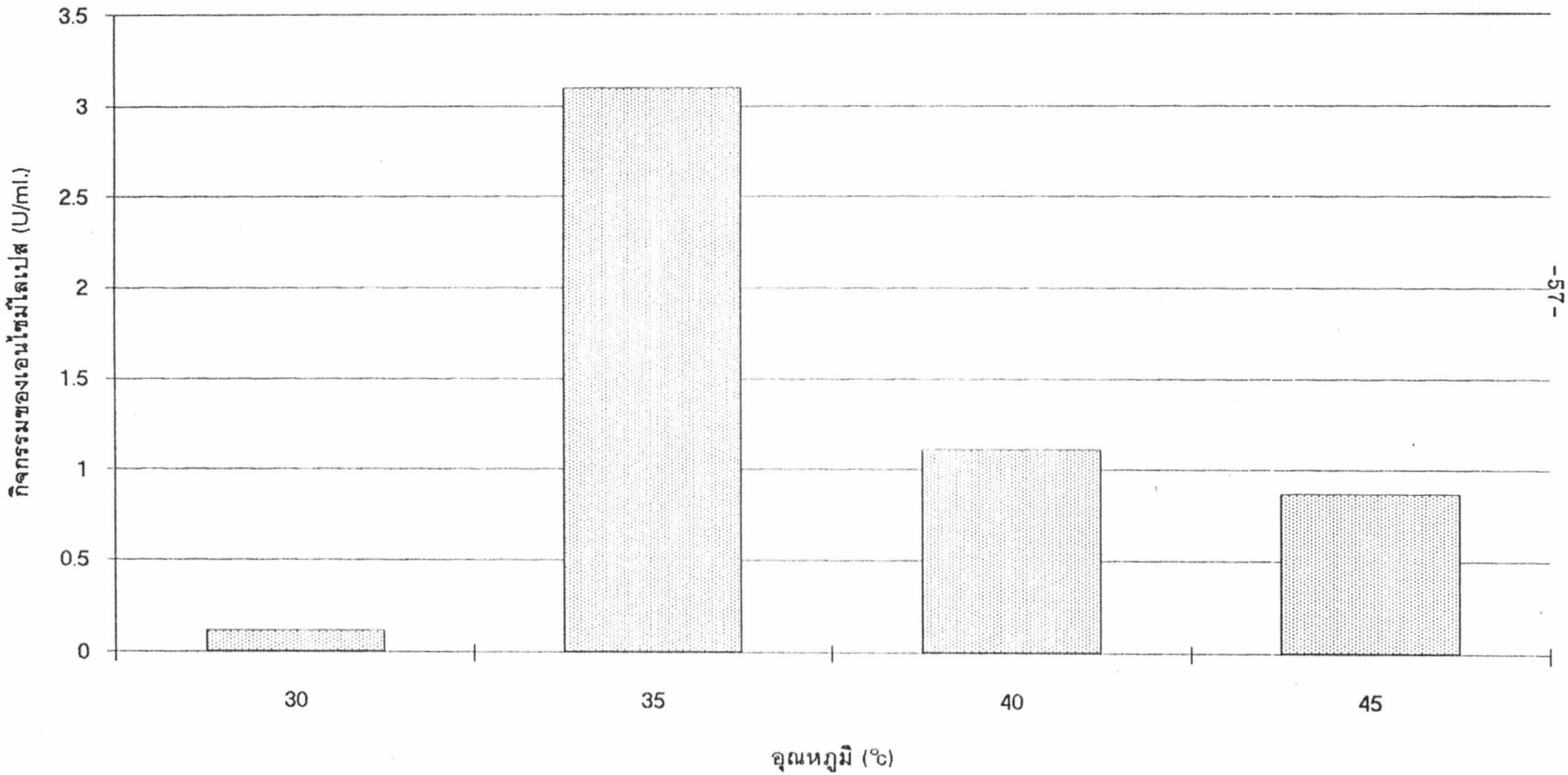
-การศึกษาทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อแบคทีเรีย 1ลูปจากอาหาร nutrient agar มาตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อดูลักษณะรูปร่างของเซล จากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ J7 มีรูปร่างเป็นแท่งย้อมติดสีแกรมลบ โคโลนีสีขาวบนอาหาร nutrient agar

