

การคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์ไลเปส
และการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไลเปส



ปริญญานิพนธ์
ของ
ภัทรรพ พิกุลขวัญ

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

มกราคม

การคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์ไลเปส
และการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไลเปส



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
มกราคม 2559
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์ไลเปส
และการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไลเปส



เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
มกราคม 2559

ภัทรพร พิภูษขวัญ . (2559). *การคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์ไลเปส และการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไลเปส*ปริญญาโท กศ.ม. (ชีววิทยา).
กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม อาจารย์ ดร.
สุชมาภรณ์ กระจำสรวง , รองศาสตราจารย์ ดร. อรอนงค์ พริ้งสุลกะ

เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องจากสามารถใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งทางชีวภาพซึ่งทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นในสภาวะที่ไม่รุนแรงได้ ปัจจุบันเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรียนั้นเริ่มได้รับความสนใจมากขึ้น เพราะสามารถใช้ในกระบวนการรีพอลิเมอร์พลาสติกชีวภาพ เช่น พอลิ(แอลแลกไทด์) ได้ งานวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากดินที่มีการปนเปื้อนของไขมันบริเวณภาคใต้ของประเทศไทยและทำการศึกษารองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยทำการเก็บตัวอย่างดิน 100 ตัวอย่าง มาคัดแยกบน Tween 80 agar แล้วสังเกตโซนรอบโคโลนี ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 662 ไอโซเลท โดยที่ไอโซเลท KKCH8611 และไอโซเลท PSR5631 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสมากที่สุดทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว ดังนั้นจึงนำไอโซเลท KKCH8611 และไอโซเลท PSR5631 มาวิเคราะห์สายพันธุ์โดยหาลำดับเบสหายีนบริเวณ 16S rRNA พบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus safensis* ตามลำดับ หลังจากนั้นนำไอโซเลท KKCH8611 และไอโซเลท PSR5631 มาศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส เช่นชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไขมันและแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของ NaCl ค่าพีเอช อุณหภูมิ และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ โดยจากการศึกษาพบว่า สายพันธุ์ PSR5631 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 68.60 U/mL ซึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย น้ำมันรำข้าว ความเข้มข้น 1.5% (v/v) yeast extract ความเข้มข้น 0.32% (w/v) NaCl ความเข้มข้น 0.16% (v/w) พีเอช 7.0 ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 ชั่วโมง และสายพันธุ์ KKCH8611 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 63.27 U/mL ซึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย น้ำมันข้าวโพด ความเข้มข้น 0.5% (v/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้น 0.12% (w/v) NaCl ความเข้มข้น 0.16% (v/w) พีเอช 7.0 ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 66 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก สายพันธุ์ KKCH8611 ไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการรีไซเคิลพลาสติกชนิด PLA ด้วยวิธีทางชีวภาพ โดยมีกรดแลคติกทางการค้าเป็นสับสเตรท ภายใต้อัตราการไหลของก๊าซไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง นำผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HNMR และ LC/MS พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นประกอบด้วย โอลิโกเมอร์ของพลาสติกชนิด PLA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 91.5-923.1

SCREENING OF HIGH EFFICIENT LIPASE PRODUCING BACTERIA
AND OPTIMAL CONDITIONS FOR LIPASE PRODUCTION

AN ABSTRACT
BY
PATTARAPORN PIKUNKWAN



Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Education Degree in Biology
at Srinakharinwirot University
January 2016

Pattaraporn Pikunkwan. (2016). *Screening of high efficient lipase producing bacteria and optimal conditions for lipase production*. Master thesis, M.Ed. (Biology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committees: Dr. Sukhumaporn Krajangsang, Assoc. Prof. Dr. Onanong Pringsulaka

Lipases are an important enzyme for many biotechnological applications as they are biocatalysts which have an activity in mild conditions. Recently, bacterial lipase has become very interesting because it can be used for re-polymerization of biodegradable plastics such as poly(L-lactide). The present work aimed to screen lipase-producing bacteria from oil-contaminated soil in the south of Thailand and study the optimization of medium composition for lipase-production as well as evaluation of the enzyme for polymerization of PLA. Lipase-producing bacteria with 662 strains were isolated from 100 soil samples according to opaque zone formation on Tween 80 agar. Bacterial strain KKCH8611 and strain PSR5631 exhibited the highest lipase activities in both mediums. It was identified as *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strain KKCH8611 and *Bacillus safensis* strain PSR5631 based on morphological study, biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequencing. Moreover, factors influencing lipase production were investigated in a shake flask culture, i.e. lipid and nitrogen sources, NaCl, pH, temperature and incubation time. Strain PSR5631 demonstrated the highest maximum enzyme activity of 68.60 U/mL by using 1.5% (w/v) rice bran oil and 0.32 % (w/v) yeast extract as lipid and nitrogen sources, 0.16% (w/v) sodium chloride, pH 7, 37°C and 60 h of cultivation time. The strain KKCH8611 showed maximum enzyme activity of 63.27 U/mL by using 0.5% (w/v) corn oil and 0.12 % (w/v) (NH₄)₂SO₄ as lipid and nitrogen sources, 0.16% (w/v) sodium chloride, pH 7, 37°C and 66 h of cultivation time. The enzyme produced by strain KKCH8611 was subjected to study of the polymerization of PLA by biological method and used commercial lactic acid as substrate under nitrogen atmosphere at 37°C for 4 h. According to H¹ NMR spectrum and LC/MS revealed that polymerization products consisted of various M_w of PLA oligomer (491.5-923.1).

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

และการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ไลเปส

ของ

ภัทรกร พิกุลขวัญ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

..... รักษาการแทนคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดุขฎิ โยเหลา)

วันที่ เดือน พ.ศ. 2559

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ คณะกรรมการสอบปากเปล่า

..... ที่ปรึกษาหลัก

..... ประธาน

(อาจารย์ ดร.สุชามาภรณ์ กระจำงส์ขันธ์)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ)

..... ที่ปรึกษาร่วม

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. อรอนงค์ พริ้งสุลกะ)

(รองศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร กิจปรีชาวนิช)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.สุชามาภรณ์ กระจำงส์ขันธ์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. อรอนงค์ พริ้งสุลกะ)

งานวิจัยนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย
จากเงินกองทุนส่งเสริมและพัฒนากการวิจัย บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความช่วยเหลืออย่างเต็มที่จากอาจารย์ ดร.สุชามารณ์ กระจำรังษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. อรอนงค์ พริ้งสุลกะ อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ร่วม ผู้ทุ่มเทและเสียสละเวลาอันมีค่าคอยให้คำปรึกษาในเรื่องต่างๆ ทั้งทางด้านงานวิจัย ด้านความรู้ และด้านจริยธรรม จนสามารถจัดทำปริญญานิพนธ์ได้เสร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้ากราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนบางส่วนเพื่อ การทำปริญญานิพนธ์สำหรับนิสิตในระดับบัณฑิตศึกษาจากงบประมาณเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2558 และได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยปี 2556

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิวาพร ลงยันต์ อาจารย์ ดร.วัลลภา หล่อเหลี่ยม อาจารย์ ดร.ณัฐริกา สุวรรณาศรัย และคณาจารย์ทุกท่านที่มอบความรู้และคำชี้แนะให้แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษาระดับปริญญาโท และขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สำหรับสถานที่และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร กิจปรีชาวนิช ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้เกียรติเสียสละเวลามาเป็นกรรมการสอบปริญญานิพนธ์ในครั้งนี้และช่วยแก้ไขปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุนิตย์ สุขसारานู ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ สำหรับการช่วยเหลือและให้คำปรึกษาเกี่ยวกับเครื่องมือทางเคมีและการวิเคราะห์สารตัวอย่าง

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนในเอกจุลชีววิทยาและเอกเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับมิตรภาพที่ดีงาม และความมีน้ำใจเอื้อเฟื้อเผื่อแผ่ที่มีให้กันและกันตลอดระยะเวลาที่ทำปริญญานิพนธ์

ท้ายที่สุดข้าพเจ้าขอ น้อมระลึกถึง พระคุณของบิดา มารดา ที่สนับสนุนและให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้าตั้งแต่เริ่มทำปริญญานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ และขอขอบคุณผู้มีพระคุณทุกท่านที่มีได้กล่าวนามในที่นี้จนสำเร็จปริญญานิพนธ์

