ว.วิทย. มข. 40(3) 924-936 (2555) KKU Sci. J. 40(3) 924-936 (2012)

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไลเปสโดยแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *Geobacillus stearothermophilus* PTL38

Influencing Factors on Lipase Production by Thermophilic Bacteria, *Geobacillus stearothermophilus* PTL38

ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล[1]

บทคัดย่อ

แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *Geobacillus stearothermophilus* PTL38 ที่คัดแยกจากบ่อดักไขมันของภัตตาคารในเขตอำเภอเมืองอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี สามารถผลิตไลเปสได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B ซึ่งประกอบด้วย basal salt solution, 0.5 % w/v ยีสต์สกัดและ 1 % v/v น้ำมันมะกอก ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปส คือ พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 หัวเชื้อตั้งต้นอายุ 36 ชั่วโมง ปริมาตรหัวเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 5.0 % (v/v) บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยแบคทีเรียสามารถผลิตไลเปสที่มีกิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 36.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร *G. stearothermophilus* PTL38 สามารถใช้น้ำมันพืชผลิตเชิงพาณิชย์หลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า 2.5 % v/v น้ำมันปาล์ม และ 1.0 % v/v น้ำมันข้าวโพดที่ผ่านการใช้แล้วสองครั้ง เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด โดยแบคทีเรียสามารถผลิตไลเปสได้เท่ากับ 40.60 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 42.40 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

[1]ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ.วารินชำราบ จ.อุบลราชธานี 34190

E-mail: scpranpa@gmail.com

ABSTRACT

Thermophilic *Geobacillus stearothermophilus* PTL38 isolated from grease chamber of restaurant in Amphoe Moungubonratchathani, Ubon Ratchathani Province. This bacterium produces lipase with hydrolytic activities when cultures in enrichment medium B comprised with basal salt solution, 0.5 % w/v yeast extract, 1 % v/v olive oil. Factors affecting the lipase production were examined. It was observed that modified enrichment medium B with 7.0 initial pH of the medium, 36 hrs inoculums age, 5.0 % (v/v) inoculums volume, 36 hrs and 55 ^{o}C incubation with 180 rpm shaking. Under this optimized condition, the bacterium gave 36.50 U/ml of maximum lipase production. *G. stearothermophilus* PTL38 utilized several commercial vegetable oils as carbon source. Palm oil (2.5 %, new) and corn oil (1.0 %, reuse twice) were the best among all carbon sources tested, yielding 40.60 U/ml and 42.40 U/ml lipase, respectively.

คำสำคัญ: ไลเปส การผลิตไลเปส แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง

Keywords: Lipase, Lipase production, Thermophilic bacteria, *G. stearothermophilus*

บทนำ

ไลเปส หรือ triacylglycerol acylhydrolases; EC 3.1.1.3 ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของไตรกลีเซอไรด์ให้เปลี่ยนเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน พบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งสัตว์ พืช แบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อรา แต่ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์เป็นแหล่งสำคัญและได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายชนิด ได้แก่ อุตสาหกรรมสารซักฟอก อุตสาหกรรมอาหารและนม อุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมการผลิตเครื่องหนังและอุตสาหกรรมการผลิตเภสัชภัณฑ์ รวมทั้งการนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสีย นอกจากนี้การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์มีข้อได้เปรียบกว่าการผลิตโดยใช้สิ่งมีชีวิตชั้นสูง เพราะจุลินทรีย์สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว วิธีการเพาะเลี้ยงไม่ยุ่งยาก สามารถผลิตได้ในปริมาณมาก กระบวนการผลิตและการเก็บเกี่ยวไม่ซับซ้อน (Lee Dong-Woo et al., 1999; Shama et al., 2001; Kambourova et al., 2003) โดยเฉพาะอย่างยิ่งไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic microorganisms) ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ดังกล่าวจะมีความคงทนต่ออุณหภูมิสูงและการถูกทำลายด้วยสารเคมี (Lee Dong-Woo et al., 1999) ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา มีรายงานเกี่ยวกับการผลิตไลเปสโดยแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง ซึ่งวิธีการผลิตจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย เพื่อให้ได้ปริมาณไลเปสที่เพิ่มมากขึ้น ตัวอย่างเช่น *Bacillus thermoleovorans* ID-1 (Lee Dong-Woo et al., 1999) *B. thermoleovorans* IHI-91 (Markossian et al., 2000) *Pseudomonas fluorescens* NS2W (Kulkami and Gadre, 2002) *Bacillus sterothermophilus* MC7 (Kambourova et al., 2003) สำหรับงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาปัจจัยในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *Geobacillus stearothermophilus*