รูปที่ 21 การศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส



รูปที่ 22 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส



-การศึกษาทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

นำเชื้อแบคทีเรีย 1 ลูปในอาหาร nutrient agar ใส่ลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 10 มล. ให้มีจำนวนเซลประมาณ 10^8 เซล/มล. เพื่อนำไปทดสอบในอาหารต่างๆ โดยการเติม 0.05 มล.ของเชื้อตั้งต้นนี้ลงในอาหารที่จะทดสอบทุกชนิด จากผลการทดสอบได้แสดงดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แสดงลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียรหัส J7

ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี	ผลการทดสอบ
motility test	+
ยูรีเอส(urease)	-
ซิเตรท(citrate)	-
MR	-
acid form:	-
กลูโคส	-
แล็กโทส	-
ซูโครส	-
แมนิทอล	-
อินโดล์	-
EMB	-
H_2S	-

จากผลการทดสอบ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับ Burgey's Manual สรุปได้ว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส J7 คือ *Pseudomonas sp.*

บทที่ 5

บทสรุป

ในการศึกษาการแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส จากดิน 8 ตัวอย่าง ได้เชื้อบริสุทธิ์จำนวน 84 สายพันธุ์ แล้วนำมาคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยวิธีการเปลี่ยนสีของบรอมครีซอลเพอเพิล(bromcresol purple) พบว่าแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนสีบรอมครีซอลเพอเพิลได้เร็วภายในเวลา 4-8 ชม. มีจำนวน 38 สายพันธุ์ แล้วนำไปทดสอบหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส พบว่าเชื้อแบคทีเรียรหัส J7 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด ซึ่งเป็น extracellular enzyme

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ และการผลิตเอนไซม์ไลเปส พบว่า เชื้อแบคทีเรียรหัส J7 จะผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย กลูโคส 1.5 เปอร์เซ็นต์, K_2HPO_4 0.09 เปอร์เซ็นต์, $MgSO_4.7H_2O$ 0.02 เปอร์เซ็นต์, $(NH_4)_2SO_4$ 0.13 เปอร์เซ็นต์, Yeast extract 0.02 เปอร์เซ็นต์ และ $CaCO_3$ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอช 8 อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ 16.81 ยูนิต/มล. เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตมีประสิทธิภาพการทำงานสูงสุด ที่พีเอช 9.6 และอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 35 องศาเซลเซียส

จากการทำให้เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์รหัส J7 บริสุทธิ์ขึ้นโดยวิธีการตกตะกอนด้วย $(NH_4)_2SO_4$ อิ่มตัว และนำไประเหิดแห้ง (lyophilize) พบว่าได้เอนไซม์ไลเปสที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 15.62 เท่า

เมื่อนำแบคทีเรียรหัส J7 ไปศึกษาลักษณะเฉพาะด้านทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมี แล้วนำไปเปรียบเทียบคุณสมบัติของแบคทีเรียจาก Bergey's mannual พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้คือ *Pseudomonas sp.*

ภาคผนวก ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.อาหารคัดเลือกเชื้อจากดิน

peptone	1 กรัม
Yeast extract	1 กรัม
NaCl	0.5 กรัม
น้ำมันมะกอก	5 มล.

2.อาหารแข็งสำหรับแยกเชื้อ

เตรียมตามข้อ 1. แต่เติมวุ้น	1.5-2.0 เปอร์เซ็นต์

3.Nutrient agar (NB)

beef extract	3.0 กรัม
peptone	5.0 กรัม
วุ้น	15.0 กรัม
น้ำกลั่น	100.0 มล..

ละลายส่วนประกอบข้างบนให้ผสมกันในน้ำกลั่น แล้วจึงเติมวุ้น หลอมวุ้นให้ละลายโดยใช้ความร้อน นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่ง ความดันไอ 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว(psi)เป็นเวลา 15 นาที

4.อาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นสำหรับทดสอบการเปลี่ยนสี บรอมครีซอลเพอเพิล

น้ำมันมะกอก	1 เปอร์เซ็นต์
$(NH_4)_2SO_4$	0.5 เปอร์เซ็นต์
K_2HPO_4	0.05 เปอร์เซ็นต์
$MgSO_4.7H_2O$	0.03 เปอร์เซ็นต์
Yeast extract	0.03 เปอร์เซ็นต์
พีเอช 7.0	