ภัทรภร พิกุลขวัญ

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการศึกษาวิจัย.....	2
สมมติฐานในการวิจัย.....	3
ผลที่ได้รับจากการวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
เอนไซม์ไลเปส.....	4
เอนไซม์ไลเปสที่สร้างจากจุลินทรีย์.....	7
ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส.....	17
พลาสติกชีวภาพ.....	24
การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในการสังเคราะห์ PLA.....	25
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	30
อุปกรณ์และสารเคมี.....	30
การเก็บตัวอย่างดิน.....	33
การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส.....	33
การจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส.....	34
การเตรียมหัวเชื้อและการผลิตเอนไซม์.....	35
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส.....	35
ศึกษาผลของระยะเวลาและการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย.....	35
ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไขมัน.....	35
ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน.....	36
ศึกษาความเข้มข้นของ NaCl.....	36
ศึกษาค่าพีเอช.....	36
ศึกษาผลของอุณหภูมิ.....	37

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 (ต่อ)	38
การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส.....	38
การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	38
การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	38
การนำเอนไซม์ไลเปสไปมาประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์พลาสติกชนิด PLA ด้วย กระบวนการทางชีวภาพ.....	38
4 ผลการทดลอง.....	40
การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส.....	40
การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่าง ดิน โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางชีวเคมี ลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA gene และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ	40
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางชีวเคมี.....	40
การศึกษาลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA gene และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis).....	45
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส.....	46
ผลของระยะเวลาและการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย.....	46
ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไขมัน.....	48
ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน.....	50
ผลของความเข้มข้นของ NaCl.....	52
ผลของค่าพีเอช.....	53
ผลของอุณหภูมิ.....	55
การประเมินการนำ crude เอนไซม์ไลเปส ที่ผลิตจากสายพันธุ์ KKCH8611 ไป ประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์พลาสติกชนิด PLA ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ.....	56
5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	58

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
บรรณานุกรม.....	70
ภาคผนวก.....	85
ภาคผนวก ก.....	86
ภาคผนวก ข.....	89
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	93



บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ไลเปส.....	10
2 เอนไซม์ไลเปสที่สร้างจากจุลินทรีย์และนำไปประยุกต์ใช้ในเชิงการค้า.....	15
3 ค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย.....	22
4 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย.....	23
5 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง.....	30
6 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	31
7 บริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างดินและรหัสที่ใช้ในงานวิจัย.....	33
8 แสดงกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและค่าดัชนีเอนไซม์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้.....	40
9 ลักษณะทางชีวเคมีของไอโซเลท KKCH8611 และ ไอโซเลท PSR5631 เทียบกับ <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> และ <i>Bacillus safensis</i> ตามลำดับ.....	43

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1 การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (ปฏิกิริยาไปข้างหน้า) และการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (ปฏิกิริยาย้อนกลับ) ของเอนไซม์ไลเปส.....	6
2 กระบวนการผลิตพลาสติกชนิด PLA แบบกระบวนการควบแน่นโดยตรง (Direct condensation) (ซ้าย) และกระบวนการ Ring opening polymerization (ขวา).....	28
3 แผนภาพแสดงกระบวนการรีไซเคิลของพลาสติกชนิด PLA.....	29
4 ลักษณะสัณฐานของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทเมื่อทำการย้อมแกรมและย้อมเอนโดสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) ด้วยกำลังขยาย 1,000 เท่า.	41
5 แผนภูมิทางวิวัฒนาการของลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA gene ของแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank ที่ค่า bootstrapping 1,000 ครั้ง.....	45
6 ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส เปสจาก <i>Bacillus safensis</i> สายพันธุ์ PSR5631 และ <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> สายพันธุ์ KKCH8611 ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณเอนไซม์ไลเปสในแต่ละการทดลองที่ $p < 0.05$	47
7 ผลของชนิดและความเข้มข้นของคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก <i>Bacillus safensis</i> สายพันธุ์ PSR5631 และ <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> สายพันธุ์ KKCH8611 (ก) การเปรียบเทียบชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 0.5% (v/v) (ข) การเปรียบเทียบความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน โดยสายพันธุ์ PSR5631 ใช้น้ำมันรำข้าว และ สายพันธุ์ KKCH8611 ใช้น้ำมันข้าวโพด เป็นแหล่งคาร์บอนตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณเอนไซม์ไลเปสในแต่ละการทดลองที่ $p < 0.05$	49
8 ผลของชนิดและความเข้มข้นของคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก <i>Bacillus safensis</i> สายพันธุ์ PSR5631 และ <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> สายพันธุ์ KKCH8611 (ก) การเปรียบเทียบชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 0.12% (w/v) (ข) การเปรียบเทียบความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนโดยสายพันธุ์ PSR5631 ใช้ yeast extract และ สายพันธุ์ KKCH8611 ใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณเอนไซม์ไลเปสในแต่ละการทดลองที่ $p < 0.05$	51

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ

หน้า

- 9 ผลของความเข้มข้นของ NaCl ต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus safensis* สายพันธุ์ PSR5631 และ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* สายพันธุ์ KKCH861 ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณเอนไซม์ไลเปสในแต่ละการทดลองที่ $p < 0.05$ 53
- 10 ผลของ พีเอช ต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส จาก *Bacillus safensis* สายพันธุ์ PSR5631 และ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* สายพันธุ์ KKCH861 ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณเอนไซม์ไลเปสในแต่ละการทดลองที่ $p < 0.05$ 54
- 11 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus safensis* สายพันธุ์ PSR5631 และ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* สายพันธุ์ KKCH8611 ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณเอนไซม์ไลเปสในแต่ละการทดลองที่ $p < 0.05$ 55
- 12 น้ำหนักโมเลกุลของโพลิโกเมอร์ ที่ได้ จากการสังเคราะห์ PLA ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยใช้ LC/MS..... 57

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

พลาสติกชีวภาพ (bioplastic) เป็นพลาสติกที่เป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากพลาสติกชีวภาพสามารถผลิตจากวัตถุดิบธรรมชาติ ซึ่งจะช่วยเพิ่มมูลค่าผลผลิตทางการเกษตรโดยเฉพาะในประเทศที่กำลังพัฒนา นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ ซึ่งจะไม่ก่อให้เกิดการสะสมของสารพิษจึงไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตอีกด้วย ในปัจจุบันพลาสติกชีวภาพที่ได้รับความสนใจและสามารถนำมาผลิตเป็นเครื่องอุปโภคบริโภคแทนที่พลาสติกที่ผลิตจากปิโตรเลียมได้แล้วนั้น ได้แก่ polycarprolactone (PCL) poly(lactic acid) (PLA) polybutylene succinate (PBS) และ polyhydroxybutyrate (PHB) สำหรับพลาสติกชนิด poly(lactic acid) (PLA) จัดอยู่ในกลุ่มพอลิเอสเตอร์สายตรง (aliphatic polyester) ซึ่งประกอบด้วยมอนอเมอร์ของกรดแลคติก พลาสติกชนิด PLA เป็นพลาสติกชีวภาพที่ได้รับความสนใจสูงสุดในปัจจุบัน เนื่องจากสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ผลิตได้จากวัตถุดิบทางการเกษตร เช่น ข้าวโพด อ้อย แป้งมันสำปะหลัง เป็นต้น และเมื่อผ่านกระบวนการย่อยสลายจะพบว่าไม่มีสารตกค้างในสิ่งแวดล้อม (Tokiwa; & Jarerat. 2004: 771-772)

เอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์และการย่อยสลายพลาสติกชนิด PLA คือ เอนไซม์ไลเปส โดยเอนไซม์ ไลเปส (lipase หรือ triacylglycerol acylhydrolases EC 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่ตำแหน่งพันธะเอสเตอร์ในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ เกิดเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ และยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะเอสเตอร์ซึ่งเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับได้อีกด้วย เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตที่หลากหลาย เช่น สัตว์ พืช และจุลินทรีย์ เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ และระดับอุตสาหกรรม ซึ่งจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณสูง และช่วยลดต้นทุนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้อีกด้วย เนื่องจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์นั้น สามารถทำได้โดยใช้อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ที่เป็นผลิตภัณฑ์เหลือใช้จากอุตสาหกรรมอาหารได้ ใช้ระยะเวลาในการเจริญที่สั้น ง่ายต่อการเก็บเกี่ยว และที่สำคัญจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ไลเปสนั้นมีหลากหลายและพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ และแอคติโนมัยซีต

