

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การคัดกรองหาจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ที่ทนต่อตัวทำลายอินทรีย์” ได้รับการสนับสนุนจาก ศูนย์ประสานงานนักเรียนทุนรัฐบาลทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ประจำปี 2553 คณะผู้วิจัย ขอกราบขอบพระคุณ ศูนย์ประสานงานนักเรียนทุนรัฐบาลทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติเป็นอย่างสูง ณ โอกาสนี้ที่ได้ให้การสนับสนุนโครงการวิจัยนี้

งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความร่วมมือของหลายๆ ฝ่าย ซึ่งผู้วิจัยขอขอบคุณทุกๆ ฝ่ายที่เกี่ยวข้อง ทั้งจากศูนย์ประสานงานนักเรียนทุนรัฐบาลทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติที่ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ รวมถึงภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัยมา ณ ที่นี้ด้วย

อังคณา วิภาตนาวิน

บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้แบคทีเรียที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ถูกแยกจากตัวอย่างดินและน้ำจำนวน 22 ตัวอย่างที่เก็บมาจากจังหวัดลำปาง เชียงใหม่ ชลบุรี สมุทรปราการ ตรัง และนครราชสีมา โดยพบว่าจุลินทรีย์จำนวน 38 ไอโซเลตที่สามารถเจริญได้ในอาหารกึ่งแข็งที่มี 2.5%(v/v) isopropanol จุลินทรีย์ทั้ง 38 ไอโซเลตถูกนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ไลเปส และออกซิเดส ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส ไลเปส และออกซิเดส มีจำนวน 21, 3 และ 22 ไอโซเลต ตามลำดับ จุลินทรีย์ไอโซเลต KY21, SK21 และ SC3 เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีการหลั่งออกมานอกเซลล์ได้ ส่วนจุลินทรีย์ไอโซเลต KY32, WB22 และ J31 เป็นจุลินทรีย์ที่มีการผลิตโปรติเอสในระดับสูงเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ทั้ง 21 ไอโซเลตที่มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่หลั่งออกมานอกเซลล์ ในขณะที่ความสามารถในการผลิตออกซิเดสของจุลินทรีย์ทั้ง 22 ไม่สามารถระบุความแตกต่างได้ ดังนั้นจุลินทรีย์ไอโซเลต เลต KY21, SK21, SC3, KY32, WB22 และ J31 จึงถูกเลือกมาเพื่อศึกษาผลของเวลาต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ ซึ่งจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 และ J31 แสดงความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสได้ดีมาก ทั้งสองไอโซเลตจึงถูกนำมาเลี้ยงในอาหารที่มีการเติม acetone, methanol, isopropanol, toluene และ hexane เพื่อศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ดังกล่าวต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ ผลการศึกษาพบว่าเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 สามารถผลิตได้สูงสุดเมื่อมีการเติม hexane ลงไป ในทางตรงข้ามตัวทำละลายอินทรีย์ทุกชนิดที่ทำการทดสอบไม่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของจุลินทรีย์ไอโซเลต J31 จุลินทรีย์ที่สามารถทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ดังกล่าวถูกระบุสายพันธุ์ว่าเป็น *Bacillus* sp. โดยใช้การวิเคราะห์ 16S ribosomal DNA ไลเปสจาก *Bacillus* sp. SC3 สามารถเร่งปฏิกิริยา hydrolysis ได้เหมาะสมในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เอนไซม์ไลเปสของ *Bacillus* sp. SC3 ยังคงสามารถมีความสามารถในการสลายลิพิดได้สูงสุด ทั้งในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 หรือที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือภาวะที่มี 50%(v/v) hexane สำหรับการศึกษาปฏิกิริยา transesterification ระหว่าง vinyl stearate และ pentanol เอนไซม์หยาบของ *Bacillus* sp. SC3 ให้ผลผลิตของ pentyl stearate ที่สูงที่สุดที่ 24 ชั่วโมง โดยมีผลผลิตสูงกว่า pentyl stearate ที่เกิดจากเซลล์ของ *Bacillus* sp. SC3 เอนไซม์ไลเปสที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์แสดงความสามารถในการเลือกทำ transesterification ปฏิกิริยากับสารตั้งต้นโดยสามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นที่เป็น vinyl ester สายสั้นได้ดี เช่นเดียวกับการเลือกทำปฏิกิริยากับ secondary alcohol เพื่อสามารถนำเอนไซม์ไปประยุกต์กับอุตสาหกรรมหรือมองภาพการนำไปใช้ในอนาคตได้ การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธี alginate, polyacrylamide และ polyvinyl alcohol จึงถูกนำมาใช้ การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธี alginate สามารถเร่งปฏิกิริยา hydrolysis ของ *p*-nitrophenyl palmitate ได้สูงที่สุด นอกจากนี้เอนไซม์ที่ผ่านการตรึงด้วย alginate สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ถึง 5 ครั้งโดยยังคงมีการทำงานที่สูงกว่า 10% ในขณะที่ pentyl stearate ไม่สามารถตรวจพบได้จากโดยการใช้อเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงด้วยวิธี alginate, polyacrylamide และ polyvinyl alcohol จากสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. SC3 แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมซักล้าง การบำบัดของเสียที่มีองค์ประกอบของน้ำมันหรือไขมัน และกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา hydrolysis

คำสำคัญ: ไลเปส, *Bacillus* sp., ตัวทำละลายอินทรีย์

Abstract

In this study, organic solvent-tolerant bacteria were isolated from 22 soils and water samples from Lampang, Chiang Mai, Chonburi, Samutprakan, Trang and Nakhonratchasima. It was found that 38 isolates were able to grow on semisolid medium containing 2.5%(v/v) isopropanol. All 38 isolates were examined for production of protease, lipase and oxidase. The results showed that bacteria produced protease, lipase and oxidase were 21, 3, and 22 isolates, respectively. There were 3 isolates, KY21, SK21 and SC3, produced extracellular lipase. Among 21 extracellular protease producers, the isolate KY32, WB22 and J31 showed high protease activity. Therefore, the isolate KY32, WB22, J31, KY21, SK21 and SC3 were selected to study time course of growth and enzyme production. The isolate SC3 and J31 showed the greatest ability to produce lipase and protease, respectively. Both isolates were then selected and cultivated in medium containing acetone, methanol, isopropanol, toluene and hexane in order to study the effect of organic solvent on growth and enzyme production. The results showed that the highest lipase production of the isolate SC3 was achieved when hexane was supplemented. On the other hands, all tested organic solvents had no effect on protease production of isolate J31. These organic solvent-tolerant bacteria were identified using 16s ribosomal DNA analysis as *Bacillus* sp. The lipase from *Bacillus* sp. SC3 exhibited the optimum hydrolysis reaction in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0 at 30°C. The highest remaining lipolytic activity of lipase from *Bacillus* sp. SC3 was performed in either 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, at 4°C, or 50%(v/v) hexane. For transesterification study between vinyl stearate and pentanol, the crude enzyme of *Bacillus* sp. SC3 gave maximum pentyl stearate production at 24 hours, which higher than pentyl stearate formation of whole *Bacillus* sp. SC3 cells. This organic-solvent tolerant lipase showed a selectivity regarding the structure of the substrates in the transesterification of short chain vinyl ester as well as secondary alcohols. Three immobilization methods, alginate, polyacrylamide and polyvinyl alcohol, were introduced for industrial applications and future perspectives. Among three immobilization methods, the highest *p*-nitrophenyl palmitate hydrolysis activity was observed in alginate. In addition, the recycling results showed that the immobilized of the SC3 lipase with alginate remained active higher than 10% at the fifth cycle. While, the yields of pentyl stearate obtained from alginate, polyacrylamide and polyvinyl alcohol was not able to detect. On the whole, the organic-solvent tolerant lipase from *Bacillus* sp. SC3 showed an interesting ability for detergent industries, treatment of fat-containing waste effluents and hydrolysis processing.

Keywords: lipase, *Bacillus* sp., organic solvent

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ.....	1
บทคัดย่อ	2
Abstract.....	3
สารบัญ.....	4
สารบัญรูป	7
สารบัญตาราง.....	8
บทที่ 1.....	9
บทนำ	9
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	10
บทที่ 2.....	11
การทบทวนวรรณกรรม	11
2.1 เอนไซม์ (Enzyme)	11
2.2 โครงสร้างของเอนไซม์	11
2.3 คุณสมบัติของเอนไซม์.....	11
2.4 การจัดกลุ่มของเอนไซม์.....	11
2.5 การกำหนดชื่อเอนไซม์ตามระบบ.....	13
2.6 การทำงานของเอนไซม์.....	13
2.7 ความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ (Enzyme specificity).....	13
2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์	14
2.9 แหล่งของเอนไซม์ในอุตสาหกรรม.....	17
2.10 ปัจจัยในการเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรม.....	18
2.11 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรม.....	19
2.11.1 อะไมเลส (amylase).....	19
2.11.2 เซลลูเลส (cellulase).....	19
2.11.3 โปรตีเอส (protease).....	20
2.11.4 ลิเปส (lipase).....	20
2.11.5 เอสเทอร์เรส (esterase).....	20
2.11.6 ออกซิเดส (oxidase).....	20
2.12 จุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์.....	21
2.13 การทำงานของเอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์.....	22
2.14 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	23
บทที่ 3	
ขอบเขตของการวิจัยและการออกแบบการวิจัย.....	25
3.1 ขอบเขตของการวิจัย	25
3.2 การออกแบบการวิจัย	25
บทที่ 4	
ระเบียบวิธีวิจัย	26
4.1 สารเคมี.....	26
4.2 อุปกรณ์	27
4.3 วิธีการทดลอง	28

4.3.1 การเก็บตัวอย่างดินหรือน้ำจากบริเวณต่างๆ ที่คาดว่าจะมีจุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์	28
4.3.2 แยกจุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์โดยอาศัยเทคนิค pour plate และ steak plate	28
4.3.3 คัดเลือกหาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่ม protease, oxidase และ lipase ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์	29
4.3.4 การศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลตที่คัดเลือก	29
4.3.5 การจำแนกจุลินทรีย์โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA	29
4.3.6 การติดตามการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ที่สนใจในภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์	32
4.3.7 การศึกษาผลของอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น	33
4.3.8 การศึกษาผลของอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างต่อการความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสที่จุลินทรีย์ผลิต	34
4.3.9 การศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของไลเปส	34
4.3.10 การศึกษาการเร่งปฏิกิริยา transesterification และความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์ไลเปส	35
4.3.11 การตรึงเอนไซม์ไลเปสโดยอาศัยเทคนิค entrapment	35
4.3.12 การศึกษาจำนวนครั้งในการนำกลับมาใช้ใหม่ (Recycling time)	36
5.1 การแยกจุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์โดยเทคนิค pour plate	37
5.2 การคัดเลือกหาจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ protease, oxidase, lipase หรือ esterase ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์	39
5.3 การศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลตที่คัดเลือก	41
5.3.1 การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตไลเปส	41
5.3.2 การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตโปรติเอส	43
5.4 การศึกษาการเจริญและความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือก	45
5.4.1 การศึกษาการเจริญและความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ที่คัดเลือก	45
5.4.2 การศึกษาการเจริญและความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของจุลินทรีย์ที่คัดเลือก	46
5.5 การศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ไอโซเลตที่คัดเลือก	49
5.6 จำแนกจุลินทรีย์ที่คัดเลือกโดยอาศัยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บน ribosomal DNA (rDNA)	52
5.7 การศึกษาปัจจัยหลักที่มีผลต่อการทำงานของไลเปส	52
5.7.1 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส	53
5.7.2 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส	53
5.8 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์	54
5.8.1 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ไลเปส	54
5.8.2 ผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ไลเปส	54
5.8.3 ผลของชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของไลเปสจาก <i>Bacillus</i> sp. ไอโซเลต SC3	55
5.9 การประยุกต์ใช้ <i>Bacillus</i> sp. ไอโซเลต SC3 ในรูปของ whole microorganisms และเอนไซม์อิสระ (free enzyme) ในปฏิกิริยา transesterification	56
5.10 ศึกษาความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์ไลเปสจาก <i>Bacillus</i> sp. ไอโซเลต SC3 ในปฏิกิริยา transesterification	57
5.11 การตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยเทคนิค entrapment	57
5.12 การศึกษาความสามารถของเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงด้วยเทคนิค entrapment ในการนำกลับมาใช้ (recycling cycles)	58
บทที่ 6	59
วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	59
6.1 วิจารณ์ผลการทดลอง	59
6.1.1 การแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์	59
6.1.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์	59
6.1.3 การศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่คัดเลือก	60

6.1.4 การศึกษาการเจริญและความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือก	60
6.1.5 การศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือก.....	61
6.1.6 การจำแนกจุลินทรีย์ที่คัดเลือกโดยอาศัยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บน ribosomal DNA (rDNA).....	62
6.1.7 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของไลเปสจาก <i>Bacillus</i> sp. ไอโซเลต SC3.....	62
6.1.8 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสจาก <i>Bacillus</i> sp. ไอโซเลต SC3	63
6.1.9 การประยุกต์ใช้ <i>Bacillus</i> sp. ไอโซเลต SC3 ในรูปของ whole microorganism และเอนไซม์อิสระในปฏิกิริยา transesterification	63
6.1.10 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์ไลเปสจาก <i>Bacillus</i> sp. ไอโซเลต SC3 ในปฏิกิริยา transesterification	64
6.1.11 การตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก <i>Bacillus</i> sp. ไอโซเลต SC3 โดยใช้เทคนิค entrapment.....	64
6.2 สรุปผลการทดลอง.....	65
บทที่ 7.....	67
เอกสารอ้างอิง.....	67
ภาคผนวก ก.....	70
ภาคผนวก ข.....	71

สารบัญรูป

รูป 1 การเปลี่ยนแปลงพลังงานอิสระระหว่างการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์	13
รูป 2 การจับกันของเอนไซม์และซับสเตรทแบบ lock and key model	14
รูป 3 การจับกันของเอนไซม์และซับสเตรทแบบ Induced fit model	14
รูป 4 ผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์	15
รูป 5 ความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตผลิตภัณฑ์กับเวลา	15
รูป 6 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์.....	16
รูป 7 ผลของความเข้มข้นของซับสเตรทต่อความเร็วของปฏิกิริยาเอนไซม์.....	16
รูป 8 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อการทำงานของเอนไซม์เมื่อมีปริมาณซับสเตรทมากพอ	16
รูป 9 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย	25
รูป 10 ความสัมพันธ์ระหว่าง $\log OD_{660}$ และ lipase activity กับ เวลา (ชั่วโมง) ของจุลินทรีย์ไอโซเลต KY21, SK21 และ SC3	47
รูป 11 ความสัมพันธ์ระหว่าง $\log OD_{660}$ และ protease activity กับ เวลา (ชั่วโมง) ของจุลินทรีย์ไอโซเลต KY32, WB22 และ J31	48
รูป 12 ความสัมพันธ์ระหว่าง $\log OD_{660}$ และ lipase activity กับ เวลา (ชั่วโมง) ของจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่เป็นชุดควบคุม I (NB), ชุดควบคุม II (NB + olive oil), อาหารเหลวที่มีการเติม methanol 5%, อาหารเหลวที่มีการเติม isoprnanol 5% อาหารเหลวที่มีการเติม toluene 5% และอาหารเหลวที่มีการเติม hexane 5%	50
รูป 13 ความสัมพันธ์ระหว่าง $\log OD_{660}$ และ protease activity กับ เวลา (ชั่วโมง) ของจุลินทรีย์ไอโซเลต J31 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่เป็นชุดควบคุม I (NB), ชุดควบคุม II (NB + skim milk) , อาหารเหลวที่มีการเติม acetone 5%, อาหารเหลวที่มีการเติม methanol 5%, อาหารเหลวที่มีการเติม isoprnanol 5% อาหารเหลวที่มีการเติม toluene 5% และอาหารเหลวที่มีการเติม hexane 5%	51
รูป 14 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของไลเปสจาก <i>Bacillus</i> sp. ไอโซเลต SC3	53
รูป 15 ผลของ pH ต่อการทำงานของไลเปสจาก <i>Bacillus</i> sp. ไอโซเลต SC3 โดยสัญลักษณ์ แทน 0.05 M acetate buffer, pH 4-6 ส่วน แทน 0.05 M phosphate buffer, pH 6-7 และ แทน 0.05 M acetate buffer, pH 7-11	53
รูป 16 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของไลเปสที่ได้จาก <i>Bacillus</i> sp. ไอโซเลต SC3	54
รูป 17 ผลของ pH ต่อความเสถียรของไลเปสที่ได้จาก <i>Bacillus</i> sp. ไอโซเลต SC3.....	55
รูป 18 ผลของชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของไลเปสที่ได้จาก <i>Bacillus</i> sp. ไอโซเลต SC3	56
รูป 19 % Remaining activity และจำนวนครั้งในการนำกลับมาใช้ใหม่ (recycling cycles) ของของเอนไซม์ไลเปสที่ผ่านการตรึงด้วย sodium alginate, polyacrylamide และ polyvinyl alcohol	58

สารบัญตาราง

ตาราง 1 การจำแนกประเภทของเอนไซม์ ¹⁶	12
ตาราง 2 เอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมและจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ ¹⁵	18
ตาราง 3 เอนไซม์ชนิดต่างๆและการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม ^{15,18,19}	21
ตาราง 4 ค่า Log P ของตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ ²⁴	23
ตาราง 5 รายละเอียดของแหล่งดินและน้ำแต่ละแหล่ง.....	28
ตาราง 6 ส่วนประกอบของสารละลายผสมในการทำ PCR.....	30
ตาราง 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers ที่ใช้.....	31
ตาราง 8 ผลการคัดกรองจุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์จากแหล่งดินและแหล่งน้ำ 8 แหล่ง เมื่อมีการเติม 1%(v/v) isopropanol ใน standard method agar.....	37
ตาราง 9 แสดงการเจริญของจุลินทรีย์บน standard method agar ที่มี 1, 2.5, 5 และ 10%(v/v) isopropanol	38
ตาราง 10 ผลการทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ไลเปส และออกซิเดส	40
ตาราง 11 ชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตไลเปส	42
ตาราง 12 ชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตโปรติเอส	44
ตาราง 13 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์บน 16s rDNA ของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากแบคทีเรียในฐานข้อมูล...52	
ตาราง 14 Transesterification activity ของเซลล์และ crude enzyme ของ <i>Bacillus</i> sp. ไอโซเลต SC3 ในการทำปฏิกิริยาระหว่าง 1-pentanol และ stearate ที่อุณหภูมิ 37°C	56
ตาราง 15 Transesterification activity ของไลเปสจาก <i>Bacillus</i> sp. ไอโซเลต SC3 เมื่อทำปฏิกิริยากับ vinyl esters และ alcohol แต่ละชนิด	57
ตาราง 16 Specific activity ของเอนไซม์ไลเปสที่ผ่านการตรึงด้วยวิธี sodium alginate, polyacrylamide และ polyvinyl alcohol ในการเร่งปฏิกิริยา hydrolysis และ transesterification	58
ตาราง 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3') บริเวณ 16S rDNA ของจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 และ J31	70

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันความต้องการเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ในภาวะรุนแรง เช่น อุณหภูมิสูง ความเป็นกรด-ด่างสูง ความดันสูง ภาวะที่มีเกลือ โลหะหนัก หรือตัวทำละลายอินทรีย์ มีเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากเอนไซม์ในกลุ่มนี้ที่สามารถทำงานได้ในภาวะที่เอนไซม์ทั่วไปไม่สามารถกระทำได้ ตัวอย่างการนำเอนไซม์ในกลุ่มที่ทนต่อภาวะรุนแรงมาใช้ในอุตสาหกรรม ได้แก่ การนำเอนไซม์ amylase ที่ทนความร้อนจาก *Clostridium thermohydrosulfuricum* มาใช้ในกระบวนการผลิต fructose หรือ glucose syrup¹ การนำ xylanase ที่ทนความร้อนจาก *Thermomyces lanuginosus* มาใช้ในกระบวนการฟอกสีกระดาษ^{1,2} การนำเอนไซม์ protease ที่ทนต่อภาวะที่เป็นด่างจาก *Streptomyces* sp. มาใช้ในการสังเคราะห์สารให้ความหวานที่ให้พลังงานต่ำ สารลดแรงตึงผิว หรือองค์ประกอบในอาหาร ยา รวมไปถึงเครื่องสำอางบางชนิด^{3,4} การนำเอนไซม์ esterase ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์มาประยุกต์ใช้ในการ hydrolysis แบบเลือก enantiomer (enantioselective synthesis) หรือการสังเคราะห์แบบเลือกตำแหน่ง (regioselective synthesis) ของยาบางชนิด⁵ เป็นต้น ซึ่งแหล่งผลิตเอนไซม์ที่ทนต่อภาวะรุนแรงที่สำคัญ คือ จุลินทรีย์ในกลุ่มที่ทนต่อภาวะรุนแรง (extremophile microorganisms) จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้สามารถแบ่งได้เป็น 6 กลุ่มใหญ่ตามสภาพแวดล้อมที่จุลินทรีย์เจริญ คือ กลุ่ม thermophiles (เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 60-80°C), psychrophiles (เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ <15°C), acidophiles (เจริญเติบโตได้ดีที่ pH <2-3), alkaliphiles (เจริญเติบโตได้ดีที่ pH >9) และ halophiles (เจริญเติบโตได้ดีที่มีความสามารถทนเกลือ) และ piezophiles (เจริญเติบโตได้ดีที่ความดันสูง)^{1,6} และยังสามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์ในกลุ่มดังกล่าว เช่น จุลินทรีย์ที่ทนต่อรังสี และจุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ เป็นต้น

นอกจากการนำเอนไซม์จากจุลินทรีย์กลุ่มที่ทนต่อภาวะรุนแรงมาใช้ประโยชน์ในภาคอุตสาหกรรมในการเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตและเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์แล้วนั้น จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์สามารถช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมอีกด้วย⁷ เช่น การนำ *Pseudomonas* sp. มาใช้ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียโดยจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้สามารถใช้ในการดูดซับโลหะหนักได้⁸⁻¹⁰ และการนำ *Flavobacterium* sp. DS-711 มาใช้ในการย่อยสลาย crude oil รวมไปถึงการนำ *Bacillus* sp. DS-1906 มาใช้ในการเปลี่ยนแปลง polyaromatic hydrocarbons ที่ไม่สามารถละลายน้ำได้⁷ ในส่วนของงานวิจัยทางด้านเคมีสะอาด เอนไซม์ที่มีคุณสมบัติทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์สามารถใช้ทดแทนตัวเร่งปฏิกิริยาเคมี (chemical catalyst) หรือใช้ในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารเคมีด้วยวิธีชีวภาพ ซึ่งมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้ตัวเร่งทางเคมีหลายประการ เช่น เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะเจาะจง การนำเอนไซม์มาใช้สามารถลดการใช้เคมีที่อาจเป็นอันตรายหรือเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และสามารถลดขั้นตอนการสังเคราะห์ทางเคมีที่อยู่ยาก^{3,11,12} ตัวอย่างของงานวิจัยด้านเคมีสะอาดที่มีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ เช่น ในการสังเคราะห์ 3'-O-crotonylfloxuridine โดยอาศัยเอนไซม์ lipase จาก *Pseudomonas cepacia* ในการเร่งปฏิกิริยาระหว่าง floxuridine และ vinyl crotonate ซึ่งสามารถลดขั้นตอนการสังเคราะห์ที่อยู่ยากลงได้และเกิดการสังเคราะห์แบบเลือกตำแหน่งได้¹¹, ส่วน decarboxylase จาก *Moraxella* sp. MB1 ซึ่งเป็นเอนไซม์ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ถูกนำมาใช้ในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ citrinin ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษ เป็น decarboxycitrinin ด้วยวิธีทางชีวภาพ¹³ นอกจากนี้ยังมีการนำเอนไซม์มาประยุกต์ใช้ในการผลิตไบโอดีเซล โดยพบว่าเมื่อนำเอนไซม์ lipase ที่มีคุณสมบัติทนต่อ methanol จาก *Photobacterium lipolyticum* มาผลิต fatty acid ester จะให้ปริมาณของผลิตภัณฑ์สูงขึ้นกว่าการนำเอนไซม์ lipase ที่ไม่ทนต่อ methanol มาใช้¹⁴

ถึงแม้ว่าการนำเอนไซม์และจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้มาใช้ในภาคอุตสาหกรรม สิ่งแวดล้อม และงานวิจัยทางด้านเคมีสะอาดจะได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก แต่การนำเอนไซม์และจุลินทรีย์กลุ่มนี้มาประยุกต์ใช้อย่างจริงจังในประเทศไทยยังมีจำนวนไม่มากนัก ดังนั้นเพื่อเป็นการส่งเสริมการนำเอนไซม์และจุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์มาประยุกต์ใช้จริง โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นไปที่การค้นหาเอนไซม์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์และศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของเอนไซม์และความเป็นไปได้ในการนำเอนไซม์ดังกล่าวมาใช้ในงานวิจัยด้านเคมีสะอาด ด้านสิ่งแวดล้อม หรือด้านอุตสาหกรรม

โดยในเบื้องต้นจุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์จะถูกแยกจากตัวอย่างดินและน้ำในบริเวณที่มีภาวะรุนแรง เช่น บ่อน้ำพุร้อน, บริเวณพื้นที่อุตสาหกรรม และชายฝั่งทะเล ก่อนทำการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ออกซิเดส และไลเปส หรือเอสเทอร์เอสที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ แล้วทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพ เพื่อทำการวิเคราะห์สายพันธุ์โดยอาศัยสมบัติทางสัณฐานวิทยาและระดับโมเลกุล สำหรับเอนไซม์ที่แสดงความสามารถทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์จะถูกนำมาศึกษาคุณลักษณะและหาภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว พร้อมทั้งศึกษาความเป็นไปได้ในการนำจุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์หรือเอนไซม์อิสระที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ มาประยุกต์ใช้ทางด้านเคมีสะอาด สิ่งแวดล้อม หรือภาคอุตสาหกรรม

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อคัดกรองหาจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในภาวะรุนแรงและสามารถผลิตเอนไซม์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์
2. เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์
3. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้เอนไซม์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ในงานวิจัยทางด้านเคมีสะอาด สิ่งแวดล้อม หรืออุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้อง

บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

2.1 เอนไซม์ (Enzyme)

เอนไซม์ คือ สารชีวโมเลกุลที่ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยมากจะเป็นสารในกลุ่มโปรตีน ปัจจุบันเอนไซม์มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมหลายชนิด เนื่องจากสามารถเร่งปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะภายใต้ภาวะที่ไม่รุนแรง และมีความปลอดภัยสูง จึงมีการใช้เอนไซม์กันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหารและยา รวมทั้งอุตสาหกรรมการผลิตสารชีวโมเลกุล อุตสาหกรรมผงซักฟอก และอื่นๆ^{15,16}

2.2 โครงสร้างของเอนไซม์

เอนไซม์ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนจึงประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เชื่อมต่อกัน เป็นโครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) แล้วเกิดการม้วนพับ เป็นโครงสร้างที่มีคุณสมบัติเป็น zwitter ionic คือ มีค่าประจุโดยรวมเป็นศูนย์ แต่จะประกอบไปด้วยกลุ่มที่มีประจุลบและประจุบวกที่ปลายแต่ละข้าง ซึ่งบริเวณ active site ของเอนไซม์ จะมีกรดอะมิโนทำหน้าที่จับซับสเตรทและเร่งปฏิกิริยา ส่วนโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ของเอนไซม์จะเกิดขึ้น เมื่อสายพอลิเปปไทด์มีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนในภาพที่เสถียรขึ้น ไม่ว่าจะเป็น α -helix หรือ β -pleated ในขณะที่โครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) เป็นโครงสร้างที่มีสายพอลิเปปไทด์ขดม้วนแน่นในลักษณะกลม โดยคงสภาพอยู่ได้ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ และพันธะอื่นๆ ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน พันธะไฮโดรโฟบิก (hydrophobic bond) และแรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals force) เมื่อหน่วยย่อยของโครงสร้างตติยภูมิเกิดการรวมตัว โดยอาศัยแรงยึดเหนี่ยวเช่นเดียวกับที่เกิดในโครงสร้างทุติยภูมิ และตติยภูมิ จึงก่อให้เกิดโครงสร้างจตุรภูมิ (quaternary structure)^{16,17}

2.3 คุณสมบัติของเอนไซม์

เอนไซม์ส่วนใหญ่มีคุณสมบัติสำคัญ 4 ประการ ดังต่อไปนี้¹⁶

1. เป็นโปรตีนชนิดก้อนกลม (globular protein) ซึ่งอาจจะประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์สายเดียวขดม้วนตัวให้มีภาพร่างจำเพาะกับซับสเตรทที่ทำปฏิกิริยา หรือประกอบด้วยหน่วยย่อย (subunit) หรือโมโนเมอร์ (monomer) หลายๆโมเลกุลอยู่รวมกัน เอนไซม์บางชนิดทำงานได้เอง แต่เอนไซม์บางชนิดต้องอาศัยกับสารประกอบอื่นที่ไม่ใช่โปรตีน เช่นโคเอนไซม์ หรือ โคแฟกเตอร์ในการเร่งปฏิกิริยา
2. ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเคมีในสิ่งมีชีวิต ทั้งภายในและนอกเซลล์
3. มีความจำเพาะ (specificity) ต่อซับสเตรท และมีประสิทธิภาพสูงในการเร่งปฏิกิริยา ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเกิดได้เร็วกว่าภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ถึง $10^7 - 10^{14}$ ขึ้นกับชนิดของเอนไซม์
4. ปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์จะมีกลไกการควบคุม (regulation) อย่างเป็นระบบ เป็นผลให้ปฏิกิริยาเคมีของสิ่งมีชีวิตเกิดขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

2.4 การจัดกลุ่มของเอนไซม์

เอนไซม์ถูกแบ่งเป็นกลุ่มย่อย (International classification) ตามการเร่งปฏิกิริยา 6 กลุ่ม ดังต่อไปนี้^{16,17}