5. อาหารทดสอบการเปลี่ยนสี บรอมครีซอลเพอเพิล (BCP)

น้ำมันมะกอก	1 เปอร์เซ็นต์
$(NH_4)_2SO_4$	0.5 เปอร์เซ็นต์
K_2HPO_4	0.05 เปอร์เซ็นต์
บรอมครีซอลเพอเพิล	0.064 เปอร์เซ็นต์
$MgSO_4.7H_2O$	0.03 เปอร์เซ็นต์
Yeast extract	0.03 เปอร์เซ็นต์

พีเอช 7.0

6. อาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นสำหรับหากิจกรรมของเอนไซม์

น้ำมันมะกอก	1 เปอร์เซ็นต์
$(NH_4)_2SO_4$	0.13 เปอร์เซ็นต์
K_2HPO_4	0.09 เปอร์เซ็นต์
$MgSO_4.7H_2O$	0.02 เปอร์เซ็นต์
Yeast extract	0.02 เปอร์เซ็นต์

พีเอช 7.0

7. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับหากิจกรรมของเอนไซม์

เตรียมตามข้อ 6 แต่เติม $CaCO_3$	0.05 เปอร์เซ็นต์

8. อาหารที่เหมาะสำหรับเลี้ยงเชื้อในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

กลูโคส	1.5 เปอร์เซ็นต์
$MgSO_4.7H_2O$	0.02 เปอร์เซ็นต์
K_2HPO_4	0.09 เปอร์เซ็นต์
$(NH_4)_2SO_4$	0.13 เปอร์เซ็นต์
$CaCO_3$	0.05 เปอร์เซ็นต์
Yeast extract	0.02 เปอร์เซ็นต์

พีเอช 8.0

ภาคผนวก ข.การเตรียมสารเคมี

1.การเตรียมสารละลาย บัฟเฟอร์(Buffer) สำหรับวิเคราะห์เอนไซม์

1.1 อะซิเตต บัฟเฟอร์ เตรียมโดยผสมสารละลาย A กับ สารละลาย B ปริมาตรต่างๆ ตามพีเอชที่ต้องการ ปรับปริมาตร 100 มล.

สารละลาย A : 0.2 M กรดแอซิติก (CH_3COOH 11.55 มล.ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย B : 0.2 M โซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa 16.4 กรัม หรือ $CH_3COONa.3H_2O$ 27.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

A (มล.)	B (มล.)	พีเอช
46.3	3.7	3.6
44.0	6.0	3.8
41.0	9.0	4.0
36.8	13.2	4.2
30.5	19.5	4.0
25.5	24.5	4.6
20.0	30.0	4.8
14.8	35.2	5.0
10.5	39.2	5.2
8.8	41.1	5.4
4.8	45.2	5.6

1.2 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

เตรียมโดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ปริมาตรต่างๆ ตามพีเอชที่ต้องการปรับปริมาตรเป็น 200 มล.

สารละลาย A:0.2 M monobasic sodium phosphate($NaH_2PO_4.2H_2O$ 31.2 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร)

สารละลาย B:0.2 M dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.7H_2O$ 53.64 กรัม หรือ$Na_2HPO_4.12H_2O$ 71.7 กรัม ในน้ำกลั่น1ลิตร)

A (มล.)	B (มล.)	พีเอช
93.5	6.5	5.7
92.0	8.0	5.8
90.0	10.0	5.9
87.7	12.3	6.0
85.0	15.0	6.1
81.5	18.5	6.2
77.5	22.5	6.3
73.5	26.5	6.4
68.5	31.5	6.5
62.5	37.5	6.6
56.5	43.5	6.7
51.0	49.0	6.8
45.0	55.0	6.9
39.0	61.0	7.0
33.0	67.0	7.1
28.0	72.0	7.2
23.0	77.0	7.3
19.0	81.0	7.4
16.0	84.0	7.5
13.0	87.0	7.6
10.5	90.5	7.7
8.5	91.5	7.8
7.0	93.0	7.9
5.3	94.7	8.0

1.3ไกลซีนบัฟเฟอร์

เตรียมโดยผสมสารละลาย A 50 มล. กับ สารละลาย B ปริมาตรต่างๆ ตามพีเอชที่ต้องการ ปรับปริมาตรเป็น 200 มล.