รายงานการย่อยสลาย (degradation) และการรีพอลิเมอร์ไรเซชัน (re-polymerization) หรือการรีไซเคิล (recycle) ด้วยวิธีทางชีวภาพของพลาสติกชนิด PLA นั้นมีไม่มากนัก ซึ่งโดยทั่วไปพลาสติกชนิด PLA จะย่อยสลายได้ช้ากว่าพลาสติกในกลุ่มพอลิเอสเตอร์สายตรงชนิดอื่นๆ (aliphatic polyester) เช่น poly(hydroxyalkanoate) (PHA) และ poly(ϵ -caprolactone) (PCL) (Pranamuda; Tsuchii; & Tokiwa. 2001: 25-29) พลาสติกชนิด PLA ส่วนใหญ่จะสามารถถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์ไลเปส เอนไซม์เอสเทอเรส และเอนไซม์โปรติเอส แต่เอนไซม์ไลเปสมีข้อได้เปรียบมากกว่าเอนไซม์ชนิดอื่น เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสยังสามารถเกิดกระบวนการรีไซเคิลพลาสติกชนิด PLA ได้ด้วย ในปัจจุบันได้มีการนำเอนไซม์ไลเปสทางการค้ามาใช้ในการกระบวนการรีพอลิเมอร์ไรเซชันในปริมาณที่มากขึ้น แต่เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสทางการค้านั้นมีราคาสูง ดังนั้นในงานวิจัยในครั้งนี้จึงได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียจากธรรมชาติที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้อย่างมีประสิทธิภาพ และหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยใช้สูตรอาหารอย่างง่าย เพื่อช่วยลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ไลเปส เพื่อนำเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้ไปประยุกต์ใช้ในการรีไซเคิลพลาสติกชนิด PLA เพื่อให้เกิดการใช้ทรัพยากรอย่างคุ้มค่าและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม โดยผลการวิจัยที่ได้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับผู้ที่สนใจในด้านการสังเคราะห์ของพลาสติกชนิด PLA ต่อไป

ความมุ่งหมายของการวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งความมุ่งหมายไว้ดังนี้

1. เพื่อคัดแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่พบได้ในแหล่งธรรมชาติที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้อย่างมีประสิทธิภาพ
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้
3. เพื่อนำเอนไซม์ไลเปสมาประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์พลาสติกชนิด PLA ในเบื้องต้นได้

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาการแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียบริเวณดินที่มีการปนเปื้อนของไขมันที่เหลือจากการผลิตอาหาร บริเวณสวนปาล์ม และบริเวณอุทยานแห่งชาติ จังหวัดเพชรบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และจังหวัดชุมพร เพื่อนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส และเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำเอนไซม์ไลเปสไปใช้ในการกระบวนการสังเคราะห์พลาสติกชนิด PLA

สมมติฐานในการวิจัย

แบคทีเรียที่แยกและคัดเลือกได้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่าย และสามารถนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์พลาสติกชนิด PLA ได้

ผลที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1. ได้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย
2. ได้ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับเอนไซม์ไลเปสที่นำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์พลาสติก

ชนิด PLA



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. เอนไซม์ไลเปส (Lipase)

ในปัจจุบันนี้มีเอนไซม์ที่เป็นที่รู้จักประมาณ 400 ชนิด และถูกนำไปใช้ในเชิงการค้าประมาณ 200 ชนิด โดยที่เอนไซม์ที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรมประมาณ 75% นั้นจัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ไฮโดรเลส (hydrolases) เช่น โปรติเอส (proteases) อะไมเลส (amylases) อะมิเดส (amidases) เอสเทอเรส (esterases) และ เอนไซม์ไลเปส (lipases) ซึ่งเอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากมีข้อดีคือสามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) และเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) ในตัวทำละลายอินทรีย์ เกิดปฏิกิริยาในสภาวะที่ไม่รุนแรง เช่น อุณหภูมิและความดันต่ำ และสามารถใช้อย่างต่อเนื่อง (Hamid; et al.; 2003: 961-968) มีการนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้ในอุตสาหกรรมหลากหลายประเภท เช่น สารปรุงแต่งกลิ่นรส สารชะล้าง เครื่องสำอาง เครื่องหนัง เวชภัณฑ์ และใช้ในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย

เอนไซม์ไลเปสพบครั้งแรกในน้ำย่อยจากตับอ่อน (pancreatic juice) โดย Claude Bernard ในปี ค.ศ. 1865 ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับไตรกลีเซอไรด์ เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถละลายน้ำได้ (Bernard. 1865: 291-294) ต่อมา Hanriot (1986) พบว่าเอนไซม์ในเนื้อเยื่อและซีรัมสามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับมอนอบิวทีริน (monobutylin) ได้ และให้ชื่อว่าเอนไซม์ไลเปส แต่จากหลักฐานพบว่าเอนไซม์จากซีรัมไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับไขมัน แต่จะทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับกรดไขมันที่มีโมเลกุลต่ำ ดังนั้นเอนไซม์จากซีรัมจึงเป็นเอนไซม์เอสเทอเรสทั้งเอนไซม์ไลเปสและเอสเทอเรสสามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจึงเกิดความสับสนระหว่างเอนไซม์ทั้งสองชนิด (Hanriot. 1896: 925-926) ในปี ค.ศ. 1995 Martinelle, Holmquist และ Hult ได้ให้คำจำกัดความของเอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์เอสเทอเรสไว้ดังนี้คือเอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสตรงตำแหน่งพันธะเอสเทอร์ของไตรกลีเซอไรด์ตรงบริเวณผิวรอยต่อระหว่างน้ำและน้ำมันเพื่อเปลี่ยนให้เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ สายยาวส่วนเอนไซม์เอสเทอเรสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไขมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันสายสั้นๆ (Martinelle; Holmquist; & Hult. 1995: 272-276)

การทำงานของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้หลากหลายตัวอย่างเช่น

1. ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะต้องอาศัยน้ำในการเกิดปฏิกิริยา โดยการสลาย

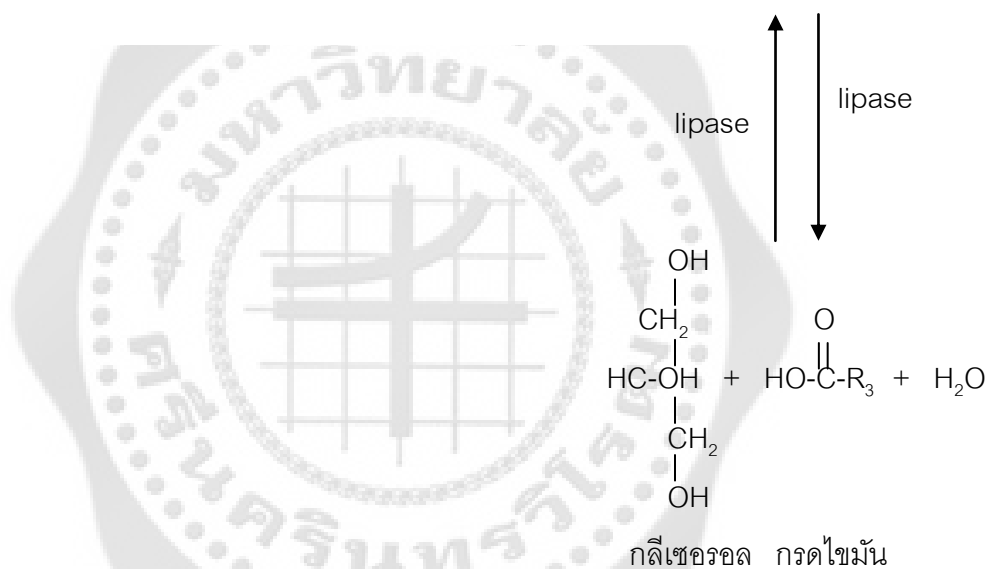
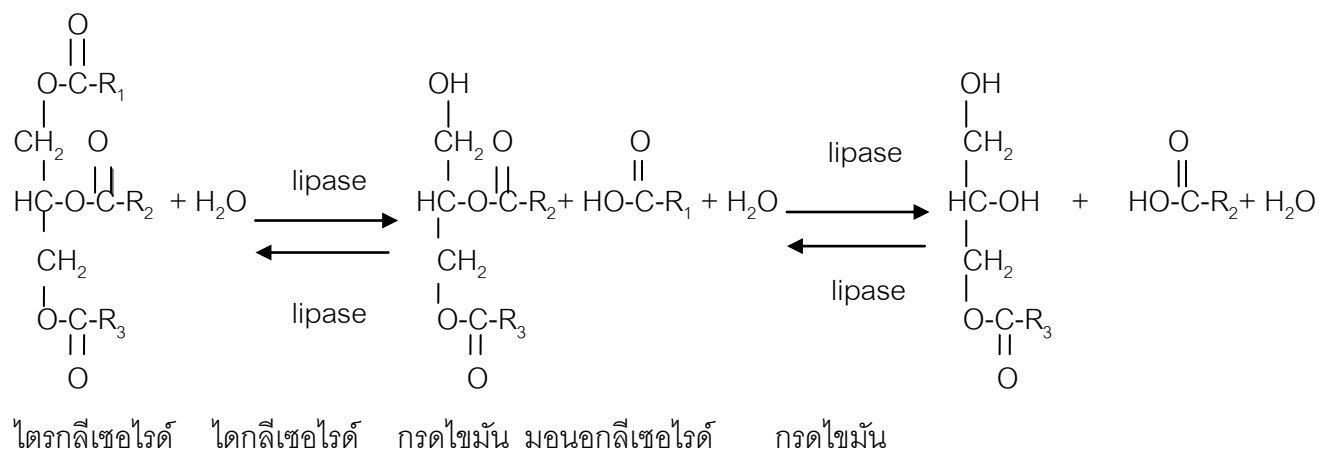
พันธะเอสเทอร์ของไตรกลีเซอไรด์ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น คือ กรดไขมัน และกลีเซอรอล ดังภาพประกอบ 1 การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่เกิดจากจุลินทรีย์จะเกิดในสภาวะที่อุณหภูมิและความดันต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีทางเคมีซึ่งใช้อุณหภูมิสูงถึง 240-260 องศาเซลเซียส นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ทำให้เกิดไม่เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ และช่วยลดต้นทุนในการผลิต (Gandhi. 1997: 621-634)

2. ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน

ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน

เป็นปฏิกิริยา ผันกลับของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

โดยจะเกิดการสร้างพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) ของกลีเซอรอลกับหมู่คาร์บอกซิล (-COOH group) ของกรดไขมัน เกิดเป็นไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งในปฏิกิริยานี้ต้องการน้ำในปริมาณน้อย ดังแสดงในภาพประกอบ 1 (Gandhi. 1997: 621-634)



ภาพประกอบ 1 การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (ปฏิกิริยาไปข้างหน้า) และการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (ปฏิกิริยาย้อนกลับ) ของเอนไซม์ไลเปส

ที่มา : ดัดแปลงจาก Koayashi, S.(2010). Lipase-catalyzed polyester synthesis-A green polymer chemistry. *Proceedings of the Japan Academy Series B*. 86: 339.

2. เอนไซม์ไลเปสที่สร้างจากจุลินทรีย์ (Lipase-producing microorganisms)

เอนไซม์ไลเปสสามารถพบได้ทั่วไปตามแหล่งธรรมชาติ เช่น พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยที่เอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพและเอนไซม์ทางการค้าส่วนใหญ่ นั้นมาจากแบคทีเรีย ยีสต์ รา และแอคติโนมัยซีท ดังแสดงในตาราง 1 และ 2 Jaeger และ Reetz ได้อธิบายถึงข้อดีของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ที่ได้เปรียบกว่าเอนไซม์ไลเปสจากพืชและสัตว์ (Jaeger; & Reetz. 1998: 396-403) ดังนี้

2.1 ไม่สลายตัวในตัวทำละลายอินทรีย์

เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยาในตัวทำละลายอินทรีย์ เนื่องจากสัณฐานส่วนใหญ่เป็นโมเลกุลที่ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ดีในสารละลายอินทรีย์ เมื่อพิจารณาโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ไลเปส พบว่าเอนไซม์ไลเปสจัดอยู่ในกลุ่ม serine proteases บริเวณเร่งของเอนไซม์ไลเปสนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วเป็นส่วนใหญ่ สามารถเกิดปฏิกิริยาบริเวณผิวหน้าระหว่างชั้นไขมันและชั้นน้ำ โดยที่พื้นผิวของชั้นน้ำเป็นบริเวณที่ประกอบด้วย α -helical ซึ่งเป็น active site จะปิดทำให้สัณฐานไม่สามารถเข้าจับกับเอนไซม์ไลเปสได้ แต่ในขณะที่บริเวณชั้นน้ำมัน α -helical ที่เป็น active site สามารถจับกับสัณฐานเกิดเป็น ES complex แต่ถึงอย่างไรก็ตามต้องอาศัยโมเลกุลของน้ำเพื่อจับกับโมเลกุลของเอนไซม์ในการรักษาโครงรูปของเอนไซม์ให้สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ (active conformation state) เอนไซม์ที่สามารถทำงาน ได้ในตัวทำละลายอินทรีย์มีหลายชนิด ได้แก่ เอนไซม์ในกลุ่ม oxidoreductases hydrolases และ isomerases ข้อเสียของการใช้ ตัวทำละลายอินทรีย์ คือตัวทำละลายอินทรีย์อาจ จะส่งผล ให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติหรือเป็นตัวยับยั้ง ในการทำงาน ของเอนไซม์ เนื่อง จากมีการ จำกัดการแพร่การปิดกั้นที่บริเวณเร่ง จึงทำให้เกิดการ เปลี่ยนแปลง ของโครงร่างที่ ไม่เหมาะสม ในการทำงาน ของโมเลกุลเอนไซม์ ลดความ ยืดหยุ่นและ การเคลื่อนไหวได้ ของโมเลกุลเอนไซม์ (Bel; et al. 1995: 468-473, Dordick; & Gorman. 1992: 392-397, Klibanov. 1997: 97-101, Varma; et al. 2005: 949-981, Lassalle; & Ferreira. 2008: 1493-1502)

2.2 ไม่จำเป็นต้องอาศัย cofactor ในการทำงาน

เอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส เช่น เอนไซม์ไลเปส เอสเทอเรส ดีฮาลิจีนเนส และเปอร์ออกซิเดส สามารถเร่งการเกิดปฏิกิริยาได้โดยไม่ต้องอาศัยโคแฟกเตอร์ (cofactor) แต่ในขณะที่เอนไซม์ส่วนใหญ่ นั้น ต้องอาศัยโคแฟกเตอร์ในการทำงานร่วมกับเอนไซม์จึงจะสามารถเร่งปฏิกิริยาได้เนื่องจากเอนไซม์ ในกลุ่มไฮโดรเลสมี บริเวณเร่ง (active site) ที่มีความสามารถในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างให้เหมาะสมกับ สับสเตรท (Line; Isupov; & Littlechild. 2004: 519-532)

2.3 สามารถใช้สับสเตรทได้หลากหลาย

เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ไม่เพียงแต่มีความจำเพาะกับชนิดและความยาวของสายของกรดไขมันเท่านั้น แต่เอนไซม์ไลเปสยังมีความจำเพาะกับหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) ของสับสเตรท เช่น เอนไซม์ไลเปสที่สร้างโดย *Aspergillus flavus* มีความสามารถในการเกิดปฏิกิริยากับ tricaprin มากกว่า triolein เอนไซม์ไลเปสที่สร้างโดย *Candida rugosa* และ *Rhizopus miehei* เกิดปฏิกิริยากับ oleic acid ได้ดีกว่า eladic acid แต่เอนไซม์ไลเปสที่สร้างโดย *C. antarctica* กลับเกิดปฏิกิริยากับ eladic acid ได้ดีกว่า oleic acid นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสสามารถเกิดปฏิกิริยากับจำนวนคาร์บอนอะตอมของกรดไขมันได้แตกต่างกัน เช่นเอนไซม์ไลเปสจาก *Penicillium roquefortii* เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอม 4 อะตอม (C4) แต่จะไม่เกิดปฏิกิริยากับกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนอะตอมสายยาว แต่เอนไซม์ไลเปสจาก *R. miehei* เกิดปฏิกิริยากับกรดไขมันสายยาว (C22) ได้ดีกว่ากรดไขมันสายสั้น (Kapoor; & Gupta. 2012: 555-569)

2.4 เกิด enantioselectivity สูง

อีแนนทิโอเมอร์ (enantiomers) เป็นโมเลกุลของสารประกอบที่เป็นภาพในกระจกเงา (mirror image) ซึ่งกันและกันแต่ไม่สามารถวางทับภาพในกระจกเงาได้สนิท (non superimposable) อีแนนทิโอเมอร์จะเกิดเป็นคู่และมีคุณสมบัติที่เป็น optically active คือหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์ได้ แต่ละอีแนนทิโอเมอร์ที่เป็นสเตอริโอไอโซเมอร์ (มีสูตรโครงสร้างเหมือนกันอะตอมต่างๆต่อกันในลักษณะเดียวกัน แต่แตกต่างกันในวิธีการจัดตัวของอะตอมแบบ 3 มิติ) ซึ่งกันและกันจะมีคุณสมบัติทางกายภาพเหมือนกัน ยกเว้นการหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์จะหมุนระนาบแสงโพลาไรซ์เป็นองศาเท่ากันแต่หมุนในทิศทางตรงข้ามกันโดยที่อีแนนทิโอเมอร์หนึ่งหมุนไปทางขวา (+ หรือ dextrorotatory) ตามเข็มนาฬิกาอีแนนทิโอเมอร์หนึ่งจะหมุนไปทางซ้าย (- หรือ levorotatory) ทวนเข็มนาฬิกาในคู่อีแนนทิโอเมอร์ แต่ละอีแนนทิโอเมอร์จะมีคอนฟิกรेशन (configuration) หรือการจัดหมู่อะตอมกลับกันถ้าอีแนนทิโอเมอร์หนึ่งเป็น R