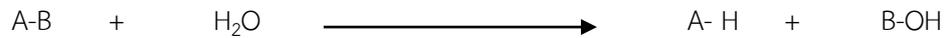
1. Oxidoreductases : เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน/รีดักชันของซับสเตรท โดยเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนที่อยู่ในภาพไฮไดรด์ไอออน (hydride ion) หรือไฮโดรเจนอะตอมจากซับสเตรทหนึ่งไปให้อีกซับสเตรท



2. Transferases : เร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่เคมีต่างๆ เช่น หมู่อะมิโน (NH_2), หมู่เมทิล ($-\text{CH}_3$), หมู่ฟอสเฟต (PO_4^-), หมู่เอซิล ($\text{R}-\text{C}=\text{O}$), หมู่ไกลโคซิล และคาร์บอนหนึ่งอะตอมซับสเตรทหนึ่งไปให้ซับสเตรทอีกตัว



3. Hydrolases : ช่วยเร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะ C-O, C-N, O-P และ C-S โดยการสลายด้วยน้ำ



4. Lyases : ช่วยเร่งปฏิกิริยาการเติมหรือดึงโมเลกุลคาร์บอนไดออกไซด์ แอมโมเนีย หรือน้ำ ออกจากโมเลกุลของสับสเตรท ซึ่งอาจทำให้เกิดการสลาย หรือสร้างพันธะคู่



5. Isomerases : เร่งปฏิกิริยาไอโซเมอไรเซชัน (การจัดเรียงตัวใหม่ของอะตอม) ของสับสเตรท



6. Ligases : เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์สารใหม่จากสับสเตรท 2 โมเลกุลมาต่อกันโดยใช้สารพลังงานสูงในรูป ATP ด้วย



ตาราง 1 แสดงประเภทและแบบการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ เมื่อทำการจำแนกโดยลักษณะหรือภาพแบบของการเร่งปฏิกิริยาตามข้อตกลงของคณะกรรมการเอนไซม์ของสหภาพชีวเคมีนานาชาติ (International Union of Biochemistry)

ตาราง 1 การจำแนกประเภทของเอนไซม์¹⁶

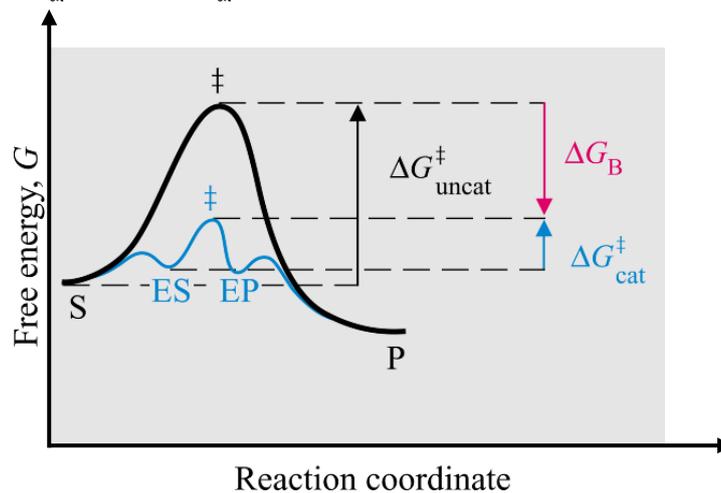
ประเภทหลัก	ประเภทรอง	แบบของการเร่งปฏิกิริยา
Oxidoreductases	Oxidases	เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสับสเตรท
	Reductases	เร่งปฏิกิริยารีดักชันของสับสเตรท
	Dehydrogenases	การเกิดพันธะคู่ (ออกซิเดชัน) โดยการกำจัด H ₂ จากสับสเตรท
Transfereases	Transaminases	ย้ายหมู่อะมิโนระหว่างสับสเตรท
	Kinases	ย้ายหมู่ฟอสเฟตระหว่างสับสเตรท
Hydrolases	Lipases	เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของหมู่เอสเทอร์ในลิพิด
		เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของหมู่เอไมด์ในโปรตีน
		เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของหมู่ฟอสเฟตในกรดนิวคลีอิก
Lyases	Dehydrases	การสูญเสียน้ำออกจากสับสเตรท
	Decarboxylases	การสูญเสียคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากสับสเตรท
Isomerases	Epimerases	ปฏิกิริยาไอโซเมอไรเซชันของ chiral center ในสับสเตรท
Ligases	Synthetases	การสร้างพันธะใหม่ระหว่างสับสเตรทสองตัว ที่มี ATP เข้ามาเกี่ยวข้อง
	Carboxylases	การสร้างพันธะใหม่ระหว่างสับสเตรท และคาร์บอนไดออกไซด์ ที่มี ATP เข้ามาเกี่ยวข้อง

2.5 การกำหนดชื่อเอนไซม์ตามระบบ

การเรียกชื่อเอนไซม์แบบทั่วไป (common name) ส่วนมากจะอาศัยชนิดของปฏิกิริยาหรือสารตั้งต้นในการเรียกชื่อ จากนั้นเติมคำว่า -ase ท้ายปฏิกิริยาหรือสารตั้งต้น ตัวอย่างเช่น synthase และ lipase เป็นต้น คณะกรรมการจากหน่วยงาน International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) ได้จัดจำแนกชนิดและหมวดหมู่ โดยตกลงใช้ระบบ EC (Enzyme Commission) ในการเรียกชื่อเอนไซม์เป็นระบบตัวเลข 4 ตัว เลขตัวแรกหมายถึง class name ส่วนตัวเลขถัดมา จะหมายถึง subclass และ functional groups ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยานั้นๆ ตัวอย่างเช่น EC 1.1.1.27 หมายถึงเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน/รีดักชันเปลี่ยน lactate เป็น pyruvate หรือปฏิกิริยาย้อนกลับโดยอาศัยโคเอนไซม์ NAD^+ เข้าร่วมปฏิกิริยา มีชื่อทางการว่า L-lactate:NAD oxidoreductase หรือมีชื่อทั่วไปว่า lactate dehydrogenase¹⁶

2.6 การทำงานของเอนไซม์

การทำงานของเอนไซม์อาศัยหลักการเดียวกับตัวเร่งปฏิกิริยาทางเคมี เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้โดยที่ตัวเอนไซม์ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง เอนไซม์จะเข้าร่วมปฏิกิริยาโดยเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นสารประกอบเชิงซ้อน enzyme-substrate complex (ES complex) ซึ่งเป็นภาวะ transition state จากนั้นจะเปลี่ยนเป็น EP complex ก่อนที่จะเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อย่างรวดเร็ว (รูป 1) นอกจากนี้เอนไซม์สามารถช่วยสร้างหรือทำลายพันธะโควาเลนต์ หรือเพิ่มความใกล้ชิดกันของสารที่ทำปฏิกิริยา เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดได้ง่ายขึ้น¹⁶



รูป 1 การเปลี่ยนแปลงพลังงานอิสระระหว่างการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

ที่มา : http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc462/462a/NOTES/ENZYMES/Fig8_6BindingEnergyCatalys.GIF (สืบค้น 20/2/2555)

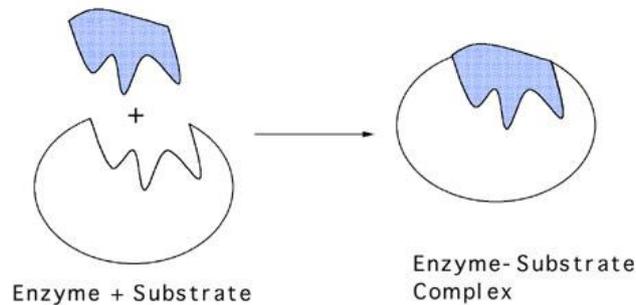
จากรูป 1 การเกิด ES complex จะได้พลังงาน (ΔG_B ; binding energy) ซึ่งสามารถลดพลังงานกระตุ้น (activation energy $\Delta G_{\text{uncat}}^{\ddagger}$) ของปฏิกิริยาที่ภาวะ transition state ทำให้ ES complex เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ได้ง่ายและรวดเร็วขึ้น binding energy นอกจากจะช่วยเร่งปฏิกิริยาให้เกิดเร็วขึ้นแล้ว ยังสัมพันธ์กับการเกิดความจำเพาะ (specificity) ระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรท เนื่องจากการจับกันอย่างเหมาะสม จึงจะทำให้เกิด binding energy สูงมากพอที่จะเร่งปฏิกิริยาได้

2.7 ความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ (Enzyme specificity)

ความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ คือ การที่สับสเตรทสามารถจับเข้าได้อย่างพอเหมาะที่บริเวณ active site ของเอนไซม์ ซึ่งสามารถอธิบายความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ได้จากสมมติฐาน ดังต่อไปนี้¹⁶

1. Lock and key hypothesis (สมมติฐานแบบลูกกุญแจและแม่กุญแจ): เอนไซม์จะมีภาพร่างเฉพาะสามารถจับได้พอดีกับสับสเตรทที่มีภาพร่างเฉพาะเจาะจงได้เท่านั้น โดยเปรียบเอนไซม์เป็นแม่กุญแจ และ

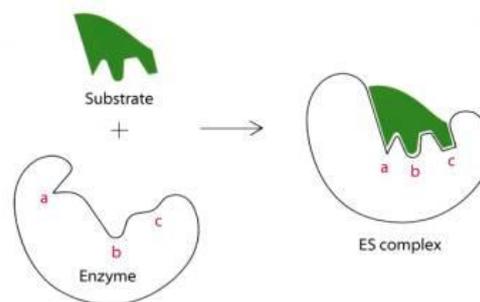
สับสเตรท คือ ลูกกุญแจ ซึ่งมีเอนไซม์บางชนิดที่มีความจำเพาะดังสมมุติฐานนี้ โดยจะทำงานได้จำเพาะกับสับสเตรทเพียงชนิดเดียว (ดังรูป 2) แต่เนื่องจาก ES complex มีความเสถียรสูง ทำให้เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ได้ค่อนข้างยากขึ้น



รูป 2 การจับกันของเอนไซม์และสับสเตรทแบบ lock and key model

ที่มา: <http://www.chemistry.wustl.edu/~edudev/LabTutorials/Carboxypeptidase/images/lockkey.jpg> (สืบค้น 22/2/2555)

2. Induced fit hypothesis: เอนไซม์สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงภาพร่างและขนาดของ active site ให้พอดีกับสับสเตรท โดยเอนไซม์และสับสเตรทที่อยู่ใกล้กันจะเกิดปฏิสัมพันธ์เหนี่ยวนำให้สามารถจับกันได้ หมู่ฟังก์ชันต่างๆของเอนไซม์ที่บริเวณ active site จะมีการเรียงตัวอยู่ในตำแหน่งและทิศทางที่เหมาะสม เป็นผลให้เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดียิ่งขึ้น (ดังรูป 3)



รูป 3 การจับกันของเอนไซม์และสับสเตรทแบบ Induced fit model

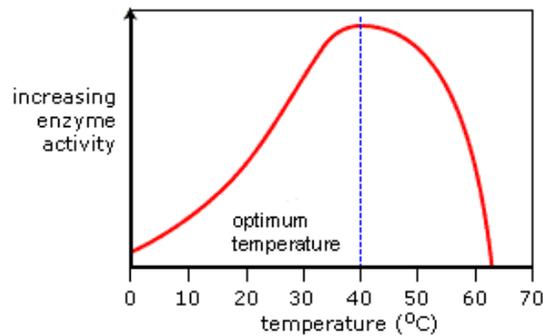
ที่มา : <http://intranet.canacad.ac.jp:3445/Biology/BHL1/admin/image.html?imageid=184078> (สืบค้น 22/2/2555)

2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

ประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์จะดีที่สุดภายใต้ภาวะที่เหมาะสม โดยปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่ อุณหภูมิ เวลา pH ความเข้มข้นของสับสเตรท ความเข้มข้นของเอนไซม์ และตัวยับยั้ง^{16,17}

1. อุณหภูมิ

เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับปฏิกิริยาเคมีทั่วไป ในกรณีที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้นจนถึงจุดๆ หนึ่งซึ่งเรียกว่า transition temperature หรือ optimal temperature เอนไซม์จะทำงานได้ดีที่สุด แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกินไป อาจทำให้เอนไซม์เสียคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยา (รูป 4) เนื่องจากเอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ (denature)

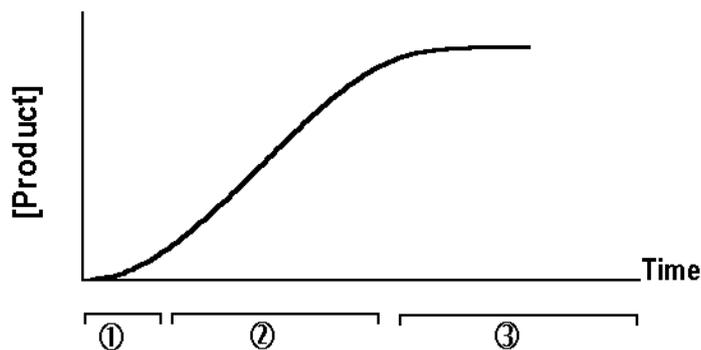


รูป 4 ผลของอุณหภูมิต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์

ที่มา : http://www.bbc.co.uk/schools/gcsebiteize/science/images/gcsechem_18part2.gif (สืบค้น 23/2/2555)

2. เวลา

ในกรณีที่สับสเตรททำปฏิกิริยากับเอนไซม์ที่เวลาต่างๆกัน จะพบว่าในระยะแรกปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เกิดจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับเวลา และเมื่อปฏิกิริยาดำเนินต่อไปการเกิดผลิตภัณฑ์จะเริ่มคงที่และไม่แปรผันตรงกับเวลา การที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจากการมีสับสเตรทอย่างจำกัด อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จึงคงที่ หรือผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาเข้ายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (รูป 5)

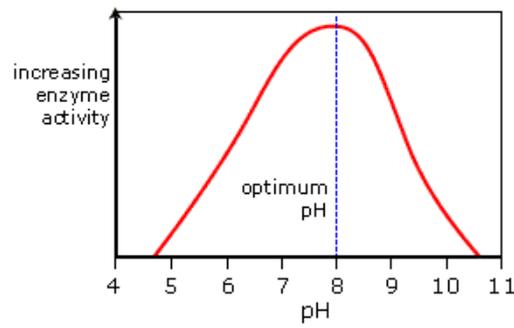


รูป 5 ความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตภัณฑ์กับเวลา

ที่มา : <http://graphpad.com/curvefit/1952b0e0.gif> (สืบค้น 23/2/2555)

3. ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

เอนไซม์แต่ละชนิดจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ทำงานได้ดีที่สุดแตกต่างกันไป ค่าความเป็นกรด-ด่างหรือ pH ที่เหมาะสมนี้ เรียกว่า optimal pH (รูป 6) ถ้าเอนไซม์อยู่ในปฏิกิริยาที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างไม่เหมาะสมความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาจะลดลง เนื่องจากความเป็นกรด-ด่างส่งผลต่อประจุของเอนไซม์และสับสเตรท โดยเฉพาะบริเวณ active site ของเอนไซม์ทำให้ความสามารถในการจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทเปลี่ยนแปลงไป ความเร็วในการเร่งปฏิกิริยาจึงเปลี่ยนไปเช่นกัน โดยทั่วไป optimal pH ของการทำงานของเอนไซม์ส่วนใหญ่จะมีค่าประมาณ 5-9 แต่อาจจะมีค่าต่ำหรือสูงมากสำหรับเอนไซม์บางชนิด เช่น pepsin มี optimal pH เท่ากับ 2 และ alkaline phosphatase มี optimal pH เท่ากับ 10 เป็นต้น

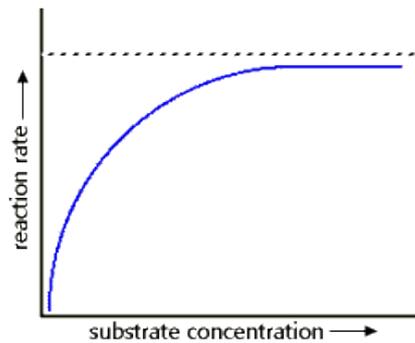


รูป 6 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์

ที่มา : http://www.bbc.co.uk/schools/gcsebiteize/science/images/gcsechem_18part1.gif (สืบค้น 23/2/2555)

4. ความเข้มข้นของสับสเตรท

เมื่อกำหนดให้ปริมาณของเอนไซม์คงที่ จากนั้นเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทขึ้นเรื่อยๆ การเปลี่ยนแปลงของอัตราเร็วเริ่มต้นกับความเข้มข้นของสับสเตรท จะมีลักษณะเป็น hyperbola (รูป 7) จะเห็นว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรท จะทำให้อัตราเร็วเริ่มต้นเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะในช่วงที่ความเข้มข้นของสับสเตรทมีค่าต่ำ จนเมื่อความเข้มข้นของสับสเตรทสูงขึ้น อัตราเร็วจะเริ่มคงที่

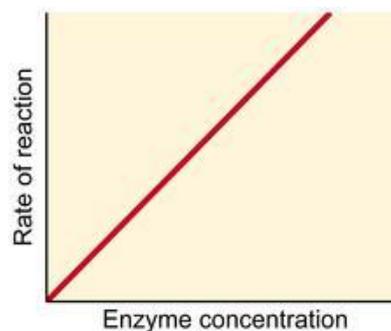


รูป 7 ผลของความเข้มข้นของสับสเตรทต่อความเร็วของปฏิกิริยาเอนไซม์

ที่มา : <http://biology12qe.wikispaces.com> (สืบค้น 24/2/2554)

5. ความเข้มข้นของเอนไซม์

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้น (รูป 8) อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของเอนไซม์ ทั้งนี้ ปริมาณของสับสเตรทต้องมีมากเกินพอ



รูป 8 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อการทำงานของเอนไซม์เมื่อมีปริมาณสับสเตรทมากพอ

ที่มา : <http://biology12qe.wikispaces.com> (สืบค้น 24/02/2554)

6. ตัวยับยั้ง

ตัวยับยั้ง (Inhibitor) คือ สารที่ส่งผลต่อปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง โดยทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาลดลง สารดังกล่าวสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 2 ลักษณะ ดังต่อไปนี้

6.1 การยับยั้งแบบถาวร (irreversible inhibition) ตัวยับยั้งดังกล่าวจับกับเอนไซม์ด้วยพันธะที่แข็งแรง เช่น พันธะโควาเลนต์ เกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่คงตัว ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาต่อไปได้ โดยไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพที่เร่งปฏิกิริยาได้อีกด้วย ตัวอย่างเช่น การยับยั้งเอนไซม์ไซโคลออกซีจีเนส (cyclooxygenase) โดยแอสไพริน (aspirin) หรือ อะซิติลซาลิไซเลต (acetyl salicylate)

6.2 การยับยั้งแบบคืนกลับได้ (reversible inhibition) การยับยั้งแบบนี้ ตัวยับยั้งจะจับกับเอนไซม์ ทั้งนี้เมื่อมีการนำตัวยับยั้งดังกล่าวออกจากปฏิกิริยา เอนไซม์จะทำงานได้ตามเดิม การยับยั้งในลักษณะนี้ สามารถแบ่งชนิดของตัวยับยั้งได้เป็น 3 ชนิด คือ ตัวยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibitor) ตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibitor) และตัวยับยั้งแบบไม่สามารถแข่งขันได้ (uncompetitive inhibitor)

- ตัวยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibitor) โดยมากมีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสับสเตรท จึงสามารถจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ได้เช่นเดียวกับสับสเตรท ดังนั้นสับสเตรทและตัวยับยั้งชนิดนี้จึงเป็นเสมือนคู่แข่งแย่งกันเข้าจับกับเอนไซม์ แต่การเข้าจับกันของตัวยับยั้งไม่สามารถทำให้ปฏิกิริยาดำเนินต่อไปได้ดังเช่นสับสเตรท หรืออาจทำปฏิกิริยาดำเนินต่อไปได้ช้าๆ ตัวยับยั้งแบบแข่งขันบางครั้งอาจเข้าจับกับเอนไซม์ที่บริเวณอื่นนอกจากบริเวณที่สับสเตรทจับ แล้วทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนแปลง จนไม่สามารถจับกับสับสเตรทได้อีก ในกรณีที่สับสเตรทมีปริมาณมากๆ การยับยั้งจะน้อยลง เนื่องจากตัวยับยั้งสามารถแย่งจับกับเอนไซม์ได้ลดลง
- ตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibitor) จะเข้าจับกับเอนไซม์บริเวณอื่นที่ไม่ใช่บริเวณเร่ง ในการเข้าจับกับเอนไซม์นั้น ตัวยับยั้งดังกล่าวสามารถจับกับเอนไซม์อิสระหรือเอนไซม์ที่อยู่ในสภาพของสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์-สับสเตรท (ES) ก็ได้ เมื่อเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์-สับสเตรท-ตัวยับยั้ง (ESI) แล้วปฏิกิริยาไม่สามารถเกิดขึ้นได้ การเพิ่มปริมาณเอนไซม์ จึงไม่สามารถลดการยับยั้งดังกล่าวได้
- ตัวยับยั้งแบบไม่สามารถแข่งขันได้ (uncompetitive inhibitor) ตัวยับยั้งแบบนี้จะเข้าจับกับสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์-สับสเตรท (ES) เท่านั้น เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนเอนไซม์-สับสเตรท-ตัวยับยั้ง (ESI) ซึ่งไม่สามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นผลิตภัณฑ์ได้ การเพิ่มปริมาณสับสเตรทมากๆ จึงไม่สามารถลดผลของการยับยั้งนี้ได้เช่นกัน

2.9 แหล่งของเอนไซม์ในอุตสาหกรรม

สิ่งมีชีวิต ทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ สามารถผลิตเอนไซม์ได้ แต่แหล่งที่ผลิตเอนไซม์ที่สำคัญในอุตสาหกรรมคือ จุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ในปริมาณสูง โดยใช้ระยะเวลาสั้น ต้นทุนการผลิตต่ำกว่าการผลิตเอนไซม์จากพืชและสัตว์ เนื่องจากจุลินทรีย์เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และมีขนาดเล็ก จึงใช้พื้นที่น้อย สามารถใช้อาหารเลี้ยงที่เป็นผลผลิตจากการเกษตรได้ และผลิตได้ตลอดเวลาไม่ขึ้นกับฤดูกาล การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ต้องการจากจุลินทรีย์ทำได้ง่าย และใช้เวลาไม่นาน เอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ มีความหลากหลายค่อนข้างสูง จึงสามารถเลือกใช้เอนไซม์ที่ภาวะต่างๆ ได้ตามต้องการ และการปรับปรุงพันธุกรรม หรือการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม เพื่อเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์ สามารถทำได้ง่ายกว่าสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ^{15,18}

จุลินทรีย์ที่สำคัญและนิยมใช้ในการผลิตเอนไซม์ชนิดต่างๆ (ตาราง 2) ได้แก่ จุลินทรีย์ในจีนัส *Bacillus* และ *Aspergillus* โดยเฉพาะ *B. amyloliquefaciens*, *A. oryzae* และ *A. niger* ซึ่งมีความสำคัญในการผลิตเอนไซม์ภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) และได้รับการยอมรับว่าเป็นจุลินทรีย์ที่ปลอดภัย (GRAS, Generally recognized as safe)¹⁵

ตาราง 2 เอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมและจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์¹⁵

เอนไซม์	จุลินทรีย์ที่สำคัญ	การผลิตรายปี (ตันของโปรตีนเอนไซม์)	เปอร์เซ็นต์ของยอดขายใน ระดับโลก
Bacillus protease	<i>Bacillus</i> sp.	500	40
Fungal protease	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Mucor</i> sp.	20	8
Bacterial α -amylase	<i>Bacillus</i> sp.	300	12
Fungal α -amylase	<i>Aspergillus</i> sp.	10	3
Glucoamylase	<i>Aspergillus</i> sp.	300	14
Pullulanase	<i>Bacillus</i> sp.	nk	<1
Bacillus protease	<i>Bacillus</i> sp.	500	40
Fungal protease	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Mucor</i> sp.	20	8
Glucose isomerase	<i>Streptomyces</i> sp. <i>Actinoplanes</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.	50	12
Pectinase	<i>Aspergillus</i> sp.	10	10
Cellulase	<i>Trichoderma reesei</i>	nk	<1
Lactase	<i>Aspergillus</i> sp.	nk	<1
Invertase	<i>Saccharomyces fragilis</i> <i>Saccharomyces</i> sp.	nk	<1
Glucose oxidase	<i>Penicillium</i> sp.	nk	<1
Catalase	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Micrococcus</i> <i>lysodeikticus</i>	nk	<1
Lipase	<i>Aspergillus</i> sp. <i>Rhizopus</i> sp. <i>Mucor</i> sp.	nk	1

หมายเหตุ : nk = ไม่ทราบจำนวนที่แน่นอน

2.10 ปัจจัยในการเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรม

1. สายพันธุ์จุลินทรีย์ ควรเป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตเอนไซม์ปริมาณสูงๆ ในระยะเวลาอันสั้น สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ราคาถูก ไม่สร้างสารพิษ ไม่สร้างผลผลิตอื่นๆ เช่น รงควัตถุ สารเมือก หรือเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งสามารถย่อยสลายเอนไซม์ที่ต้องการซึ่งเป็นโปรตีนได้ อาจทำให้เกิดปัญหาในการแยกเอนไซม์และการทำให้บริสุทธิ์¹⁵

2. กระบวนการหมัก ภาวะที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ อุณหภูมิ pH ชนิดและปริมาณสารอาหารต่างๆ (แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ แร่ธาตุชนิดต่างๆ และวิตามิน) ควรเหมาะสมกับการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์¹⁵

3. ระยะการเจริญของจุลินทรีย์ที่ให้ผลผลิตเอนไซม์สูงสุด ข้อมูลดังกล่าวมีความสำคัญ เนื่องจากการเก็บเกี่ยวเอนไซม์ในช่วงที่มีการทำงานสูงสุด จะทำให้ได้ปริมาณผลผลิตของเอนไซม์สูงสุด¹⁵

4. ข้อมูลในการควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์ระดับยีน หากทราบกลไกในการผลิตเอนไซม์สามารถกระทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ได้อีกด้วย¹⁵

2.11 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรม

เนื่องจากเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพสูงทางานได้ดีในภาวะที่ไม่รุนแรง มีความจำเพาะสูงในการเร่งปฏิกิริยา สลายตัวในธรรมชาติ ไม่ก่อให้เกิดภาวะแวดล้อมเป็นพิษ สามารถจะปรับปรุงและเปลี่ยนแปลงให้มีคุณสมบัติที่ต้องการได้ ปัจจุบันจึงได้มีการนำเอนไซม์มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ อย่างแพร่หลาย ซึ่งเอนไซม์ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรม มีดังนี้

2.11.1 อะไมเลส (amylase)

อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายสับสเตรทพวกแป้งหรือไกลโคเจน แบ่งได้ 3 ชนิด ดังนี้^{15,19}

- α -amylase (EC 3.2.1.1, 1,4- α -D-glucanohydrolase, endo-amylase) ป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มไฮโดรเลส ย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกที่ตำแหน่ง α -1,4 ในลักษณะตัดภายในสายพอลิเมอร์อย่างอิสระ ได้ผลผลิตเป็น glucan และ dextrin เอนไซม์นี้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด ได้แก่ อุตสาหกรรมผงซักฟอก อุตสาหกรรมแป้งและขนมอบ อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม และอุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นต้น
- β -amylase (EC. 3.2.1.2, α -1,4-glucan maltohydrolase) ย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกที่ตำแหน่ง α -1,4 ในลักษณะการตัดสายพอลิเมอร์อย่างเป็นระเบียบจากปลายสายด้านที่ไม่มีหมู่รีดิวซ์เข้าสู่ภายในสายไปที่ละหนึ่งหน่วยของมอลโทสหรือที่ละสองหน่วยของกลูโคส และจะหยุดปฏิกิริยาที่ตำแหน่ง α -1,6 ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเป็น glucan, limited dextrin ซึ่งเป็นส่วนเหลือจากการย่อยของเอนไซม์ และ β -maltose ซึ่งเป็นมอลโทสที่มี configuration ต่างไปจากเดิม
- γ -amylase (EC. 3.2.1.3, α -1,4-glucan glucohydrolase, glucoamylase) สามารถย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกที่เป็น α -1,4, α -1,6 และ α -1,3 แต่จะช้ากว่า α -1,4 การตัดสายพอลิเมอร์จะเหมือนกับ β -amylase แต่ตัดปลายสายเข้าไปที่ละหนึ่งหน่วยของกลูโคส ดังนั้นผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นกลูโคสที่มี configuration ต่างไปจากเดิม คือได้ β -configuration หรือ β -glucose และส่วนของ glucan และ limited dextrin

2.11.2 เซลลูเลส (cellulase)

เซลลูเลสทำหน้าที่สลายเซลลูโลสซึ่งพบมากในพืช เซลลูโลสเป็นโพลิเมอร์สายยาวของกลูโคสที่เชื่อมด้วย β -1,4 glycosidic bond เซลลูเลสที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่อยู่ในภาพของเอนไซม์ผสม (cellulase complex) โดยอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ ได้แก่ endoglucanase, cellobiohydrolase และ cellobiase เซลลูเลสมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมผลิตน้ำตาล อุตสาหกรรมกระดาษ โดยย่อยเซลลูโลสที่ตกค้างจากโรงงานเพื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปใช้ในกระบวนการหมัก ในอุตสาหกรรมทอผ้า ช่วยให้เส้นใยผ้าเรียบเนียน^{15,19}

2.11.3 โปรติเอส (protease)