สารละลาย A:0.2 M สารละลายไกลซีน (15.01 กรัม ในน้ำ 1,000 มล.)

สารละลาย B:0.2 M โซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH 8 กรัมในน้ำ 1,000 มล.)

B(มล.)	พีเอช
4.0	8.6
6.0	8.8
8.8	9.0
12.0	9.2
16.8	9.8
27.2	9.8
32.6	10.0
38.6	10.4
45.5	10.6

2.การเตรียมสารละลายมาตรฐาน NaOH

เตรียมstock solutionของNaOH ก่อน ทำโดยชั่งNaOH มาประมาณ 4กรัมจากนั้นเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 มล.เก็บในขวดสีชา เมื่อจะนำมาใช้จะทำการเจือจางstock solution โดยปิเปตต์ stock solution 100 มล. ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล.ใน volumemetric flask และ 0.01 N. NaOH ที่ได้หาความเข้มข้นมาตรฐานมาก่อน

การหาความเข้มข้นมาตรฐานของNaOH ทำโดยชั่ง acid potassium phthalate (potassium hydrogen phthalate, $COOH.C_6H_4.COOK$,analytical reagent) อบที่ 120 °ซ. แล้วทำให้เย็นใน dessicator ชั่งอย่างละเอียดประมาณ 0.01 กรัม ลงในฟลาสก์ 250 มล. เติมน้ำปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์(เตรียมโดยต้มน้ำกลั่นให้เดือด 20 นาที)ปริมาณ 75 มล.เติมสารละลาย ฟีนอล์ฟทาลีน 3 หยด แล้วไทเทรตด้วยสารละลาย 0.01 N NaOH ความเข้มข้นมาตรฐานของ NaOH หาได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นมาตรฐาน (N)} = \frac{\text{กรัมของ} COOH.C_6H_4.COOK \times 100}{\text{มล.ของNaOH} \times 204.22}$$

ภาคผนวก ค.วิธีการวิเคราะห์

1.การวิเคราะห์หาโปรตีนโดยวิธีของ Lowry(1951)

สารเคมี

1. สารละลาย Lowry A : 1 เปอร์เซ็นต์ (นน./ปริมาตร $CuSO_4.5H_2O$
2. สารละลาย Lowry B : 2 เปอร์เซ็นต์ (นน./ปริมาตร) NaK tartrate
3. สารละลาย Lowry C : 0.2 M NaOH
4. สารละลาย Lowry D : 4เปอร์เซ็นต์(นน./ปริมาตร) Na_2CO_3
5. สารละลาย Lowry E : A 1 มล. ผสมกับ B 1 มล. + C 49 มล.
6. สารละลาย Lowry F : Folin Ciocalteu's phenol eagent:H_2O(1:1)

วิธีการ

1.ทำ standard ของโปรตีนโดยใช้ สารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin ให้มีความเข้มข้น 10 ถึง 200 ไมโครกรัม/มล.

2.นำตัวอย่าง 0.5 มล. เติมในสารละลาย lowry E 2.5 มล. ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