(rectus, ขวา, ตามเข็มนาฬิกา) อีกอีแนนทิโอเมอร์หนึ่งจะเป็น S (sinister, ซ้าย, ทวนเข็มนาฬิกา) (รำไพสิริมณฑล . 2535: 119-158) การค้นพบเอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อสารที่เป็นอีแนนทิโอเมอร์ในรูปแบบใดรูปแบบหนึ่งจึงนำมาใช้แยกสารให้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นเช่น การใช้เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Candida cylindracea* เร่งปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันระหว่าง (R,S)-ibuprofen กับ amyl alcohol [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{OH}$] ในตัวทำละลายอินทรีย์ที่เป็นไฮโดรโฟบิก เช่น decane, isooctane, heptane และ hexane พบว่าสารตั้งต้นที่อยู่ในรูป S(+)-ibuprofen หายไปเพียงรูป R(-)-ibuprofen แสดงว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *C. cylindracea* มีความจำเพาะกับอีแนนทิโอเมอร์ในรูป S(+)-ibuprofen (Mustranta. 1992: 61-66) Tsai และ Wei ศึกษาความจำเพาะอีแนนทิโอเมอร์ของเอนไซม์ไลเปสโดยทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันระหว่าง (R,S)-naproxen [2-(6-methoxy-2naphthyl) propionic acid กับแอลกอฮอล์ในไอโซออกเทน พบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea* และ *Rhizopus arrhizus* มีความจำเพาะกับ S (+)-naproxen ในขณะที่เอนไซม์ไลเปสจาก Porcine pancreas, *Rhizopus* sp., *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus* และ *Pseudomonas fluorescens* มีความจำเพาะต่อ R(-)-naproxen (Tsai; & Wei. 1994: 328-333)

ตาราง 1 จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ไลเปส

จุลินทรีย์	สกุล	สปีชีส์	อ้างอิง
Bacteria (Gram-	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	Ruiz; et al. 2002: 263-267.
		<i>B. cereus</i> C7	Dutta; & Ray. 2009: 142-154.
		<i>B. stearothermophilus</i> L1	Hwang; et al. 2004: 85-90.
		<i>B. subtilis</i> EH37	Ahmed; Raghavendra; & Madamwar. 2010: 2102-2113. 133-
		<i>B. sphaericus</i> 205y	Hun; et al. 2003: 147-151.
		<i>B. thermoleovorans</i> IHI-91	Markossian; et al. 2000: 365-371.
		<i>Bacillus</i> . sp. WAI 28A5	Janssen; Monk; & Morgan. 1994: 195-200.
		<i>B. licheniformis</i> MTCC	Chakraborty; & Raj. 2008: 727-736.
		<i>B. coagulans</i> BTS-3	Kumar; et al. 2005: 38-44.
		<i>B. acidocaldarius</i>	Manco; et al. 1998: 203-212.
		<i>Bacillus</i> sp. RS-12	Sidhu; et al. 1998: 9-12.
		<i>B. thermoleovorans</i> ID-1	Lee; et al. 2001: 363-371.
		<i>Bacillus</i> sp. J33	Nawani; & Kaur. 2000: 91-96.
		<i>Staphylococcus canosus</i>	Tahoun; E-Kady; & Wahba. 1995: 133-139.
		<i>S. aureus</i>	Lee; & Yandolo. 1986: 385-391.
		<i>S. hyicus</i>	Van; et al. 1998: 39-45.

ตาราง 1 (ต่อ)

จุลินทรีย์	สกุล	สปีชีส์	อ้างอิง
Bacteria (Gram-positive)	<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Simons; et al. 1998: 675-683.
		<i>S. warneri</i>	Talon; et al. 1995: 6-11.
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	El-Sawah; Sherief; & Bayoumy. 1995: 356-362.
		<i>L. plantarum</i>	Lopes; et al. 2002: 107-115.
	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus lactis</i>	Sztajler; Maliszewska; & Wieczorek. 1988: 492-497.
	<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus freudenreichii</i>	Hou. 1994: 242-248.
		<i>M. luteus</i>	Hou. 1994: 242-248.
Bacteria (Gram-negative)	<i>Propionibacterium</i>	<i>Propionibacterium acne</i>	Sztajler; Maliszewska; & Wieczorek. 1988: 492-497.
	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderiacepacia</i>	Pan; et al. 2010: 9822-9824.
		<i>Bu. glumae</i>	Boekema; et al. 2007: 3838-3844.
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ruchi; Anshu; & Khare. 2008: 4796-4802.
		<i>P. fragi</i>	Alquati; et al. 2002: 3321-3328.
		<i>P. mendocina</i> PK-12CS	Jinwal; et al. 2003: 1041-1046.

ตาราง 1 (ต่อ)

จุลินทรีย์	สกุล	สปีชีส์	อ้างอิง
Bacteria (Gram-negative)	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lacointe; Dubreucq; & Galzy. 1996: 869-874.
		<i>P. putida</i> 3SK	Lee; & Rhee. 1993: 617-623.
		<i>P. aeruginosa</i> KKA-5	Sharon; et al. 1998: 304-307.
		<i>P. pseudoalcaligenes</i> F-111	Lin; et al. 1996: 1093-1095.
		<i>P. fluorescens</i> MF0	Guillou; et al. 1995: 377-382.
		<i>Pseudomonas</i> sp. KWI56	Yang; et al. 2000: 295-302.
	<i>Chromobacterium</i>	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Diogo; et al. 1999: 413-419.
	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter pseudoalcaligenes</i>	Sztajer; Maliszewska; & Wieczorek. 1988: 492-497.
		<i>Aci. radioresistens</i>	Chen; Wen; & Chen. 1999: 311-316.
	<i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas hydrophilia</i>	Anguita; Rodriguez-Aparicio; & Naharro. 1993: 2411-2417.
Fungi	<i>Rhizopus</i>	<i>Rhizopus delemar</i>	Klein; et al. 1997: 123-130.
		<i>R. oryzae</i>	Hiol; et al. 2000: 421-430.
		<i>R. arrhizus</i>	Elilbol; & Ozer. 2002: 367-372.
		<i>R. nigricans</i>	Ghosh; et al. 1996: 119-157.
		<i>R. nodosus</i>	Nakashima; et al. 1988: 441-448.

ตาราง 1 (ต่อ)

จุลินทรีย์	สกุล	สปีชีส์	อ้างอิง
Fungi	Aspergillus	<i>Aspergillus flavus</i>	Long; et al. 1998: 369-372.
		<i>A. niger</i>	Mahadik; et al. 2002: 715-721.
		<i>A. japonicus</i>	Satayanarayan; & Johri. 1981: 680-682.
		<i>A. awamori</i>	Satayanarayan; & Johri. 1981: 680-682.
		<i>A. fumigatus</i>	Satayanarayan; & Johri. 1981: 680-682.
		<i>A. oryzae</i>	Maeda; et al. 2005: 778-788.
	Penicillium	<i>Penicillium cyclopium</i>	Vanot; et al. 2001: 342-345.
		<i>P. citrinum</i>	Miranda; et al. 1999: 145-147.
		<i>P. roqueforti</i>	Larsen; & Jensen. 1999: 159-166.
		<i>P. fusiculosum</i>	Hou. 1994: 242-248.
		<i>Mucorja vanicus</i>	Abuin; et al. 2007: 475-479.
	Fusarium	<i>M. circinelloides</i>	Antczak; et al. 2004: 155-161.
		<i>Fusarium oxysporum</i>	Prazeres; Cruz; & Pastore. 2006: 505-509.
		<i>F. heterosporum</i>	Nagao; et al. 2001: 167-172.