โปรติเอสมีชื่อสามัญที่หลากหลาย ได้แก่ เปปติเดส โปรติเอส โปรติเนส เปปไทด์ไฮโดรเลส และโปรติโอไลติก โปรติเอสเร่งการไฮโดรไลซ์พันธะเปปไทด์ภายในโมเลกุลของโปรตีน และพอลิเปปไทด์ โดยสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ exopeptidases เป็นกลุ่มที่สลายพันธะเปปไทด์ที่ปลาย N-terminal หรือปลาย C-terminal ส่วนอีกกลุ่มเรียกว่า endopeptidases จะสลายพันธะเปปไทด์ภายในสายโพลีเปปไทด์ นอกจากนี้ยังแบ่งประเภทตามโครงสร้าง หรือตามกรดอะมิโนที่บริเวณ active site เช่น serine protease, threonine proteases, cysteine proteases, aspartic proteases, metalloproteases และ glutamic acid proteases หรือ แบ่งเป็น acidic, neutral, and alkaline (basic) proteases โดยแบ่งตาม pH ที่เหมาะสมต่อการทำงาน โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการย่อยอาหารในร่างกาย นอกจากนี้ยังช่วยควบคุมการแข็งตัวของหลอดเลือด ควบคุมการจับเชื้อโรคโดยการย่อยสลายโปรตีนจากภายนอก และใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย เช่น อุตสาหกรรมผลิตชีส เพื่อทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะตัวของชีส อุตสาหกรรมเบียร์ ใช้ในการป้องกันการรวมตัวกันของโปรตีนและแทนนิน ซึ่งจะช่วยกำจัดความขุ่นระหว่างเก็บเบียร์ อุตสาหกรรมฟอกหนัง ใช้ในการช่วยย่อยโปรตีนในหนังสัตว์ อุตสาหกรรมผงซักฟอก ใช้ช่วยกำจัดคราบโปรตีนบนผ้า เป็นต้น^{15,19}

2.11.4 ไลเปส (lipase)

ไลเปส หรือ glycerol esterhydrolase, EC 3.1.1.3 เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) สลายพันธะเอสเทอร์ของไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ได้เป็นกลีเซอไรด์ (glyceride) และกรดไขมัน รวมทั้งสามารถเร่งปฏิกิริยาย้อนกลับในภาวะที่ไม่มีน้ำ (มีตัวทำละลายอินทรีย์) หรือในภาวะมีน้ำน้อย โดยสร้างพันธะเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันและแอลกอฮอล์สายสั้น เกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (transesterification) ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างไขมันหรือน้ำมัน (Triglyceride) กับแอลกอฮอล์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอสเทอร์และกลีเซอรอล ไลเปสจะสามารถทำหน้าที่ได้ดีเมื่ออยู่ในชั้น oil-water interface ไลเปสถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมโอลิโอเคมี อุตสาหกรรมการผลิตยาและเวชสำอาง อุตสาหกรรมการซักล้าง รวมไปถึงการบำบัดน้ำเสีย ตัวอย่างของการนำเอนไซม์ไลเปสไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่ การผลิตไบโอดีเซลโดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน การผลิตมาการีน โดยไลเปสทำหน้าที่สลายไขมันในพืชให้เป็นกรดไขมัน ส่วนการผลิตช็อกโกแลต ไลเปสจะช่วยในการย่อยไขมันในเมล็ดโกโก้ เพื่อให้ได้ Cacao Butter สำหรับในอุตสาหกรรมยา ไลเปสถูกใช้ผสมในยาช่วยย่อย นอกจากนี้ไลเปสยังถูกนำมาใช้ในการเร่ง stereospecific esterification ในการผลิตยาบางชนิด เช่น นาโปรเซน (naproxen) และอิบูโพรเฟน (ibuprofen) และการผลิตสาร moisturizing agents^{18,20}

2.11.5 เอสเทอร์เรส (esterase)

เอสเทอร์เรส หรือ carboxyl ester hydrolase (EC 3.1.1.1) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มของ hydrolase ที่เร่งการสลายพันธะเอสเทอร์ และสามารถเร่งการเกิดสร้างพันธะเอสเทอร์ โดยเอสเทอร์เรสสามารถทำงานได้ในตัวทำละลายอินทรีย์เช่นเดียวกับเอนไซม์ไลเปส ดังนั้นจึงมีการนำเอนไซม์นำเอสเทอร์เรสไปใช้ อุตสาหกรรมกลุ่มเดียวกันกับไลเปส คือ อุตสาหกรรมโอลิโอเคมี การผลิตยาและสารเคมีบางชนิด¹⁸

2.11.6 ออกซิเดส (oxidase)

ออกซิเดส เป็นจัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม oxidoreductase เกี่ยวข้องกับการเร่งปฏิกิริยา oxidation หรือ reduction ที่มีโมเลกุลของออกซิเจนทำหน้าที่เป็นเสมือน electron acceptor ออกซิเจนจะถูก reduced เป็นน้ำ (H₂O) หรือ hydrogen peroxide (H₂O₂) ซึ่งเอนไซม์ในกลุ่มออกซิเดสโดยมาจะถูกนำมาใช้ในการตรวจวัดสาร ตัวอย่างเช่น glucose oxidase ถูกนำมาใช้ในการตรวจวัดน้ำตาลกลูโคส ส่วน cholesterol oxidase ปัจจุบันนิยมนำมาใช้ในการตรวจวัดปริมาณ cholesterol ในกระแสเลือด ส่วน

horseradish peroxidase ถูกนำมาใช้เชื่อมกับ antibody เพื่อใช้ในการตรวจวัดหาสารหรือ antigen ด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) สำหรับ pyranose 2-oxidase มีการนำมาใช้เป็น ส่วนประกอบของสีที่ใช้ในการย้อมผมแทนการใช้ hydrogen peroxidase (H₂O₂)¹⁸

ตาราง 3 เอนไซม์ชนิดต่างๆและการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม^{15,18,19}

เอนไซม์	การใช้ประโยชน์
Amylase	<ul style="list-style-type: none"> - ปรับปรุงรสชาติ สี และคุณภาพขนมปัง (fungal amylase จาก <i>A. niger</i>, <i>A. oryzae</i>) - ผลิตไซรัป - ใช้ผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ โดยเฉพาะเบียร์ (malt amylase, bacterial amylase) - ทำให้น้ำผลไม้ใส - ย่อยแป้งเป็นน้ำตาล เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในอุตสาหกรรมการหมัก
Cellulase	<ul style="list-style-type: none"> - ในผงซักฟอก ใช้ขยายเส้นใยเซลลูโลสของผ้าเพื่อให้เอนไซม์เข้าสู่เนื้อผ้า ทำให้สิ่งสกปรกหลุดจากเนื้อผ้า - ช่วยย่อยสลายเซลลูโลสในระหว่างการทำเมล็ดกาแฟให้แห้ง - ย่อยเซลลูโลสที่ตกค้างจากโรงงานกระดาษเพื่อนำผลิตภัณฑ์ไปใช้ในกระบวนการหมัก
Protease	<ul style="list-style-type: none"> - ทำให้เนื้อนุ่ม (papain, bromelain, ficin) - ลดเวลาการผสม และทำให้โด (dough) อ่อนตัว (fungal protease จาก <i>Aspergillus</i>) - ป้องกัน chill haze ในเบียร์ซึ่งเกิดจากการรวมตัวกันของโปรตีนและแทนนิน ทำให้เบียร์ขุ่น (neutral protease) - ทำเนยแข็ง (rennin และ fungal protease จาก <i>Aspergillus</i>, <i>mucor</i>) - ผสมผงซักฟอก (alkaline protease) - ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง (neutral protease)
Lipase/Esterase	<ul style="list-style-type: none"> - ใช้ในการผลิต Cacao Butter และ เนยแข็ง (ทำให้เกิดกลิ่นรสในระหว่างการเก็บรักษา) - ผสมในอาหารสัตว์ - ผสมในผงซักฟอก - เสริมการย่อยอาหารของมนุษย์ - สลายไขมันตามท่อน้ำ เครื่องมือและอุปกรณ์ - ผลิตกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ - ผลิต moisturizing agents และ emulsifier ในเครื่องสำอาง
Oxidase	<ul style="list-style-type: none"> - ใช้ป้องกันการเปลี่ยนแปลงสีและกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่ม - ใช้ในการวิเคราะห์สารหรือการตรวจวัดสารด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพ - ใช้เป็นสารออกซิไดส์ในผลิตภัณฑ์ย้อมสีผม

2.12 จุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์จัดอยู่ในกลุ่ม extremophilic microorganisms ซึ่งสามารถเจริญได้ในภาวะที่มีความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ที่สูง โดยทั่วไปตัวทำละลายอินทรีย์เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ โดยสามารถทำให้ cell membrane ถูกทำลาย เกิดการสูญเสียโครงสร้างและการทำงานของเซลล์ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าจุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ จะสามารถปรับตัวได้ โดยอาศัยการบีบอัดตัวทำละลายอินทรีย์เข้าออก การเกิด

การซ่อมแซมเยื่อหุ้มเซลล์อย่างรวดเร็ว การเกิดการซึมผ่านของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ต่ำกว่าจุลินทรีย์ทั่วไป การเพิ่มความแข็งแรงของเมมเบรน การลดบริเวณที่เป็น non-polar ของเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น ซึ่งจุลินทรีย์ที่ทนตัวทำละลายอินทรีย์ย่อมสามารถผลิตเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์เช่นเดียวกัน⁷ ปัจจุบันความต้องการจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้มีเพิ่มสูงขึ้นในภาคอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมทางเภสัชกรรม อุตสาหกรรมเคมีภัณฑ์ อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เป็นต้น จุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์โดยมากอยู่ในจีนัส *Pseudomonas* และ *Bacillus*²¹

2.13 การทำงานของเอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์

การเลือกตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามีความสำคัญมากต่อแอกติวิตี และ stereoselectivity ของเอนไซม์ โดยทั่วไปการเลือกตัวทำละลายอินทรีย์ จะอาศัยสัมประสิทธิ์การกระจายตัวเป็นพารามิเตอร์หลัก ซึ่งสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (partition coefficient, P) เป็นค่าที่บอกความสามารถในการละลายของสารในตัวทำละลาย 2 ชนิด ที่ไม่สามารถผสมกันได้ (immiscible) คือน้ำและน้ำมัน โดยจะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ ออกทานอล (n-octanol) แทนชั้นน้ำมันหรือเนื้อเยื่อ (membrane) ต่างๆ และจะเรียกค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวนี้ว่า ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารในชั้นน้ำและชั้นออกทานอล (n-octanol/water partition coefficient, P_{ow})^{7,22-24}

ขั้นตอนการหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารในชั้นน้ำและชั้นออกทานอลทำได้โดยปล่อยให้สารกระจายตัวในตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิด จนถึงภาวะสมดุล จากนั้นหาความเข้มข้นของสารในตัวละลายแต่ละชนิด แล้วจึงนำมาคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว ดังสมการ

$$P = \frac{C_{oct}}{C_{water}}$$

เมื่อ P คือ สัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารในระหว่างชั้นออกทานอลและชั้นน้ำ
 C_{oct} คือ ความเข้มข้นของสารในชั้นออกทานอล
 C_{water} คือ ความเข้มข้นของสารในชั้นน้ำ

โดยปกติค่าสัมประสิทธิ์ที่ได้จะแสดงอยู่ในภาพของลอการิทึม เรียกว่า ค่า Log P เพื่อให้ค่าอยู่ในหลักหน่วยที่นิยมใช้ในการอ้างอิงและเปรียบเทียบความเป็นขั้วของโมเลกุล

$$\text{Log } P = \text{Log } \frac{C_{oct}}{C_{water}}$$

ค่า Log P จะบ่งบอกถึงกระจายตัวเข้าไปอยู่ในชั้นน้ำหรือชั้นน้ำมันของสารเคมี โดยถ้าค่า $\text{Log } P < 1$ แสดงว่า สารดังกล่าวละลายในชั้นน้ำได้ดีกว่าชั้นน้ำมัน แต่ถ้าค่า $\text{Log } P > 1$ แสดงว่าสารดังกล่าวชอบที่จะละลายในชั้นน้ำมันมากกว่า ซึ่งค่า Log P ของตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ แสดงในตาราง 4

ตาราง 4 ค่า Log P ของตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ²⁴

ตัวทำละลายอินทรีย์	Log P
Dimethyl sulfoxide	-1.22
Methanol	-0.80
Ethanol	-0.24
Acetone	-0.23
Acetonitrile	-0.15
Isopropanol	0.05
Butanol	0.80
Isoamyl alcohol	1.10
Benzene	2.00
Chloroform	2.00
Toluene	2.30
Ethyl benzene	3.00
Styrene	3.00
Xylene	3.10
Hexane	3.60
Heptane	4.00
Decane	5.60
Hexadecane	8.80

2.14 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากรายงานการวิจัยที่มีมาก่อนหน้านี้ พบว่าเอนไซม์ที่สามารถทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ได้สูง โดยมากจะพบได้ในกลุ่มของจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในภาวะรุนแรง โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ที่เจริญหรือทนได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ ตัวอย่างเช่น *Pseudomonas aeruginosa*, *Halobacterium* sp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus* และ *Bacillus pumilus* เป็นต้น^{7,14,25-28} ซึ่งเอนไซม์ที่มีสมบัติทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์สามารถนำมาใช้ทดแทนตัวเร่งปฏิกิริยาเคมี (chemical catalyst) หรือใช้ในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารเคมีด้วยวิธีชีวภาพ ซึ่งมีข้อได้เปรียบกว่าการใช้ตัวเร่งทางเคมีหลายประการ เช่น เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้อย่างจำเพาะเจาะจง การนำเอนไซม์มาใช้สามารถลดการใช้เคมีที่อาจเป็นอันตรายหรือเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และสามารถลดขั้นตอนการสังเคราะห์ทางเคมีที่ยุงยาก^{3,11,12} ตัวอย่างของการนำเอนไซม์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์มาใช้ ได้แก่ การผลิตไบโอดีเซล เอนไซม์ไลเปสที่มีคุณสมบัติทนต่อ methanol จาก *P. lipolyticum* จะสามารถผลิต fatty acid ester ในปริมาณที่สูงกว่าการนำเอนไซม์ lipase ที่ไม่ทนต่อ methanol มาใช้¹⁴ ส่วนเอนไซม์ esterase ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์สามารถนำมาใช้เร่งปฏิกิริยา hydrolysis แบบเลือก enantiomer (enantioselective synthesis) หรือการสังเคราะห์แบบเลือกตำแหน่ง (regioselective synthesis) ของยาบางชนิดได้⁵ การใช้เอนไซม์ lipase จาก *Pseudomonas cepacia* ในการเร่งปฏิกิริยาระหว่าง floxuridine และ vinyl crotonate ซึ่งสามารถลดขั้นตอนการสังเคราะห์ 3'-O-crotonylfloxuridine ที่ยุ่งยากลงได้และเกิดการสังเคราะห์แบบเลือกตำแหน่งได้สังเคราะห์ได้¹¹ ส่วนการบำบัดของเสียได้มีการนำ *Pseudomonas* sp. มาใช้ในกระบวนการบำบัดน้ำเสียโดยจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้สามารถใช้ในการดูดซับโลหะหนักได้⁸⁻¹⁰ และการนำ *Flavobacterium* sp. DS-711 มาใช้ในการย่อยสลาย crude

oil รวมถึงการนำ *Bacillus* sp. DS-1906 มาใช้ในการเปลี่ยนแปลง polyaromatic hydrocarbons ที่ไม่สามารถละลายน้ำได้⁷ นอกจากนี้ยังมีการนำ decarboxylase จาก *Moraxella* sp. MB1 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ถูกนำมาใช้ในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ citrinin ซึ่งเป็นสารที่มีความเป็นพิษ เป็น decarboxycitrinin ด้วยวิธีทางชีวภาพ¹³

บทที่ 3

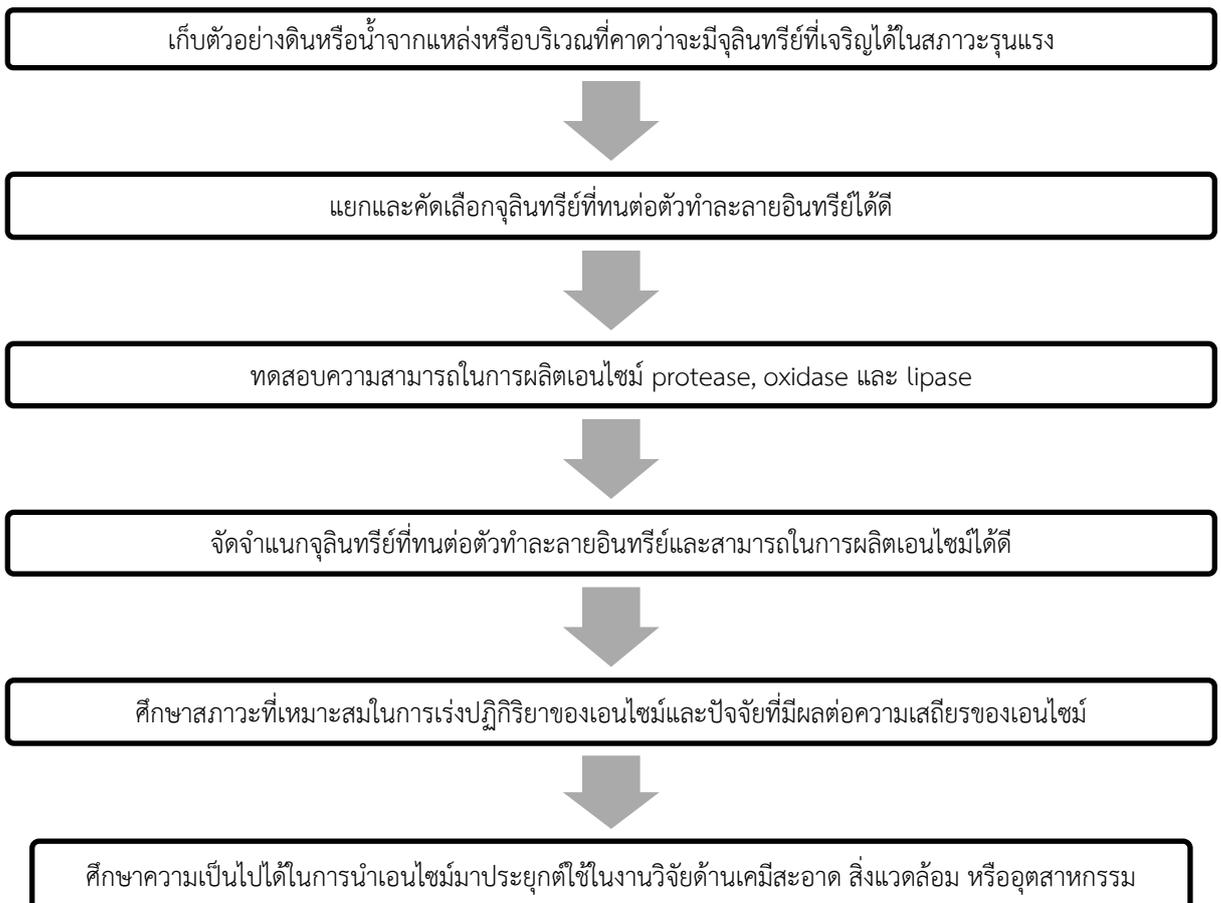
ขอบเขตของการวิจัยและการออกแบบการวิจัย

3.1 ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้เป็นการคัดกรองหาจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในตัวทำละลายอินทรีย์และสามารถผลิตเอนไซม์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในตัวทำละลายอินทรีย์จะถูกแยกจากแหล่งดินหรือน้ำที่จัดอยู่ในภาชนะรุนแรง เช่น บริเวณบ่อน้ำพุร้อน, น้ำเสียจากโรงงาน หรือบริเวณชายฝั่งทะเล โดยอาศัยอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็งกึ่งเหลวที่มีส่วนผสมของตัวทำละลายอินทรีย์ในการคัดกรอง พร้อมทั้งทดสอบการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มของ protease, oxidase และ lipase จากนั้นจึงจำแนกจุลินทรีย์ที่สนใจได้โดยอาศัยการสังเกตลักษณะของจุลินทรีย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการเกิดปฏิกิริยาทางชีวเคมีหรือลำดับนิวคลีโอไทด์บน ribosomal DNA ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ดังกล่าว เช่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง, อุณหภูมิ และปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ เป็นต้น รวมทั้งศึกษาความเป็นไปได้ในการประยุกต์เอนไซม์ดังกล่าวในงานวิจัยทางด้านเคมีสะอาด สิ่งแวดล้อม หรือภาคอุตสาหกรรม ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่พบ

3.2 การออกแบบการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ได้มีการออกแบบขั้นตอนการวิจัย ดังรูปที่ 9



รูป 9 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

บทที่ 4
ระเบียบวิธีวิจัย

4.1 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศผู้ผลิต
1-pentanol (AR)	Riedel de haen	Germany
2-propanol (AR)	QRec	New Zealand
3-pentanol (AR)	Merck	Germany
95% Ethanol (commercial grade)	Analar normapur	Ireland
Acetic acid	Carlo erba	Italy
Acetone	Lab-Scan	Thailand
Acetonitrile (AR)	Lab scan	Poland
Acrylamide	BDH Chemicals Ltd	England
Agar	Bacto	Australia
Alginate sodium salt	Sigma	USA
Ammonium persulfate	Univar	Australia
Boric acid	Sigma	England
Calcium chloride	Carlo erba	Spain
Casein	BDH	France
Chloroform	Lab scan	Poland
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Lab-Scan	Thailand
DNA marker	Fermentas	EU
Folin-Ciocalteu's reagent	Carlo Erba	Spain
Hexane (AR)	Lab scan	Poland
Isoamyl alcohol	BDH Chemical	England
Methanol	Lab-Scan	Thailand
N,N,N',N'-tetramethyl- <i>p</i> -phenylenediamine dihydrochloride	Sigma	USA
N,N'-Methylenebisacrylamide	Fluka	USA
Nucleospin® Extract II	Macherey-Nagel	USA
Nutrient agar	Hardy Diagnostics	USA
Nutrient broth	Hardy Diagnostics	USA
<i>p</i> -nitrophenol	Fluka	USA
<i>p</i> -nitrophenyl palmitate	Sigma	USA
Proteinase K	Macherey-Nagel	Germany
Rhodamine B	Merck	Germany
Sodium acetate	Carlo erba	Italy
Sodium carbonate (anhydrous)	Fisher Scientific	England

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศผู้ผลิต
Sodium chloride	Carlo erba	Spain
Sodium deoxycholate	BDH Chemicals Ltd	England
Sodium hydroxide	AGC	Australia
Standard method agar	Criterion	USA
Tetramethyl ethylene diamine	Acros organics	USA
Toluene	Carlo erba	Italy
Trichloroacetic acid (TCA)	Scharlau	Spain
Tris (hydroxymethyl) aminomethane	Vivantis	Malaysia
Triton x-100	Fluka	USA
Vinyl acetate	Merck	France
Vinyl butyrate	Sigma	USA
Vinyl stearate	Sigma	USA
หางนม (skim milk)	Hi-media	India

4.2 อุปกรณ์

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศผู้ผลิต
Agarose electrophoresis apparatus	Biorad	USA
Autoclave	Wisconsin Aluminium Foundry co.,Ltd.	USA
Balance	A&D	Japan
Centrifuge	International Equipment company	USA
Freeze dryer	Berkert	Germany
Hot air oven	Fisher Scientific	Canada
Hot plate	Torrey pines scientific	USA
Magnetic stirrer	Clifton	England
Microcentrifuge	Kendro Laboratory product	USA
Micropipette	Vipro	India
Micropipette tips	Quality Scientific Plastic	USA
Microwave oven	LG	Thailand
PCR machine	Eppendorf	Germany
PCR tube	Vivatis	France
pH meter	Vitran instrument	USA
Power supply	Biorad	USA
Shaker incubator	N-Biotek	Taiwan
Spectrophotometer	Milton Roy company	USA
UV portable carbinet	Viber Lourmat	France
UV-Visible spectrophotometer	Perkin Elmer	USA
Vernier caliper	Macoh	China
Vortex	Scientific Industries	USA
Water bath	Memmert	Germany

4.3 วิธีการทดลอง

4.3.1 การเก็บตัวอย่างดินหรือน้ำจากบริเวณต่างๆ ที่คาดว่าจะมีจุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำลายอินทรีย์

เก็บตัวอย่างดินหรือน้ำที่บริเวณบ่อน้ำพุร้อน สันกำแพง และรุ่งอรุณ จ. เชียงใหม่ อุทยานแห่งชาติแจ้ซ้อน จ.ลำปาง บริเวณชายฝั่งทะเล จ. ตรัง และ จ. ชลบุรี น้ำเสียจากโรงงานปอสา จ.เชียงใหม่ และโรงงานผลิตเครื่องดื่ม จ.สมุทรปราการ ลงภาชนะที่สะอาดพร้อมทำการบันทึกอุณหภูมิและค่า pH ของตำแหน่งที่ทำการเก็บตัวอย่าง ดังตาราง 5 จากนั้นนำตัวอย่างไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเพื่อรอการแยกเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป

ตาราง 5 รายละเอียดของแหล่งดินและน้ำแต่ละแหล่ง

ลำดับ	แหล่งดินและน้ำ	ตำแหน่ง	อุณหภูมิ	ค่า pH
1	อุทยานแจ้ซ้อน จ.ลำปาง	J1	71-75°C	7.30
		J2	66-72°C	7.62
		J3	46-50°C	8.30
		J4	49°C	7.90
		J5	64-67°C	7.34
		J6	48-50°C	8.00
		J7	47-50°C	8.30
2	น้ำพุร้อนรุ่งอรุณ จ.เชียงใหม่	R1	66°C	9.52
		R3	59°C	8.61
3	น้ำพุร้อนสันกำแพง จ.เชียงใหม่	SK1	57°C	8.58
		SK2	105°C	9.38
		SK3	52°C	9.48
4	อ่างศิลา จ.ชลบุรี	SC	30°	8.49
5	น้ำเสียจากโรงงานปอสา จ.เชียงใหม่	WCH	-	7.43
6	น้ำเสียจากโรงงานผลิตเครื่องดื่ม จ.สมุทรปราการ	WB1	32°C	5.14
		WB2	32°C	5.09
7	อุทยานแห่งชาติหาดเจ้าไหม จ.ตรัง	T1	30°C	8.42
		T2	30°C	8.49
8	เขาใหญ่ จ.นครราชสีมา	KY2	25-28°C	5.47
		KY3	26-30°C	6.94
		KY4	26-30°C	6.94
		KY5	25-28°C	5.47

หมายเหตุ :- ไม่มีข้อมูล

4.3.2 แยกจุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำลายอินทรีย์โดยอาศัยเทคนิค pour plate และ steak plate

ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม หรือปิเปตตัวอย่างน้ำปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาทำการเจือจางลำดับส่วนด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ความเข้มข้น 10^{-1} , 10^{-2} และ 10^{-3} ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยง จากนั้นเทอาหารกึ่งแข็งที่มีส่วนผสมของ

isopropanol ที่ความเข้มข้น 1%(v/v) ลงไปบนจานเพาะเลี้ยงดังกล่าว วนจานเพาะเลี้ยงเพื่อให้มีการกระจายตัวของตัวอย่างสม่ำเสมอในอาหารเพาะเลี้ยง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง โคลนิจของจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ดีจะถูกนำไป re-streak บนจานอาหารเลี้ยงชนิดเดิมจนได้โคลนเดี่ยวของจุลินทรีย์ จากนั้นนำโคลนเดี่ยวของจุลินทรีย์ที่แยกได้มาทำการเลี้ยงในอาหารชนิดเดียวกันที่มี isopropanol ที่ความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10% (v/v) สังเกตและบันทึกผลการทดลองเมื่อทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

4.3.3 คัดเลือกหาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่ม protease, oxidase และ lipase ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์

4.3.3.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

เตรียมอาหารกึ่งแข็งที่มีส่วนผสมของ 1% (w/v) หางนม จากนั้นรฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อและมี isopropanol ความเข้มข้น 1% (v/v) มาเทลงบนจานเพาะเลี้ยง จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อจุดตัวอย่างของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่แยกได้ลงบนจานเพาะเลี้ยงที่เตรียมไว้ ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ภายหลังจากที่จุลินทรีย์เจริญบนจานอาหารกึ่งแข็งที่มีส่วนผสมของ 1% (w/v) skim milk ทำการวัดขนาดของ colony และ clear zone ที่เกิดขึ้นบนจานเพาะเลี้ยงด้วย vernier caliper

4.3.3.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

ทดสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยเตรียมอาหารกึ่งแข็งที่มี 1%(v/v) น้ำมันมะกอก และ 0.001%(w/v) rhodamine B จากนั้นรฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi เวลา 20 นาที นำอาหารที่มีส่วนผสมต่างๆ เทลงบนจานเพาะเลี้ยง ทิ้งไว้จนอาหารเป็นวุ้นแข็ง ใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายแหลมจุดตัวอย่างของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ลงบริเวณกลางจานเพาะเลี้ยง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นำไปตรวจสอบการเรืองแสงภายใต้รังสี UV ที่ 365 nm ทุกๆ 24 ชั่วโมง

4.3.3.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ออกซิเดส

ทดสอบการผลิตเอนไซม์ออกซิเดสโดยทำการเติม 1% (w/v) ของ N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride ปริมาตร 200 μ l ลงบนโคลนิจของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารกึ่งแข็ง จากนั้นสังเกตสีม่วงที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ออกซิเดส ภายในเวลา 30 วินาที

4.3.4 การศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลตที่คัดเลือก

นำจุลินทรีย์ที่สนใจจาก stock culture มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ dimethyl sulfoxide (DMSO), acetone, isopropanol, methanol, isoamyl alcohol, hexane และ toluene ที่มีความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% (v/v) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 160 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่า OD₆₆₀ พร้อมทั้ง streak ลงบนอาหารกึ่งแข็ง ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของจุลินทรีย์และทำการบันทึกผลการเจริญบนอาหารกึ่งแข็งเป็น % การเจริญ

4.3.5 การจำแนกจุลินทรีย์โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA

4.3.5.1 การสกัด chromosome DNA จากแบคทีเรีย

นำโคลนเดี่ยวของจุลินทรีย์ที่สนใจมาเลี้ยงในอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็ว 160 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ

10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำตาลละลายส่วนใสทิ้ง แล้วนำตะกอนเซลล์ที่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วอย่างน้อย 2 ครั้งมาเติม buffer S ปริมาตร 500 ไมโครลิตร, Proteinase K ปริมาตร 5 ไมโครลิตร และ RNase A ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer จากนั้นเติม 10%(w/v) SDS ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 60 นาที โดยนำมา vortex ทุกๆ 15 นาที จากนั้นเติม phenol: chloroform (อัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลาต่อเนื่องนาน 5 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาเติม isopropanol ในอัตราส่วน 0.6 เท่าของปริมาตรส่วนใสก่อนผสมให้เข้ากัน เมื่อสังเกตเห็นตะกอนสีขาวลักษณะคล้ายสำลี (cotton-like genome DNA) ให้ทำการดูดสารละลายทิ้งแล้วเติม 70% Ethanol ที่เย็นจัดเพื่อล้างตะกอน DNA ก่อนที่จะทำ DNA ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลายตัวอย่างที่ได้ด้วยน้ำปราศจากไอออน ก่อนทำการวิเคราะห์คุณภาพของ genomic DNA ใน 1.0% agarose gel electrophoresis ต่อไป