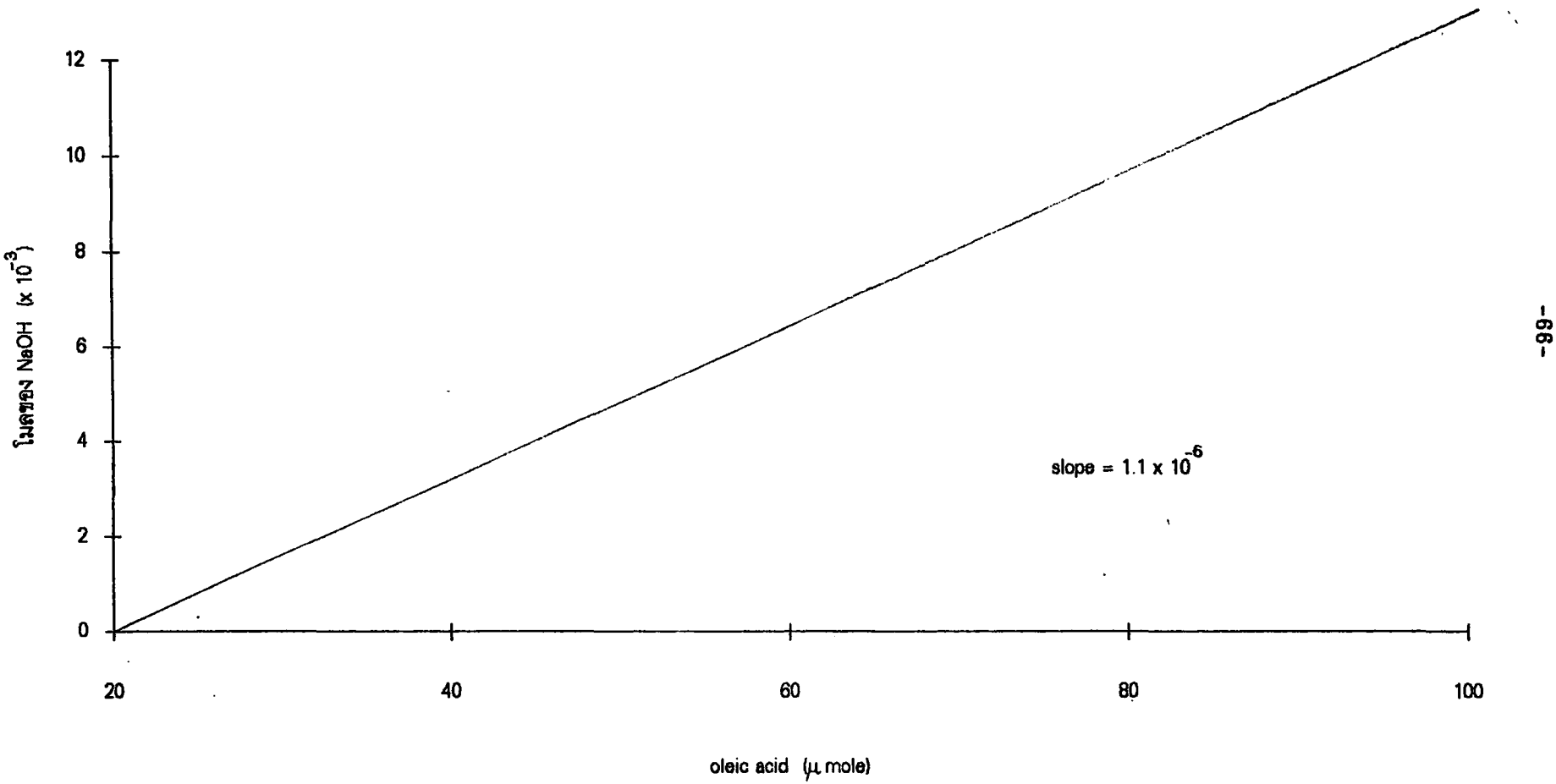
3.เติมสารละลาย Folin ciocalteu's phenol Reagent ปริมาตร 0.25 มล. ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที (รูปที่ 25)

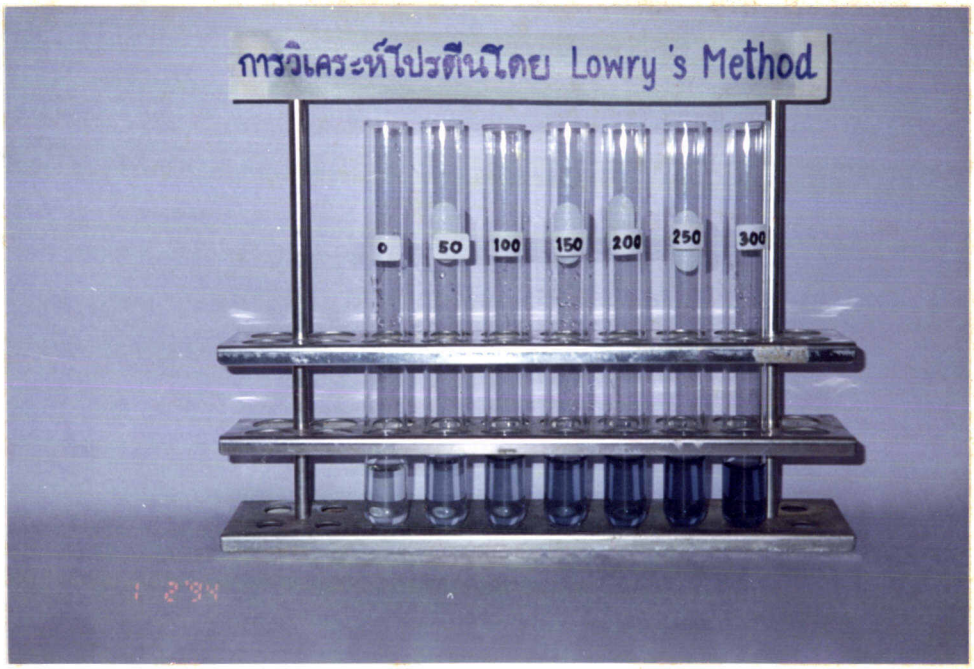
4. นำไปวัดค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร(BSA 0.05-0.03 มก./มล.) นำค่าที่ได้ไปเทียบกับ กราฟมาตรฐาน (รูปที่ 25)