ตาราง 1 (ต่อ)

จุลินทรีย์	สกุล	สปีชีส์	อ้างอิง
Yeast	<i>Candida</i>	<i>Candida rugosa</i>	Knezevic; et al. 2006: 269-278.
		<i>C. tropicalis</i>	Takahashi; et al. 1998: 164-168.
		<i>C. antarctica</i>	Jaeger; & Reetz, 1998: 396-403.
		<i>C. cylindracea</i>	Muralidhar; et al. 2001: 17-23.
		<i>C. parapsilosis</i>	Lacointe; Dubreucq; & Gatz. 1996: 869-874.
	<i>Pichia</i>	<i>Pichia bispora</i>	Hou. 1994: 242-248.
		<i>P. maxicana</i>	Hou. 1994: 242-248.
		<i>P. sivecicola</i>	Sugihara; et al. 1995: 277-281.
		<i>P. xylosa</i>	Sugihara; et al. 1995: 277-281.
		<i>P. burtonii</i>	Sugihara; et al. 1995: 277-281.
Actinomycetes	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis mediterranei</i> DSM 43304	Dheeman; Frias; & Hennehan. 2010: 1-17.
		<i>Streptomyces</i> sp. PCB27	Sztajer; Maliszewska; & Wieczorek. 1988: 492-497.
	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i> sp. CCM33	Sztajer; Maliszewska; & Wieczorek. 1988: 492-497.

ตาราง 2 เอนไซม์ใหม่ที่ได้สร้างจากจุลินทรีย์และนำไปประยุกต์ใช้ในเชิงการค้า

จุลินทรีย์	ชื่อทางการค้า	ผู้จำหน่าย
Bacteria		
<i>Pseudomonas mendocina</i>	Lumfast	Genencor International, USA
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Lipomax	Gist-Brocades, The Netherlands; Genencor International, USA
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Chiro CLEC-PC, Chirazyme L-1	Altus Biologics, Mannheim
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Amano P, P-30, PS, LPL-80, LPL-200S	Amano Pharmaceuticals, Japan
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Lipase LH	Amano Pharmaceuticals, Japan
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipase AK, YS	Amano Pharmaceuticals, Japan
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Lipase 56P	Biocatalysts, UK
<i>Pseudomonas</i> sp.	Lipase K-10	Amano Pharmaceuticals, Japan
<i>Chromobacterium viscosum</i>	<i>Chromobacterium viscosum</i> lipase	Asahi Chemical Biocatalysts
<i>Chromobacterium viscosum</i>	Lipase 50P	Biocatalysts, UK
<i>Alcaligenes</i> sp.	Lipase QL	Meito Sankyo Co., Japan
<i>Alcaligenes</i> sp.	Lipoprotein	Meito Sankyo Co., Japan
<i>Alcaligenes</i> sp.	Lipase PL, QL/QLL, PLC/PLG, QLC/QLG	Meito Sankyo Co., Japan
<i>Achromobacter</i> sp.	Alkaline lipase	Meito Sankyo Co., Japan

ตาราง 2 (ต่อ)

จุลินทรีย์	ชื่อทางการค้า	ผู้จำหน่าย
Bacteria		
<i>Achromobacte</i> <i>rsp.</i>	Lipase AL, ALC/ALG	Meito Sankyo Co., Japan
Fungi		
<i>Aspergillu</i> <i>sniger</i>	Lipase DS	Amano Pharmaceuticals, Japan
<i>Rhizopus</i> <i>oryzae</i>	Lipomod TM 627P-L627P	Biocatalysts, UK
<i>Rhizomucor</i> <i>miehei</i>	Palatase	Novozyme
Yeast		
<i>Candida</i> <i>cylindracea</i>	Lipase MY	Meito Sankyo Co., Japan
<i>Candida</i> <i>antarctica</i>	Resinase	Novozyme

ที่มา: ดัดแปลงจาก Gupta; Gupta; & Rathi. 2004: 763-781, Salihi; et al. 2012: 36-44.

3. ปัจจัยที่ส่งผลในการผลิตเอนไซม์ไลเปส (Factors affecting lipase-production)

จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสส่วนใหญ่นั้นจะหลั่งเอนไซม์ไลเปสออกมานอกเซลล์ (extracellular lipase) ซึ่งการผลิตไลเปสจะขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิ พีเอช ปริมาณออกซิเจน ที่ละลายน้ำ และองค์ประกอบทางเคมีของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้แก่ แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสเป็น inducible enzyme จึงจำเป็นต้องอาศัยน้ำมัน ไตรกลีเซอไรด์หรือตัวเหนี่ยวนำอื่นๆ เช่น กรดไขมัน กลีเซอรอล Tween และเกลือแร่ที่ดี ซึ่งเติม ลงไปในอาหารเพื่อเหนี่ยวนำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ไลเปสมาย่อยสลายสเตรทเหล่านี้

ปัจจัยที่ส่งผลในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจำแนกออกได้เป็น 5 ปัจจัยดังนี้

3.1 แหล่งไขมัน

องค์ประกอบของไขมันและน้ำมันพืชส่วนใหญ่คือ ไตรเอซิลกลีเซอรอล ซึ่งเป็นโมเลกุลของกลีเซอรอลกับกรดไขมันอิสระสายยาว โครงสร้างของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว (C18) ซึ่งสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น กรดโอเลอิก (oleic acid) กรดไลโนเลอิก (linoleic acid) และกรดไลโนเลนิก (linolenic acid) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการรักษาคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำมัน และถูกนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม การผลิตเอนไซม์ไลเปส จากแบคทีเรียนี้ ต้องการแหล่งคาร์บอนเป็นอาหารหลัก (Zhang; et al. 2009: 78-84) ในปี ค.ศ. 2003 Hamid และคนอื่นๆ ทำการคัดแยกและระบุลักษณะของแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในบริเวณบ่อน้ำพุร้อน ประเทศมาเลเซีย พบว่า *Bacillus* sp. สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงถึง 4.58 U/mL โดยใช้ น้ำมันมะกอกความเข้มข้น 10% (v/v) เป็นแหล่งไขมัน (Hamid; et al. 2003: 961-968)เช่นเดียวกับ Fabiszewska และคนอื่นๆ ทำการศึกษาแหล่งไขมัน ต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ

Yarrowialipolytica KKP 379 พบว่า แหล่งไขมันที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส คือ น้ำมันมะกอกความเข้มข้น 1% (v/v) ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 2.87 U/mL (Fabiszewska; et al. 2014: 404-410) นอกจากน้ำมันมะกอกแล้ว ในปี ค.ศ. 2004 Burkert, Maugeri และ Rodrigues ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Geotrichum* sp. พบว่า น้ำมันถั่วเหลืองความเข้มข้น 0.6% (v/v) สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่ากับ 20 U/mL (Burkert; Maugeri; & Rodrigues. 2004: 77-84) นอกจากนี้ ในปี ค.ศ. 2013 Almeida และ Taulk-Tornisielo ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida viswanathii* พบว่า เมื่อเติม triolein (C14) ความเข้มข้น 2% (w/v) สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่ากับ 10.25 U (Almeida; & Taulk-Tornisielo. 2013: 1225-1234)

จุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เอง เนื่องจาก เอนไซม์ไลเปส จะไม่ค่อยพบในรูปของ constitutive และด้วยเหตุนี้เองจึงจะต้องอาศัยตัวเหนี่ยวนำ (inducer) เพื่อช่วยให้ เกิดการชักนำในการผลิตเอนไซม์ (Kumar; et al. 2005: 38-44) ดังเช่น Kumar และคนอื่นๆ ได้ศึกษา สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ที่ผลิตจาก *Bacillus pumilus* 31 พบว่า น้ำมันมะกอก ความเข้มข้น 1% (v/v) และ Tween 80 ความเข้มข้น 0.5%(v/v) นั้น จัดได้ว่าเป็นตัวเหนี่ยวนำที่ทำให้เกิด การผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด คือเท่ากับ 5.59 IU/mL เนื่องจากน้ำมันมะกอกและ Tween 80 ประกอบ ไปด้วย long fatty acyl chain triglycerol และ fatty acyl ester bond ตามลำดับ ซึ่งจะเหนี่ยวนำ lipase operon จึงทำให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ไลเปส (Kumar; et al. 2011: 65-71) เช่นเดียวกับ Anbu และคนอื่นๆ ได้ทำการคัดแยกและหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Acinetobacter junii* บริเวณดินที่มีการปนเปื้อนของไขมันในประเทศเกาหลีใต้พบว่า Tween 80 เป็นตัวเหนี่ยวนำที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ไลเปส (Anbu; et al. 2011: 4147-4156) ในขณะที่ การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากการใช้น้ำมันชนิดต่างๆ เป็นตัวเหนี่ยวนำร่วมกับน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 1% (w/v) ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า น้ำมันปาล์มความเข้มข้น 1.5% (v/v) เป็นตัวเหนี่ยวนำที่ เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Burkholderia cepacia* ซึ่งจากรายงานข้างต้นจะพบว่า กระบวนการผลิตเอนไซม์ไลเปสจะเกิดอย่างสมบูรณ์ ถ้าเติมน้ำมันเป็นตัวเหนี่ยวนำ นอกจากนี้การเพิ่ม ความเข้มข้นของน้ำมันจะส่งผลต่อการเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไลเปส แต่ ถ้าเพิ่มความเข้มข้นที่มากเกินไป อาจส่งผลให้เกิด ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic) ซึ่งกลไกการควบคุมการผลิตเอนไซม์ไลเปส ในแบคทีเรียที่มีความแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ (Rathi; Saxena; & Gupta. 2001: 187-192)