4.3.5.2 การวิเคราะห์คุณภาพของ genomic DNA ด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

เตรียม 1.0% agarose gel electrophoresis โดยละลาย agarose 0.5 กรัม ใน 1xTAE buffer 50 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนกระทั่ง agarose ละลายหมด ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 60°C ก่อนเติม ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ลงไปจากนั้นผสมให้เข้ากัน ก่อนนำไปเทลงในชุด agarose electrophoresis ที่มีหัวเสียบไว้ ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 20 นาที จนกระทั่งเจลแข็งตัวแล้วค่อยๆ ทำการดึงหัวเสียบออก นำเจลที่เตรียมได้ใส่ลงใน gel chamber ก่อนเติม 1xTAE buffer ให้ท่วมเจล เตรียมตัวอย่าง DNA ที่ต้องการวิเคราะห์โดยนำมาผสมกับ 6x loading dye ในอัตราส่วน 5:1 ให้ได้ปริมาตรรวมเท่ากับ 12 ไมโครลิตร จากนั้น pipette DNA ที่ต้องการทดสอบและ DNA marker ลงในช่องใส่สารตัวอย่างต่อหัวอิเล็กโทรดเข้ากับแหล่งจ่ายกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์ 10 V ต่อความยาวเจล 1 cm เมื่อสีของ bromophenol blue ใน loading dye เคลื่อนที่ได้ 2 ใน 3 ส่วนของความยาวเจลจึงทำการปิดแหล่งจ่ายกระแสไฟฟ้า นำแผ่นเจลที่ได้มาทำการตรวจสอบหาแถบ DNA ภายใต้แสง UV

4.3.5.3 การเพิ่มปริมาณของ 16S rDNA โดยเทคนิค PCR

ในการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บน 16S rDNA เพื่อใช้ในการวิเคราะห์สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ การเพิ่มปริมาณของ 16S rDNA ในตำแหน่งคู่เบสที่ 9-1509 จะถูกเพิ่มจำนวนด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ในการ สาระละลายผสมที่ใช้ในการเตรียมผลิตภัณฑ์ PCR ดังแสดงในตารางที่ 6

ตาราง 6 ส่วนประกอบของสารละลายผสมในการทำ PCR

Reagents	Volumes (ไมโครลิตร)
genomic DNA ที่สกัดได้จากแบคทีเรีย	5.0
2.0 μ M primers 20F ¹	5.0
2.0 μ M primers 1500R ²	5.0
2xJump start Red <i>Taq</i> polymerase	15.0
Total volume	30.0

ปิเปตสารละลายทุกชนิดดังตารางที่ 6 ลงในหลอด PCR และผสมสารละลายให้เข้ากันโดยเคาะเบาๆ ที่ก้นหลอด จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 5 วินาที นำไปทำปฏิกิริยา PCR โดยตั้งโปรแกรมของเครื่อง Thermal Cycler ดังนี้

Initial Denaturation	94°C	3 นาที	} 30 Cycles
Denaturation	94°C	1 นาที	
Annealing	48°C	1 นาที	
Elongation	72°C	2 นาที	
Final Extension	72°C	3 นาที	

แล้วจึงทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ต่อไป

4.3.5.4 การสกัด DNA ออกจาก agarose gel

ในการแยกผลิตภัณฑ์ PCR ออกจาก agarose gel ด้วยน้ำยาสำเร็จภาพ NucleoSpin® Extract II นั้น ชิ้นส่วนของ gel ที่ครอบคลุมชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR จะถูกตัดออก แล้วนำมาใส่ในหลอด microcentrifuge พร้อมชั่งน้ำหนักเจล จากนั้นเติม NT buffer ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ต่อน้ำหนักเจล 0.05 กรัม ก่อนนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 5-10 นาทีหรือจนกระทั่งเจลละลายหมด เมื่อเจลละลายหมดแล้วทำการบีบอัดสารละลายลงใน NucleoSpin® Extract II column ที่มี collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ประกอบอยู่ด้านล่าง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ผลิตภัณฑ์ PCR จะติดอยู่ด้านบนของ column เทสารละลายที่อยู่ใน collection tube ทิ้งก่อนเติม NT3 buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงใน NucleoSpin® Extract II column นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที กำจัด NT3 buffer ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 rpm เป็นเวลา 2 นาทีอีกครั้ง นำ NucleoSpin® Extract II column มาใส่ในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ แล้วชะผลิตภัณฑ์ PCR ด้วย NE buffer หรือน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาทีแล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่สกัดได้จากเจลด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ก่อนที่จะนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปเป็น DNA แม่แบบในการหาลำดับของนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Big Dye™ Terminator ต่อไป

4.3.5.5 การเตรียมผลิตภัณฑ์ PCR สำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Big Dye™ Terminator

ในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Big Dye™ Terminator จะต้องทำการเตรียมผลิตภัณฑ์ PCR ให้มีปริมาณ 30 ไมโครกรัม ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และ primers ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์แสดงดังตารางที่ 7 ให้มีความเข้มข้น 2 µM

ตาราง 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ primers ที่ใช้

Primer	ลำดับนิวคลีโอไทด์
20F, 520R	5'-GTA TTA CCG CGG CTG CTG-3'; position 536-519
1500R, 520F	5'-CAG CAG CCG CGG TAA TAC-3'; position 519-536
920F	5'-AAA CTC AAA TGA ATT GAC GG-3'; position 907-926
920R	5'-CCG TCA ATT CAT TTG AGT TT-3'; position 926-907

จากนั้นทำการส่งผลิตภัณฑ์ PCR และ primers ทั้ง 4 สายไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี Big Dye™ Terminator ผ่านบริษัท Biodesign ต่อไป

4.3.5.6 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกรวบรวมเข้าด้วยกันโดยใช้โปรแกรมสำเร็จภาพ BioEdit (Biological sequence alignment editor) แล้วนำมาวิเคราะห์ความคล้ายคลึง (homology) ของลำดับ นิวคลีโอไทด์บน 16S rDNA กับฐานข้อมูลโดยอาศัยโปรแกรมสำเร็จภาพ standard nucleotide BLAST จาก NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลจาก GenBank/EMBL/DDBJ database

4.3.6 การติดตามการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ที่สนใจในภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์

เมื่อสามารถคัดกรองหาจุลินทรีย์ที่สามารถทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์จากข้อ 4.3.4 ได้แล้ว จึงนำจุลินทรีย์ที่สนใจมาเลี้ยงในอาหารที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ พร้อมทั้งติดตามเจริญและการผลิตเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ดังกล่าวผลิต

4.3.6.1 การติดตามการเจริญของจุลินทรีย์ในภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์

นำโคโลนีเดี่ยวของจุลินทรีย์ที่สนใจมาเลี้ยงในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็ว 160 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่าย pre-culture ลงในอาหารเหลวให้ได้ 1% (v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 160 rpm โดยในการศึกษานี้กำหนดให้อาหารเหลวที่ไม่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์เป็นตัวควบคุมผลบวก ส่วนอาหารเหลวที่ไม่มีการเติมน้ำมันมะกอกและตัวทำละลายอินทรีย์เป็นตัวควบคุมผลลบ เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ตะกอน (pellet) ที่ได้นำมาละลายด้วยน้ำ กลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ก่อนวัดค่า OD₆₆₀ โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank สำหรับส่วนใส (supernatant) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปทำการวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ต่อไป

4.3.6.2 การวิเคราะห์การทำงานของไลเปส

เตรียม solution A โดยละลาย *p*-nitrophenyl palmitate 30 มิลลิกรัม ใน 10 มิลลิลิตร ของ 2-propanol และเตรียม solution B โดยละลาย sodium deoxycholate 207 มิลลิกรัม ใน 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.8 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จากนั้นทดสอบการทำงานของไลเปสโดยปิเปต crude enzyme ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และ solution B ปริมาตร 1,850 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง นำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลาอย่างน้อย 2 นาที ก่อนเติม solution A ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เติม triton x-100 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm โดยใช้ solution A ผสม solution B ในอัตราส่วน 1:9 เป็น blank ซึ่งในการวิเคราะห์นี้ หลอดทดลองที่เติม crude enzyme ต้มที่ 100°C 10 นาที และหลอดทดลองที่ไม่มีการเติม solution A ถูกใช้เป็น negative control จากนั้นคำนวณหาปริมาณของ *p*-nitrophenol ที่เกิดขึ้นโดยใช้กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 nm และปริมาณของ *p*-nitrophenol ซึ่งกราฟมาตรฐานนั้น ทำการเตรียมโดยใช้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 nm ของสารละลายมาตรฐาน *p*-nitrophenol ที่ความเข้มข้นในช่วง 0.00-0.05 mmole

4.3.6.3 การวิเคราะห์การทำงานของโปรติเอส

เตรียม 0.65% (w/v) casein โดยชั่ง casein 0.65 กรัม ละลายใน 0.1 M NaOH ปริมาตร 20 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 7.0 โดยใช้ 1 M HCl แล้วเติม 0.05 M potassium phosphate buffer pH 7.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำปราศจากไอออน จากนั้นทำการทดสอบการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสโดยนำ 0.65% (w/v)

casein ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปีเปิด crude enzyme ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปเขย่าด้วยการ vortex ก่อนนำไปอุ่นต่อเป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 0.4 M TCA ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปผสมด้วยการ vortex จากนั้นนำไปเหวี่ยงให้ตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ปีเปิดสารละลายส่วนใส (supernatant) ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มี 0.5 M sodium carbonate ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร เพื่อปรับให้สารละลายเป็นเบส จากนั้นเติมสารละลาย Folin & Ciocalteu's phenol reagent ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าด้วยการ vortex ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้สารละลาย Folin & Ciocalteu's phenol ทำปฏิกิริยากับ L-tyrosine เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงินในภาวะเบส วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm โดยใช้สารละลายในหลอด blank (หลอดที่ใช้น้ำแทนส่วนใสของ crude enzyme ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง ภายหลังหยุดปฏิกิริยาด้วย TCA) ในการปรับศูนย์ ส่วน negative control คือ หลอดที่ไม่มี 0.65% (w/v) casein หรือ หลอดที่ใช้ crude enzyme ที่ต้มที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 10 นาที แทน crude enzyme จากนั้นทำการคำนวณหาแอกติวิตีของเอนไซม์ โดยใช้ L-tyrosine ที่มีปริมาณระหว่าง 0-0.880 μmol เป็นสารมาตรฐานในการทำปฏิกิริยากับ 0.5 M sodium carbonate และ Folin & Ciocalteu's phenol reagent แทนส่วนใสของ crude enzyme ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงภายหลังหยุดปฏิกิริยาด้วย TCA ทั้งนี้ (กำหนดให้: 1 unit ของ protease หมายถึง ปริมาณของ L-tyrosine 1 μmole ที่เกิดจากการ hydrolyzed casein ของ protease ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 37°C

4.3.7 การศึกษาผลของอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปสที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น

4.3.7.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

ปีเปิด crude enzyme ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และ solution B คือ 0.05 M phosphate buffer pH 7.8 ที่มี sodium deoxycholate ปริมาตร 1,850 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง นำไปบ่มอุณหภูมิ 30, 37, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90°C เป็นเวลาอย่างน้อย 2 นาที จากนั้นเติม solution A ที่บ่มที่อุณหภูมิเดียวกัน ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 30, 37, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90°C เป็นเวลา 30 นาที เติม triton X-100 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm จากนั้นทำการคำนวณหาแอกติวิตีของเอนไซม์

4.3.7.2 การศึกษาผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์

ปีเปิด crude enzyme ปริมาตร 400 ไมโครลิตร และ solution B ปริมาตร 1,850 ไมโครลิตร ที่มี sodium deoxycholate ผสมอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ดังต่อไปนี้ 0.05 M sodium acetate buffer pH 4.0, 5.0 และ 6.0, 0.05 M sodium phosphate buffer pH 6.0 และ 7.0 หรือ 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 จากนั้นนำไปบ่มอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.7.1 เป็นเวลาอย่างน้อย 2 นาที ก่อนทำปฏิกิริยา เติม solution A ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ที่ผ่านการอุ่นที่อุณหภูมิเดียวกันกับ solution B ผสมให้เข้ากัน บ่มต่อเป็นเวลา 30 นาที เติม triton X-100 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm แล้วคำนวณหาแอกติวิตีของเอนไซม์

4.3.7.3 การศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการทำงานของเอนไซม์

นำ crude enzyme มาผสมกับตัวทำละลายอินทรีย์ดังต่อไปนี้ acetone, chloroform, dimethylsulfoxide (DMSO), dichloromethane (DCM), ethylacetate, hexane, methanol และ

toluene ให้ได้อัตราส่วนของ crude enzyme ต่อตัวทำละลายอินทรีย์ดังกล่าวเป็น 25, 50 และ 75% จากนั้นเติม crude enzyme ที่ผสมกับตัวทำละลายอินทรีย์ที่เตรียมไว้ให้ได้ปริมาตรของ crude enzyme สุทธิเท่ากับ 125 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่มี solution B คือ สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมจากข้อ 4.3.7.2 ที่มี sodium deoxycholate ก่อนเติม solution A ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4.3.7.1 เป็นเวลา 30 นาที เติม triton X-100 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm จากนั้นทำการคำนวณหาแอกติวิตีของเอนไซม์

4.3.8 การศึกษาผลของอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างต่อการความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสที่จุลินทรีย์ผลิต

4.3.8.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของไลเปส

ในการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของไลเปส เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยนำ crude enzyme มา 250 ไมโครลิตร มาบ่มที่อุณหภูมิ 4, 25, 30, 37, 40, 50, 70 และ 100°C เก็บสารละลายตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 1, 3, 5 และ 7 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบการทำงานของไลเปสตามข้อ 3.7.1 ที่อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบกับความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์หลังบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ กับเอนไซม์ก่อนนำไปบ่ม

4.3.8.2 การศึกษาผลของ pH ต่อความเสถียรของไลเปส

เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยนำสารละลายเอนไซม์ 150 ไมโครลิตร มาผสมกับบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ซึ่งบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดสอบคือ 0.05 M Acetate buffer (pH 4.0, 5.0, 6.0) 0.05 M Phosphate buffer (pH 6.0, 7.0) และ 0.05 M Tris buffer pH (pH 7.0, 8.0, 9.0, 10.0) นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาจากข้อ 4.3.7.1 เป็นเวลา 1, 3, 5 และ 7 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่บ่มกับบัฟเฟอร์ชนิดและเวลาต่างๆ ปริมาตร 300 ไมโครลิตร มาเติมลงในหลอดทดลองที่มี solution B จากนั้นเติม solution A ปริมาตร 250 ไมโครลิตร นำมาทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิที่เหมาะสม ก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยทำการเปรียบเทียบกับ A_{410} กับ blank และหลอดควบคุม (เอนไซม์ก่อนนำไปบ่มกับบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ)

4.3.9 การศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของไลเปส

เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยนำสารละลายเอนไซม์มาผสมกับตัวทำละลายอินทรีย์ในอัตราส่วน 50% ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ คือ acetone, chloroform, DMSO, DCM, ethylacetate, hexane, methanol และ toluene บ่มสารละลายเอนไซม์กับตัวทำละลายอินทรีย์เป็นเวลา 1, 3, 5 และ 7 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่บ่มกับตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิดและเวลาต่างๆ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร มาเติมลงในหลอดทดลองที่มี solution B จากนั้นเติม solution A ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยทำการเปรียบเทียบกับ A_{410} กับ blank และหลอดควบคุม (เอนไซม์ก่อนนำไปบ่มกับตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ)

4.3.10 การศึกษาการเร่งปฏิกิริยา transesterification และความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์ไลเปส

4.3.10.1 การเตรียมเอนไซม์และเซลล์ของ *Bacillus sp. SC3* ในลักษณะแห้งเพื่อใช้ในการทดสอบการเร่งปฏิกิริยา transesterification

นำโคโลนีเดี่ยวของ *Bacillus sp.* ไอโซเลต SC3 มาเลี้ยงในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็ว 160 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่าย pre-culture ลงในอาหารเหลวที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ให้ได้ความเข้มข้น 1% (v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C พร้อมกับเขย่าด้วยความเร็ว 160 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ส่วนใส (supernatant) และตะกอนเซลล์ที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์อย่างน้อย 2 ครั้งถูกนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -30°C ก่อนนำไปทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dryer)

4.3.10.2 การศึกษาการเร่งปฏิกิริยา transesterification

เตรียม vinyl stearate ใน hexane 10 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 mM แล้วเติม pentanol ลงไปให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 2 mM ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมเอนไซม์หรือตะกอนเซลล์ที่ผ่านการทำแห้งน้ำหนัก 0.1 กรัม ลงไป บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 160 rpm นาน 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 และ 48 ชั่วโมง นำส่วนใสมากรองผ่าน 0.45 μm cellulose acetate membrane แล้วแบ่งส่วนใสที่กรองแล้วมา 10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรเป็น 2,000 ไมโครลิตร ด้วย acetonitrile เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 200 nm สำหรับหลอดที่ใช้เป็น blank นั้นไม่มีการเติมเอนไซม์ลงไป²⁹

4.3.10.3 ความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์

เตรียม vinyl acetate, vinyl butyrate และ vinyl stearate ใน hexane 10 มิลลิลิตร และ pentanol ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 mM ผสมให้เข้ากัน ก่อนเติมเอนไซม์แห้งน้ำหนัก 0.1 กรัม ลงไป บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 160 rpm นาน 63 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 12, 24, 39, 48 และ 63 ชั่วโมง โดยกรองส่วนใสผ่าน 0.45 μm cellulose acetate membrane แล้วแบ่งส่วนใสที่กรองแล้วมา 10 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรเป็น 2,000 ไมโครลิตร ด้วย acetonitrile เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 200 nm สำหรับหลอดที่ใช้เป็น blank นั้นไม่มีการเติมเอนไซม์ลงไป

4.3.11 การตรึงเอนไซม์ไลเปสโดยอาศัยเทคนิค entrapment

4.3.11.1 การตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วย *Sodium alginate*

ปิเปต crude enzyme ปริมาตร 5.0 ml ลงในขวดรูปชมพู่ที่มี sodium alginate ความเข้มข้น 3% (w/v) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 50 ml เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นใช้ micropipette หยดสารละลายดังกล่าวลงในสารละลาย calcium chloride ความเข้มข้น 0.1 M โดยมีการกวนอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง จากนั้นกรองเม็ด bead ด้วยผ้าขาวบางที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และเก็บเม็ด bead ที่ได้ในสารละลาย 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ในการศึกษาการทำงาน of เอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ที่ผ่านการตรึงด้วย sodium alginate³⁰

4.3.11.2 การตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วย *Polyacrylamide*

ชั่ง acrylamide 14.25 g และ N,N'-Methylene bisacrylamide 0.75 g ละลายด้วย 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0 ปริมาตร 100 ml แล้วทำการฆ่าเชื้อ จากนั้นเติม ammonium persulfate 10 mg, tetramethyl ethylene diamine (TEMED) 10 μl และ crude enzyme ปริมาตร 5.0 ml แล้ว

เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเทสารละลายดังกล่าวลงบนจานเลี้ยงเชื้อ (petri dish) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ รอให้สารละลายแข็งแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ที่ผ่านการตรึงด้วย polyacrylamide³¹

4.3.11.3 การตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วย Polyvinyl alcohol-boric acid

เตรียม polyvinyl alcohol (PVA) ให้มีความเข้มข้น 12.5%(w/v) จากนั้นเติมสารละลาย sodium alginate ความเข้มข้น 0.5%(w/v) ลงไปผสมคนให้เข้ากันได้เป็น PVA-alginate จากนั้นเติม crude enzyme ลงไปปริมาตร 5.0 ml ผสมให้เข้ากันก่อนนำสารละลายผสมทั้งหมดมาทำหยดลงใน boric acid ที่อุณหภูมิ 4°C พร้อมกวนอย่างต่อเนื่องเป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เกิด cross linking ระหว่าง PVA และ boric acid อย่างสมบูรณ์³²

4.3.12 การศึกษาจำนวนครั้งในการนำกลับมาใช้ใหม่ (Recycling time)

นำเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงจากการตรึงทั้ง 3 วิธีในหัวข้อ 4.3.11 มาศึกษาจำนวนครั้งในการนำกลับมาใช้ใหม่ โดยทำการวัดการทำงานของเอนไซม์ทั้งปฏิกิริยา hydrolysis และ transesterification ในกรณีที่ทำกรทดสอบปฏิกิริยา hydrolysis ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.3.6.2 ส่วนการทดสอบปฏิกิริยา transesterification จะทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.3.10.2 หลังจากวัดการทำงานของไลเปสจากจุลินทรีย์ที่ผ่านการตรึงแล้ว จึงกรองเม็ด bead หรือแยกเม็ด bead ออกมาจากสารละลายทดสอบ จากนั้นวัดการทำงานของไลเปสจากจุลินทรีย์ที่ผ่านการตรึงอีกครั้งโดยเติมสารละลายที่ใช้ในการทดสอบลงไปใหม่ ทำเช่นนี้จนกว่าไม่สามารถตรวจวัด activity ของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ได้

บทที่ 5 ผลการวิจัย

5.1 การแยกจุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์โดยเทคนิค pour plate

ในการแยกจุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์จากตัวอย่างดินหรือน้ำที่อยู่ในภาวะที่มีอุณหภูมิสูง ความเค็มสูง หรือมีค่าความเป็นกรดหรือด่างสูง จำนวน 22 ตัวอย่างนั้น การเติมตัวทำละลายอินทรีย์ลงไปให้อาหารเลี้ยงจะช่วยให้การคัดแยกจุลินทรีย์ในกลุ่มดังกล่าวกระทำได้ง่ายขึ้น ทั้งนี้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ควรสามารถกระจายตัวอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี เพื่อไม่ให้ตัวทำละลายอินทรีย์เกิดการแยกชั้นแล้วเกิดการปกคลุมอาหารเพาะเลี้ยงจนทำให้จุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนไม่สามารถเจริญได้ ในการทดลองนี้ isopropanol ซึ่งมีค่าการกระจายตัวของสารในชั้นน้ำต่อชั้นออกทานอล หรือ $\log P$ เท่ากับ 0.05 (ค่า $\log P$ ที่ต่ำกว่า 1 จะแสดงความสามารถในการกระจายตัวในชั้นน้ำได้ดีกว่าชั้นออกทานอล)²⁴ จึงถูกเลือกใช้ เมื่อแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างดินหรือน้ำด้วยเทคนิค pour plate ในอาหารกึ่งแข็งที่มีการเติม 1%(v/v) isopropanol พบจุลินทรีย์ทั้งหมด 38 ไอโซเลตที่สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์จากตัวอย่างดินและน้ำทั้งหมด 22 ตัวอย่าง โดยจุลินทรีย์ที่แยกได้จากอุทยานแจ้ซ็อน น้ำพุร้อนรุ่งอรุณ น้ำพุร้อนสันกำแพง อ่างศิลา น้ำเสียในจังหวัดเชียงใหม่ น้ำเสียในจังหวัดสมุทรปราการ ทะเลตรัง และเขาใหญ่ มีจำนวน 15, 4, 3, 2, 2, 4, 2 และ 6 ไอโซเลต ตามลำดับ (ตารางที่ 8) ผลจากการคัดกรองเบื้องต้นพบว่าแหล่งดินจากอุทยานแห่งชาติแจ้ซ็อน จังหวัดลำปาง พบจุลินทรีย์ที่ทนต่อ 1% (v/v) isopropanol มากที่สุด จำนวน 15 ไอโซเลต

ตาราง 8 ผลการคัดกรองจุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์จากแหล่งดินและแหล่งน้ำ 8 แหล่ง เมื่อมีการเติม 1%(v/v) isopropanol ใน standard method agar

ลำดับ	แหล่งดินหรือน้ำ	จำนวนไอโซเลตที่พบ
1	อุทยานแจ้ซ็อน จ.ลำปาง	15
2	น้ำพุร้อนรุ่งอรุณ จ.เชียงใหม่	4
3	น้ำพุร้อนสันกำแพง จ.เชียงใหม่	3
4	อ่างศิลา จ.ชลบุรี	2
5	น้ำเสียจากโรงงานปอสา จ.เชียงใหม่	2
6	น้ำเสียจากโรงงานผลิตเครื่องดื่ม จ.สมุทรปราการ	4
7	อุทยานแห่งชาติหาดเจ้าไหม จ.ตรัง	2
8	เขาใหญ่ จ.นครราชสีมา	6

เมื่อนำจุลินทรีย์ทั้ง 38 ไอโซเลตที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหารกึ่งแข็งที่มี 2.5% (v/v) isopropanol พบจุลินทรีย์จำนวน 35 ไอโซเลต สามารถเจริญได้ดีบนอาหารดังกล่าว แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ isopropanol เป็น 5% (v/v) พบจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีจำนวน 15 ไอโซเลต ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญได้ปานกลางจำนวน 7 ไอโซเลต สำหรับจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้น้อยมีทั้งหมด 9 ไอโซเลต เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ isopropanol ไปที่ 10% (v/v) พบจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ดีเพียง 5 ไอโซเลต จุลินทรีย์ที่เจริญได้ปานกลางจำนวน 4 ไอโซเลต และจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้น้อยมีทั้งหมด 14 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 9

ตาราง 9 แสดงการเจริญของจุลินทรีย์บน standard method agar ที่มี 1, 2.5, 5 และ 10%(v/v) isopropanol

แหล่งดินและน้ำ	ไอโซเลต	ความเข้มข้น isopropanol (v/v)			
		1%	2.5%	5%	10%
อุทยานแจ้ซอน	J21	+++	+++	+	-
	J22	+++	+++	++	+
	J23	+++	+++	+	-
	J31	+++	+++	+	+
	J41	+++	+++	+++	+++
	J52	+++	+++	+++	-
	J53	+++	+++	+	-
	J61	+++	+++	+++	-
	J71	+++	+++	++	+
	J72	+++	+++	+++	+
	J73	+++	+++	+	+
	J701	+++	-	-	-
	J702	+++	+++	-	-
	J503	+++	+	+	+
	J301	+++	-	-	-
น้ำพุร้อนรุ่งอรุณ	R1	+++	+++	+	-
	R3	+++	+++	+	-
	R31	+++	+++	+++	+
	R32	+++	+++	++	+
น้ำพุร้อนสันกำแพง	SK11	+++	+++	+++	++
	SK12	+++	+++	+++	++
	SK21	+++	+++	+++	+++
อ่างศิลา	SC2	+++	+++	++	+
	SC3	+++	+++	+	+
น้ำเสียวเชียงใหม่	W1	+++	+++	++	-
	W2	+++	-	-	-
น้ำเสียวสมุทรปราการ	WB1	+++	+++	+++	+
	WB21	+++	+++	+++	+++
	WB22	+++	+++	+++	+++
	WB23	+++	+++	+++	+++
ทะเลตรัง	T1	+++	+++	+	-
	T2	+++	+++	+++	++

หมายเหตุ : - คือ ไม่มีการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์, + คือ การเจริญของจุลินทรีย์น้อย, ++ คือ การเจริญของจุลินทรีย์ปานกลาง และ +++ คือ การเจริญของจุลินทรีย์ดี

ตาราง 9 แสดงการเจริญของจุลินทรีย์บน standard method agar ที่มี 1%, 2.5%, 5% และ 10%(v/v) isopropanol (ต่อ)

แหล่งดินและน้ำ	ไอโซเลต	ความเข้มข้น isopropanol (v/v)			
		1%	2.5%	5%	10%
เขาใหญ่	KY2	+++	+++	+++	++
	KY21	+++	+++	++	+
	KY22	+++	+++	+++	-
	KY23	+++	+++	-	-
	KY32	+++	+++	++	+
	KY33	+++	+++	++	+

หมายเหตุ : - คือ ไม่มีการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์, + คือ การเจริญของจุลินทรีย์น้อย, ++ คือ การเจริญของจุลินทรีย์ปานกลาง และ +++ คือ การเจริญของจุลินทรีย์ดี

จากผลการทดลองพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ isopropanol จำนวนไอโซเลตของจุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำลายดังกล่าวยังมีจำนวนลดลงเรื่อยๆ เนื่องจากตัวทำลายอินทรีย์อาจซึมผ่านเข้าไปที่เยื่อหุ้มเซลล์แล้วสะสมอยู่ในเซลล์ หรือทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เกิดการแตกและตายในที่สุด โดยแหล่งที่พบจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีที่ 10% (v/v) isopropanol มากที่สุดนั้น คือ น้ำเสียจากโรงงานผลิตเครื่องดื่มในจังหวัดสมุทรปราการ

5.2 การคัดเลือกหาจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ protease, oxidase, lipase หรือ esterase ที่ทนต่อตัวทำลายอินทรีย์

ในการคัดเลือกหาจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ที่ทนต่อตัวทำลายอินทรีย์นั้น จุลินทรีย์แต่ละไอโซเลตที่ทนต่อ isopropanol จะถูกนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลุ่ม protease, oxidase, lipase หรือ esterase โดยการทดสอบการผลิตเอนไซม์ protease และ lipase หรือ esterase จากจุลินทรีย์นั้นนิยมทดสอบบนอาหารกึ่งแข็งที่มีการเติมสารตั้งต้นแล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้นหรือผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นร่วมกับตัวบ่งชี้ (indicator) สำหรับเอนไซม์ในกลุ่ม oxidase นั้นการตรวจสอบเบื้องต้นที่นิยมนั้นเป็นการติดตามเปลี่ยนแปลงสีของ N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride เมื่อสีดังกล่าวทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ oxidase ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น สีดังกล่าวจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสีน้ำเงินอมม่วงเมื่อถูก oxidize³³

