การคัดเลือกจุลินทรีย์จากน้ำทิ้งที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายไขมัน

Screening for High Efficiency Lipase Producing Microorganisms from Waste Water

สุวรรณา เนียมสนิท (Suwanna Niamsanit)* งามนิจ นนทโส (Ngamnit Nontaso)*
ประสาท โพธิ์นิ่มแดง (Prasart Phonimdaeng)* พลสัณห์ มหาขันธ์ (Polson Mahakhan)**
สุรศักดิ์ ศิริพรอดุลศิลป์ (Surasak Siripornadulsil)** นิยม กำลังดี (Niyom Kumlangdee)**

บทคัดย่อ

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อใช้ในการยอยสลายไขมัน โดยเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งในจังหวัดขอนแก่น 12 แหล่ง แยกได้เชื้อบริสุทธิ์ 221 สายพันธุ์ โดยวิธี double layer technique พบว่าเชื้อ 33 สายพันธุ์ มีการเปลี่ยนสีของ bromocresol purple อย่างรวดเร็วภายใน 6 ชั่วโมง เมื่อนำมาหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าสายพันธุ์ $1A_{42}$ และ $2C_8$ มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยเชื้อสายพันธุ์ $1A_{42}$ ให้กิจกรรมไลเปสสูงสุดเมื่อเลี้ยงใน 2% sucrose, 0.15% yeast extract, 0.09% K_2HPO_4, 0.06% KH_2PO_4, 0.02% $MgSO_4$ $7H_2O$, 0.5% $CaCO_3$, pH 8.0, อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนสายพันธุ์ $2C_8$ จะให้เอนไซม์สูงสุดเมื่อเลี้ยงใน 2% dextrose, 0.15% beef extract, 0.09% K_2HPO_4, 0.06% KH_2PO_4, 0.02% $MgSO_4$ $7H_2O$, 0.5% $CaCO_3$, pH 7.0, อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Abstract

This study is to select bacteria producing high efficiency of lipase enzyme for degrading lipid. 221 isolates were obtained by double layer technique from 12 samples of waste water at various locations in Khon Kaen. Among 221 isolates, 33 showed strong lipase activity during primary screening by changing colour of bromocresol purple within 6 hours of culturing. Upon titration with standard sodium hydroxide solution, isolate $1A_{42}$ and $2C_8$ showed highest lipase activity. The culturing conditions for optimum lipase production for $1A_{42}$ consists of 2% sucrose, 0.15% yeast extract, 0.09% K_2HPO_4, 0.06% KH_2PO_4, 0.02% $MgSO_4$ $7H_2O$, 0.5% $CaCO_3$, pH 8.0, at 30°C. with shaking at 150 rpm for 24 hours and for $2C_8$ consists of 2% dextrose, 0.15% beef extract, 0.09% K_2HPO_4, 0.06% KH_2PO_4, 0.02% $MgSO_4$ $7H_2O$, 0.5% $CaCO_3$, pH 7.0, at 26°C. with shaking at 150 rpm for 24 hours.

*ผู้ช่วยศาสตราจารย์
*อาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

บทนำ

น้ำมันหรือไขมันเป็นปัจจัยที่สำคัญในอาหาร แต่กลับเป็นปัญหาทางสุขาภิบาลก่อให้เกิดการเน่าเสียของแหล่งน้ำ เพราะหากมีในปริมาณเล็กน้อยจะถูกย่อยสลายไปโดยจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ในแหล่งน้ำทั้งนั้น ๆ ที่มีเอนไซม์ไลเปสช่วยเร่งการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไตรกลีเซอไรด์ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของไขมันและน้ำมัน (Macrae, 1983) แต่ปริมาณการปนเปื้อนเหล่านี้นับวันจะมีปริมาณสูงขึ้นเรื่อย ๆ จึงมีการใช้ระบบบ่อดักไขมันที่วางต่อจากท่อระบายน้ำทิ้งของบ้านเรือนหรือโรงงานอุตสาหกรรมมาช่วย แต่ถ้าปริมาณของไขมันมีมากเกินไปจนบ่อดักไขมันไม่สามารถดักไขมันไว้ได้หมด ไขมันก็จะถูกปล่อยออกสู่ท่อระบายน้ำทิ้ง เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์จะมีคุณสมบัติแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ ทำให้สามารถที่จะคัดเลือกเอนไซม์ไลเปสมาใช้ประโยชน์ให้ตรงตามวัตถุประสงค์ได้มากมาย (Yamane,1987) ดังนั้นจึงอาจใช้เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์มาย่อยสลายไขมัน โดยย่อยในลักษณะเซลล์อิสระหรือในรูปเอนไซม์ที่ละลายอยู่ในระบบ (Bitton,1994) หรือการใช้เซลล์จุลินทรีย์และเอนไซม์ไลเปสที่ถูกตรึง (Pakula and Freeman, 1996)