5.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนจัดเป็นธาตุอาหารหลักของแบคทีเรียเช่นเดียวกับแหล่งไขมัน โดยแบคทีเรียอาจ จะใช้ แหล่งไขมัน และไนโตรเจนพร้อมกันหรือเกิดต่อเนื่องกันขึ้นกับเมแทบอลิซึม ของแบคทีเรีย (Dalmau; et al. 2000: 657-663) นอกจากนี้แบคทีเรียยังมีความสามารถในการใช้แหล่ง ไนโตรเจนทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปส เช่น การทดลองของ Marimuthu ได้ทำการคัดแยกและศึกษาลักษณะของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Staphylococcus hominis* JX961712 บริเวณดินที่มีการปนเปื้อนของไขมัน พบว่า yeast extract ความเข้มข้น 0.5% (w/v)จะทำให้เชื้อ ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ 19.5 U/mL (Marimuthu. 2013: 252-256) เช่นเดียวกับ Liu และคนอื่นๆ ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Burkholderia* sp. C20 พบว่าเมื่อ

ใช้ yeast extract ความเข้มข้น 2.175 กรัมต่อลิตร และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 16.7 U/mL แต่เมื่อเพิ่มปริมาณ yeast extract จะส่งผลให้การผลิตเอนไซม์ไลเปสลดลง ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าสับสเตรทจะไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไลเปส (Liu et al. 2012: 511-561) ซึ่งจากการศึกษาต่อมาพบว่า เมื่อใช้ CASO ความเข้มข้น 0.16% ซึ่งประกอบด้วย glucose ความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร tryptone ความเข้มข้น 17 กรัมต่อลิตร และ peptone ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน จะส่งผลให้การผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เพียง 3.9 U/mL (Liu; Lu; & Chang. 2006: 1940-1944) Almeida และ Taulk-Tornisielo ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida viswanathii* พบว่า แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ คือ yeast extract และ NH_4NO_3 ความเข้มข้น 0.2% (w/v) จะทำให้มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุดเท่ากับ 68.75 U และ 58.50 U ตามลำดับ (Almeida; & Taulk-Tornisielo. 2013: 1225-1234) นอกจากนี้ Eltaweel และคนอื่นๆ ได้ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. strain 42 ในตัวทำละลายอินทรีย์ พบว่า เมื่อเติม tryptone ความเข้มข้น 0.6% (w/v) และ yeast extract ความเข้มข้น 0.2% (w/v) จะช่วยเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้มากถึง 1.8 เท่า เมื่อเทียบกับการเติม tryptone เพียงอย่างเดียว (Eltaweel; et al. 2005: 187-192) แต่ Tan และคนอื่นๆ ทำการคัดแยก *Candida* sp. ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดและศึกษาสภาวะการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยกระบวนการหมัก พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ กากถั่วเหลือง ความเข้มข้น 4% (w/v) และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้น 0.1% (w/v) ในถังหมักขนาด 1,500 ลิตร ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่ากับ 8,060 U/mL (Tan; et al. 2003: 459-465) Burkert, Maugeri และ Rodrigue ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Geotrichum* sp. พบว่า corn steep liquor ความเข้มข้น 13-15% (v/v) และ NH_4NO_3 ความเข้มข้น 2.1-2.5% (w/v) ส่งผลให้ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่ากับ 20 U/mL (Burkert; Maugeri; & Rodrigues. 2004: 77-84) จากการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าแหล่งไนโตรเจนส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยที่จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนได้หลากหลายไม่ว่าจะเป็นสารอินทรีย์ หรือสารอนินทรีย์ ทั้งนี้ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสควรคำนึงถึงแหล่งและความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสม นอกจากนี้ควรคำนึงถึงต้นทุนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมด้วย

5.3 พีเอช

การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช จะส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย เนื่องจากแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชแตกต่างกัน จากตาราง 3 พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้นั้นอยู่ในช่วง 5.5-10.6 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ทั้งในสภาวะที่เป็นกรดและเบส ดังนั้นควรคำนึงถึงค่าพีเอชที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

5.4 อุณหภูมิ

แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการเจริญในช่วงที่อุณหภูมิที่กว้าง ดังแสดงในตาราง 4 พบว่าช่วงอุณหภูมิที่แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้นั้นอยู่ในช่วง 25-80 องศาเซลเซียส ดังนั้นควรคำนึงถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียด้วยเช่นกัน

5.5 ปัจจัยอื่นๆ

นอกจากปัจจัยที่กล่าวมาข้างต้น ไอออนของโลหะ การให้อากาศ และระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรีย นับได้ว่าเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยเช่นกัน โดยที่ *Acinetobacter calcoaceticus* ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยง 12 ชั่วโมง (Mahler; et al. 2000: 25-30) แต่ *Burkholderia* sp. C20 ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงถึง 21 ชั่วโมง (Liu; et al. 2012: 511-516) นอกจากนี้ *Geobacillus thermodenitrifican* AZ1 ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยง 24 ชั่วโมงเช่นเดียวกับ *Acinetobacter junii* (Anbu; et al. 2011: 4147-4156) และ *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 (Dheeman; Frias; & Henahan. 2010: 1-17) และ *Debaryomyces hansenii* YLL29 ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงนานถึง 72 ชั่วโมง (Papagora; Roukas; & Kotzekidou. 2013: 413-420) เช่นเดียวกับ *Burkholderia cepacia* (Ma; et al. 2010: 429-437) ผลของการให้อากาศ พบว่า *Staphylococcus* sp. เจริญได้ดีเมื่อนำไปบ่มที่เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 140 rpm (Kumar; Parihar; & Batra. 2012: 26-30) ในขณะที่ *Geobacillus thermodenitrifican* AZ1 เจริญได้ดีเมื่อนำไปบ่มที่เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm (Abdel-Fattah; et al. 2012: 193-200) เช่นเดียวกับ *Burkholderia* sp. C20 (Liu; et al. 2012: 511-516) และ *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 (Dheeman; Frias; & Henahan. 2010: 1-17) แต่ *Acinetobacter calcoaceticus* เจริญได้ดีเมื่อนำไปบ่มที่เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 rpm

(Mahler; et al. 2000: 25-30) และผลของการเติมไอออนของโลหะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า *Staphylococcus hominis* JX961712 การเติม Ca^{2+} จะช่วยเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไลเปส แต่ Hg^{2+} และ Ni^{2+} จะเป็นตัวยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไลเปส (Marimuthu. 2013: 252-256) ส่วน *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304 การเติม Fe^{3+} จะช่วยเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไลเปส แต่การเติม Hg^{2+} , Li^+ และ Mg^{2+} จะเป็นตัวยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไลเปส (Dheeman; Frias; & Henahan. 2010: 1-17) และ *Bacillus coagulans* BTS-3 การเติม K^+ , Fe^{3+} , Hg^{2+} และ Mg^{2+} จะช่วยเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไลเปสแต่การเติม Al^{3+} , Co^{2+} , Mn^{2+} และ Zn^{2+} จะเป็นตัวยับยั้งในการผลิตเอนไซม์ไลเปส (Kumar; et al. 2005: 38-44)



ตาราง 3 ค่าพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตเอโนไซม์ได้มาจากแบคทีเรีย

จุลินทรีย์	พีเอชที่เหมาะสม	อ้างอิง
<i>Bacillus alcalophilus</i>	10.6	Ghanem; Al-Sayed; & Saleh. 2000: 459-464.
<i>B. pumilus</i> RK 31	7	Kumar; et al. 2011: 65-71.
<i>B. coagulans</i> BTS-3	8.5	Kumar; et al. 2005: 38-44.
<i>B. thermoleovorans</i> ID-1	6	Lee; et al. 2001: 363-371.
<i>B. brevis</i>	8	Rajendran; & Thangavelu. 2010: 310-322.
<i>Burkholderia</i> sp. C 20	9	Liu; Lu; & Chang. 2006: 1940-1944.
<i>Bu. multivorans</i>	7	Gupta; Sahai; & Gupta. 2007: 518-526.
<i>Bu. cepacia</i>	8	Ma; et al. 2010: 429-437.
<i>Bu. cenocepacia</i> ST8	9	Lau; et al. 2011: 7002-7009.
<i>Pseudomonas</i> sp. KB700A	8	Rashid; et al. 2001: 4064-4069.
<i>P. fluorescens</i> NS2W	9	Gupta; Gupta; & Rathi. 2004: 763-781.
<i>Pseudomonas</i> sp. ZBC 1	7	Xing; et al. 2013: 949-957.
<i>Staphylococcus hominis</i> JX961712	7	Marimuthu. 2013: 252-256
<i>Geobacillus thermodenitrifican</i> AZ 1	8	Abdel-Fattah; et al. 2012: 193-200.
<i>Debaryomyces hansenii</i>	5.5	Papagora; Roukas; & Kotzekidou. 2013: 413-420.
<i>Acinetobacter junii</i>	6	Anbu; et al. 2011: 4147-4156.