เมื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยการจุดจุลินทรีย์ (spot) แต่ละไอโซเลตลงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีอาหารกึ่งแข็งที่ประกอบด้วย 1% (w/v) skim milk จากการสังเกตวงใสที่เกิดขึ้น พบจุลินทรีย์ที่ผลิตโปรติเอสจำนวน 21 ไอโซเลต โดยจุลินทรีย์ไอโซเลต KY32, WB22 และ J31 สามารถผลิตโปรติเอสได้สูงเป็น 3 อันดับแรก (ตาราง 10) เมื่อจุดจุลินทรีย์ลงบนอาหารกึ่งแข็งที่มี 1% (v/v) olive oil และ 0.001% (w/v) rhodamine B เพื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปส ซึ่งความสามารถในการผลิตไลเปสของจุลินทรีย์สังเกตได้จากความสามารถในการเรืองแสงรอบโคโลนีและระยะเวลาการเกิดการเรืองแสงบนอาหารทดสอบ จากการทดสอบพบจุลินทรีย์ไอโซเลต คือ KY21, SK21 และ SC3 เพียง 3 ไอโซเลตที่สามารถผลิตไลเปสได้โดยมีความสามารถในการผลิตไลเปสได้ดี ตามลำดับ (ตาราง 10) ส่วนการผลิตออกซิเดสนั้น เมื่อนำจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลตมาทดสอบโดยสังเกตการเกิดการเปลี่ยนแปลงสีของสารทดสอบบนโคโลนีของจุลินทรีย์หลังจากเติมสารทดสอบ พบว่าจุลินทรีย์ทั้งหมด 22 ไอโซเลตผลิตเอนไซม์ออกซิเดสได้ (ตารางที่ 10) แต่เนื่องจากการทดสอบดังกล่าวเป็นการทดสอบเชิงคุณภาพเท่านั้นจึงไม่สามารถทำการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ออกซิเดสได้จากการทดลองนี้ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เลือก

จุลินทรีย์ไอโซเลต KY21, SK21, SC3, KY32, WB22 และ J31 มาศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการเจริญ การเปลี่ยนแปลง pH และการผลิตเอนไซม์ เนื่องจากการสังเคราะห์สารอินทรีย์ด้วยเทคนิคเคมีสีเขียว (Green Chemistry) และการเปลี่ยนโครงสร้างของสารทางชีวภาพ รวมไปถึงการใช้เอนไซม์ในภาคอุตสาหกรรมนั้นมีความต้องการใช้เอนไซม์ไลเปสและโปรตีเอสสูงกว่าเอนไซม์กลุ่มอื่นๆ

ตาราง 10 ผลการทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ไลเปส และออกซิเดส

ไอโซเลต	Protease			Lipase	Oxidase
	Colony (cm)	Clear zone (cm)	ratio		
J21	0.55	0.69	1.25	-	+
J22	-	-	-	-	-
J23	-	-	-	-	-
J31	0.34	0.83	2.44	-	+
J41	0.26	0.39	1.50	-	+
J52	0.74	1.45	1.96	-	+
J53	-	-	-	-	-
J61	0.84	1.62	1.93	-	+
J71	0.65	0.96	1.48	-	+
J72	0.55	1.10	2.00	-	+
J73	2.17	2.90	1.34	-	+
J701	-	-	-	-	-
J702	-	-	-	-	+
J503	-	-	-	-	+
J301	-	-	-	-	-
R1	-	-	-	-	-
R3	0.55	0.61	1.11	-	-
R31	0.54	0.94	1.74	-	-
R32	0.53	0.77	1.45	-	+
SK11	0.79	1.17	1.48	-	+
SK12	-	-	-	-	+
SK21	-	-	-	++	-
SC2	2.38	3.63	1.52	-	+
SC3	-	-	-	+	-
W1	0.70	1.44	2.06	-	-
W2	-	-	-	-	-

หมายเหตุ :

- Ratio คือ อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสต่อโคโลนี
- การทดสอบ lipase -: ไม่พบการเรืองแสงที่ UV 365 nm, +: พบการเรืองแสงที่ UV 365 nm รอบโคโลนีช้า, ++: มีการเรืองแสงที่ UV 365 nm รอบโคโลนีเร็วปานกลาง และ +++: พบการเรืองแสงที่ UV 365 nm รอบโคโลนีเร็วที่สุด

ตาราง 10 ผลการทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ไลเปส และออกซิเดส (ต่อ)

ไอโซเลต	Protease			Lipase	Oxidase
	Colony (cm)	Clear zone (cm)	ratio		
WB1	0.45	0.62	1.38	-	-
WB21	0.59	0.83	1.41	-	+
WB22	0.40	1.30	3.25	-	+
WB23	-	-	-	-	+
T1	-	-	-	-	-
T2	0.64	0.99	1.55	-	+
KY2	0.43	0.54	1.26	-	-
KY21	-	-	-	+++	+
KY22	0.44	0.96	2.18	-	+
KY23	-	-	-	-	-
KY32	0.49	1.60	3.27	-	+
KY33	-	-	-	-	+

หมายเหตุ :

- 1) Ratio คือ อัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสต่อโคโลนี
- 2) การทดสอบ lipase -: ไม่พบการเรืองแสงที่ UV 365 nm, +: พบการเรืองแสงที่ UV 365 nm รอบโคโลนีช้า, ++: มีการเรืองแสงที่ UV 365 nm รอบโคโลนีเร็วปานกลาง และ +++: พบการเรืองแสงที่ UV 365 nm รอบโคโลนีเร็วที่สุด

5.3 การศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลตที่คัดเลือก

การทดลองนี้มีจุดประสงค์เพื่อยืนยันความสามารถทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ของจุลินทรีย์ที่สนใจ พร้อมทั้งศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิดต่อการเจริญของจุลินทรีย์ดังกล่าว เพื่อคัดกรองหาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูง ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่ DMSO, acetone, isopropanol, methanol, isoamyl alcohol และ toluene ซึ่งนิยมใช้ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์และมีค่า log P ที่แตกต่างกัน

5.3.1 การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตไลเปส

จากตารางที่ 11 พบว่าจุลินทรีย์ไอโซเลต KY21, SK21 และ SC3 ที่มีความสามารถผลิตไลเปสได้นั้นทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ได้ต่างกัน โดยจุลินทรีย์ไอโซเลต KY21 ที่สามารถผลิตไลเปสได้นั้นสามารถเจริญได้ในอาหารเหลวที่มี DMSO, acetone, isopropanol, methanol, toluene และ hexane ที่ความเข้มข้นสูงสุด 10, 10, 5, 20, 30 และ 50%(v/v) ตามลำดับ ส่วนจุลินทรีย์ไอโซเลต SK21 สามารถเจริญได้ในอาหารเหลวที่มี acetone, isopropanol, methanol และ hexane ที่ความเข้มข้นสูงสุด 10, 10, 10 และ 40% (v/v) ตามลำดับ ในขณะที่ SC3 สามารถเจริญได้ในอาหารเหลวที่มี acetone, isopropanol, methanol, toluene และ hexane ที่ความเข้มข้นสูงสุด 10, 10, 5, 10 และ 90% (v/v) ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากความสามารถในการเจริญของ SC3 บนอาหารกึ่งแข็งภายหลังจากทำการบ่มใน hexane 100%(v/v) เป็นเวลา 48 ชั่วโมงพบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวทนต่อ hexane ได้ถึง 100%(v/v) เนื่องจากยังคงสามารถเจริญบนอาหารกึ่งแข็งได้

ตาราง 11 ชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตไลเปส

Solvent	ความเข้มข้น (%v/v)	KY21		SK21		SC3	
		OD ₆₆₀	การเจริญบนอาหารกึ่งแข็ง (%)	OD ₆₆₀	การเจริญบนอาหารกึ่งแข็ง (%)	OD ₆₆₀	การเจริญบนอาหารกึ่งแข็ง (%)
No solvent	-	0.150	100	0.410	100	0.165	100
DMSO (log P = -1.22)	5	0.120	100	0.000	0	0.000	0
	10	0.055	100	0.000	0	0.000	0
	15	0.000	0	ND	ND	ND	ND
	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Acetone (log P = -0.23)	5	0.270	100	0.340	100	0.120	100
	10	0.045	100	0.270	100	0.000	25
	15	0.010	0	0.000	0	0.000	0
	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Isopropanol (log P = 0.05)	5	0.010	25	0.365	100	0.100	100
	10	0.010	0	0.020	25	0.000	25
	15	0.010	0	0.000	0	0.000	0
	20	0.010	0	ND	ND	ND	ND
Methanol (log P = -0.80)	5	0.020	100	0.420	100	0.160	100
	10	0.020	100	0.007	100	0.000	0
	15	0.020	100	0.000	0	0.000	0
	20	0.010	100	ND	ND	ND	ND
	30	0.005	0	ND	ND	ND	ND
	40	0.000	0	ND	ND	ND	ND
	50	0.040	0	ND	ND	ND	ND
Isoamylalcohol (log P = 1.10)	5	0.000	0	0.000	0	0.000	0
	10	0.000	0	0.000	0	0.000	0
	15	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Toluene (log P = 2.30)	5	0.025	100	0.000	0	0.045	100
	10	0.025	100	0.000	0	0.000	25
	15	0.030	100	ND	ND	ND	ND
	20	0.040	25	ND	ND	ND	ND
	30	0.070	5	ND	ND	ND	ND
	40	0.100	0	ND	ND	ND	ND

ND: not determine

ตาราง 11 ชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตไลเปส (ต่อ)

Solvent	ความเข้มข้น (%v/v)	KY21		SK21		SC3	
		OD ₆₆₀	การเจริญบนอาหารกึ่งแข็ง (%)	OD ₆₆₀	การเจริญบนอาหารกึ่งแข็ง (%)	OD ₆₆₀	การเจริญบนอาหารกึ่งแข็ง (%)
Hexane (log P = 3.60)	5	0.145	100	0.450	100	0.115	100
	10	0.050	100	0.420	100	0.090	100
	15	0.010	100	0.400	100	0.160	100
	20	0.040	100	0.200	100	0.142	10
	30	0.030	100	0.040	50	0.070	100
	40	0.040	50	0.080	5	0.105	100
	50	0.040	50	ND	ND	0.030	100
	60	0.010	0	ND	ND	0.042	100
	70	0.010	0	ND	ND	0.012	100
	80	ND	ND	ND	ND	0.077	100
	90	ND	ND	ND	ND	0.027	100
	100	ND	ND	ND	ND	0.000	100

ND: not determine

5.3.2 การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตโปรติเอส

เมื่อนำจุลินทรีย์ที่ผลิตโปรติเอสได้สูงสุด 3 ไอโซเลตแรก คือ KY32, WB22 และ J31 มาทดสอบความสามารถทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าจุลินทรีย์ไอโซเลต KY32 ที่ผลิตโปรติเอสได้สูงนั้นสามารถเจริญได้ในอาหารเหลวที่มี methanol ความเข้มข้นสูงสุดของเท่ากับ 10% และในอาหารที่มี 50% (v/v) hexane (ตาราง 12) ส่วนจุลินทรีย์ไอโซเลต J31 นั้นสามารถเจริญได้ในอาหารเหลวที่มี acetone, isopropanol, methanol, toluene และ hexane ที่ความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 5, 5, 10, 10 และ 90% (v/v) ตามลำดับ โดยจุลินทรีย์ไอโซเลต J31 ทนต่อ hexane ได้ถึง 100% (ตารางที่ 5.7) สำหรับจุลินทรีย์ไอโซเลต WB22 นั้นสามารถเจริญได้ในอาหารเหลวที่มี acetone, isopropanol, methanol และ hexane ที่ความเข้มข้นสูงสุดเพียง 5, 5, 5 และ 10% (v/v) ตามลำดับ (ตารางที่ 12)

ตาราง 12 ชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตโปรตีนเอส

	ความเข้มข้น (%v/v)	KY32		J31		WB22	
		OD ₆₆₀	การเจริญบนอาหารกึ่งแข็ง (%)	OD ₆₆₀	การเจริญบนอาหารกึ่งแข็ง (%)	OD ₆₆₀	การเจริญบนอาหารกึ่งแข็ง (%)
No solvent	-	0.230	100	0.380	100	0.400	100
DMSO (log P = -1.22)	5	0.000	0	0.000	0	0.000	0
	10	0.000	0	0.000	0	0.000	0
	15	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Acetone (log P = -0.23)	5	0.000	0	0.123	100	0.140	100
	10	0.000	0	0.000	0	0.000	0
	15	0.000	0	0.000	0	0.000	0
	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Isopropanol (log P = 0.05)	5	0.000	0	0.047	100	0.085	100
	10	0.000	0	0.000	0	0.000	0
	15	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Methanol (log P = -0.80)	5	0.005	100	0.080	100	0.150	100
	10	0.004	100	0.017	100	0.000	0
	15	0.000	0	0.000	0	0.000	0
	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Isoamylalcohol (log P = 1.10)	5	0.000	0	0.000	0	0.000	0
	10	0.000	0	0.000	0	0.000	0
	15	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Toluene (log P = 2.30)	5	0.000	0	0.051	15	0.000	0
	10	0.000	0	0.002	10	0.000	0
	15	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	20	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: not determine

ตาราง 12 ชนิดและความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตโปรตีน (ต่อ)

	ความเข้มข้น (%v/v)	KY32		J31		WB22	
		OD ₆₆₀	การเจริญบนอาหารกึ่งแข็ง (%)	OD ₆₆₀	การเจริญบนอาหารกึ่งแข็ง (%)	OD ₆₆₀	การเจริญบนอาหารกึ่งแข็ง (%)
Hexane (log P = 3.60)	5	0.053	100	0.073	100	0.190	100
	10	0.115	100	0.072	100	0.150	100
	15	0.053	100	0.050	100	0.000	0
	20	0.115	100	0.130	100	0.000	0
	30	0.150	100	0.350	100	ND	ND
	40	0.070	50	0.140	100	ND	ND
	50	0.070	5	0.200	100	ND	ND
	60	ND	ND	0.150	100	ND	ND
	70	ND	ND	0.070	100	ND	ND
	80	ND	ND	0.080	100	ND	ND
	90	ND	ND	0.240	100	ND	ND
	100	ND	ND	0.000	100	ND	ND

ND: not determine

จากผลการทดลองในตารางที่ 11 และ 12 พบว่าจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลตมีความสามารถในการเจริญหรือทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ได้แตกต่างกันซึ่งจุลินทรีย์ที่ได้ไอโซเลต KY21 ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ได้หลากหลายที่สุด ส่วนจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 และ J31 มีความสามารถทนต่อ hexane ได้สูงที่สุดในเบื้องต้นจุลินทรีย์ทั้ง 3 จึงเป็นจุลินทรีย์ที่มีความน่าสนใจ แต่ทั้งนี้จะต้องพิจารณาถึงสามารถในการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ดังกล่าวเพื่อคัดเลือกหาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพต่อไป

5.4 การศึกษาการเจริญและความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือก

ในการทดลองนี้เป็นทดลองเพื่อประเมินความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ที่ได้คัดเลือกซึ่งได้แก่ KY21, SK21, SC3, KY32, J31 และ WB22

5.4.1 การศึกษาการเจริญและความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ที่คัดเลือก

เมื่อนำจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดี คือ จุลินทรีย์ไอโซเลต KY21, SK21 และ SC3 มาเลี้ยงใน nutrient broth และ nutrient broth ที่มีการเติมน้ำมันมะกอก 1%(v/v) แล้วติดตามการเจริญพร้อมวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ไลเปส พบว่าการเติมน้ำมันมะกอกลงไปไม่ได้เหนี่ยวนำให้จุลินทรีย์ไอโซเลต KY21 สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงขึ้น จุลินทรีย์ไอโซเลต KY21 ที่เลี้ยงใน nutrient broth สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดในระยะ log phase โดยมี lipase activity เท่ากับ 0.290 ± 0.003 unit/ml ในขณะที่การเลี้ยงจุลินทรีย์ดังกล่าวในอาหารเหลวที่มีน้ำมันมะกอกนั้นส่งผลให้จุลินทรีย์มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดในระยะ stationary phase โดยมี activity สูงสุดเท่ากับ 0.140 ± 0.002 unit/ml (ดังภาพที่ 10a)

เมื่อติดตามการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ไอโซเลต SK21 ใน nutrient broth ที่มีการเติมน้ำมันมะกอกกับ nutrient broth ที่ไม่มีการเติมน้ำมันมะกอก พบว่าการเติมน้ำมันมะกอกลงไปช่วยเร่งการ

เจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลต SK21 ในระยะ log phase เพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 10b) แต่เมื่อพิจารณาการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ดังกล่าวในภาวะที่เหนียวน้ำและไม่ได้เหนียวน้ำ พบว่าระยะเวลาเจริญของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดมีความแตกต่างกัน ในกรณีที่เลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลต SK21 ใน nutrient broth พบว่าจุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง (ระยะ log phase) โดยมี activity เท่ากับ 0.12 ± 0.003 unit/ml เมื่อเติมน้ำมันมะกอกลงไป พบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงขึ้นเป็น 0.200 ± 0.003 unit/ml แต่เป็นการผลิตที่เวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในระยะ stationary phase (ภาพที่ 10b)

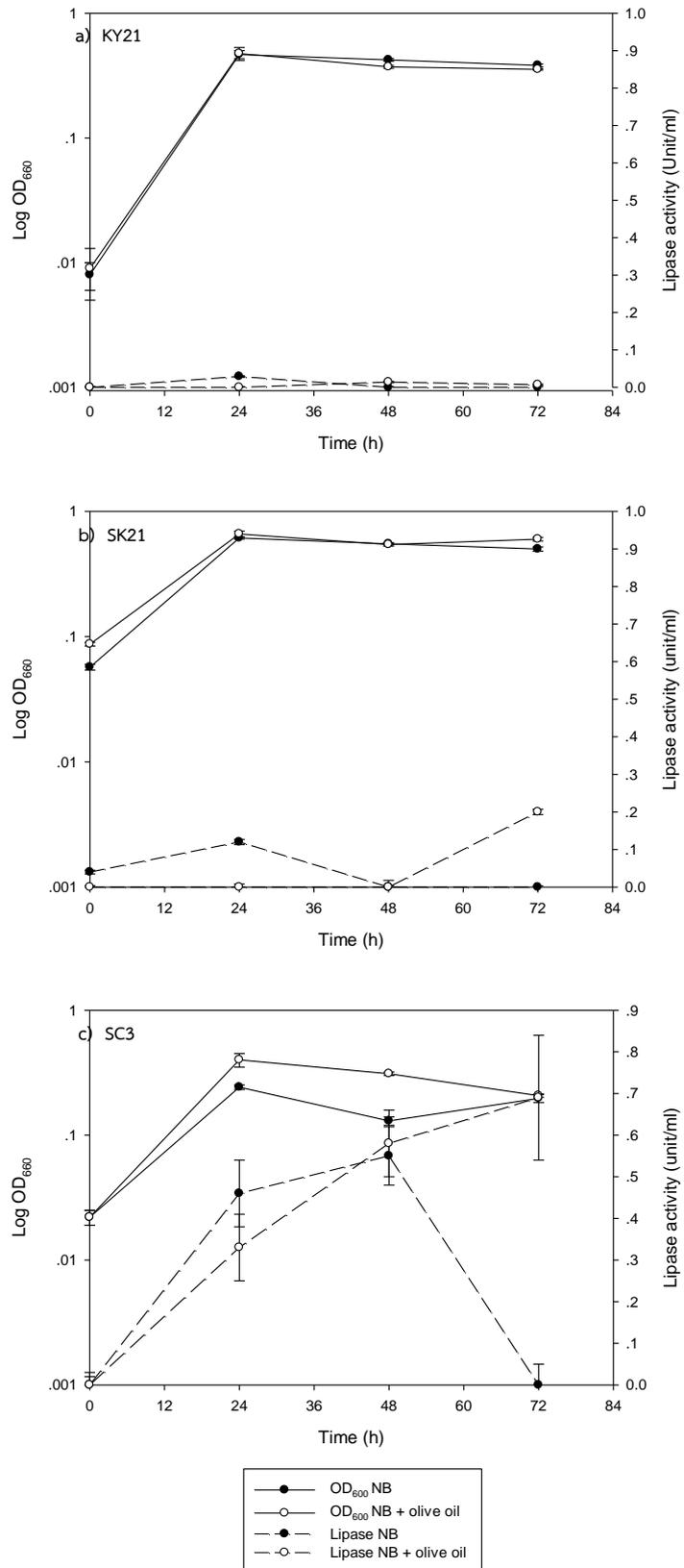
สำหรับจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 นั้น พบว่าการเติมน้ำมันมะกอกลงไปนั้นสามารถเร่งการเจริญของจุลินทรีย์และสามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์ได้เช่นกัน ภาพที่ 5.1c พบว่าค่า OD₆₆₀ ของ SC3 ใน nutrient broth ที่มีการเติมน้ำมันมะกอกนั้นมีค่าสูงกว่าค่า OD₆₆₀ ของ SC3 ที่เลี้ยงใน nutrient broth ที่ไม่ได้เติมน้ำมันมะกอกตั้งแต่จุลินทรีย์เริ่มเข้าสู่ระยะ log phase จนถึงระยะ stationary phase เมื่อพิจารณาการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ดังกล่าวทั้งสองภาวะ พบว่าการเติมน้ำมันมะกอกลงไปจะช่วยให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงขึ้น แต่ระยะเวลาการผลิตเอนไซม์สูงสุดจะแตกต่างกันซึ่งมีลักษณะเหมือนจุลินทรีย์ไอโซเลต SK21 คือ จุลินทรีย์ที่ถูกเลี้ยงในภาวะที่มีการเหนียวน้ำจะมีการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดช้ากว่าจุลินทรีย์ที่ไม่ได้ผ่านการเหนียวน้ำ ซึ่งจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 นั้นผลิตเอนไซม์ได้ดีในช่วง mid-stationary phase หรือที่ 48 ชั่วโมง ในกรณีที่ไม่ได้ทำการเหนียวน้ำโดยมี activity สูงสุดเท่ากับ 0.55 ± 0.07 unit/ml เมื่อทำการเหนียวน้ำการผลิตเอนไซม์ด้วยน้ำมันมะกอก พบว่าความสามารถของจุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์นั้นเพิ่มสูงขึ้นเป็น 0.69 ± 0.15 unit/ml ที่เวลา 96 ชั่วโมงหรือช่วง late-stationary phase นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมน้ำมันมะกอกลงไปช่วยให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ได้อย่างต่อเนื่องกว่ากรณีที่ไม่ได้เติมน้ำมันมะกอกลงไป (ภาพที่ 10c) ทั้งนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ทั้งสามไอโซเลต พบว่าจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุดโดยไม่ต้องทำการเหนียวน้ำ (ภาพที่ 10)

5.4.2 การศึกษาการเจริญและความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของจุลินทรีย์ที่คัดเลือก

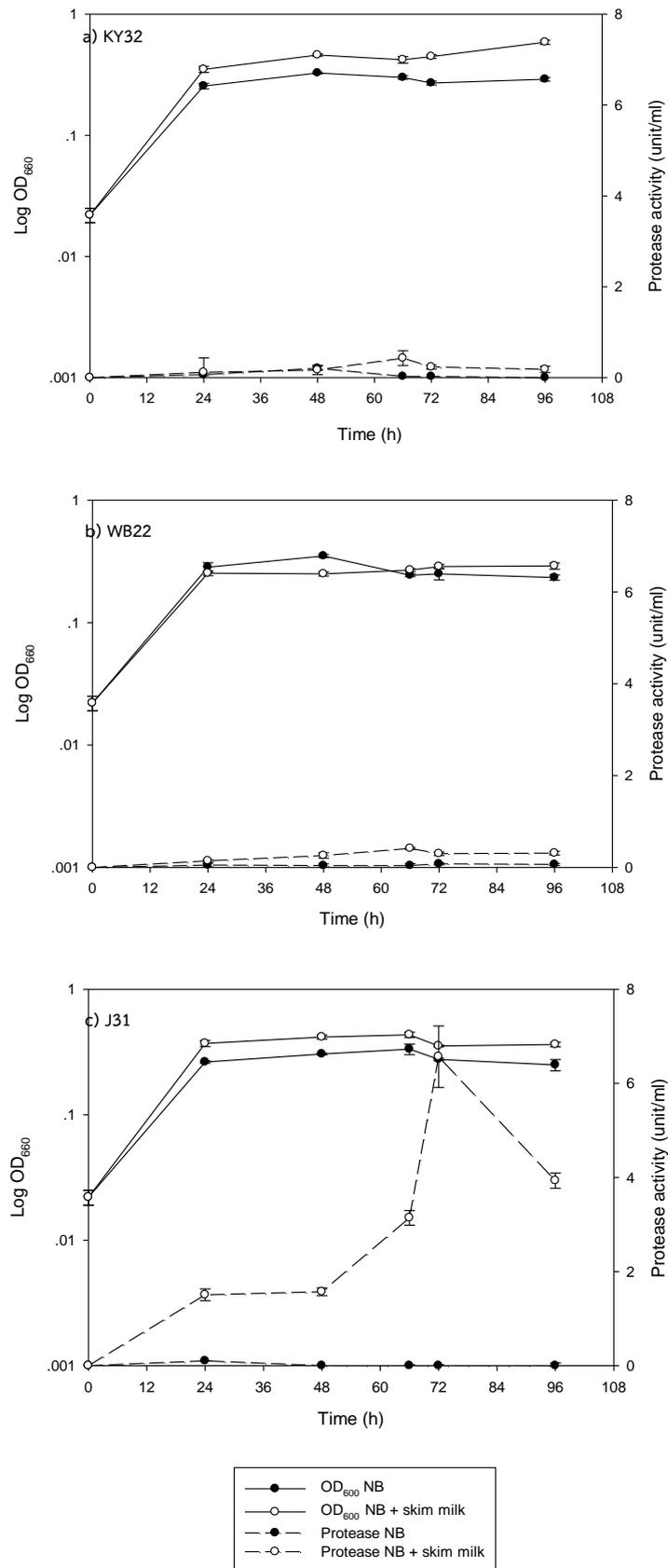
การศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของจุลินทรีย์ไอโซเลต KY32, WB22 และ J31 ในภาวะที่ถูกเหนียวน้ำและไม่ถูกเหนียวน้ำการผลิตเอนไซม์ด้วยการเติม skim milk นั้น พบว่าการเติมหางนมหรือ skim milk ลงไปใน nutrient broth นั้นช่วยเร่งการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของจุลินทรีย์ไอโซเลต KY32 ได้ดังภาพที่ 5.2a โดยจุลินทรีย์ไอโซเลต KY32 ที่เลี้ยงในภาวะเหนียวน้ำผลิตเอนไซม์สูงสุดที่เวลา 66 ชั่วโมง โดยมี activity เท่ากับ 0.428 ± 0.16 unit/ml ในขณะที่จุลินทรีย์ไอโซเลต KY32 ที่เลี้ยงในภาวะปกติผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุดเพียง 0.208 ± 0.05 unit/ml ที่เวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 11a)

เมื่อพิจารณาการเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลต WB22 ในภาวะที่เหนียวน้ำและไม่ถูกเหนียวน้ำ พบว่าการเติมหางนมลงไปให้อาหารเหลวไม่ได้ส่งผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ดังกล่าว แต่เมื่อพิจารณาการผลิตเอนไซม์กลับพบว่าการเติมหางนมลงไปช่วยให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงขึ้นถึง 5 เท่า (ภาพที่ 11b)

สำหรับการติดตามการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ไอโซเลต J31 ในอาหารเหลวที่มีการเติมหางนมลงไป พบว่าการเติมหางนมลงไปนั้นช่วยเร่งการเจริญของจุลินทรีย์และเหนียวน้ำให้จุลินทรีย์ไอโซเลต J31 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงขึ้นประมาณ 15-65 เท่า จุลินทรีย์ไอโซเลต J31 ที่ถูกเหนียวน้ำสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่เวลา 72 ชั่วโมงซึ่งอยู่ในระยะ stationary phase โดยมี activity สูงถึง 6.57 ± 0.65 unit/ml (ภาพที่ 11c) จากความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของจุลินทรีย์ทั้งสามไอโซเลตที่ทดสอบ พบว่าจุลินทรีย์ไอโซเลต J31 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงเมื่อทำการเหนียวน้ำการผลิตเอนไซม์ด้วยหางนม



รูป 10 ความสัมพันธ์ระหว่าง logOD₆₆₀ และ lipase activity กับ เวลา (ชั่วโมง) ของจุลินทรีย์ไฮโซเลต KY21, SK21 และ SC3



รูป 11 ความสัมพันธ์ระหว่าง logOD₆₆₀ และ protease activity กับ เวลา (ชั่วโมง) ของจุลินทรีย์ไอโซเลต KY32, WB22 และ J31