2.การหากราฟมาตรฐานของ กรดโอเลอิก

ชั่งกรดโอเลอิกที่มีความบริสุทธิ์สูง (extra pure) 1 มิลลิโมล (millimole) (0.28247 กรัม)ละลายด้วยสารละลายผสมระหว่างethanol กับ diethyl ether อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ที่ปรับสภาพให้เป็นกลาง แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 มล. ด้วย volumetric flask ดังนั้นสารละลายที่ได้จะมีความเข้มข้น 2 ไมโครโมล/มล. นำสารละลายที่ได้มาปริมาณ 1,2,3,4 และ 5 มล. (20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครโมล) ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มล.จากนั้นเติมสารละลายชนิดเดิม 50 มล.เติมฟีนอล์ฟทาลีน 1หยด ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐาน NaOH 0.01 N จนกระทั่งฟีนอล์ฟทาลีนเปลี่ยนสี (รูปที่ 23)

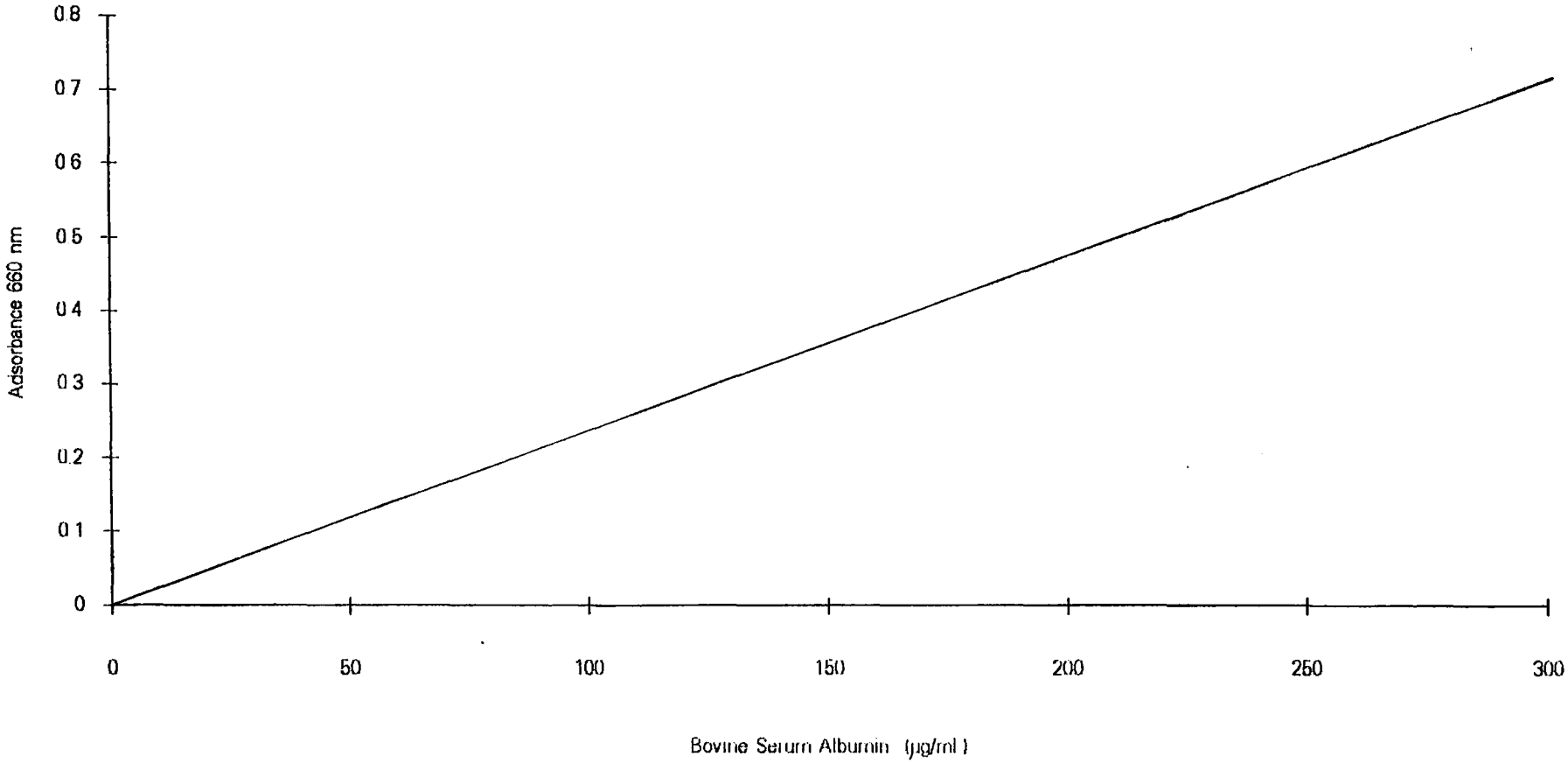
รูปที่ 23 กราฟมาตรฐานของ oleic acid





รูปที่ 24 การวิเคราะห์โปรตีนโดย Lowry 's Method

รูปที่ 25 กราฟมาตรฐานของ Bovine Serum Albumin



เอกสารอ้างอิง

1. กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย และคณะ(2534) วิธีการที่รวดเร็วสำหรับคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง. ว.เกษตรศาสตร์(วิทย).25:162-168
2. ศิศิธร สุวรรณภูชัย และสุรีย์ พูตระกูล. การศึกษาเบื้องต้นของแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสที่แยกจากน้ำพุร้อน ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่
3. Abergel,C.,Fontecilla J.and Cambillau,C.(1991) Crystallization of gastric lipases. In: Alberghina L., Schmid R.D. and Verger R. (Eds.), Lipase : Structure, Mechanism and Genetic Engineering.GBF Monograph, Vol.16.Braunschweig, Germany,pp. 28-30.