PTL38 (ปราณี, 2555) เพื่อการผลิตไลเปส ปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ ช่วงอายุของหัวเชื้อตั้งต้น ปริมาตรหัวเชื้อตั้งต้น อัตราการเขย่าให้อากาศ ช่วงเวลา ชนิดของแหล่งคาร์บอน และระดับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

วิธีดำเนินการวิจัย

1. พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นโดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *G. stearothermophilus* PTL38 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium A ซึ่งประกอบด้วย basal salt solution 0.1 % w/v ยีสต์สกัดและ 1 % v/v น้ำมันมะกอก บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเชื้อ (OD_{600}) เท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium A จากนั้นปิเปตหัวเชื้อตั้งต้นที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 5 % (v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร) ซึ่งประกอบด้วย basal salt solution 0.5 % w/v ยีสต์สกัดและ 1 % v/v น้ำมันมะกอก โดยปรับพีเอชเท่ากับ 4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 และ 9.0 ด้วย 0.1 M HCl หรือ NaOH นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วทำการแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 19,000 x*g* เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมไลเปส (Odera et al., 1986) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำการทดลองและกำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันมะกอกให้ได้กรดไขมันที่อยู่ในรูป oleic acid ปริมาตร 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 20 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

2. อุณหภูมิ

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นเช่นเดียวกับข้อ 1 จากนั้นปิเปตหัวเชื้อตั้งต้นที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 5 % (v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B โดยปรับพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 35 45 55 และ 60 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้ว ทำการแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 19,000 x*g* เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมไลเปส (Odera et al., 1986) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำการทดลอง

3. ช่วงอายุของหัวเชื้อตั้งต้น

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium A เช่นเดียวกับข้อ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลาต่าง ๆ คือ 18 24 30 36 42 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตหัวเชื้อตั้งต้นที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 5 % (v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B โดยปรับพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2 บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วทำการแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 19,000 x*g* เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมไลเปส (Odera et al., 1986) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำการทดลอง

4. ปริมาตรหัวเชื้อตั้งต้น

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นในช่วงอายุของหัวเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมจากข้อ 3 จากนั้นปิเปตหัวเชื้อตั้งต้นที่เจือจางแล้วในปริมาตร 1.0 3.0 5.0 7.0 และ 9.0 %

(v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B โดยปรับพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2 บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วทำการแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 19,000 x*g* เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมไลเปส (Odera et al., 1986) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำการทดลอง

5. อัตราการเขย่าให้อากาศ

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นในช่วงอายุของหัวเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมจากข้อ 3 จากนั้นปิเปตหัวเชื้อตั้งต้นที่เจือจางในปริมาตรที่เหมาะสมจากข้อ 4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B โดยปรับพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2 บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบในระดับต่าง ๆ คือ 100 150 180 และ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วทำการแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 19,000 x*g* เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมไลเปส (Odera et al., 1986) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำการทดลอง

6. ช่วงเวลา

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นในช่วงอายุของหัวเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมจากข้อ 3 จากนั้นปิเปตหัวเชื้อตั้งต้นที่เจือจางแล้วปริมาตรที่เหมาะสมจากข้อ 4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B โดยปรับพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2 บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบที่เหมาะสมจากข้อ 5 เป็นเวลา 24 36 48 60 และ 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วตามช่วงเวลาต่าง ๆ ให้ทำการแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 19,000 x*g* เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมไลเปส (Odera et al., 1986) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำการทดลอง

7. ชนิดของแหล่งคาร์บอน

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นในช่วงอายุของหัวเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมจากข้อ 3 จากนั้นปิเปตหัวเชื้อตั้งต้นที่เจือจางแล้วปริมาตรที่เหมาะสมจากข้อ 4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B แต่มีแหล่งคาร์บอน (ปริมาตร 1% v/v) แตกต่างกันคือ 1) น้ำมันพืชประกอบอาหารที่ผลิตเชิงพาณิชย์ (ใหม่) และ 2) น้ำมันพืชประกอบอาหารที่ผลิตเชิงพาณิชย์ (ผ่านการใช้แล้ว) ซึ่งได้แก่ น้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันข้าวโพด น้ำมันรำข้าว น้ำมันปาล์มโอลีนโดยปรับพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2 บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบที่เหมาะสมจากข้อ 5 บ่มในช่วงเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 6 เมื่อครบกำหนดแล้วทำการแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 19,000 x*g* เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมไลเปส (Odera et al., 1986) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

8. ระดับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

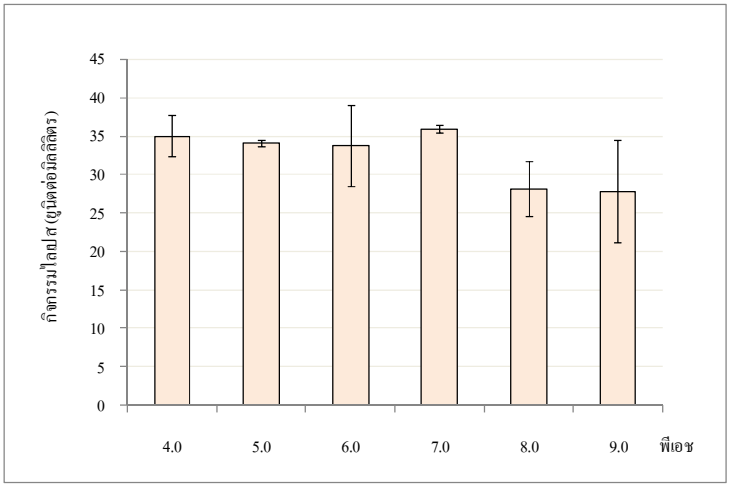
เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นในช่วงอายุของหัวเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมจากข้อ 3 จากนั้นปิเปตหัวเชื้อตั้งต้นที่เจือจางแล้วปริมาตรที่เหมาะสมจากข้อ 4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B ที่มีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากข้อ 7 แต่มีระดับความเข้มข้นในระดับต่างๆ คือ 0.25 0.5 1.0 1.5 2.0 และ 2.5 % (v/v) โดยปรับพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2 บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบที่เหมาะสมจากข้อ 5 บ่มในช่วงเวลาที่เหมาะสมจากข้อ 6 เมื่อครบกำหนดแล้ว ทำการแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 19,000 x*g* เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไป

วิเคราะห์กิจกรรมไลเปส (Odera et al., 1986) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำการทดลอง

ผลการวิจัย

1. พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมในการผลิตไลเปส โดยแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *G. stearothermophilus* PTL38 ผลการวิจัยพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *G. stearothermophilus* PTL38 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B ที่ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0 เชื้อสามารถผลิตไลเปสที่มีกิจกรรมสูงสุด เท่ากับ 35.94 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ พีเอช 4.0 5.0 6.0 8.0 และ 9.0 ตามลำดับ ซึ่งมีกิจกรรมไลเปสเท่ากับ 35.00 34.06 33.75 28.13 และ 27.81 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 กิจกรรมไลเปสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *G. stearothermophilus* PTL38 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับค่าพีเอชระดับต่าง ๆ

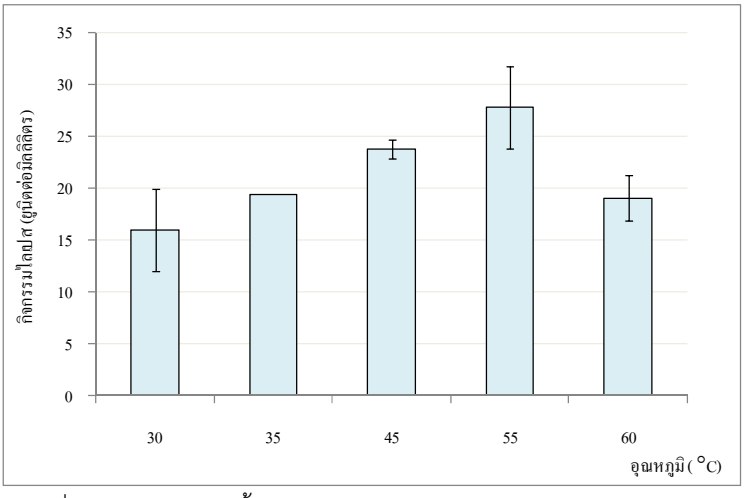
2. อุณหภูมิ

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสโดยแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *G. stearothermophilus* PTL38 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B พีเอชเท่ากับ 7.0 และบ่มที่อุณหภูมิระดับต่าง ๆ กัน ผลการวิจัยพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *G. stearothermophilus* PTL38 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อสามารถผลิตไลเปสที่มีกิจกรรมสูงสุด เท่ากับ 27.81 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 35 60 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งมีกิจกรรมไลเปสเท่ากับ 23.75 19.38 19.06 และ 15.94 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 2