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตไลเปสสูงจากแหล่งน้ำทิ้งต่าง ๆ กันและศึกษาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

วิธีการวิจัย

การแยกและคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

โดยเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากจังหวัดขอนแก่น 12 แหล่ง นำมา 0.5 มล. ใส่ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 มล. เขย่าให้เข้ากันแล้วถ่ายส่วนผสมนี้ 1-2 หยด ลงในอาหารเหลว 5 มล. ที่มีส่วนผสมของน้ำมันชนิดต่าง ๆ [$(NH_4)_2SO_4$ 5.0 กรัม, K_2HPO_4 0.5 กรัม, $MgSO_4$ 0.3 กรัม, น้ำมันชนิดต่าง ๆ (ได้แก่ น้ำมันปาล์มโอเลอีน, น้ำมันถั่วเหลือง ผสมรำข้าว, น้ำมันไก่ และน้ำมันมะพร้าว) 20.0 มล., น้ำกลั่น 1 ลิตร] นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบ gyrotary shaker ที่ความเร็ว 100 stroke ต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน เมื่ออาหารขุ่นให้เจือจางเชื้อด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีความเข้มข้นที่พอเหมาะ เลี้ยงในอาหารชนิดเดิมที่เติมวุ้นร้อยละ 2 ที่หลอมละลายในหลอดทดลองหลอดละ 6 มล. ซึ่งอยู่ในอ่างอุ่นสารละลายที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันดี จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อลงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหาร basal medium (เป็นอาหารชนิดเดิมแต่ไม่มีน้ำมัน) ที่บรรจุอยู่ก่อนแล้ว (double layer technique) บ่มจานเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน สังเกตบริเวณใสรอบ ๆ โคโลนี ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ แยกแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวที่มีรูปร่างแตกต่างกันที่เจริญได้รวดเร็วและสร้างบริเวณใสมาเลี้ยงในจานอาหาร nutrient agar เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ แล้วเก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ในอาหารวุ้นเอียง nutrient agar

ทำการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียโดยการวัดความสามารถในการผลิตกรดในอาหารเหลว oil liquid medium ที่มีน้ำมันชนิดต่าง ๆ (เช่นเดียวกับการแยกเชื้อ) โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของ bromocresol purple (BCP) เป็นเกณฑ์ตามวิธีของ Okuda และ Ito (1987, อ้างในกิตติเดช, 2532) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวชนิดเดิมแล้วปรับความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้มีค่า

เท่ากับ 0.1 เพื่อเป็นเชื้อเริ่มต้น จากนั้นดูดเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 0.5 มล. ลงในหลอดบรรจุอาหารปริมาตร 5 มล. ที่มีอาหารชนิดเดิมผสมกับ bromocresol purple (BCP) ร้อยละ 0.064 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที โดยเอียงหลอด 45 องศา ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส คัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนสี bromocresol purple (BCP) จากสีม่วงเป็นสีเหลืองในเวลาอันสั้น

การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตเอนไซม์ไลเปสขั้นที่สอง

เป็นการหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (กิตติเดช, 2532) โดยการวัดปริมาณของกรดไขมันที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันมะกอกโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่จะใช้หากิจกรรมของเอนไซม์แต่ไม่มี $CaCO_3$ แล้วปรับความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ได้ 0.1 ก่อนเลี้ยงในอาหารที่จะใช้หากิจกรรมของเอนไซม์ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มล. ที่บรรจุอาหาร 50 มล. [$(NH_4)_2SO_4$ 1.3 กรัม, K_2HPO_4 0.9 กรัม, KH_2PO_4 0.6 กรัม, $MgSO_47H_2O$ 0.3 กรัม, yeast extract 0.1 กรัม, น้ำมันมะกอก 10 มล. CaCO3 5 กรัม, ในน้ำกลั่น 1 ลิตร] นำไปเขย่าในเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำส่วนใสออกโดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 19,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปหาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

การหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ใช้สารละลายเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดปริมาตร 4 มล. ผสมกับสับสเตรทปริมาตร 2 มล. (โพลีไวนิลอัลกอฮอล์ร้อยละ 0.09, น้ำมันมะกอกร้อยละ 10 ในน้ำกลั่น) และ 0.2 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ปริมาตร 2 มล. ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ นำไปบ่มในตู้บ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติม acetone : alcohol 20 มล. ลงไป แล้วไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.05 โมลาร์ โดยมีฟีนอลทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ และให้ 1 หน่วยของเอนไซม์หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันมะกอกให้ได้กรดไขมันที่อยู่ในรูป oleic acid 1 μmole ในเวลา 20 นาที ภายใต้เงื่อนไขของวิธีการที่กำหนด (กิตติเดช, 2532)

การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ $1A_{42}$ และ $2C_8$

โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีสูตรเหมือนกับอาหารที่จะใช้ในการหากิจกรรมของเอนไซม์และผันแปรชนิดของคาร์บอนที่จะศึกษาเป็น 2% dextrose, 2% glycerol, 2% oleic acid และ 2% sucrose และบ่มเชื้อเป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ $1A_{42}$ และเป็นเวลา 18, 24 และ 48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ $2C_8$ ก่อนนำมาหากิจกรรมของเอนไซม์ เมื่อทราบชนิดของคาร์บอนที่เหมาะสมแล้วจะผันแปรแหล่งของไนโตรเจนที่จะศึกษาเป็น 0.15% $(NH_4)_2SO_4$, 0.15% beef extract, 0.15% yeast extract และตัวควบคุมคือ 0.13%$(NH_4)_2SO_4$ กับ 0.01% yeast extract จากนั้นก็ผันแปร pH เริ่มต้นเป็น 5, 6, 7 และ 8 จากนั้นก็ผันแปรอุณหภูมิที่เลี้ยงเชื้อเป็น 30, 35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (26 องศาเซลเซียส) และหาความเร็วรอบในการ

เลี้ยงเชื้อ คือ 150, 200 และ 250 รอบต่อนาที โดยใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อนาน 24 ชั่วโมง (ดัดแปลงจากกิตติเดช, 2532)

ผลการวิจัย

การแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเป่สด้วยวิธี Double layer technique

จากตัวอย่างน้ำทิ้ง 12 ตัวอย่าง แยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จำนวนทั้งสิ้น 221 สายพันธุ์ เชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย เมื่อนำมาทดสอบต่อในอาหาร oil liquid medium ที่เติม bromocresol purple (BCP) ลงไป พบว่าสามารถแบ่งแบคทีเรียได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เปลี่ยนสี BCP ได้รวดเร็วภายในเวลาน้อยกว่า 6 ชั่วโมง, 6-8 ชั่วโมง และมากกว่า 8 ชั่วโมง มีจำนวน 33, 50 และ 138 สายพันธุ์ ตามลำดับ ดังตารางที่ 1

การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตเอนไซม์ไลเปสขั้นที่สอง

จากการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อ 33 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมสูงสุดมี 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ $1A_{42}$ และ $2C_8$ ซึ่งให้กิจกรรมของเอนไซม์ 28.25 ยูนิต/มล.

การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

1. การหาแหล่งคาร์บอนและพลังงานที่เหมาะสม

แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ $1A_{42}$ และ $2C_8$ คือ 2% sucrose และ 2% dextrose ตามลำดับ และเวลาที่ใช้เลี้ยงเชื้อคือ 24 ชั่วโมง ดังตารางที่ 2 และตารางที่ 3 ตามลำดับ

2. การหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ $1A_{42}$ เมื่อใช้ 2% sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน คือ 0.15% yeast extract ส่วนเชื้อ $2C_8$ คือ 0.15% beef extract เมื่อใช้ 2% dextrose เป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 1

3. การหา pH ที่เหมาะสม

pH ที่เหมาะสมของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ $1A_{42}$ เมื่อใช้ 2% sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ 0.15% yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน คือ pH 8.0 ส่วนเชื้อ $2C_8$ คือ pH 7.0 เมื่อใช้ 2% dextrose เป็นแหล่งคาร์บอน และ 0.15% beef extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ดังแสดงในรูปที่ 2

4. การหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปสสายพันธุ์ $1A_42$ เมื่อใช้ 2% sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน, 0.15% yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน, pH 8.0 คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ส่วนเชื้อ $2C_8$ คือ อุณหภูมิห้อง (26 องศาเซลเซียส) เมื่อใช้ 2% dextrose เป็นแหล่งคาร์บอน, 0.15% beef extract เป็นแหล่งไนโตรเจน, pH 7.0 ดังรูปที่ 3

5. การหาความเร็วรอบที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ

ความเร็วรอบที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย เพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปสสายพันธุ์ $1A_{42}$ เมื่อใช้ 2% sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน, 0.15% yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน, pH 8.0, อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส คือ 150 รอบต่อนาที ส่วนเชื้อ $2C_8$ คือ 200 รอบต่อนาที เมื่อใช้ 2% dextrose เป็นแหล่งคาร์บอน, 0.15% beef extract เป็นแหล่งไนโตรเจน, pH 7.0 และอุณหภูมิห้อง (26 องศาเซลเซียส) ดังแสดงในรูปที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในขั้นต้น โดยดูการเปลี่ยนสีของ bromocresol purple นั้น แบ่งเชื้อเป็น 3 กลุ่ม คือเปลี่ยนสี bromocresol purple ได้ภายในเวลา 6 ชั่วโมง, ระหว่าง 6-8 ชั่วโมง และใช้เวลามากกว่า 8 ชั่วโมงดังแสดงในตารางที่ 1 แต่กิตติเดช (2532) จะแยกเชื้อเป็น 3 กลุ่ม โดยเริ่มต้นที่เวลา 6-8 ชั่วโมง, 8-10 ชั่วโมง และมากกว่า 10 ชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งอาจเนื่องมาจากของกิตติเดชเป็นเชื้อที่แยกจากตัวอย่างดิน แต่ในการทดลองนี้แยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างน้ำทิ้งบริเวณที่มีน้ำมันลอยอยู่ ดังนั้นเชื้อที่แยกได้จึงน่าจะมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสดีกว่า นอกจากนี้อาหารที่เตรียมขึ้นยังใช้น้ำมันที่ใช้แยกเชื้อเป็นแหล่งคาร์บอนด้วย พบเชื้อจำนวน 33 สายพันธุ์ จาก 221 สายพันธุ์ที่สามารถเปลี่ยนสี bromocresol purple ได้ภายในเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อที่แยกได้ส่วนใหญ่แยกมาจากท่อระบายน้ำในโรงอาหาร ซึ่งมักจะเป็นร้านอาหารตามสั่งที่มีท่อระบายน้ำที่มีกลิ่นเหม็นและสีดำ

การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในขั้นที่สอง พบว่าเชื้อสายพันธุ์ $1A_{42}$ และ $2C_8$ สามารถผลิตเอนไซม์ได้ถึง 28.25 ยูนิต/มล. โดยเชื้อ $1A_{42}$ และเชื้อ $2C_8$ ใช้เวลาในการเปลี่ยนสี bromocresol purple 4 ชั่วโมง แต่เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* KM-2 ของกิตติเดช (2532) ให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 22.12 ยูนิต/มล. และเวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนสี bromocresol purple เป็น 6 ชั่วโมง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปสนั้น ได้ทดลองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ $1A_{42}$ เป็นเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง แล้วหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ซึ่งจากการศึกษาหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของเชื้อ $1A_{42}$ พบว่าเวลาที่เหมาะควรจะเป็น 24 ชั่วโมง ดังตารางที่ 2 ซึ่ง Stuer; et.al. (1986) ได้ศึกษาช่วงการเจริญที่หมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสในเชื้อแบคทีเรีย พบว่า *Pseudomonas aeruginosa* จะผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดในช่วงปลาย logarithmic phase และ Suzuki; et.al. (1988) เชื่อว่าการผลิต extracellular enzyme นั้น ถ้าเลี้ยงให้อยู่ในสภาพกึ่งอดอาหารจะเหมาะต่อการผลิตเอนไซม์มาก เพราะ extracellular enzyme ส่วนมาก (รวมทั้งเอนไซม์ไลเปส) จะถูกปล่อยออกมามากที่สุดในช่วง late logarithmic phase ดังนั้นในการศึกษาหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของเชื้อ $2C_8$ จึงทดลองเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 18, 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วหากิจกรรมของเอนไซมไลเปส พบว่าช่วงเวลาที่เหมาะสมควรจะเป็น 24 ชั่วโมง ดังตารางที่ 3 ซึ่งกิตติเดช (2532) จะศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสหลังจากที่เลี้ยงเชื้อไว้ 48 ชั่วโมง

การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส พบว่าเชื้อสายพันธุ์ $1A_{42}$ จะเป็น 2% sucrose ในขณะที่เชื้อ $2C_8$ จะเป็น 2% dextrose ซึ่งสอดคล้องกับของวสี และคณะ (2537) เป็น glucose ส่วนของกิตติเดช (2532) เป็น 3% fructose แต่ในการศึกษานี้ไม่ได้ทดลองกับน้ำตาล fructose แต่ศึกษาแหล่งคาร์บอนเพียง 4 ชนิดเท่านั้น

สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมนั้น เชื้อ $1A_{42}$ และ $2C_8$ เป็น yeast extract และ beef extract ตามลำดับ ซึ่งของวสี และคณะ (2537) จะเป็น $(NH_4)_2SO_4$ กับ yeast extract แต่กิตติเดช (2532) เป็น $(NH_4)_2HPO_4$

การศึกษา pH ที่เหมาะสม สำหรับเชื้อ $1A_{42}$ คือ pH 8.0 ดังรูปที่ 2 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของวสี และคณะ (2537) แต่เชื้อ $2C_8$ พบว่าที่

pH 7.0 จะให้กิจกรรมของเอนไซม์มากกว่าที่ pH 8.0 แต่ค่าเอนไซม์ที่ได้แตกต่างกันไม่มากนัก

สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้นจากการศึกษาพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อ $1A_{42}$ คือ 30 องศาเซลเซียส ในขณะที่เชื้อ $2C_8$ คืออุณหภูมิห้อง (26 องศาเซลเซียส) ดังรูปที่ 3 ซึ่งวสี และคณะ (2537) ศึกษาพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 27 องศาเซลเซียส

ส่วนความเร็วรอบที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ $1A_{42}$ คือ 150 รอบต่อนาที ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของวสี และคณะ (2537) แต่เชื้อ $2C_8$ คือ 200 รอบต่อนาที ดังรูปที่ 4