3. Akio Sugihara, Tadaaki Tani, and Yoshio Tominaga.(1991).Purification and Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Bacillus sp.* J.Biochem 109:211-216
4. Antonian, E. (1988) Recent advances in the purification , characterization and structure determination of lipase. Lipids 23,1101-1106.
5. Arnold, R.g.,R.M. Shahani and B.K. Dwivedi.(1975). Application of lipolytic enzymes to flavour development in dairy products. J. Dairy Sci. 58(8) : 1127-1143.
6. Buchanan, R.E.; N.E. Gibbson; S.T. Cowan; J.G. Holt; J.Liston; R.E.G. Murray; C.F. Nivin; A.W. Ravin and R.Y. Stanier. (1974).Bergey's Mannual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Williams and Willkins Company , Baltimore.

7. Cambillau,C. and Bourne, Y.(1991). Crystallographic studies of the Pancreatic lipase/colipase system. In:Alberghina L.Schmid R.D. and Verger S. (Eds.), Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering . GBF Monographs, Vol.16. Braunschweig, Germany, pp. 31-34.

8. Gagouri, y., Moreau, H. and Verger, R.(1989). Gastric lipases: biochemical and Physiological studies. Biochim.Biophys. Acta 1006, 255-271.

9. Ibrahim Cheomar, Naomichi Nishio and Shiro Nagai. (1987). Production of a Thermostable Lipase by *Humicola lanuginosa* Grown on Sorbitol-Corn Steep Liquor Medium. J.Agr.Biol.Chem. 51:2145-2151.

10. Ibrahim Cheonar, Mitsunori Hayashi and Shiro Nagai.(1987). Purification and Sound Properties of a Thermostable Lipase form *Humicola lanuginosa* No.3. J.Agr.Biol.Chem. 51:37-45.