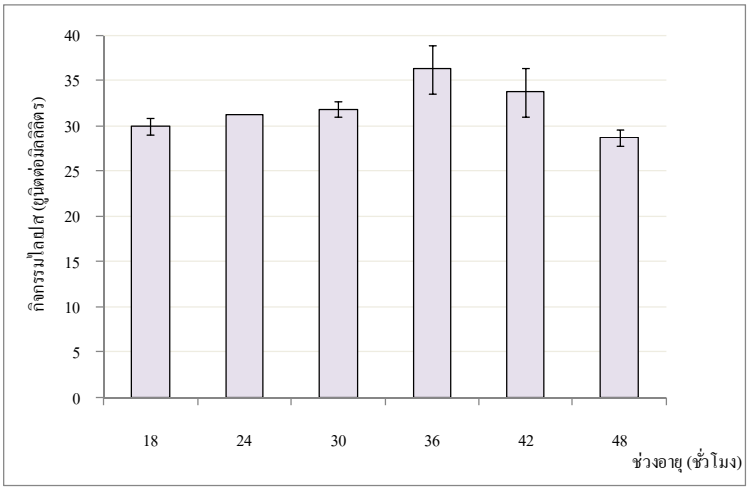
3. ช่วงอายุของหัวเชื้อตั้งต้น

การศึกษาช่วงอายุของหัวเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสโดยแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *G. stearothermophilus* PTL38 โดยเพาะหัวเชื้อตั้งต้นที่มีช่วงอายุต่าง ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B ผลการวิจัยพบว่า เมื่อใช้หัวเชื้ออายุ 36 ชั่วโมง เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในการเพาะเลี้ยง

เชื้อสามารถผลิตไลเปสที่มีกิจกรรมสูงสุด เท่ากับ 36.25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ หัวเชื้ออายุ 42 30 24 18 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยมีกิจกรรมไลเปสเท่ากับ 33.75 31.88 31.25 30.00 และ 28.75 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 2 กิจกรรมไลเปสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *G. stearothermophilus* PTL38 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับพีเอชเท่ากับ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิระดับต่าง ๆ



รูปที่ 3 กิจกรรมไลเปสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *G. stearothermophilus* PTL38 โดยใช้ช่วงอายุของหัวเชื้อตั้งต้นระดับต่าง ๆ

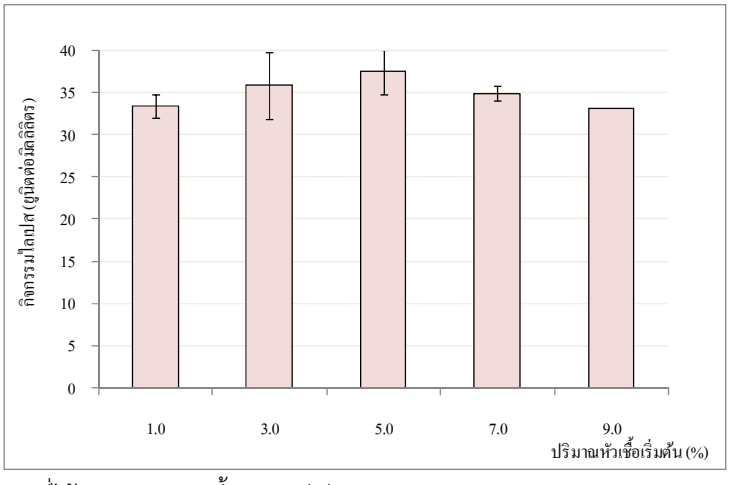
4. ปริมาตรหัวเชื้อตั้งต้น

การศึกษาปริมาตรหัวเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสโดยแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *G. stearothermophilus* PTL38 โดยใช้ปริมาตรหัวเชื้อตั้งต้นระดับต่าง ๆ ผลการวิจัยพบว่าเมื่อใช้หัวเชื้อเริ่มต้นอายุ 36 ชั่วโมง ปริมาตร 5.0% (v/v) เชื้อสามารถผลิตไลเปสที่มีกิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 37.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือปริมาตรหัวเชื้อเท่ากับ

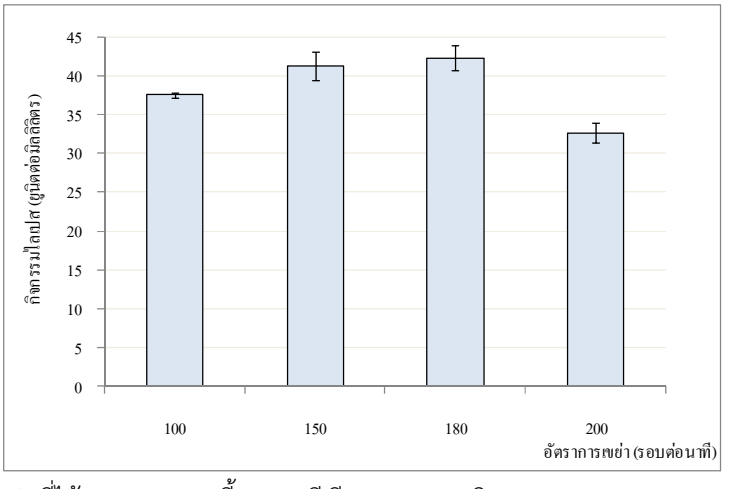
3.0 7.0 1.0 และ 9.0 % (v/v) ตามลำดับ โดยมีกิจกรรมไลเปสเท่ากับ 35.94 35.00 33.50 และ 33.13 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4