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปสนั้น พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่ได้บางครั้งลดต่ำลงซึ่งอาจอธิบายได้ว่า การถ่ายเชื้อแบคทีเรียในอาหาร nutrient agar บ่อย ๆ มีผลทำให้การผลิตเอนไซม์ของเชื้อลดลงได้ ซึ่งในการทดลองนี้ จะมีการเลี้ยงเชื้อก่อนใน nutrient agar ทุกครั้งก่อนที่จะนำไปเลี้ยงในอาหารที่จะใช้ในการศึกษา แต่อย่างไรก็ตามในการหาสภาวะที่เหมาะสมนั้น ในแต่ละสภาวะที่ทำการศึกษานั้นเชื้อจะอยู่ในสภาวะเดียวกันในแต่ละครั้งของการทดลอง ดังนั้นจึงน่าจะสรุปได้ว่าสารใดหรือสภาวะใดที่เหมาะกับเชื้อจุลินทรีย์นั้น ๆ ได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ให้การสนับสนุนเงินทุนเพื่อการศึกษานี้

เอกสารอ้างอิง

กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย. 2532. การคัดเลือกแบคทีเรียจากดินเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปสและศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิต. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วสี สุขวงศ์, สุกิจ โพธิ์พิทักษ์กุล, ประเสริฐ อังกูรวัฒนะ, และอรไท สุขเจริญ. 2537. การผลิตและคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากเชื้อ *Pseudomonas sp. J7.* **ทีดีโอ ควอเตอร์ลี่.** 3(3) : 14-19.

Bitton, G. 1994. **Wastewater Microbiology.** New York: John Wiley & Sons.

Macrae, A. R. 1983. Extracellular microbial lipase. *In* **Microbial Enzymes and Biotechnology.** Fogarty, W. M., ed. England: Applied Science Publishers.

Pakula, P. and Freeman, A. 1996. A new continuous bioflim bioreactor for immobilized oil-degrading filamentous fungi. **Biotechol. Boieng.** 49 : 20-25.

Stuer, W.; Jaeger, K.E. and Winkler, U.K. 1986. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa.* **J. Bacteriol.** 168(3) : 1707-1074.

Suzuki, T.; Mushiga, Y.; Yanane, T. and Himizu, S. 1988. Mass production of lipase by fed-batch culture of *Pseudomonas fluorescens.* **Appl. Microbiol. Biotech.** 27: 417-422.

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

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนสายพันธุ์ของแบคทีเรียใช้ในการเปลี่ยนสี bromo-cresol purple (BCP)

เวลาที่ใช้ในการเปลี่ยนสี BCP (ชม.)	จำนวนสายพันธุ์
<6	33
6-8	50
>8	138

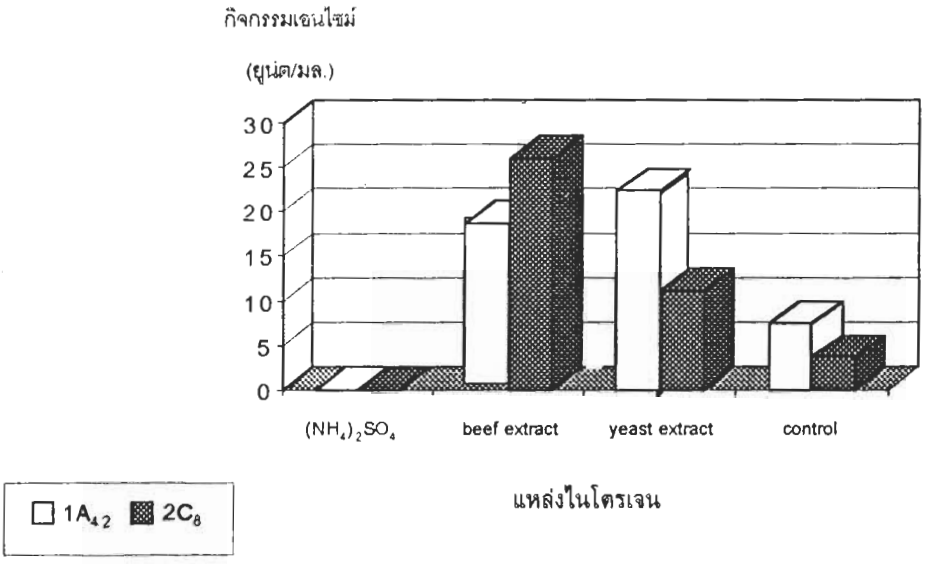
ตารางที่ 2 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสกับเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ $1A_{42}$ ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน

เวลาในการเลี้ยงเชื้อ (ชม.)	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล.)			
	dextrose	glycerol	oleic acid	sucrose
6	0	0	0	8.3
12	0	0	12.5	8.3
24	8.3	20.8	0	20.8

ตารางที่ 3 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสกับเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ $2C_8$ ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน

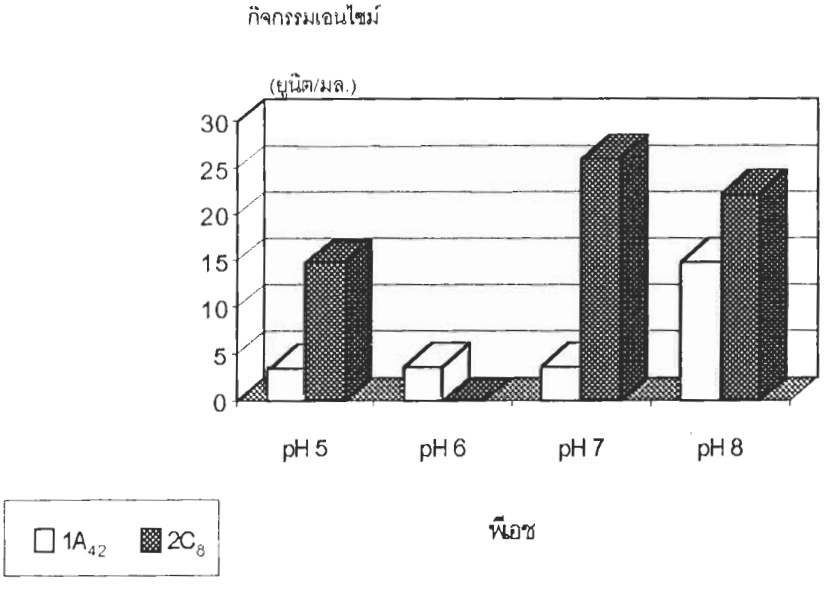
เวลาในการเลี้ยงเชื้อ (ชม.)	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิต/มล.)			
	dextrose	glycerol	oleic acid	sucrose
18	ND	3.7	0	0
24	29.7	3.7	0	0
48	14.9	3.7	0	14.9

หมายเหตุ *ND หมายถึง ไม่ได้ทำ*



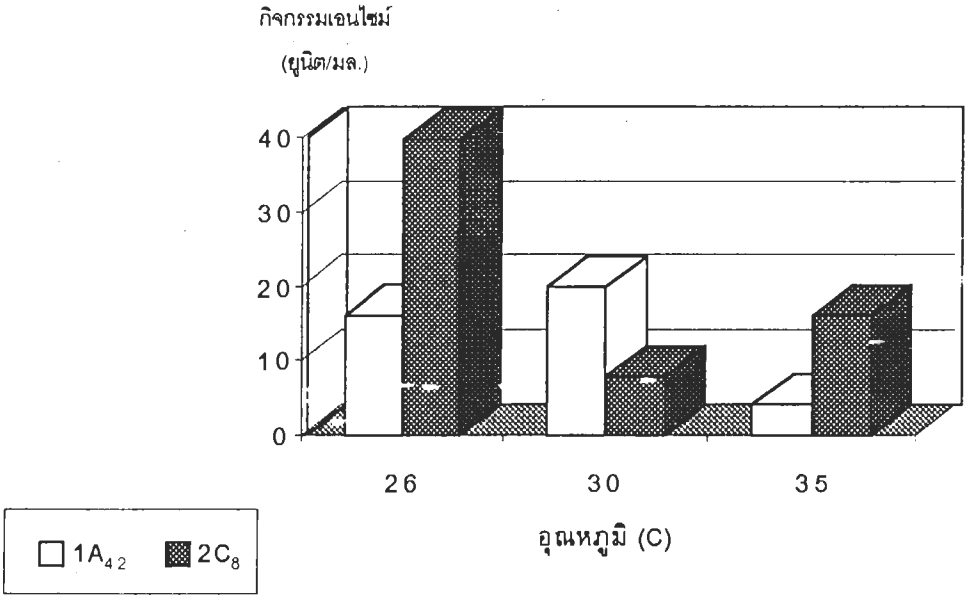
หมายเหตุ *เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ $1A_{42}$ เลี้ยงในอาหารที่มี 2% sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน*
เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ $2C_8$ เลี้ยงในอาหารที่มี 2% dextrose เป็นแหล่งคาร์บอน
Control คือใช้ 0.13% $(NH_4)2SO_4$ กับ 0.01% yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน

รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ของกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ $1A_{42}$ และ $2C_8$ ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ กัน



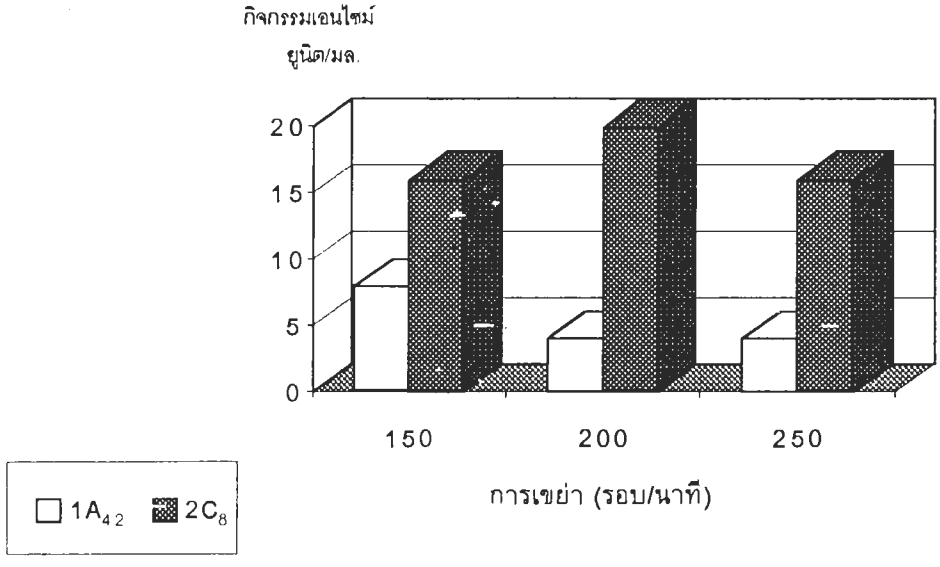
หมายเหตุ *เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ $1A_{42}$ เลี้ยงในอาหารที่มี 2% sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ 0.15% yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน*
เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ $2C_8$ เลี้ยงในอาหารที่มี 2% dextrose เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ 0.15% beef extract เป็นแหล่งไนโตรเจน

รูปที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ของกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ $1A_{42}$ และ $2C_8$ ในอาหารที่มี pH ต่าง ๆ กัน



หมายเหตุ *เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ $1A_{42}$ เลี้ยงในอาหารที่มี 2% sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน, 0.15% yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน, pH 8.0*
เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ $2C_8$ เลี้ยงในอาหารที่มี 2% dextrose เป็นแหล่งคาร์บอน, 0.15% beef extract เป็นแหล่งไนโตรเจน, pH 7.0

รูปที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ของกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ $1A_{42}$ และ $2C_8$ ในอาหารที่มีอุณหภูมิต่าง ๆ กัน



หมายเหตุ *เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ $1A_{42}$ เลี้ยงในอาหารที่มี 2% sucrose เป็นแหล่งคาร์บอน, 0.15% yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน, pH 8.0, อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส*
เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ $2C_8$ เลี้ยงในอาหารที่มี 2% dextrose เป็นแหล่งคาร์บอน, 0.15% beef extract เป็นแหล่งไนโตรเจน, pH 7.0, อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส

รูปที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ของกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ $1A_{42}$ และ $2C_8$ ในอาหารที่ความเร็วรอบต่าง ๆ กัน