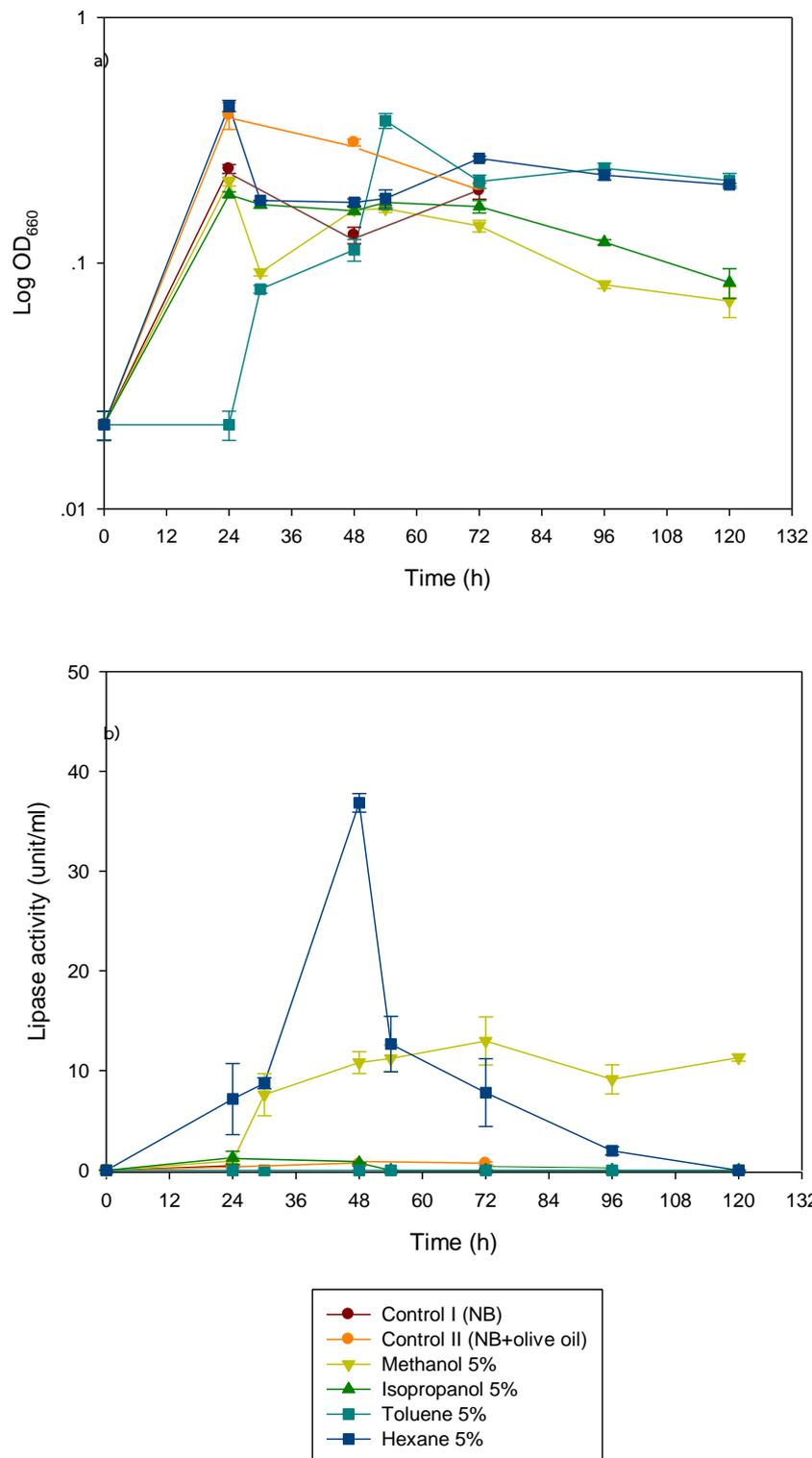
5.5 การศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ไอโซเลตที่คัดเลือก

จากผลการทดสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกในหัวข้อ 5.4 พบว่าจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 มีสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงกว่าไอโซเลตอื่นๆ สำหรับจุลินทรีย์ที่ผลิตโปรติเอสได้ดีคือ จุลินทรีย์ไอโซเลต J31 ในการทดลองนี้จึงได้ทำการติดตามการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ทั้งสองไอโซเลตในอาหารเหลวที่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์เปรียบเทียบกับภาวะควบคุมที่ไม่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบนี้ ได้แก่ hexane, methanol, toluene หรือ isopropanol ที่ความเข้มข้น 5%(v/v) และ acetone ที่ความเข้มข้นเดียวกันสำหรับจุลินทรีย์ไอโซเลต J31

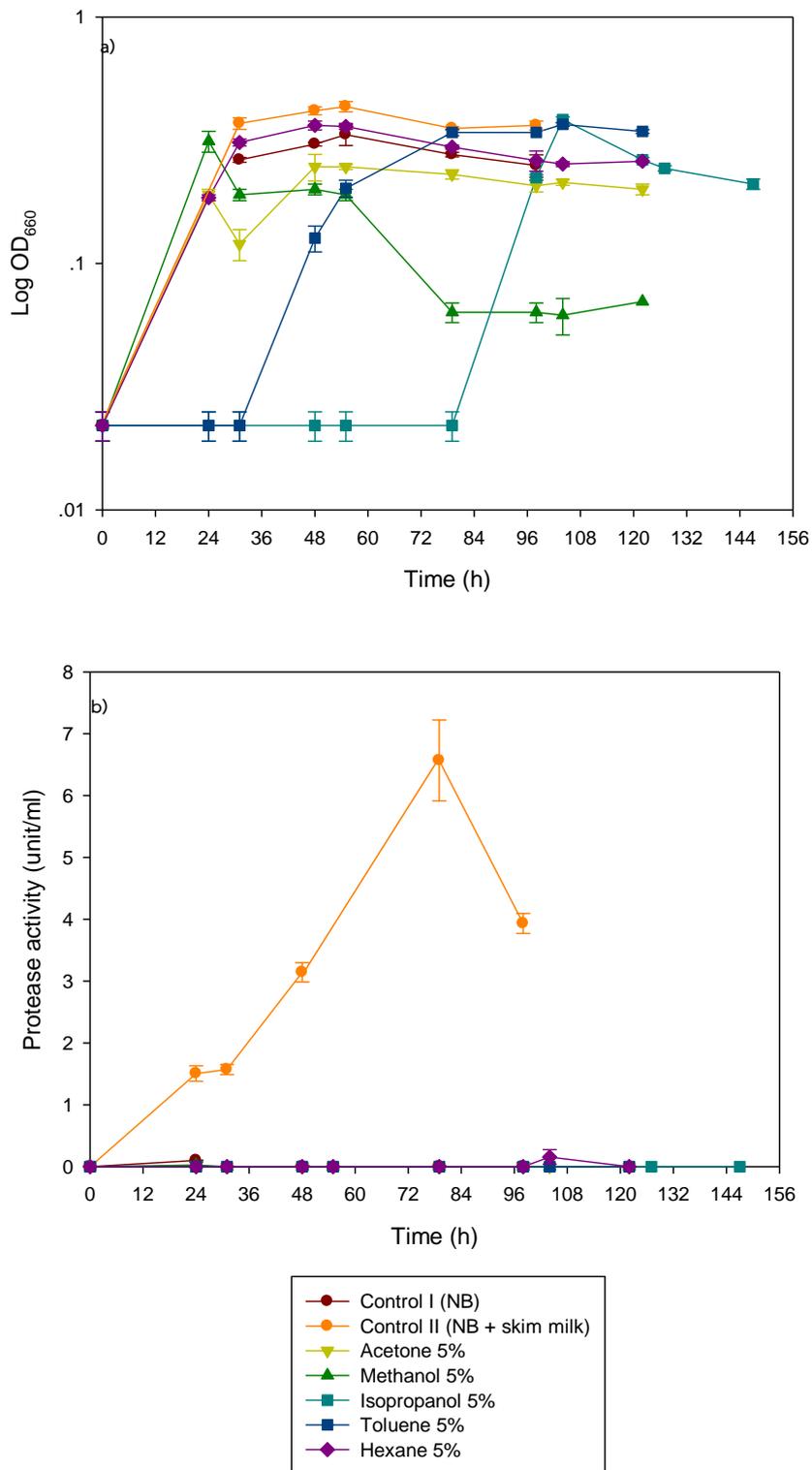
จากภาพที่ 12a เมื่อพิจารณาค่า OD₆₆₀ ในอาหารเหลวที่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 ที่เลี้ยงใน 5%(v/v) hexane, methanol และ isopropanol ไม่ต้องใช้เวลาในการปรับตัว สามารถเจริญเข้าสู่ระยะ log phase ได้ทันทีหลังจากเริ่มการเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับภาวะควบคุมทั้งสองโดยสังเกตได้จากความชันที่ใกล้เคียงกันของกับภาวะควบคุมที่ 1 (อาหารเหลว) และ 2 (อาหารเหลวที่มีตัวเหนียวนำการผลิตเอนไซม์) ในกรณีที่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ลงไปอาหารเหลว เมื่อจุลินทรีย์มีการเจริญแบบทวีคูณ (log phase) แล้วจะพบลักษณะการเจริญลดลงในเวลาที่ไม่นานนัก ส่วนในภาวะที่มี 5%(v/v) toluene จุลินทรีย์จะอาศัยเวลาในการปรับตัวที่ยาวจึงทำให้มีช่วง lag phase นานซึ่งการทดลองพบว่าจุลินทรีย์จะเข้าสู่ระยะ log phase ที่เวลา 24 ชั่วโมง ในการวิเคราะห์การผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 ในภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ พบว่าจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงขึ้นประมาณ 23 และ 67 เท่า เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ดังกล่าวในอาหารเหลวที่มี methanol และ hexane ตามลำดับ (ภาพที่ 12b) ในขณะที่การเติม isopropanol หรือ toluene ลงไปไม่ได้ช่วยให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ได้ดีขึ้น และยังพบว่าการเติม methanol ลงไปจะช่วยให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 30 ไปแล้ว ในขณะที่การเติม hexane ลงไปนั้นสามารถช่วยให้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ได้ดีขึ้นที่เวลา 48 ชั่วโมงซึ่งเป็นระยะที่จุลินทรีย์ได้ผ่านการเจริญแบบทวีคูณแล้ว

เมื่อศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิดต่อการเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลต J31 พบว่าการเติม hexane และ acetone ในอาหารเหลวที่ความเข้มข้น 5%(v/v) ไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ดังกล่าวในช่วงของการเจริญแบบทวีคูณเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม แต่เมื่อพิจารณาค่า OD₆₆₀ ของจุลินทรีย์ภายหลังจากเข้าสู่ระยะ log phase แล้ว พบว่าค่า OD₆₆₀ ของจุลินทรีย์ไอโซเลต J31 ในภาวะที่มี acetone เมื่อจุลินทรีย์มีค่าต่ำกว่าชุดควบคุมทั้งสองอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่การเติม hexane ลงไปส่งผลกระทบต่อเจริญเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมทั้งสองภายหลังจากที่จุลินทรีย์เข้าสู่ระยะ log phase แล้ว ดังภาพที่ 5.4a ในกรณีที่เติม methanol ลงไปในอาหารเหลว พบว่า methanol ลดการเจริญของจุลินทรีย์อย่างต่อเนื่องภายหลังจากที่จุลินทรีย์เจริญเข้าสู่ระยะ log phase แล้ว ในขณะที่การเติม acetone ลงไปจะส่งผลกระทบต่อเจริญของจุลินทรีย์เพียงระยะหนึ่งเมื่อผ่านระยะ log phase แล้ว ส่วนการเติม toluene และ isopropanol นั้นทำให้จุลินทรีย์ไอโซเลต J31 ต้องปรับตัวในระยะแรกค่อนข้างนานจึงสามารถสังเกตเห็นช่วงของ lag phase ในอาหารที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ดังกล่าวได้อย่างชัดเจน ดังภาพที่ 13a จุลินทรีย์ไอโซเลต J31 ใช้เวลาในการปรับตัวในอาหารเหลวที่มี toluene เป็นเวลา 30 ชั่วโมง และ 79 ชั่วโมง ในกรณีที่มีการเติม isopropanol ลงไป (ภาพที่ 13a) ส่วนการผลิตเอนไซม์โปรติเอส พบว่าการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ เช่น acetone, methanol, isopropanol, hexane และ toluene นั้นส่งผลให้การผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ไอโซเลต J31 ลดลง ดังภาพที่ 13b

จากภาพที่ 12 และ 13 พบว่าชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์มีผลต่อความสามารถในการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ได้แตกต่างกัน เมื่อพิจารณาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลต พบว่าจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 เพียงไอโซเลตเดียวที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงขึ้นเมื่อมีการเติม hexane หรือ toluene ดังนั้นในการทดลองถัดไปผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์นี้เป็นหลัก



รูป 12 ความสัมพันธ์ระหว่าง $\log OD_{660}$ และ lipase activity กับ เวลา (ชั่วโมง) ของจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่เป็นชุดควบคุม I (NB), ชุดควบคุม II (NB + olive oil), อาหารเหลวที่มีการเติม methanol 5%, อาหารเหลวที่มีการเติม isopropanol 5% อาหารเหลวที่มีการเติม toluene 5% และอาหารเหลวที่มีการเติม hexane 5%



รูป 13 ความสัมพันธ์ระหว่าง logOD₆₆₀ และ protease activity กับ เวลา (ชั่วโมง) ของจุลินทรีย์ไอโซเลต J31 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวที่เป็นชุดควบคุม I (NB), ชุดควบคุม II (NB + skim milk) , อาหารเหลวที่มีการเติม acetone 5%, อาหารเหลวที่มีการเติม methanol 5%, อาหารเหลวที่มีการเติม isopropanol 5% อาหารเหลวที่มีการเติม toluene 5% และอาหารเหลวที่มีการเติม hexane 5%

5.6 จำแนกจุลินทรีย์ที่คัดเลือกโดยอาศัยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บน ribosomal DNA (rDNA)

จากผลการทดสอบการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ในอาหารที่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ นั้น พบว่าจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 และ J31 ผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสสูงกว่าจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ทดสอบ เมื่อทำการสังเกตใต้กล้องจุลทรรศน์และลักษณะการเจริญบนอาหารกึ่งแข็ง พบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 2 ไอโซเลตเป็นแบคทีเรีย จึงนำจุลินทรีย์ดังกล่าวมาหาลำดับนิวคลีโอไทด์บน 16S rDNA โดยเพิ่มปริมาณชิ้น DNA บริเวณ 16S rDNA บางส่วน (partial 16S rDNA) ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction หรือ PCR แล้วนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จะถูกนำไปวิเคราะห์ด้วย Cap contig assembly program ใน BioEdit Program และเปรียบเทียบชนิดของแบคทีเรียที่ได้โดยใช้ standard nucleotide BLAST (BLASTn) จากฐานข้อมูล NCBI (ภาคผนวก) เมื่อทำการวิเคราะห์พบว่าจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (%homology) กับ *Bacillus aerophilus*, *Bacillus altitudinis*, *Bacillus stratosphericus* มากที่สุดโดยมี % ความคล้ายคลึงเท่ากับ 99.23% (ตารางที่ 13) จึงทำให้ไม่สามารถระบุ species ของจุลินทรีย์ชนิดนี้ได้ สำหรับจุลินทรีย์ไอโซเลต J31 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงกับ *Bacillus anthracis* และ *Bacillus cereus* มากถึง 100% (ตารางที่ 13) จึงทำให้ไม่สามารถระบุสายพันธุ์ที่ชัดเจนได้เช่นเดียวกับจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 ทั้งนี้จากผลการวิเคราะห์สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ไอโซเลต J31 พบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวมีโอกาสเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถก่อให้เกิดอันตรายต่อคนและสัตว์ได้ ดังนั้นในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ความเสถียร และการประยุกต์ใช้จึงทำการศึกษาเฉพาะในส่วนของจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3

ตาราง 13 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์บน 16s rDNA ของจุลินทรีย์ที่แยกได้กับแบคทีเรียในฐานข้อมูล

Isolate	Rank	Name	Strain	Pairwise Similarity (%)
SC3	1	<i>Bacillus aerophilus</i>	28K(T)	99.23
	2	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b(T)	99.23
	3	<i>Bacillus stratosphericus</i>	41KF2a(T)	99.23
	4	<i>Bacillus safensis</i>	FO-036b(T)	98.76
	5	<i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 7061(T)	98.69
J31	1	<i>Bacillus anthracis</i>	ATCC 14578(T)	100.00
	2	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 14579(T)	100.00
	3	<i>Bacillus anthracis</i>	Ames	99.89
	4	<i>Bacillus pseudomycolides</i>	DSM12442(T)	99.68
	5	<i>Bacillus mycolides</i>	ATCC6462(T)	99.68

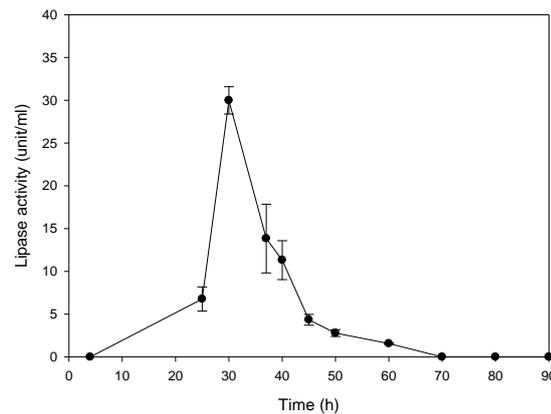
5.7 การศึกษาปัจจัยหลักที่มีผลต่อการทำงานของไลเปส

เพื่อศึกษาปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการทำงานของไลเปสที่ได้จาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 ในการทดลองนี้ ผู้วิจัยได้เตรียม crude enzyme โดยทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ดังกล่าวในอาหารเหลวที่มีการเติม hexane ลงไป 5%(v/v) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อแยก crude enzyme ออกจากตะกอนของ

จุลินทรีย์ จากนั้นจึงนำ crude enzyme ที่ได้มาศึกษาผลของอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการทำงานของไลเปสเพื่อให้ได้ข้อมูลสำคัญของเอนไซม์ดังกล่าว

5.7.1 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

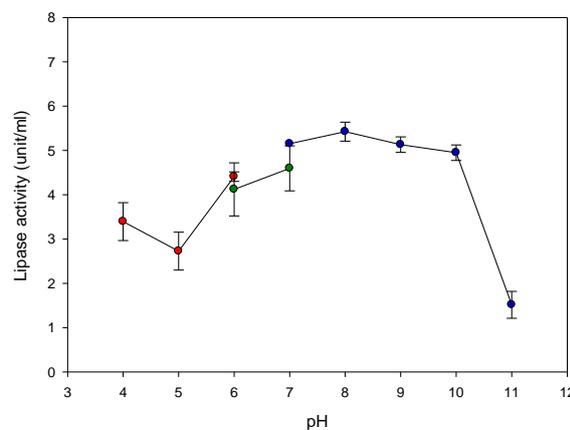
เมื่อทดสอบผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของไลเปสที่ *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 ผลิตขึ้นที่อุณหภูมิ 4, 30, 37, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90°C พบว่า เอนไซม์ไลเปสสามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุด เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°C โดยมีแอกติวิตีสูงที่สุดเท่ากับ 29.98 ± 1.60 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงภาพที่ 14 ดังนั้นอุณหภูมิ 30°C จึงอุณหภูมิที่ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้ดีที่สุด (optimal temperature)



รูป 14 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของไลเปสจาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3

5.7.2 ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

ในการการศึกษาผลของ pH ต่อการทำงานของไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 นั้น sodium deoxycholate จะถูกละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ต่างๆ ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการทำปฏิกิริยา จากภาพที่ 15 พบว่าเอนไซม์ไลเปสสามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดเมื่ออยู่ในสารละลาย 0.05M Tris-HCl buffer, pH 8.0 โดยมีแอกติวิตีสูงที่สุดเท่ากับ 5.42 ± 0.21 ยูนิตต่อมิลลิลิตร



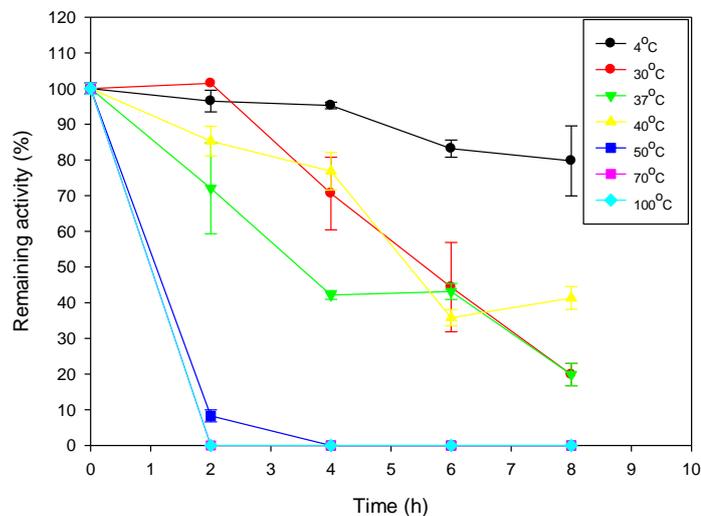
รูป 15 ผลของ pH ต่อการทำงานของไลเปสจาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 โดยสัญลักษณ์ ● แทน 0.05 M acetate buffer, pH 4-6 ส่วน ● แทน 0.05 M phosphate buffer, pH 6-7 และ ● แทน 0.05 M acetate buffer, pH 7-11

จากภาพที่ 14 และ 15 พบว่าไลเปสจาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ อุณหภูมิ 30°C ใน สารละลาย 0.05 M Tris-HCl buffer ที่มีค่า pH เท่ากับ 8.0 เพื่อให้การศึกษาการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์มีประสิทธิภาพ ดังนั้นการทดลองในลำดับถัดไปจะเป็นการทดลองที่ อุณหภูมิ 30°C ใน 0.05 M Tris-HCl buffer ที่มีค่า pH เท่ากับ 8.0

5.8 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์

5.8.1 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ไลเปส

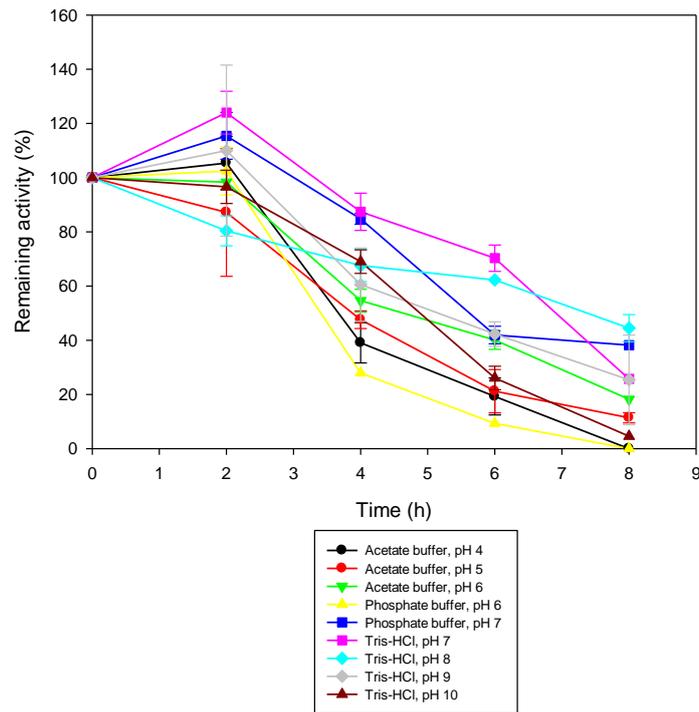
ในการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของไลเปส พบว่าไลเปสที่ได้จาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 4°C ได้ดีที่สุด โดยการทำงานของไลเปสหรือแอกติวิตีของไลเปสลดลงไปประมาณ 20% เมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิดังกล่าวเป็นเวลา 8 ชั่วโมง เมื่อนำไลเปสไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C พบว่าไลเปสยังคงทำงานได้เหมือนเดิมที่เวลา 2 ชั่วโมงแรก แต่เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมงพบแอกติวิตีของไลเปสค่อยๆ ลดลง จนเมื่อเวลาผ่านไป 8 ชั่วโมงการทำงานของไลเปสลดลงไปถึง 80% เช่นเดียวกับกรณีที่บ่มไลเปสไว้ที่อุณหภูมิ 37 และ 40°C ในระยะ 2 ชั่วโมงแรกภายหลังการบ่มนั้น การทำงานของเอนไซม์จะมีค่าลดลงไม่มากนัก แต่เมื่อทำการบ่มเอนไซม์ต่อไปการทำงานจะลดลงอย่างมาก ดังภาพที่ 16 ทั้งนี้เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์จาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิที่ทดสอบได้ถึงแม้จะทำการบ่มไว้เพียง 2 ชั่วโมงก็ตาม (ดังภาพที่ 16)



รูป 16 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของไลเปสที่ได้จาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3

5.8.2 ผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ไลเปส

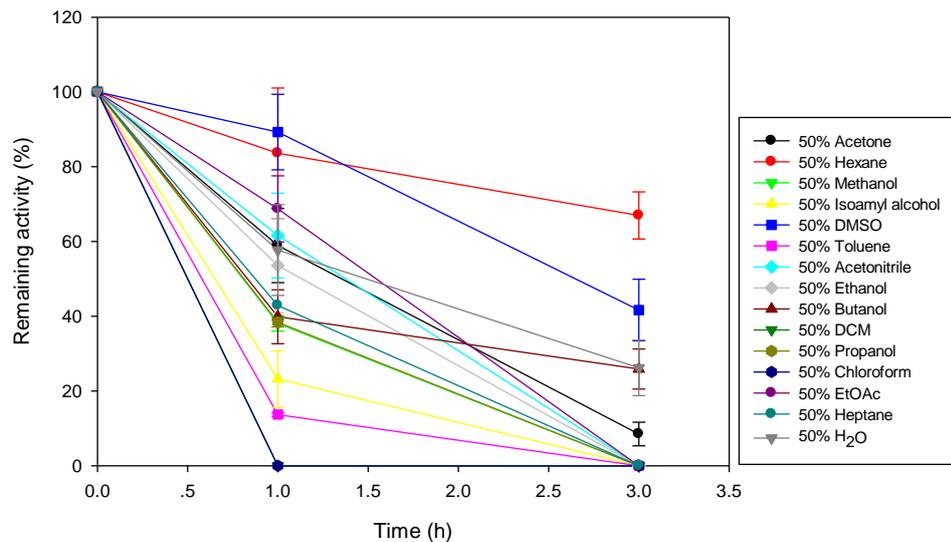
เมื่อนำไลเปสมาบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่มีค่า pH อยู่ในช่วง 4.0-10.0 แล้วทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 2, 4 และ 8 ชั่วโมง มาวัดความการทำงานของไลเปส พบว่าไลเปสมีความเสถียรในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl, pH 8.0 มากที่สุดโดยไลเปสยังคงมีแอกติวิตีที่เหลือ 44.45% เมื่อทำการบ่มในบัฟเฟอร์ดังกล่าวที่ 8 ชั่วโมง ทั้งนี้พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวยังคงสามารถทำงานได้ดีเมื่อบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ ที่มีค่า pH อยู่ในช่วง 4.0-10.0 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ภาพที่ 17)



รูป 17 ผลของ pH ต่อความเสถียรของไลเปสที่ได้จาก *Bacillus sp.* ไอโซเลต SC3

5.8.3 ผลของชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของไลเปสจาก *Bacillus sp.* ไอโซเลต SC3

การทดลองนี้เป็นการศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ ต่อความเสถียรของไลเปสที่ได้จาก *Bacillus sp.* ไอโซเลต SC3 โดยตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้เป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีการประยุกต์ใช้จริงในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไลเปส คือ acetone, hexane, methanol, isoamyl alcohol, DMSO, toluene, acetonitrile, ethanol, butanol, DCM, chloroform และ heptanes สำหรับน้ำนั้นใช้เป็นตัวอย่างควบคุม จากภาพที่ 18 พบว่าไลเปสยังคงสามารถทำงานได้ดีโดยมี remaining activity อยู่ที่ 67% เมื่อทำการบ่มในสารละลาย 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 ที่มี hexane ความเข้มข้น 50% เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ตัวทำละลายอินทรีย์ที่สามารถทำให้เอนไซม์ยังคงทำงานได้ดีรองลงมาเมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง คือ DMSO โดยมี % remaining activity ประมาณ 41% ในขณะที่น้ำนั้นส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์อย่างเห็นได้ชัด โดยพบว่าไลเปสที่ได้จาก *Bacillus sp.* ไอโซเลต SC3 นั้นมี remaining activity อยู่ประมาณ 26% เท่านั้นซึ่งใกล้เคียงกับการบ่มเอนไซม์ในสารละลาย 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 ที่มี butanol ความเข้มข้น 50% ดังภาพที่ 18 ทั้งนี้เมื่อพิจารณา remaining activity ของไลเปสจาก *Bacillus sp.* ไอโซเลต SC3 ในตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ พบว่าตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ ที่ทดสอบ เช่น acetone, methanol, isoamyl alcohol, toluene, acetonitrile, ethanol, butanol, DCM, chloroform และ heptanes นั้นส่งผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ดังกล่าว ดังจะสังเกตได้จากภาพที่ 18 % remaining activity ของไลเปสมีค่าต่ำกว่า 10% ภายหลังจากที่ทำการบ่มเอนไซม์ดังกล่าวเป็นเวลา 3 ชั่วโมง



รูป 18 ผลของชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของไลเปสที่ได้จาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3

จากการทดสอบผลของอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่าการเก็บรักษาเอนไซม์ไลเปสที่ได้จาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 ที่อุณหภูมิ 4°C ในสารละลาย 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 ในภาวะที่มี hexane เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีอยู่

5.9 การประยุกต์ใช้ *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 ในรูปของ whole microorganisms และเอนไซม์อิสระ (free enzyme) ในปฏิกิริยา transesterification

เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 มาประยุกต์ใช้ในด้านเคมีสะอาด ปฏิกิริยา transesterification ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่พบได้บ่อยในการสังเคราะห์สารอินทรีย์ ปฏิกิริยาดังกล่าวจึงถูกเลือกใช้ในการทดลองนี้ ทั้งนี้หากมีน้ำอยู่ในปฏิกิริยา น้ำจะรบกวนการเกิดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาได้ ดังนั้น crude enzyme ของ *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 จึงถูกนำมาทำให้แห้งเป็นผงโดยใช้เครื่องระเหิดแห้ง ก่อนทำปฏิกิริยากับ vinyl stearate และ 1-pentanol จากตารางที่ 14 พบว่าการทำปฏิกิริยาที่ 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°C สามารถก่อให้เกิดปริมาณของ pentyl stearate ได้ดีกว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่า crude enzyme จาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 สามารถเร่งปฏิกิริยา transesterification ได้ดีกว่าเซลล์ถึง 141.1 เท่าที่เวลา 24 ชั่วโมง

ตาราง 14 Transesterification activity ของเซลล์และ crude enzyme ของ *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 ในการทำปฏิกิริยาระหว่าง 1-pentanol และ stearate ที่อุณหภูมิ 37°C

<i>Bacillus</i> sp. ไอโซเลต SC3	Transesterification activity ($\mu\text{mole} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}^{-1}$)	
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
Cells	0.05±0.00	0.03±0.01
Crude enzyme	7.07±0.82	1.47±0.46

5.10 ศึกษาความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 ในปฏิกิริยา transesterification