5. อัตราการเขย่าให้อากาศ

การศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสโดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *G. stearothermophilus* PTL38 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B บนเครื่องเขย่าความเร็ว (รอบต่อนาที) ที่ระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการวิจัยพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที เชื้อสามารถผลิตไลเปสที่มีกิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 42.35 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือที่อัตราการเขย่าเท่ากับ 150 100 และ 200 รอบต่อนาที ตามลำดับ โดยกิจกรรมไลเปสเท่ากับ 41.35 37.60 และ 32.75 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 5



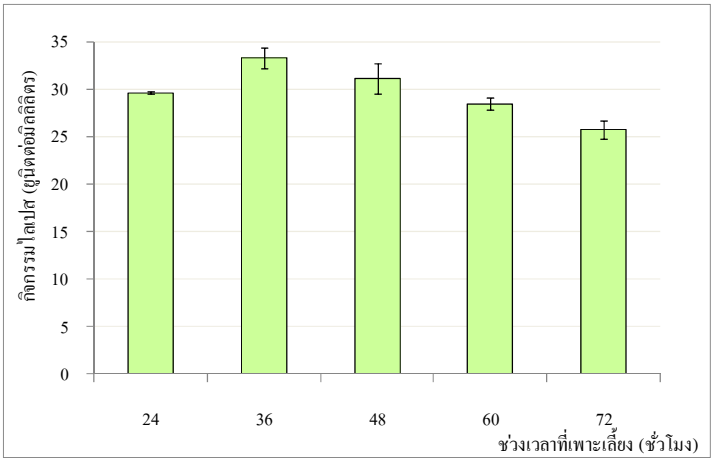
รูปที่ 4 กิจกรรมไลเปสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *G. stearothermophilus* PTL38 ที่มีอายุของหัวเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 36 ชั่วโมง โดยใช้ปริมาตรหัวเชื้อตั้งต้นที่ระดับต่าง ๆ



รูปที่ 5 กิจกรรมไลเปสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *G. stearothermophilus* PTL38 บนเครื่องเขย่าความเร็ว (รอบต่อนาที) ที่ระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

6. ช่วงเวลา

เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ชอบอุณหภูมิสูง *G. stearothermophilus* PTL38 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B ตามช่วงเวลาต่าง ๆ ผลการวิจัยพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 36 ชั่วโมง แบคทีเรียสามารถผลิตไลเปสที่มีกิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 33.35 ยูนิต ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 24 60 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยมีกิจกรรมไลเปสเท่ากับ 31.15 29.70 28.55 และ 25.80 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 กิจกรรมไลเปสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *G. stearothermophilus* PTL38 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน ตามช่วงเวลาต่าง ๆ

7. ชนิดของแหล่งคาร์บอน

7.1 น้ำมันพืชประกอบอาหารที่ผลิตเชิงพาณิชย์

การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสโดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *G. stearothermophilus* PTL38 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำมันพืชประกอบอาหารที่ผลิตเชิงพาณิชย์ชนิดต่าง ๆ (ระดับความเข้มข้น 1 % v/v) ผลการวิจัยพบว่าน้ำมันปาล์มเป็นชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม เชื้อสามารถผลิตไลเปสที่มีกิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 39.38 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันรำข้าว น้ำมันข้าวโพด และน้ำมันมะกอก ตามลำดับ โดยมีกิจกรรมไลเปสเท่ากับ 37.50 36.39 34.25 และ 31.75 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 7

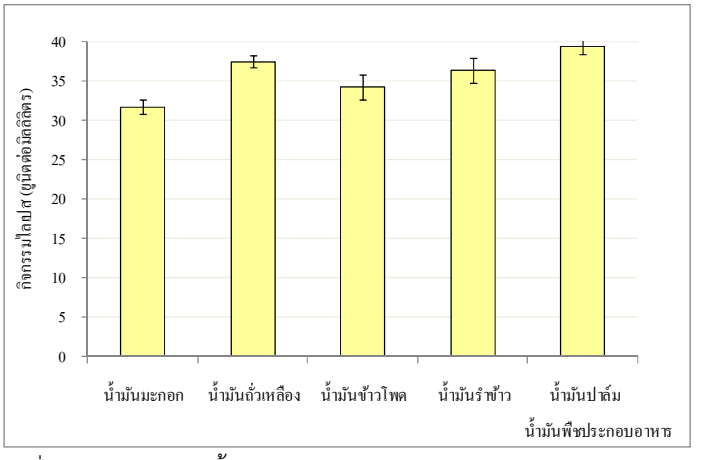
7.2 น้ำมันพืชประกอบอาหารที่ผลิตเชิงพาณิชย์ (ผ่านการใช้แล้ว)

การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสโดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *G. stearothermophilus* PTL38 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำมันพืชประกอบอาหารที่ผลิตเชิงพาณิชย์ชนิดต่าง ๆ ที่ผ่านการใช้แล้ว 2 ครั้ง (ที่ระดับความเข้มข้น 1 % v/v) ผลการวิจัยพบว่าน้ำมันข้าวโพดที่ผ่านการใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม โดยเชื้อมีกิจกรรมไลเปสสูงสุดเท่ากับ 42.40 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ น้ำมันปาล์ม น้ำมันรำข้าว น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมัน

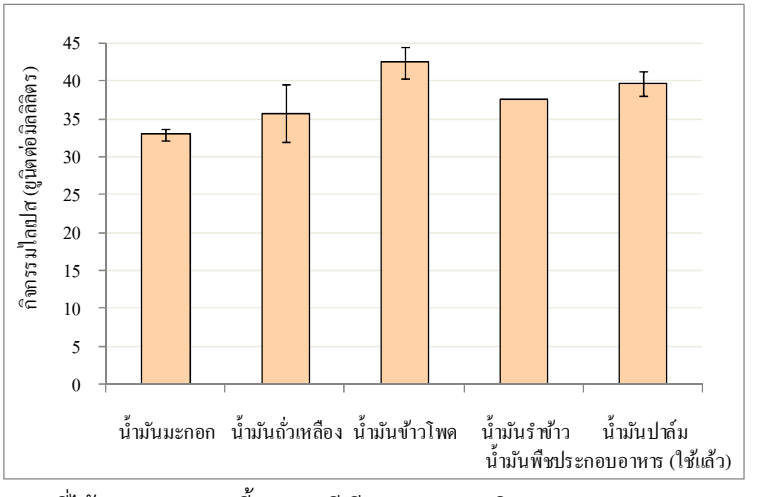
มะกอก ตามลำดับ โดยมีกิจกรรมไลเปสเท่ากับ 39.70 37.50 35.70 และ 32.95 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 8

8. ระดับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

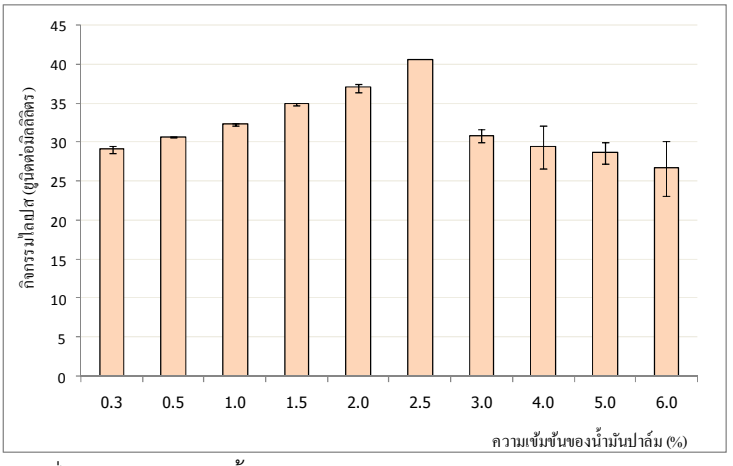
การศึกษาระดับความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตไลเปส โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *G. stearothermophilus* PTL38 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B ที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน ผลการวิจัยพบว่าเมื่อใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 2.5 % (v/v) เชื้อสามารถผลิตไลเปสที่มีกิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 40.60 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 2.0 1.5 1.0 0.5 3.0 0.3 5.0 4.0 และ 6.0 % (v/v) โดยมีกิจกรรมไลเปสเท่ากับ 37.50 34.90 32.50 30.80 30.1 29.50 27.50 27.0 และ 23.60 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 9



รูปที่ 7 กิจกรรมไลเปสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *G. stearothermophilus* PTL38 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันพืชประกอบอาหารที่ผลิตเชิงพาณิชย์ชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 8 กิจกรรมไลเปสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *G. stearothermophilus* PTL38 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันพืชประกอบอาหารที่ผลิตเชิงพาณิชย์ผ่านการใช้แล้ว 2 ครั้ง เป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 9 กิจกรรมไลเปสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *G. stearothermophilus* PTL38 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ

บทสรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

การผลิตไลเปสจากจุลินทรีย์จะมีปัจจัยต่าง ๆ มาเกี่ยวข้องเพื่อเป็นการปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่สูงขึ้น แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *G. stearothermophilus* PTL38 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกจากบ่อดักไขมันของภัตตาคารในเขตอำเภอเมืองอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี เจริญที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันได้ดี (ปราณี, 2548) เมื่อศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตไลเปส พบว่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไลเปสโดยแบคทีเรีย *G. stearothermophilus* PTL38 มีค่าเท่ากับ 7.0 ซึ่งสอดคล้องกับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตไลเปสโดยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. PS15 (จุรีรัตน์, 2541) *B. cereus* C71 (Chen et al., 2007) แต่เป็นค่าที่ต่ำกว่าการผลิตไลเปสโดยแบคทีเรีย *Burkholderia cepacia* C737-11 ซึ่งมีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.0 (Ma et al., 2010) พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตไลเปสโดยแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. HY-10 เท่ากับ 8.5 (Park et al., 2007) และพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตไลเปสโดยแบคทีเรีย *Burkholderia* sp. C20 เท่ากับ 9.0 (Liu et al., 2006) และสูงกว่าค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตไลเปสโดยแบคทีเรีย *Pseudomonas* sp. ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.5 (Sarkar et al., 1998) พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตไลเปสโดยแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* มีค่าเท่ากับ 5.5 (Lopes et al., 1999) พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตไลเปสโดยแบคทีเรีย *Bacillus thermoleovorans* ID-1 มีค่าเท่ากับ 6.0 (Lee Dong-Woo et al., 1999) พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตไลเปสโดยแบคทีเรีย *Bacillus thermoleovorans* IHI-91 มีค่าเท่ากับ 6.5 (Markossian et al., 2000) แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *G. stearothermophilus* PTL38 ผลิตไลเปสได้ในปริมาณสูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (กิจกรรมไลเปสเท่ากับ 27.81 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ซึ่งสูงกว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตไลเปสโดยแบคทีเรีย *Bacillus* sp. คือที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (กิจกรรมไลเปสเท่ากับ 0.45 ยูนิตต่อ

มิลลิลิตร; Handelsmann and Shoham, 1994) และ *B. thermoleovorans* ID-1 (กิจกรรมไลเปสเท่ากับ 0.70 ยูนิตต่อมิลลิลิตร; Lee Dong-Woo et al., 1999) อย่างไรก็ตาม Markossian et al. (2000) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสโดยแบคทีเรีย *B. thermoleovorans* IHI-91 คือ 65 องศาเซลเซียส (กิจกรรมไลเปสเท่ากับ 0.30 ยูนิตต่อลิตร) นอกจากนี้อัตราการเขย่ามีบทบาทสำคัญต่อการเคลื่อนย้ายออกซิเจนเข้าสู่อาหารเลี้ยงเชื้อและมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจึงใช้อัตราการเขย่าให้อากาศแตกต่างกัน ผลการวิจัยพบว่าอัตราการเขย่าที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไลเปสโดยแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *G. stearothermophilus* PTL38 คือ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เมื่ออัตราการเขย่าสูงขึ้นที่ 200 รอบต่อนาที แบคทีเรียสังเคราะห์ไลเปสที่มีกิจกรรมลดลง แต่แบคทีเรียสายพันธุ์ $1A_{42}$ และ สายพันธุ์ $2C_8$ ต้องการอัตราการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 150 และ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ (สุวรรณา และคณะ, 2540) ในขณะที่แบคทีเรีย *Burkholderia* sp. C20 ต้องการอัตราการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (Liu et al., 2011)

แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *G. stearothermophilus* PTL38 สามารถเจริญและผลิตไลเปสได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ยังไม่ผ่านการใช้ (2.5 % น้ำมันปาล์ม) และผ่านการใช้แล้ว (น้ำมันข้าวโพด) เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Haba et al. (2000) กล่าวว่าเมื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Pseudomonase* sp. 3AT และ *Pseudomonase aeruginisa* ATCC 111 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันประกอบอาหารที่ใช้แล้วเป็นแหล่งคาร์บอน แบคทีเรียสองชนิดนี้ให้กิจกรรมไลเปสสูงสุดเมื่อใช้อัตราส่วนของน้ำมันมะกอกและน้ำมันเมล็ดดอกทานตะวันเท่ากับ 1:1 Lee Dong-Woo et al. (1999) พบว่า *Bacillus thermoleovorans* ID-1 สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันมินเนอรอล ไตรกลีเซอไรด์ Tween 20 และ Tween 80 เป็นองค์ประกอบ Emanuilova et al. (1993) รายงานว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. MC7 มีกิจกรรมไลเปสสูงสุด 2.0-3.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Tween-80 เป็นองค์ประกอบ ส่วนแบคทีเรีย *Bacillus thermoleovorans* IHI-91 ที่แยกจากน้ำพุร้อนสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกรดปาร์มิคติก กรดสเตรียริก ลาโนริน น้ำมันมะกอก น้ำมันเมล็ดดอกทานตะวัน น้ำมันถั่วเหลือง และน้ำมันปลา เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน โดยไม่ต้องการเติมสารจำเป็นต่อการเจริญ (growth factor) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Markossian et al., 2000) Kulkarni and Gradre (2002) พบว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* NS2W สามารถใช้น้ำมันพืชเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่าน้ำตาลเฮกโซส และน้ำตาลเพนโตส