11. Kazua Aisaka and Osamu Terada. (1981). Purification and Properties of lipase fron *Rhizopus japonicus*.J.Biochem. 89:817-822.

12. Kozo Nagaoka and Yujiro Yamada. (1973).Purification of *Mucor* Lipases and Their Properties. J.Agr.Biol.Chem. 37:2791-2796

13. Lawrance, K.C., T.F. Fryer and B. Reiter,(1976). Rapid method for the quantitative estimation of microbial lipase, Nature 25:1264-1265.

14. Manikuntala Kundu,Joyoti Basu, Mrityunjay Guchhait and Puarul Chahrabarti. (1987). Isolation and Characterization of an Extracellular Lipase form the Conidia of *Neurospora crassa*. J. General Microbiology 133:149-153.

15. M.A. Taipa, M.R. Aires-Barros and J.M.S. Cabral. (1992). Purification of lipases. J.of Biotechnology.26:111-142.

16. Mitsu Suzuki,Hirotaka. Yamamoto, and Michinao Mizugaki.(1986). Purification and General Properties of a Metal-Insensitive Lipase from *Rhizopus japonicus* NR 400. J. Biochem. 100:1207-1213.

17. Nishio, T.,Chikano,T. and Kamimura,M.(1987). Purification and some Properties of lipase produced by *Pseudomonas fragi* 22.39 B.Agric.Biol.Chem. 51, 181-187.

18. Odera, M.,N.Takeuchi and A.Toh-e. (1986) Molecular Cloning of lipase genes From *Alcaligines denitrificans* and their expresion in *Escherichia coli*.J. Ferment.Technol. 64(5):363-371.

19. Omar, I.C., N. Nishio and S. Nagai. (1987a). Production of a thermostable lipase by *Humicola lanuginosa* grown on sorbital corn steep liquour medium. Agri. Biol Chem. 51(8):2145-2151

20. Omar, I.C.,Hayashi,M. and NaGai, S. (1987b). Purification and some Properties of Thermostable lipase from *Humicola lanuginosa* No. 3. Agric.Biol.Chem. 51, 37-45.

21. Ota, Y., Gomi, K., Kato, S. Sugiura, T. and Minoda, Y. (1982). Purification and some properties of cell-bound lipase from *Saccharomycopsis lipolytica*. Agric. Biol.Chem. 46, 2885-2893.

22. Seitz, E.W. 1974. Industrial application of microbial: a review. J.Amar. Oil. Chem. 51(2):12-16.

23. Seoung Yonglee and Byong H. Lee. (1989). Production and Characterization of Esterase-Lipase of *Lactobacillus casei* subsp. *Pseudoplantarum* LE 2.1 J.Biotechnology and applied Biochemistry 11:552-563.

24. Suzuki, T.,Mushiga, y, yamane, T. and Shimizu, S.(1988). Mass production of lipase by fed-batch culture of *Pseudomonas fluorescens* lipase. Appl. Microbiol. 27, 417-422.

25. Tatara, T., Fujii, T.Kawase and M. Minogawa.(1985).Studies on aplications of lipolytic enzyme in detergent,II.Evalution of various kinds of lipase in practical laundary conditions. J.Amer. oil. chem. soc. 62 (5) 1053-1058.

26. Toshiharu Muraoka, Takao Ando, Hiromichi Okuda. (1982). Purification and Properties of a Novel Lipase.J.Biochem. 92:1933-1939.

27. Toshiyuki Nishio, Takahide Chikano and Shiro Nagai. 1987. Purification and Some Properties of Lipase Produced by *Pseudomonas fragi* 22.39 B. J.Agr.Biol.Chem. 51:181-186.

28. Tsujisaka, Y., Iwai, M. and Tominaga, Y.(1973). Purification, crystallization and some Properties of lipase from *Geotrichum candidum* Link. Agr.Biol.Chem. 37, 1475-1464.

29. Yamaguchi, T., Muroya, N., Isobe, M. and Sugiura, M. (1973). Production and properties of lipase from a newly isolate *Chromobacterium*. Agr. Biol. Chem. 37, 999-1005.

30. Yamane T.(1987). Enzyme technology for the lipids industry an engineering overview. J. Amer. Oil. Chem. Soc. 64(2): 1657-1661.