จากการทดลองที่ 5.9 พบว่า crude enzyme ของ *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา transesterification ได้ดีกว่าเซลล์ของแบคทีเรียดังกล่าว ดังนั้น crude enzyme ของ *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 จึงถูกใช้ในการทดสอบความจำเพาะเจาะจงของสารตั้งต้นต่อการทำงานของเอนไซม์ไลเปส จากตารางที่ 15 เมื่อพิจารณาความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 ระหว่าง vinyl esters แต่ละชนิดกับ alcohol ที่มีหมู่ไฮดรอกซิลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1, 2 และ 3 พบว่า เอนไซม์ไลเปสที่ *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 ผลิตรวมสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับ vinyl acetate และ 2-pentanol ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ vinyl stearate และ 2-pentanol ตามด้วย vinyl butyrate และ 2-pentanol ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบความสามารถในการทำปฏิกิริยาระหว่าง vinyl esters ทั้งสามกับ 3-pentanol พบว่าเอนไซม์ไลเปสมีความสามารถในการเร่งการปฏิกิริยาระหว่าง vinyl stearate และ 3-pentanol ได้น้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบ transesterification activity ระหว่าง 3-pentanol กับ vinyl acetate และ vinyl butyrate ทั้งนี้เมื่อใช้ 1-pentanol ในการทำปฏิกิริยากับ vinyl esters ทั้งสามชนิดนั้น พบว่าเอนไซม์ไลเปสมีความสามารถในการเร่งการเกิดปฏิกิริยา transesterification ได้ไม่แตกต่างกัน

ตาราง 15 Transesterification activity ของไลเปสจาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 เมื่อทำปฏิกิริยากับ vinyl esters และ alcohol แต่ละชนิด

Vinyl esters	Alcohol	Transesterification activity ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)*
Vinyl acetate	1-pentanol	6.27±0.09
	2-pentanol	15.54±3.65
	3-pentanol	7.07±0.82
Vinyl butyrate	1-pentanol	7.12±1.32
	2-pentanol	8.11±0.39
	3-pentanol	6.64±0.48
Vinyl stearate	1-pentanol	6.68±0.66
	2-pentanol	9.23±0.73
	3-pentanol	4.35±1.02

* ที่อุณหภูมิ 37°C เวลา 24 ชั่วโมง

5.11 การตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วยเทคนิค entrapment

เพื่อให้การนำเอนไซม์ที่ *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 ไปประยุกต์เกิดประสิทธิภาพ การทดลองนี้จึงได้ทำการตรึงเอนไซม์ไลเปสที่ *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 ด้วยเทคนิค entrapment ซึ่งเทคนิค entrapment ที่เลือกใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่ sodium alginate, polyacrylamide และ polyvinyl alcohol จากตารางที่ 16 พบว่าเมื่อนำเอนไซม์ไปตรึงด้วยวิธี sodium alginate เอนไซม์ที่ผ่านการตรึงสามารถเร่งปฏิกิริยา hydrolysis ได้ดีกว่าวิธีการตรึงด้วย polyacrylamide และ polyvinyl alcohol ทั้งนี้ไม่สามารถตรวจพบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา transesterification ของเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงด้วย sodium alginate, polyacrylamide และ polyvinyl alcohol เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ที่เท่ากัน ดังตารางที่ 16

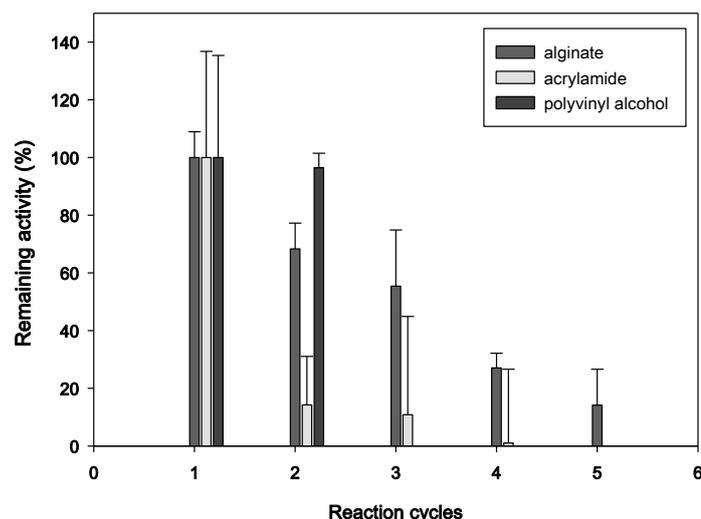
ตาราง 16 Specific activity ของเอนไซม์ไลเปสที่ผ่านการตรึงด้วยวิธี sodium alginate, polyacrylamide และ polyvinyl alcohol ในการเร่งปฏิกิริยา hydrolysis และ transesterification

วิธีการตรึง	Specific activity	
	Hydrolysis activity	Transesterification activity
Sodium alginate	5.793 ± 0.816	ND
Polyacrylamide	2.595 ± 0.955	ND
Polyvinyl alcohol	0.268 ± 0.000	ND

ND: ไม่พบ transesterification activity

5.12 การศึกษาความสามารถของเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงด้วยเทคนิค entrapment ในการนำกลับมาใช้ (recycling cycles)

จากผลการทดลองในหัวข้อ 5.11 พบเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงด้วยเทคนิค entrapment ไม่ว่าจะเป็น sodium alginate, polyacrylamide และ polyvinyl alcohol แสดงความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา hydrolysis ได้ดีกว่าปฏิกิริยา transesterification ดังนั้นในการศึกษาความสามารถในการนำกลับมาใช้จึงเลือกทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา hydrolysis แต่เพียงอย่างเดียว จากผลการศึกษาความสามารถในการนำกลับมาใช้ของเอนไซม์ไลเปสที่ผ่านตรึง พบว่าการตรึงเอนไซม์ด้วยโดยใช้ sodium alginate สามารถนำเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงกลับมาใช้ได้ถึง 5 รอบโดยยังคงมี remaining activity อยู่ที่ประมาณ 14% ในรอบที่ 5 ของการเร่งปฏิกิริยา (รูป 19) ส่วนการตรึงเอนไซม์โดยใช้ polyacrylamide สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ได้ 4 รอบ แต่ถ้าพิจารณา remaining activity จะพบว่า activity ของเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงด้วย polyacrylamide ในรอบที่ 2 ของการทดสอบลดลงไปมากกว่า 80% ของ activity เริ่มต้น (รูป 19) ในขณะที่ polyvinyl alcohol มี remaining activity ลดลงเพียงเล็กน้อยในรอบที่ 2 ของการนำเอนไซม์มาใช้ แต่ทั้งนี้ไม่สามารถตรวจวัด activity ของเอนไซม์ดังกล่าวในรอบที่ 3 ได้ (รูป 19)



รูป 19 % Remaining activity และจำนวนครั้งในการนำกลับมาใช้ใหม่ (recycling cycles) ของของเอนไซม์ไลเปสที่ผ่านการตรึงด้วย sodium alginate, polyacrylamide และ polyvinyl alcohol

บทที่ 6 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

6.1 วิจารณ์ผลการทดลอง

6.1.1 การแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์

จากการแยกจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในอาหารกึ่งแข็งที่มี 1%(v/v) isopropanol จากตัวอย่างดิน และน้ำทั้งหมด 8 แหล่งในจังหวัดลำปาง เชียงใหม่ ชลบุรี สมุทรปราการ ตรัง และนครราชสีมา โดยใช้เทคนิค pour plate พบว่ามีจุลินทรีย์ทั้งหมด 38 ไอโซเลตที่สามารถเจริญได้ แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถทนต่อภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์อยู่ โดยแหล่งดินจากอุทยานแห่งชาติแจ้ซ้อน จังหวัดลำปาง พบจุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ที่มากที่สุด 15 ไอโซเลต ซึ่งดินบริเวณดังกล่าวอาจจะมีสารอาหาร แร่ธาตุ โดยเฉพาะแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนซึ่งเป็นธาตุอาหารที่สำคัญต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ในปริมาณที่เหมาะสม และเพียงพอต่อความต้องการของจุลินทรีย์มากกว่าบริเวณแหล่งอื่นๆ จุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำละลายเหล่านี้จัดเป็น extremophilic microorganisms สามารถปรับตัวให้อยู่รอดในภาวะแวดล้อมที่มีตัวทำละลายอินทรีย์²⁶ เพื่อยืนยันผลการคัดกรองจุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ จุลินทรีย์ที่แยกได้ทั้งหมดจำนวน 38 ไอโซเลต ถูกนำมาเลี้ยงบน standard method agar ที่ผสม 1, 2.5, 5 และ 10% (v/v) isopropanol โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์สูงขึ้น จำนวนโคโลนีและชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้มีจำนวนน้อยลง เนื่องจาก isopropanol อาจซึมผ่านเข้าไปที่เยื่อหุ้มเซลล์แล้วสะสมอยู่ในเซลล์ หรือทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์แตก⁷ โดยแหล่งน้ำเสียจากโรงงานผลิตเครื่องดื่มในจังหวัดสมุทรปราการ มีจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีบนอาหารที่มี isopropanol ได้ถึง 10% จำนวนมากที่สุด

6.1.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์

จุลินทรีย์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ นอกจากจะสามารถปรับตัวให้อยู่รอดในภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ได้แล้ว โดยทั่วไปจุลินทรีย์ดังกล่าวจะผลิตเอนไซม์ที่ทำงานได้ในภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์เช่นเดียวกัน²⁵ เอนไซม์ที่มีคุณสมบัติทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์มีประโยชน์อย่างมากในระดับอุตสาหกรรม^{7,15,18} จากการทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของจุลินทรีย์ทั้ง 38 ไอโซเลต โดยสังเกตจากวงใสที่เอนไซม์ที่จุลินทรีย์ดังกล่าวทำการย่อยหางนมในอาหารทดสอบ ซึ่งอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสต่อโคโลนีบนอาหารกึ่งแข็งสามารถระบุประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลตได้ จุลินทรีย์ที่ผลิตโปรติเอสได้มีจำนวน 21 ไอโซเลต โดยไอโซเลต KY32 แยกได้จากดินบริเวณเขาใหญ่ WB22 แยกจากน้ำเสียในจังหวัดสมุทรปราการ และ J31 จากแยกจากดินในอุทยานแห่งชาติแจ้ซ้อน มีอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสต่อโคโลนีสูงสุด 3 อันดับแรก ส่วนการตรวจสอบการผลิตไลเปสของจุลินทรีย์โดยการสังเกตการเรืองแสงของสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจากการรวมตัวระหว่าง rhodamine B และ fatty acid ที่ได้จากการสลายน้ำมันมะกอก ภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ความยาวคลื่น 365 nm³⁴ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไลเปสได้มีทั้งหมดเพียง 3 ไอโซเลต โดย ไอโซเลต KY21 เกิดการเรืองแสงภายใต้รังสีอัลตราไวโอเล็ตใช้ระยะเวลาสั้นที่สุด ส่วน SK21 จากน้ำพุร้อน และ SC3 จากอ่างศิลา ใช้ระยะเวลาในการผลิตไลเปสที่นานกว่า ตามลำดับ สำหรับการศึกษาการผลิตเอนไซม์ออกซิเดสที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นจะอาศัยการติดตามสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ oxidase และ N, N, N', N'-tetramethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride (reduced TMPD) คือ oxidized TMPD ซึ่งมีสีฟ้า แต่ทั้งนี้ในการวิเคราะห์การผลิตเอนไซม์ oxidase ดังกล่าวไม่สามารถระบุความสามารถในการผลิตได้ ประกอบกับการนำเอนไซม์ในกลุ่ม oxidase ไปใช้ในภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์มีความต้องการน้อยกว่าในกรณีของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกศึกษาจุลินทรีย์ที่

ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์และผลิตโปรตีนเอสและไลเปสได้ โดยพิจารณาเลือกจุลินทรีย์จากความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ซึ่งได้แก่จุลินทรีย์ไอโซเลต KY32, WB22, J31, KY21, SK21 และ SC3

6.1.3 การศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่คัดเลือก

ในการทดลองนี้ได้ทำการเลือกชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า log P ที่แตกต่างกัน ได้แก่ dimethyl sulfoxide, acetone, isopropanol, methanol, isoamyl alcohol, hexane และ toluene ซึ่งค่า log P ที่แตกต่างกันจะแสดงถึงความสามารถในการกระจายตัวของสารในชั้นน้ำและชั้นออกทานอลที่ต่างกัน ซึ่งโดยทั่วไปแล้วสารละลายที่มีความเป็นขั้วต่ำจะมีค่า log P สูง ส่วนสารละลายที่มีความเป็นขั้วสูงจะมีค่า log P ต่ำ^{23, 24} จากผลการทดสอบจุลินทรีย์พบว่าจุลินทรีย์ไอโซเลต KY21 สามารถเจริญได้ในอาหารเหลว ที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ 6 ชนิด ได้แก่ dimethyl sulfoxide, acetone, isopropanol, methanol, toluene และ hexane ที่ความเข้มข้นสูงสุด 10, 10, 5, 20, 30 และ 15%(v/v) ส่วนจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 และ J31 พบว่ามีความสามารถในการเจริญในภาวะที่มี hexane ได้สูงที่สุดโดยสามารถเจริญได้ในภาวะที่มี hexane ถึง 90%(v/v) และยังคงรอดชีวิตได้ใน hexane 100%(v/v) จากผลดังกล่าวทำให้แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์สามารถทนต่อความเข้มข้นสูงสุดของตัวทำละลายแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน จุลินทรีย์บางไอโซเลตสามารถเจริญได้น้อยในภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า log P ที่ต่ำ อาจมีสาเหตุจากการที่ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า log P ต่ำแสดงควมมีขั้วสูงและสามารถการกระจายตัวในน้ำได้ดี จึงเคลื่อนเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ผ่าน lipid membrane bilayer ได้มาก ส่งผลให้จุลินทรีย์เจริญได้ลดลงหรือตายได้ในที่สุด ในขณะที่ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า log P สูง ตัวทำละลายอินทรีย์จะสะสมในเซลล์ได้แต่มีความเข้มข้นจะไม่สูง เนื่องจากความสามารถในการละลายและการกระจายตัวในน้ำที่ต่ำ⁷

6.1.4 การศึกษาการเจริญและความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ที่คัดเลือก

ปัจจัยสำคัญที่ใช้ในการคัดเลือกจุลินทรีย์นอกจากความสามารถของจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์แล้ว คือ ความสามารถของจุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองเพื่อประเมินความสามารถของจุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์ที่สนใจ ได้แก่ โปรตีนเอส และไลเปส โดยในการประเมินประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์นั้นเป็นการทดสอบความสามารถของจุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์ในภาวะปกติและภาวะที่มีการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ด้วยการเติมสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวเหนี่ยวนำให้จุลินทรีย์สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีขึ้น

จากการติดตามการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ไอโซเลต KY21, SK21 และ SC3 ซึ่งสามารถผลิตไลเปสได้ พบว่าจุลินทรีย์ทั้งสามไอโซเลตมีการเจริญสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง ทั้งนี้พบว่าการเติมน้ำมันมะกอกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ส่งผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ไอโซเลต KY21 ในขณะที่การเติมน้ำมันมะกอกไม่ส่งผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลต SK21 แต่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยพบว่าจุลินทรีย์ไอโซเลต SK21 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวปกติสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดในช่วงเวลาที่ยุติเจริญได้สูงสุด แต่เมื่อทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลต SK21 ในภาวะเหนี่ยวนำ พบว่าการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์จะผลิตได้ดีในช่วงที่จุลินทรีย์เจริญอยู่ในระยะ stationary phase โดยมี activity ที่สูงกว่าจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในภาวะปกติประมาณ 1.7 เท่า เมื่อทำการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 กับไอโซเลต KY21 และ SK21 พบว่าจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีกว่าจุลินทรีย์ทั้งสองไอโซเลต เมื่อพิจารณาผลของการเติมน้ำมันมะกอกต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของจุลินทรีย์ดังกล่าวพบว่าความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 ในระยะที่จุลินทรีย์เจริญอยู่ในช่วง late log และ early stationary phases ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จนเมื่อจุลินทรีย์เจริญเข้าสู่ระยะ late stationary phase จุลินทรีย์ที่เลี้ยงในอาหารปกติจะไม่สามารถผลิตเอนไซม์ได้อีกแล้ว ซึ่งตรงข้ามกับจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีการเติมน้ำมันมะกอกหรือภาวะเหนี่ยวนำที่ยังคงสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้อยู่และมีการผลิตที่

สูงกว่าระยะอื่นๆ ทั้งนี้เมื่อพิจารณาลักษณะการเจริญที่เวลาของจุลินทรีย์ในภาวะเหนี่ยวนำเปรียบเทียบกับภาวะปกติจะพบว่าจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในภาวะเหนี่ยวนำมีจำนวนลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อเข้าสู่ late stationary phase เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 ที่เลี้ยงในภาวะปกติที่ระยะเวลาเดียวกัน ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าในระยะแรกจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 อาศัยสารอาหารที่มีในอาหารเหลวเพื่อใช้ในการเจริญจนกระทั่งสารอาหารหมดไป จุลินทรีย์ดังกล่าวจึงผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อสามารถนำน้ำมันมะกอกมาใช้เป็นแหล่งอาหารและพลังงานในการเจริญต่อไปได้

สำหรับการศึกษาความเจริญและความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของจุลินทรีย์ไอโซเลต KY32, WB22 และ J31 นั้นพบว่าในภาวะปกติจุลินทรีย์ทั้งสามมีความสามารถในการเจริญและผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในภาวะเหนี่ยวนำที่มีการเติมหางนมลงไปในการอาหารเหลวพบว่าจุลินทรีย์ไอโซเลต J31 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงกว่าจุลินทรีย์ไอโซเลตอื่นๆ ที่เลี้ยงในภาวะเหนี่ยวนำ โดยจุลินทรีย์ไอโซเลต J31 ผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่เวลา 72 ชั่วโมงและมีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงกว่าภาวะปกติถึง 15-65 เท่า ในขณะที่จุลินทรีย์ไอโซเลต KY32 และ WB22 ที่เลี้ยงในภาวะเหนี่ยวนำสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงจากเดิมเพียง 2-5 เท่า ส่วนการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งสามไอโซเลตในภาวะเหนี่ยวนำนั้นพบว่าการเติมหางนมลงไปจะช่วยให้จุลินทรีย์ไอโซเลต KY32 และ J31 เจริญได้มากขึ้นกว่าภาวะปกติเล็กน้อย

จากความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ทั้ง 6 ไอโซเลต พบว่าจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 และ J31 เป็นจุลินทรีย์ที่น่าสนใจ เนื่องจากจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 และ J31 เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงกว่าไอโซเลตอื่นๆ ที่ทดสอบเมื่อทำการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ ทั้งนี้พบว่าการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 สามารถกระทำได้ทั้งในภาวะที่เลี้ยงในอาหารเหลวปกติและภาวะเหนี่ยวนำ

6.1.5 การศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ที่

คัดเลือก

เนื่องจากจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 และ J31 สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้นที่แตกต่าง โดยจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 เจริญได้ในอาหารเหลวที่มีการเติม acetone, isopropanol, methanol, toluene และ hexane ที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ 10, 10, 5, 10 และ 90%(v/v) ส่วนจุลินทรีย์ไอโซเลต J31 สามารถเจริญได้ในอาหารเหลวที่มีการเติม acetone, isopropanol, methanol, toluene และ hexane ที่ความเข้มข้นสูงสุด 5, 5, 10, 10 และ 90%(v/v) เพื่อทำการศึกษาผลของชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ทั้งสอง ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการเลือกความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ 5%(v/v) ในการทดสอบ เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาที่อาจเกิดจากผลของความเข้มข้นของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการผลิตเอนไซม์

เมื่อทำการเปรียบเทียบการเจริญของจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 ในอาหารที่ไม่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์และน้ำมันมะกอก (ภาวะควบคุมที่ 1) พบว่าการเติม methanol, isopropanol และ hexane ลงในอาหารเลี้ยงไม่ส่งผลต่อการปรับตัวของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์สามารถเจริญเข้าสู่ระยะ log phase ได้ทันทีหลังจากถ่ายเชื้อเช่นเดียวกับภาวะควบคุมทั้งสองภาวะ เนื่องจากกราฟมีความชันใกล้เคียงกับกับภาวะควบคุมที่ 1 และ 2 ส่วนในภาวะที่มี 5%(v/v) toluene จุลินทรีย์จะใช้ระยะเวลาในการปรับตัวที่ยาว ทำให้มีช่วง lag phase ที่ยาว ซึ่งเมื่อจุลินทรีย์ปรับตัวได้แล้ว จะมีการเจริญแบบทวีคูณ หรือเข้าสู่ระยะ log phase และมีการเจริญในลักษณะคงที่หรือระยะ stationary phase ในลำดับถัดไป

จากการติดตามการผลิตไลเปสของจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 ในอาหารเหลวที่มี methanol, isopropanol, toluene และ hexane เทียบกับภาวะควบคุม ที่ช่วงเวลาต่างๆ โดยใช้ *p*-nitrophenyl palmitate ซึ่งละลายใน isopropanol (solution A) เอนไซม์ไลเปสจะสลายพันธะเอสเทอร์ของ *p*-

nitrophenyl palmitate เกิดสารผลิตภัณฑ์ คือ *p*-nitrophenol ที่มีสีเหลืองดูคลีนแสงได้ที่ยาวคลื่น 410 nm และ palmitic acid ซึ่งเป็นกรดไขมันที่ทำให้เกิดความขุ่น และทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของ *p*-nitrophenol เกิดการเบี่ยงเบนได้ การเติม triton X-100 นอกจากจะช่วยหยุดปฏิกิริยาแล้ว ยังช่วยลดความขุ่นที่เกิดขึ้น เนื่องจากสามารถทำให้กรดไขมันที่รวมตัวอยู่เกิดการกระจายตัวในสารละลาย ทำให้สารละลาย³⁵ จากผลการทดลองพบว่าจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเติม hexane สามารถผลิตไลเปสได้สูงสุด ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยมีแอกติวิตีของไลเปสเท่ากับ 36.84 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามด้วย จุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเติม methanol ที่เวลา 72 ชั่วโมง โดยมีแอกติวิตีของไลเปสเท่ากับ 12.96 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Anbu และคณะ³⁶ ที่พบว่า *Bacillus licheniformis* PAL05 สามารถผลิตไลเปสได้สูงขึ้นเมื่อเติม hexane หรือ ethanol ลงไป 20%(v/v) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Hun และคณะที่พบว่าเมื่อเลี้ยง *Bacillus sphaericus* 205y ในอาหารที่มีการเติม hexane แอกติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจาก crude enzyme ของ *B. sphaericus* 205y มีค่าเพิ่มขึ้น ถึง 3.5 เท่า เนื่องจากเอนไซม์จะมีความเสถียรเมื่ออยู่ในสารละลายที่มี hydrophilic หรือ hydrophobic organic solvent มากกว่าเมื่ออยู่ในสารละลายที่ไม่มีตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งการเติมสารละลายอินทรีย์ลงไปจะช่วยให้โครงสร้างของเอนไซม์เสถียรมากขึ้น³⁷

สำหรับการศึกษาผลของ acetone, methanol, isopropanol, toluene และ hexane ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ไอโซเลต J31 ในภาวะควบคุมที่ 1 (ไม่มีตัวทำละลายอินทรีย์ และไม่มีสารเติม inducer) และภาวะควบคุมที่ 2 ซึ่งมีการเติม skim milk เพื่อเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์โปรติเอส พบว่าการเติม toluene และ isopropanol ลงไปจะส่งผลกระทบต่อระยะเวลาในการปรับตัวของจุลินทรีย์ ในขณะที่ methanol, acetone และ hexane ไม่ส่งผลกระทบต่อระยะเวลาในการปรับตัวหรือของจุลินทรีย์ เมื่อจุลินทรีย์สามารถปรับตัวได้แล้ว จะมีการเจริญแบบทวีคูณ และมีการเจริญในลักษณะคงที่ ในส่วนของผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส พบว่าการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ไม่ว่าจะเป็น acetone, methanol, isopropanol, toluene และ hexane ไม่สามารถเพิ่มความสามารถในการผลิตเอนไซม์ให้สูงขึ้นได้เช่นเดียวกับกรณีของจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 ความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของจุลินทรีย์ไอโซเลต J31 จะเพิ่มสูงขึ้น เมื่อมีการเติม skim milk ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์

6.1.6 การจำแนกจุลินทรีย์ที่คัดเลือกโดยอาศัยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บน ribosomal DNA

(rDNA)

จากผลการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ จุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 และ J31 ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอสได้ดีกว่าจุลินทรีย์ไอโซเลตอื่นที่ทดสอบ ดังนั้นจุลินทรีย์ทั้ง 2 ไอโซเลตจึงถูกนำมาวิเคราะห์และจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บน 16S rDNA จากผลของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ที่วิเคราะห์ พบว่าจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 มีโอกาสที่จะเป็น *B. aerophilus*, *B. altitudinis* และ *B. stratosphericus* มากที่สุด แต่จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณที่ทำการทดลองนี้ไม่สามารถระบุได้ species ของจุลินทรีย์ได้แน่ชัด ระบุได้เพียง genus เท่านั้น ส่วนจุลินทรีย์ไอโซเลต J31 นั้นมีความคล้ายคลึงกับ *B. anthracis* และ *B. cereus* ถึง 100% แต่เนื่องจาก *B. anthracis* เป็นจุลินทรีย์ที่มีอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์³⁸ ดังนั้นในการทดลองขั้นถัดไป ผู้วิจัยจึงเลือกใช้เอนไซม์ที่จุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 หรือ *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 ผลิตขึ้นแต่เพียงเอนไซม์เดียว

6.1.7 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของไลเปสจาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3

ในการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของไลเปสที่ *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 ผลิตขึ้นนั้นพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ทำให้เอนไซม์ไลเปสที่จุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 ที่เลี้ยงในภาวะที่มี hexane

5%(v/v) สามารถทำงานได้ คือ อุณหภูมิที่ 30°C รองลงมา คือ 37 และ 40°C ตามลำดับ ดังนั้นอุณหภูมิ 30°C เป็นอุณหภูมิที่ทำให้โครงสร้างระดับตติยภูมิของเอนไซม์มีความเสถียรและเข้าจับกับ *p*-nitrophenyl palmitate ได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *B. licheniformis* PAL05, *Pseudomonas* sp. (MSI057) และ *Acinetobacter* sp. BK43 มีการทำงานที่อุณหภูมิ 30°C ได้ดีที่สุด^{36, 39, 40}

จากการทดสอบหาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสจาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 ที่เลี้ยงในภาวะที่มี hexane 5%(v/v) โดยกำหนดให้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยามีค่าคงที่ที่ 30 องศาเซลเซียส แล้วทำการทดสอบการทำปฏิกิริยาในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH ต่างๆ พบว่าไลเปสที่ผลิตมีค่าแอดวิตีวี่สูงสุดในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 ตามด้วยการทดสอบในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M Tris-HCl, pH 9.0 และ 0.05 M Tris-HCl, pH 7.0 เช่นเดียวกับการทำงานของเอนไซม์ไลเปสของ *B. licheniformis* PAL05 ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์³⁶

6.1.8 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3

เมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และชนิดของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสที่ *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 ผลิตขึ้นพบว่าที่อุณหภูมิ 4°C เอนไซม์ไลเปสที่มีความเสถียรที่สุด โดยเอนไซม์มีการทำงานลดลงประมาณ 20% เมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 8 ชั่วโมง ในขณะที่การบ่มเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50°C นั้นทำให้เอนไซม์สูญเสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 ของการทดสอบซึ่งอาจเกิดจากอุณหภูมิที่สูงทำให้เอนไซม์เกิดการเสียสภาพหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทำให้ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ สำหรับการทดสอบผลของความเป็นกรด-ด่างต่อความเสถียรของไลเปสจาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรมากที่สุดในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 ซึ่งเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่ทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุด ส่วนการศึกษาชนิดตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ ต่อความเสถียรของเอนไซม์ไลเปสที่ *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 ผลิตขึ้นนั้น พบว่าเอนไซม์ไลเปสยังคงทำงานได้ดีในภาวะที่มี 50%(v/v) hexane เช่นเดียวกับเอนไซม์ไลเปสที่พบใน *B. licheniformis* PAL05, *Bacillus megaterium* และ *Pseudomonas putida* ECU1011 ที่ยังคงทำงานได้เมื่อในภาวะที่มี 50%(v/v) ของ hexane^{36 41 42} ทั้งนี้เอนไซม์ไลเปสที่ *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 ผลิตขึ้นยังคงสามารถทำงานได้สูงกว่า 20% ในภาวะที่มีการบ่มไว้ที่ 50%(v/v) DMSO และ butanol นาน 3 ชั่วโมง การที่เอนไซม์ไลเปสที่ *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 ยังคงทำงานได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีค่า log P ที่แตกต่างกัน แสดงถึงความเป็นไปได้ในการนำเอนไซม์ดังกล่าวไปประยุกต์กับการเร่งในระบบที่มี polar solvents และ non-polar solvent ความเสถียรของเอนไซม์ในตัวทำละลายอินทรีย์โดยมากขึ้นอยู่กับลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ ซึ่งอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ดังกล่าวอาจจะเกี่ยวข้องกับ active site หรือโครงสร้างของเอนไซม์^{43, 44}

6.1.9 การประยุกต์ใช้ *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 ในรูปของ whole microorganism และเอนไซม์อิสระในปฏิกิริยา transesterification

จากสมบัติของไลเปสที่ *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 ที่ยังคงทำงานได้ดีในภาวะที่มี hexane ซึ่งเป็นตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้ในปฏิกิริยา transesterification ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำ crude enzyme และเซลล์ของ *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 มาทำการเร่งปฏิกิริยา transesterification ระหว่าง vinyl acetate กับ pentanol²⁹ จากผลการทดลองพบว่า crude enzyme สามารถเร่งการเกิด pentyl sterate ได้สูงกว่าเซลล์ของแบคทีเรีย เมื่อทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

6.1.10 การศึกษาความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นของเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 ในปฏิกิริยา transesterification

เพื่อให้ได้ข้อมูลในส่วนของความจำเพาะเจาะจงของสารตั้งต้นต่อการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ไลเปสที่เป็นประโยชน์ต่อการนำเอนไซม์ที่ *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 ผลิตขึ้น ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้เลือกใช้ vinyl acetate, vinyl butyrate และ vinyl stearate เป็นสารตั้งต้นที่จะทำปฏิกิริยากับ 1-pentanol, 2-pentanol หรือ 3-pentanol ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 มีความจำเพาะต่อ 2-pentanol และ vinyl acetate มากที่สุด ทั้งนี้เมื่อทำการเปรียบเทียบ transesterification activity กับระหว่าง vinyl ester ทั้งสามพบว่า vinyl acetate เป็นสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะมากกว่า vinyl butyrate และ vinyl stearate เนื่องจากสามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยา transesterification ได้ดีกว่า vinyl ester อื่นๆ และจากการเปรียบเทียบการใช้ alcohol ทั้ง 3 พบว่าการใช้ 2-pentanol เป็น alcohol ที่มีความจำเพาะกับเอนไซม์นี้สูงกว่า 1-pentanol และ 3-pentanol ซึ่งความจำเพาะเจาะจงในของเอนไซม์ไลเปสในการเข้าทำปฏิกิริยากับ secondary alcohol แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำเอนไซม์นี้ไปใช้ในอุตสาหกรรมเคมีหรือการผลิตยาที่ต้องอาศัยความจำเพาะในการเลือกทำปฏิกิริยา⁴⁵