สรุปได้ว่า แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *G. stearothermophilus* PTL38 ที่คัดแยกจากบ่อดักไขมันของภัตตาคารในเขตอำเภอเมืองอุบลราชธานี จังหวัดอุบลราชธานี สามารถผลิตไลเปสได้ดี ภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูงและพีเอชที่เป็นกลาง แบคทีเรียสามารถใช้น้ำมันที่ผลิตเชิงพาณิชย์ได้หลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนการใช้น้ำมันมะกอก จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำแบคทีเรียชนิดนี้ไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมและสิ่งแวดล้อมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณ ผู้วิจัยขอขอบคุณนางสาวพิยาดา

สุรารักษ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างและการวิเคราะห์ข้อมูล ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่สำหรับทำงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

จุรีรัตน์ แซ่แต้. (2541). การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่แยกได้จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. (2548). การคัดแยกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่สร้างไลเปส วารสารวิชาการ ม.อบ. 7: 95-114.

ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. (2555). การคัดเลือกไลเปสที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงเพื่อการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 14:71-77.

สุวรรณา เนียมสนิท, งานนิจ นนทโส, ประสาท โพธิ์นิ่มแดง, พลสัณห์ มหาขันธ์, สุรศักดิ์ ศิริพรอดุลศิลป์, นิยม กำลังดี. (2540). การคัดเลือกจุลินทรีย์จากน้ำทิ้งที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายไขมัน. วารสารวิจัย มข. 2 : 27-35

Chen, S., L. Qian, and B. Shi. (2007). Purification and properties of enantioselective lipase from a newly isolated *Bacillus cereus*. Proc. Bio. 42: 988-994.

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

Haba, E., O. Bresco., C. Ferrer., A. Marques., M. Usquets. and A. Anresa. (2000). Isolation of lipase screening bacteria by deploying used flying oil as selective substrate. Enzyme Microb. Technol. 26: 40-44.

Handelsmann, T. and Y. Shoham. (1994). Produciton and characterization of an extracellular thermostable liase from a thermophillic *Bacillus* sp. J. Gen. Appl. Microbiol. 40: 435-443.

Kambourova, M., N. Kirilova, R. Mandeva and A. Derekova. (2003). Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearoyhermophills* M7. J. Mol Catal B: Enzym. 22: 307-313.

Kulkarni, N. and R.V. Gadre. (2002). Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. Ind. Microbiol. Biotechnol. 28: 344-348.

Lee Dong-Woo, You-Seok Koh, Ki-Jun Kim, Byung-Chan Kim, Hak-Jong Choi, Doo-Sik Kim, M.T. Suhartono and Yu-Ryang Pyun. (1999). Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. FEMS Microbiol. Lett. 179: 393-400.

Liu, C. H., W. B. Lu and J. S. Chang. (2006). Optimizing lipase production of *Burkholderia* sp. by response surface methodology. Proc. Bio. 41: 1940-1944.

Liu, C-H, C-Y Chen, Y-W Wang, and J-S Chang. (2011). Fermentation strategies for the production of lipase by an indigenous isolate *Burkholderia* sp. C20. Biochem. Eng. J. 59: 96-102

Lopes, M. F. S., A. E. Cunha, J. J. Clemente, M. J. Teixeira Carrondo, M. T. Barreto Crespo. (1999). Influence of environ-mental factors on lipase production by *Lactobacillus plantarum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 249-254

Ma Q., X. Sun, and S. Gong. (2010). Screening and Identification of a highly lipolytic bacterial strain from barbecue sites in Hainan and characteristization of its lipase. Ann. Microbiol. 60: 429-437.

Markossian, S., P. Becker., H. Markl, and G. Antranikian. (2000). Isolation and characterization of lipid-degrading *Bacillus theroleovorans* IHI-91 from and Icelandic hotspring. Extremophies. 4: 356-371.

Odera, M., K. Takeuchi and A. Tohe. (1986). Molecular cloning of lipase genes from *Alcaligenes denitrificans* and their expression in *Escherichia coli.* J. Ferment. Tech. 64: 363-371.

Park, D. S., H. W. Oh, S. Y. Heo, W. J. Jeong, D. H. Shin, K. S. Bae, and H. Y. Park. (2007). Characterization of an extra-cellular lipase in *Burkholderia* sp. HY-10 isolated from a longicorn beetle. J. Microbiol. 45: 409-417.

Sarkar, S., B. Sreekanth, S. Kant, R. Banerjee, B. C. Bhattachryya. (1998). Production and optimization of microbial lipase. Bioproc. Biosystems Eng. 19: 29-32

Sharma, R., Y. Chisti. and T. Banerjee. (2002). Production, Purification, Characterization and Application of lipase. Biotechnol. Adv. 19: 627-662.

❑❑❑❑❑