6.1.11 การตรึงเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 โดยใช้เทคนิค entrapment

เพื่อให้การใช้เอนไซม์ไลเปสที่ *Bacillus* sp. SC3 ผลิตขึ้นเกิดประสิทธิภาพสูงสุด ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการตรึงเอนไซม์โดยอาศัยวิธีการ entrapment ซึ่งเป็นวิธีการตรึงเอนไซม์ที่เลือกใช้สำหรับการทดลองนี้ คือ การตรึงเอนไซม์โดยใช้ sodium alginate, polyacrylamide และ polyvinyl alcohol โดยทั้ง 3 วิธีนี้มีขั้นตอนในการตรึงที่ไม่ซับซ้อน และมีค่าใช้จ่ายที่ไม่สูงนัก ทั้งนี้โดยทั่วไปการตรึงเอนไซม์ด้วยวิธีการ entrapment นั้นอาจทำให้ activity ของเอนไซม์มีระดับที่ต่ำกว่า activity ของเอนไซม์อิสระ^{30,32} จากการทดสอบพบว่า sodium alginate มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยา hydrolysis และสามารถนำเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงกลับมาใช้ได้จำนวนรอบสูงที่สุด ในขณะที่เอนไซม์ที่ผ่านการตรึงด้วยวิธี polyacrylamide สามารถเร่งปฏิกิริยา hydrolysis และมีจำนวนรอบในการนำกลับมาใช้ได้เป็นอันดับถัดมา ถึงแม้ว่าความสามารถของเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงด้วยวิธีนี้จะต่ำกว่า sodium alginate อย่างมาก ในขณะที่การตรึงเอนไซม์ไลเปสด้วย polyvinyl alcohol สามารถเร่งปฏิกิริยา hydrolysis ได้ต่ำกว่าวิธีอื่นๆ แต่มี remaining activity ที่สูงที่สุดเมื่อนำกลับมาใช้รอบแรก ซึ่ง activity ของเอนไซม์ไลเปสที่ลดลงจากการตรึงเซลล์ด้วย polyacrylamide นั้นอาจมีสาเหตุความร้อนที่เกิดขึ้นระหว่างปฏิกิริยา polymerization อาจทำให้เซลล์ของจุลินทรีย์บางชนิดสูญเสียความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ลดลงได้ ซึ่งการแก้ปัญหาโดยทั่วไปจะลดอุณหภูมิของสารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาให้อยู่ระหว่าง 4-15°C หรือการลดปริมาณของ acrylamide เพื่อลดปริมาณของอนุมูลอิสระที่อาจเกิดขึ้น⁴⁶ ส่วนสาเหตุที่การตรึงเอนไซม์ด้วย polyvinyl alcohol มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา hydrolysis ลดลงอาจเกิดจากในระหว่างขั้นตอนการเตรียมเม็ดเจล boric acid อาจทำให้เอนไซม์ไลเปสมีการทำงานลดลง⁴⁷ นอกจากนี้การอัตราส่วนของ polyvinyl alcohol ที่ใช้อาจจะไม่เหมาะสมกับการใช้ในการเร่งปฏิกิริยา hydrolysis เมื่อนำเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงด้วยวิธี sodium alginate, polyacrylamide และ polyvinyl alcohol ไปทำให้แห้งด้วยการ lyophilize แล้วนำมาทดสอบการเร่งปฏิกิริยา transesterification โดยใช้ปริมาณของเอนไซม์เทียบเท่ากับที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยา hydrolysis พบว่าที่เอนไซม์ที่ผ่านการตรึงไม่สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยา transesterification ได้ที่ปริมาณเอนไซม์ที่ทดสอบ จึงกล่าวได้ว่าเอนไซม์ไลเปสที่ *Bacillus* sp. SC3 ผลิตขึ้นมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา hydrolysis ได้สูงกว่า transesterification เช่นเดียวกับเอนไซม์ไลเปสที่พบในเชื้อราและตับอ่อนของหมู⁴⁸

ในการศึกษาจำนวนครั้งในการนำกลับมาใช้ใหม่ (Recycling time) พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. ไอโซเลต SC3 ที่ผ่านการตรึงด้วย sodium alginate สามารถนำกลับมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยา

hydrolysis ได้ทั้งหมดอย่างน้อย 5 ครั้งโดยยังคงมี % remaining activity ที่สูงกว่า 10% ในรอบที่ 5 ของการนำกลับมาใช้ ถึงแม้ว่าในการนำเอนไซม์ที่ผ่านการตรึงด้วย polyvinyl alcohol มาใช้ในรอบที่ 2 มีการทำงานของเอนไซม์ที่ลดลงไม่ถึง 10% แต่เอนไซม์ที่ผ่านการตรึงดังกล่าวไม่สามารถนำกลับมาใช้ในรอบที่ 3 ได้ ในขณะที่เอนไซม์ที่ผ่านการตรึงด้วย polyacrylamide ยังคงนำกลับมาใช้ได้ถึง 4 ครั้งแต่การทำงานของเอนไซม์ลดต่ำลงจากครั้งแรกมากกว่า 80% ซึ่งอาจจะเกิดจากการรั่วไหลของเอนไซม์ภายหลังการนำมาใช้ในรอบแรกจึงทำให้ activity ของเอนไซม์ลดลงอย่างมาก⁴⁶ ดังนั้นในกรณีที่ต้องการนำเอนไซม์ไลเปสที่ *Bacillus* sp. SC3 ผลิตขึ้นกลับมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยา hydrolysis จึงควรเลือกใช้การตรึงเอนไซม์ด้วยวิธี sodium alginate เนื่องจากสามารถนำกลับมาใช้ได้หลายครั้งโดยที่การทำงานของเอนไซม์ยังคงอยู่ในระดับปานกลาง

6.2 สรุปผลการทดลอง

ในการคัดกรองจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์จากแหล่งดินและน้ำทั้งหมด 22 ตัวอย่าง พบจุลินทรีย์ทั้งหมด 38 ไอโซเลตที่สามารถเจริญได้ในอาหารกึ่งแข็งที่มี 2.5%(v/v) isopropanol โดยจุลินทรีย์ไอโซเลต KY32, WB22 และ J31 สามารถผลิตโปรตีนเอสได้ระดับที่สูงเมื่อทำการทดสอบในอาหารแข็ง ทั้งนี้พบจุลินทรีย์เพียง 3 ไอโซเลต คือ KY21, SK21 และ SC3 ที่สามารถผลิตไลเปสได้ จึงได้นำจุลินทรีย์ทั้ง 6 ไอโซเลตมา ทดสอบความสามารถในการเจริญในอาหารที่มี DMSO, acetone, isopropanol, methanol, isoamylalcohol, toluene และ hexane ซึ่งพบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 6 ไอโซเลตมีความสามารถในการทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์แต่ละชนิดได้แตกต่างกัน โดยพบว่าจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 และ J31 สามารถเจริญในภาวะที่มี hexane 90%(v/v) และพบการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ดังกล่าวในภาวะที่มี hexane สูงสุดถึง 100%(v/v) เพื่อคัดเลือกหาจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดจึงได้ทำการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในภาวะปกติและภาวะเหนียวน้ำ ซึ่งพบว่าจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้สูงกว่าไอโซเลต KY21 และ SK21 ในขณะที่จุลินทรีย์ไอโซเลต J31 สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีนเอสได้ดีกว่าไอโซเลต KY32 และ WB22 เมื่อทำการเหนียวน้ำด้วย skim milk ดังนั้นในการศึกษาผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ จุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 และ J31 จึงถูกนำมาทดสอบในอาหารเหลวที่มีการเติมตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่จุลินทรีย์ดังกล่าวสามารถเจริญได้ โดยควบคุมความเข้มข้นไว้ที่ 5%(v/v) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าการเติม hexane หรือ methanol ลงไปในระหว่างที่ทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 ช่วยเพิ่มความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ดังกล่าว ในขณะที่ตัวทำละลายอินทรีย์ไม่ว่าจะเป็น acetone, methanol, isopropanol, toluene และ hexane ไม่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ไอโซเลต J31 มีเพียง skim milk เท่านั้นที่สามารถเหนียวน้ำให้จุลินทรีย์ดังกล่าวผลิตเอนไซม์ได้สูงขึ้น ทั้งนี้จากการวิเคราะห์สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ไอโซเลต SC3 และ J31 โดยอาศัยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่าจุลินทรีย์ดังกล่าวจัดอยู่ในกลุ่มของ *Bacillus* sp. โดยจุลินทรีย์ไอโซเลต J31 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใกล้เคียงกับ *B. anthracis* ซึ่งมีอันตราย ดังนั้นการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์จึงเลือกทดสอบกับเอนไซม์ไลเปสที่ *Bacillus* sp. SC3 ผลิตขึ้นเท่านั้น โดยไลเปสที่จุลินทรีย์ดังกล่าวผลิตขึ้นสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสารละลาย 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 และมีความเสถียรสูงที่สุดเมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในสารละลาย 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0 นอกจากนี้ยังพบว่าการบ่มเอนไซม์ในภาวะที่มี 50%(v/v) hexane เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการทำงานที่สูงกว่าการบ่มในระบบ aqueous solution จากสมบัติของเอนไซม์ที่ทนและทำงานได้ดีในภาวะที่มี hexane ดังนั้นเอนไซม์ดังกล่าวจึงถูกนำมาทดสอบความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา transesterification ซึ่งพบว่าเอนไซม์ไลเปสที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นในรูปของเอนไซม์อิสระและเซลล์สามารถใช้ในการเร่งปฏิกิริยาดังกล่าวได้ โดยเอนไซม์อิสระสามารถทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่ดีกว่าเซลล์ นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสที่ *Bacillus* sp. SC3 ผลิตขึ้นมีความจำเพาะเจาะจงต่อการทำ

ปฏิกิริยา transesterification กับสารตั้งต้นที่จัดเป็น secondary alcohol และ vinyl ester ที่มีสายสั้น ทั้งนี้ เอนไซม์ไลเปสที่ *Bacillus* sp. SC3 ผลิตขึ้นสามารถเร่งปฏิกิริยา hydrolysis ได้ดีกว่าปฏิกิริยา transesterification ซึ่งการนำเอนไซม์ไลเปสไปใช้ในปฏิกิริยา hydrolysis นั้นวิธีการตรึงด้วย sodium alginate สามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ได้ถึง 5 ครั้งโดยที่ยังคงมีการทำงานที่สูงกว่า 10% เมื่อทำการเปรียบเทียบกับการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวในรอบแรกของการเร่งปฏิกิริยา จากข้อมูลทั้งหมดพบว่าเอนไซม์ไลเปสที่ *Bacillus* sp. SC3 ผลิตขึ้นมีความเหมาะสมในการนำไปใช้ในส่วนของผสมของสารซักล้าง การบำบัดน้ำเสีย หรืออุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา hydrolysis

บทที่ 7
เอกสารอ้างอิง

- 1 Fujiwara, S. Extremophiles: Developments of their special functions and potential resources. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **94**, 518-525 (2002).
- 2 Khucharoenphaisan, K., Tokuyama, S. & Kitpreechavanich, V. Characterization of the thermostability of xylanase produced by new isolates of *Thermomyces lanuginosus*. *ScienceAsia* **34**, 187-192 (2008).
- 3 Kennedy, J. F. *et al.* Enzyme-catalyzed regioselective synthesis of sugar esters and related compounds. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **81**, 866-876 (2006).
- 4 Maruyama, T., Nagasawa, S. & Goto, M. Enzymatic synthesis of sugar amino acid esters in organic solvents. *Journal of bioscience and bioengineering* **94**, 357-361 (2002).
- 5 Bornscheuer, U. T. Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases. *Current opinion in biotechnology* **13**, 543-547 (2002).
- 6 van den Burg, B. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Current Opinion in Microbiology* **6**, 213-218 (2003).
- 7 Sardesai, Y. N. & Bhosle, S. Industrial potential of organic solvent tolerant bacteria. *Biotechnology progress* **20**, 655-660 (2004).
- 8 Shetty, R. & Rajkumar, S. Biosorption of Cu (II) by Metal Resistant *Pseudomonas* sp. *International Journal of Environmental Research* **3**, 121-128 (2009).
- 9 Guo, L. *et al.* Impacts of sterilization, microwave and ultrasonication pretreatment on hydrogen producing using waste sludge. *Bioresource technology* **99**, 3651-3658 (2008).
- 10 Hussein, H., Ibrahim, S. F., Kandeel, K. & Moawad, H. Biosorption of heavy metals from waste water using *Pseudomonas* sp. *Electronic Journal of Biotechnology* **7**, 38-46 (2004).
- 11 Zhao, Z., Zong, M. & Li, N. Efficient regioselective synthesis of 3'-O-crotonylfloxuridine catalysed by *Pseudomonas cepacia* lipase. *Biotechnology and applied biochemistry* **52**, 45-51 (2009).
- 12 Patterson, L. D. & Miller, M. J. Enzymatic deprotection of the cephalosporin 3'-acetoxy group using *Candida antarctica* lipase B. *The Journal of organic chemistry* **75**, 1289-1292 (2009).
- 13 Devi, P., Naik, C. G. & Rodrigues, C. Biotransformation of citrinin to decarboxycitrinin using an organic solvent-tolerant marine bacterium, *Moraxella* sp. MB1. *Marine biotechnology (New York, N.Y)* **8**, 129-138 (2006).
- 14 Yang, K. S., Sohn, J. H. & Kim, H. K. Catalytic properties of a lipase from *Photobacterium lipolyticum* for biodiesel production containing a high methanol concentration. *Journal of bioscience and bioengineering* **107**, 599-604 (2009).
- 15 สมใจ ศิริโชค, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (ศูนย์ส่งเสริมกรุงเทพ, 2550).
- 16 Lehninger, A., Nelson, D. & Cox, M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. (W. H. Freeman, 2008).
- 17 Wiseman, A. *Handbook of enzyme biotechnology*. (E. Horwood, 1985).

- 18 รัชดาภรณ์ ศรีปรารงค์ โคบายาชิ, วีระวัฒน์ แซ่มปรีดา, สุทิพา ธรพงศ์พิพัฒน์, นิรันดร์ รุ่งสว่าง, & ลีลี่ เอื้อ
 วิลโลจิตร. เอนไซม์และการประยุกต์. (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ 2556).
- 19 ปราณี อ่านเรือง, เอนไซม์ทางอาหาร. (ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
 มหาวิทยาลัย, 2553).
- 20 Chang, C. S. & Hsu, C. S. Lipase-catalyzed enantioselective esterification of (S)-naproxen
 hydroxyalkyl ester in organic media. *Biotechnology letters* **25**, 413-416 (2003).
- 21 Doukyu, N. & Ogino, H. Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochemical Engineering Journal*
48, 270-282 (2010).
- 22 Sardesai, Y. & Bhosle, S. Tolerance of bacteria to organic solvents. *Research in
 microbiology* **153**, 263-268 (2002).
- 23 Geok, L. P., Razak, C. N. A., Abd Rahman, R. N. Z., Basri, M. & Salleh, A. B. Isolation and
 screening of an extracellular organic solvent-tolerant protease producer. *Biochemical
 Engineering Journal* **13**, 73-77 (2003).
- 24 Inoue, A. & Horikoshi, K. Estimation of solvent-tolerance of bacteria by the solvent
 parameter log P. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **71**, 194-196, (1991).
- 25 Ogino, H., Yasui, K., Shiotani, T., Ishihara, T. & Ishikawa, H. Organic Solvent-Tolerant
 Bacterium Which Secretes an Organic Solvent-Stable Proteolytic Enzyme. *Applied and
 environmental microbiology* **61**, 4258-4262 (1995).
- 26 Tang, X. Y., Pan, Y., Li, S. & He, B. F. Screening and isolation of an organic solvent-tolerant
 bacterium for high-yield production of organic solvent-stable protease. *Bioresource
 technology* **99**, 7388-7392 (2008).
- 27 Akolkar, A. V. *et al.* Organic solvent tolerance of *Halobacterium* sp. SP1(1) and its
 extracellular protease. *Journal of Basic Microbiology* **48**, 421-425 (2008).
- 28 Torres, S., Pandey, A. & Castro, G. R. Organic solvent adaptation of Gram positive bacteria:
 applications and biotechnological potentials. *Biotechnology Advances* **29**, 442-452, (2011).
- 29 Goujard, L. *et al.* A spectrophotometric transesterification-based assay for lipases in
 organic solvent. *Analytical Biochemistry* **385**, 161-167, (2009).
- 30 Bhushan, I., Parshad, R., Qazi, G. N. & Gupta, V. K. Immobilization of Lipase by Entrapment
 in Ca-alginate Beads. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* **23**, 552-562 (2008).
- 31 Shafei, M. S. & Allam, R. F. Production and immobilization of partially purified lipase from
Penicillium chrysogenum. *Malaysian Journal of Microbiology* **6**, 196-202 (2010).
- 32 Dave, R. & Madamwar, D. Entrapment of lipase in polymer of polyvinyl alcohol-boric acid
 for esterification in organic media. *Indian Journal of Biotechnology* **5**, 368-372 (2006).
- 33 Poyton, R. O. *et al.* in *Methods in Enzymology* Vol. Volume 260 (ed Anne Chomyn
 Giuseppe M. Attardi) 97-116 (Academic Press, 1995).
- 34 Kouker, G. & Jaeger, K. E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *Applied
 and environmental microbiology* **53**, 211-213 (1987).
- 35 Kanwar, S. S., Kaushal, R. K., Jawed, A., Gupta, R. & Chimni, S. S. Methods for inhibition of
 residual lipase activity in colorimetric assay: a comparative study. *Indian J Biochem
 Biophys* **42**, 233-237 (2005).

- 36 Anbu, P. & Hur, B. K. Isolation of an organic solvent-tolerant bacterium *Bacillus licheniformis* PAL05 that is able to secrete solvent-stable lipase. *Biotechnology and applied biochemistry*, (2014).
- 37 Hun, C. J., Rahman, R. N. Z. A., Salleh, A. B. & Basri, M. A newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus* 205y producing organic solvent-stable lipase. *Biochemical Engineering Journal* **15**, 147-151, (2003).
- 38 Jelacic, T. M. *et al.* Exposure to *Bacillus anthracis* capsule results in suppression of human monocyte-derived dendritic cells. *Infection and Immunity* (2014).
- 39 Kiran, G. S. *et al.* Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas* sp. (MSI057). *Bioprocess and Biosystems Engineering* **31**, 483-492, (2008).
- 40 Anbu, P. *et al.* Screening and optimization of extracellular lipases by *Acinetobacter* species isolated from oil-contaminated soil in South Korea. *African Journal of Biotechnology* **10**, 4147-4156 (2011).
- 41 Lima, V. M. G. *et al.* Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. *Journal of Molecular Catalysis B* **31**, 53-61, (2004).
- 42 Ma, B. D. *et al.* A thermostable and organic-solvent tolerant esterase from *Pseudomonas putida* ECU1011: catalytic properties and performance in kinetic resolution of alpha-hydroxy acids. *Bioresource technology* **133**, 354-360, (2013).
- 43 Kawata, T. & Ogino, H. Amino acid residues involved in organic solvent-stability of the LST-03 lipase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **400**, 384-388, (2010).
- 44 Demirjian, D. C., Moris-Varas, F. & Cassidy, C. S. Enzymes from extremophiles. *Current opinion in chemical biology* **5**, 144-151 (2001).
- 45 Kim, M.-J., Park, J. & Choi, Y. K. Asymmetric transformations by coupled enzyme and metal catalysis: dynamic kinetic resolution. *Multi-Step Enzyme Catalysis: Biotransformations and Chemoenzymatic Synthesis* (2008).
- 46 ภาวิณี คณาสวัสดิ์, การตรึงเอนไซม์และเซลล์. 2 edn, (ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2537).
- 47 Dave, R. & Madamwar, D. Esterification in organic solvents by lipase immobilized in polymer of PVA–alginate–boric acid. *Process Biochemistry* **41**, 951-955, (2006).
- 48 Zaks, A. & Klibanov, A. M. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **82**, 3192-3196 (1985).

ภาคผนวก ก

ตาราง 17 ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3') บริเวณ 16S rDNA ของจุลินทรีย์ไฮโซเลต SC3 และ J31

จุลินทรีย์ไฮโซเลต	ลำดับนิวคลีโอไทด์ (5' → 3') บริเวณ 16S rDNA
SC3	GAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTAGCGGGCGGACGGG TGAGTAACACGCTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAGTTCCTTGAA CCGCANGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACCCCGGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT AACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCNACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCANACT CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGGACCAACGCCGCTGAGTGATGAAGTT TTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGAAGAGTAAGTGCCTTGACCTTGACCGGTACCTAACCCAGAA AGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCCGTTGTCGGGAATTTATGGGCGTAAAGGG CTCCGAGGGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCAATGGAAACTGGGAACTTGAG TGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACCCAGTGGCGAAGGCGAC TCTCTGGTCTGTAACGTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGT AACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGTTTCCGCCCTTATGCTGCAGCTACGCATTAACACTCCGCCCTGGGGAGTACGGT CGCAAGACTGATTACTCAAGGAATTGACAGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG
J31	GAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGGGACG GGTGAGTAACACGCTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTG AACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAG GTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGA CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAG CTTTCGGGTCGTAACACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACCGGTACCTAACCA GAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAAATTTATGGGCGTAAA GCGCGCGCAGGTGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACTGGGAGACTT GAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC GACTTTCTGGTCTGTAACGTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCC GTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTATGCTGTAAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGA GTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG

ภาคผนวก ข
ประวัติย่อ่นักวิจัย

อังคณา วิภาตนาวิน (เสาวภาคย์ศิริณย์)
ANGKANA WIPATANAWIN (SAOVAPAKHIRAN)

EDUCATION

- | | |
|-----------|--|
| 2004-2008 | Ph.D. (Pharmaceutical Sciences)
School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Faculty of Medical and Human Sciences,
The University of Manchester, UK |
| 1998-2002 | M.Sc. (Biotechnology)
Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Thailand |
| 1994-1998 | B.Sc. (Biotechnology)
Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Thailand |

EXPERIENCE

- | | |
|--------------|--|
| 2002-present | Lecturer in Biochemistry and Biochemical Technology, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University |
|--------------|--|

PUBLICATIONS IN INTERNATIONAL JOURNAL

- **Saovapakhiran, A.**, D'Emanuele, A., Attwood, D. and Penny, J. Surface modification of PAMAM dendrimers modulates the mechanism of cellular internalization. *Bioconjug Chem*, 2009, 20, 693-701.
- Phothongkam S., Chancharunee S., **Saovapakhiran A.**, Wichai U., Pohmakotr M. Facile Synthesis and Anticancer Activity of C-10 Non-acetal Deoxoartemisinin Dimers. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22, 7598–7601.
- Phakhodee W., Pongparna P., **Saovapakhiran A.**, Laphookhieo S. Coumarin Precursor from *Micromelum integerrimum* Leaves. *Nat Prod Commun*, 2013, 8, 799–7601.
- Nittayajairom W., Sangthong P., Chancharunee S., **Wipatanawin A.**, Wanasawa P., Chulasiri M. Mutagenicity, antimutagenicity and tyrosinase inhibition activity of hydroglycol extracts from *Terminalia chebula* Retzius, *Terminalia bellerica* Roxb and *Rafflesia kerrii* Meijer *International Journal of Phytomedicine*, 2014, 6, 93-102.

CONFERENCE PROCEEDINGS

- Khuna S., Chandet N., **Saovapakhiran A.**, Influence of Culture Conditions on the Production of Antibacterial Substances by *Bacillus licheniformis*. In *Proceeding of the Pure and Applied Chemistry International Conference 2013 (PACCON 2013)*, page 166-169, 2013.
- Pipatsamut P., Chancharunee S., Chawapun N., Wichai U., **Saovapakhiran A.** 2012. Transformation of artemisinin by *Aspergillus oryzae* and the biological activity of the transformed product. In *Proceeding of the 23rd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology TSB2011: Systems Biotechnology*, page 223-225, 2012.
- Nittayajairom W., **Saovapakhiran A.**, Sangthong P., Chancharunee S., Wanasawas P. and Chulasiri M. Genotoxicity and Anti-mutagenicity studies from *Rafflesia kerrii* Meijer. In *Proceeding of the 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology TSB2010: International Conference on Biotechnology for Healthy Living*, page 1254-1262, 2010.
- **Saovapakhiran A.**, Chancharunee S., Phothongkam S., Wichai U., Pohmakotr M. Synthesis and Cytotoxicity of Fmoc-Aeg-Artemisinin-OtBu in HT-29 cells. In *Proceeding of the 35th Congress on Science and Technology of Thailand (STT 35): Science and technology for a better future*, page 1-6, 2009.
- **Saovapakhiran A.**, D'Emanuele A., Attwood D., Penny J., Investigation of the mechanisms of cellular uptake of PAMAM dendrimers in Caco-2 cells. In *Proceeding of Bioasia 2008*, 2008.
- **Saovapakhiran A.**, Wiwat C., Verduyn C. and Bhumiratana A. Glucose metabolism in *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki*. In *Proceeding of the 14th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology: Biotechnology for Better Living in the New Economy*, 2002.

- **Saovapakhiran A.** and Bhumiratana A. Fructose metabolism in *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki*. In *Proceeding of the 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference and 11th Annual meeting of the Thai Society for Biotechnology*, 1999.

PRESENTATIONS

- Soisuwan C., **Wipatanawin A.** 2014. Immobilization and Stability Studies of Organic Solvent-tolerant Lipase Production by *Bacillus* sp. SC3. In the 2014 Asian Conference on the Life Sciences and Sustainability, 27-29 August, 2014, the KKR Hotel Hiroshima, Hiroshima, Japan.
- Jutrakul C., Khuna S., **Wipatanawin (Saovapakhiran) A.** 2013. Characterization of Lipase from *Bacillus licheniformis* R102. In *the 25th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB2013): Agro-Industrial Biotechnology for Global Sustainable Prosperity*, 16-19 October, 2013, the Emerald Hotel, Bangkok, Thailand.
- Phannasorn W., Khuna S., Gaewyana N., **Wipatanawin (Saovapakhiran) A.** 2013. Effect of Organic Solvents on Growth and Production of Lipase by *Bacillus* sp. KY21. In *the 25th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB2013): Agro-Industrial Biotechnology for Global Sustainable Prosperity*, 16-19 October, 2013, the Emerald Hotel, Bangkok, Thailand.
- Chancharunee S., **Saovapakhiran A.**, Sangthong P., Wichai U., Tragoolpua Y. 2012. Structure of modification of mangiferin. In *the 38th Congress on Science and Technology of Thailand (STT38): Science for future of mankind*, 17-19 October, 2012, the Empress Convention Centre, Chiang Mai, Thailand.
- Asawatinnapan N., Pipatsamut W., Chancharunee S., Chawapun N., **Saovapakhiran A.** 2012. Transformation of artemisinin by *Geotrichum* sp. In *the 23rd Annual Meeting of Thai Society for Biotechnology TSB2011: Systems Biotechnology*, 1-2 February, 2012, the Imperial Queen's park hotel, Bangkok, Thailand.
- Khuna S., Na Lampoon K., **Saovapakhiran A.** 2012. Isolation and screening of antibacterial substances producing bacteria. In *the 23rd Annual Meeting of Thai Society for Biotechnology TSB2011: Systems Biotechnology*, 1-2 February 2012, the Imperial Queen's park hotel, Bangkok, Thailand.
- Phothongkam S., Chancharunee S., **Saovapakhiran A.**, Wichai U., Pohmakotr M. Synthesis and Cytotoxicity of Fmoc-Aeg-Artemisinin-OtBu Oligomers in HT-29 cells In *International Congress for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC Congress VII): Chemistry, Environment and Society*, 4-7 May, 2011, Chonburi, Thailand.
- Nittayajaiprom W., **Saovapakhiran A.**, Sangthong P., Chancharunee S., Wanasawas P. and Chulasiri M. Biological activities study of *Terminalia chebula* Retzius, *Terminalia bellirica* and *Rafflesia kerrii* Meijer Extracts In *International Congress for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC Congress VII): Chemistry, Environment and Society*, 4-7 May, 2011, Chonburi, Thailand.
- Nittayajaiprom W., **Saovapakhiran A.**, Sangthong P., Chancharunee S., Wanasawas P. and Chulasiri M. Biological Activities and Inhibitory Effect on Morphological Changed Induced by UV of Some Thai Plants Extracts In *TRF-Master Research Congress V*, 30 March-1 April, 2011, Chonburi, Thailand.
- Pipatsamut W., Chancharunee S., Chawapan N., **Saovapakhiran A.** Transformation of Artemisinin by *Aspergillus* spp. In *Research Path: Innovation for Creative Economy and Sustainability*, 25-26 November, 2010, Chiang Mai, Thailand.
- Vitsupakorn D., Na Lampoon K., Sangthong P. and **Saovapakhiran A.** Biological Activities Screening from Thermotolerant *Bacillus* sp. In *TSB2010: International Conference on Biotechnology for Healthy Living*, 20-22 October, 2010, Trang, Thailand.
- Nittayajaiprom W., **Saovapakhiran A.**, Sangthong P., Chancharunee S., Wanasawas P. and Chulasiri M. Co-Mutagenic Activity of *Etlingera elatior* (Jack) R. M. Smith in *Salmonella typhimurium* TA98 In *TSB2010: International Conference on Biotechnology for Healthy Living*, 20-22 October, 2010, Trang, Thailand.
- **Saovapakhiran A.**, D'Emanuele A., Attwood D., Penny J., Investigation of the mechanisms of cellular uptake of PAMAM dendrimers. In *the 5th International Nanomedicine and Drug Delivery Symposium*, 1-2 November, 2007, Boston, USA.