ตาราง 4 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอโนไซม์ได้เปปสจากแบคทีเรีย

จุลินทรีย์	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)	อ้างอิง
<i>Bacillus alcalophilus</i>	60	Ghanem; Al-Sayed; & Saleh. 2000: 459-464.
<i>B. pumilus</i> RK 31	37	Kumar; et al. 2011: 65-71.
<i>B. coagulans</i> BTS-3	55	Kumar; et al. 2005: 38-44.
<i>B. thermoleovorans</i> ID-1	50	Lee; et al. 2001: 363-371.
<i>B. brevis</i>	33.7	Rajendran; & Thangavelu. 2010: 310-322.
<i>Burkholderia</i> sp. C 20	55	Liu; Lu; & Chang. 2006: 1940-1944.
<i>Bu. multivorans</i>	37	Gupta; Sahai; & Gupta. 2007: 518-526.
<i>Bu. cepacia</i>	37	Ma; et al. 2010: 429-437.
<i>Bu. cenocepacia</i> ST8	37	Lau; et al. 2011: 7002-7009.
<i>Pseudomonas</i> sp. KB700A	25	Rashid; et al. 2001: 4064-4069.
<i>P. fluorescens</i> NS2W	55	Gupta; Gupta; & Rathi. 2004: 763-781.
<i>Pseudomonas</i> sp. ZBC 1	80	Xing; et al. 2013: 949-957.
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> AZ 1	55	Abdel-Fattah; et al. 2012: 193-200.
<i>Debaryomyces hansenii</i>	30	Papagora; Roukas; & Kotzekidou. 2013: 413-420.
<i>Acinetobacter junii</i>	25	Anbu; et al. 2011: 4147-4156.

4. พลาสติกชีวภาพ (Bioplastic)

พลาสติกชีวภาพ (bioplastic) คือ พลาสติกที่ผลิตจากวัตถุดิบทางธรรมชาติ เช่น ข้าว, ข้าวโพด, อ้อย และมันสำปะหลัง เป็นต้น และสามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ (พิชาภัค สมยูรทรัพย์. 2553)

4.1 พลาสติกที่เป็นส่วนผสมของพอลิเมอร์บางชนิด เช่น พอลิเอสเทอร์กับแป้งซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสเรียงต่อกันเป็นสายยาว โดยที่การผสมกันระหว่างพอลิเมอร์กับแป้งนั้น ต้องมีแป้งเป็นส่วนผสมมากกว่า 60% ถึงจะสามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ

4.2 พลาสติกที่เป็นพอลิเอสเทอร์แบ่งออกเป็น 2 ประเภท ดังนี้

4.2.1 อะลิฟาติก พอลิเอสเทอร์ (aliphatic polyester) คือ พอลิเมอร์สายโซ่ตรงที่ถูกรวมกันด้วยพันธะเอสเทอร์ จะถูกย่อยสลายได้ง่าย พลาสติกที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่

4.2.1.1 Polyhydroxyalkanoates (PHA) เป็นพลาสติกที่เกิดจากการสกัดเอา inclusion body ที่สะสมคาร์บอนไว้ในเซลล์จุลินทรีย์ ประกอบด้วยคาร์บอนอะตอมต่อกันตั้งแต่ 5-14 อะตอม พลาสติกในกลุ่มนี้ที่ได้รับความสนใจในการศึกษา คือ polyhydroxybutyrate (PHB) สามารถถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ที่สร้างจากจุลินทรีย์ เช่น PHB depolymerase ซึ่งสร้างจาก *Pseudomonas stutzeri*

4.2.1.2 Polycaprolactone (PCL) เป็นพลาสติกที่เกิดจากกระบวนการ polymerization ของ ϵ -caprolactone พลาสติกกลุ่มนี้จะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์เอสเทอเรส

4.2.1.3 Polylactic acid (PLA) เป็นพลาสติกที่เกิดจากกระบวนการหมักจากวัตถุดิบทางธรรมชาติได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแลคติก หลังจากนั้นผ่านกระบวนการ ring opening polymerization หรือ การควบแน่นโดยตรง (direct condensation) กลายเป็นพลาสติกชนิด PLA ซึ่งพลาสติกชนิดนี้จะถูกย่อยสลายได้ด้วยจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) โดยที่การย่อยสลายนี้จะต้องอาศัยน้ำในการเกิดปฏิกิริยา หรือที่เรียกว่ากระบวนการไฮโดรไลซิส เอนไซม์ที่ย่อยพลาสติกชนิด PLA เช่น เอนไซม์ไลเปส เอนไซม์เอสเทอเรส และเอนไซม์โปรติเอส เป็นต้น

4.2.2 อะโรมาติก พอลิเอสเตอร์ (aromatic polyester) เป็นพอลิเมอร์ที่มีลักษณะแบบวง เกิดการย่อยสลายทางธรรมชาติได้ยาก หรือใช้เวลานานกว่าอะลิฟาติก พอลิเอสเตอร์ ตัวอย่างของพลาสติกกลุ่มนี้ เช่น Modified polyethylene terephthalate (Modified PET) และ Aliphatic-aromatic copolyesters (AAC)

5. การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสในการสังเคราะห์ PLA (Application of lipases for PLAsynthesis)

เอนไซม์ไลเปสนอกจากจะนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมแล้วยังสามารถนำมาใช้ในการสังเคราะห์พลาสติกชีวภาพได้อีกด้วย โดยที่ในปัจจุบันนอกจากจะศึกษาการผลิตพลาสติกชีวภาพเพื่อนำไปใช้อุปโภคแล้ว การนำพลาสติกชีวภาพที่ผ่านการย่อยสลายมาผ่านกระบวนการรีไซเคิลโดยวิธีทางชีวภาพนั้นถือได้ว่าเป็นแนวทางที่จะช่วยลดการใช้ทรัพยากรทางธรรมชาติ ซึ่งในอนาคตผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรมีแนวโน้มที่จะลดลง เนื่องจากผลกระทบของปรากฏการณ์โลกร้อน พลาสติกชีวภาพชนิด polylactic acid (PLA) เป็นพลาสติกที่ไม่ทำลายสิ่งแวดล้อม เนื่องจากผลิตโดยวัตถุดิบทางการเกษตร และสามารถถูกย่อยสลายด้วย extracellular enzyme เช่น เอนไซม์โปรติเอส เอนไซม์ไลเปส เป็นต้น

5.1 การย่อยสลายพลาสติกชนิด PLA โดยเอนไซม์ไลเปส

การย่อยสลายของพอลิเมอร์จากการทำงานของจุลินทรีย์โดยทั่วไปมีกระบวนการ 2 ขั้นตอน เนื่องจากขนาดของสายพอลิเมอร์ยังมีขนาดใหญ่และไม่ละลายน้ำ

ขั้นตอนที่ 1 การย่อยสลาย เกิดขึ้นภายนอกเซลล์โดยการปลดปล่อยเอนไซม์ของจุลินทรีย์ซึ่งเกิดได้ทั้งแบบใช้ endo-enzyme หรือเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกตัวของพันธะภายในสายโซ่พอลิเมอร์อย่างไม่เป็นระเบียบ และแบบ exo-enzyme หรือเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการแตกหักของพันธะที่ละหน่วยจากหน่วยซ้ำที่เล็กที่สุดที่อยู่ด้านปลายของสายโซ่พอลิเมอร์ เมื่อพอลิเมอร์แตกตัวจนมีขนาดเล็กพอจะแพร่ผ่านผนังเซลล์เข้าไปในเซลล์

ขั้นตอนที่ 2 ได้ผลิตภัณฑ์ในขั้นตอนสุดท้าย (ultimate biodegradation) คือพลังงาน และสารประกอบขนาดเล็กที่เสถียรในธรรมชาติ เช่น แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ แร่ธาตุต่างๆ และมวลชีวภาพ (biomass)

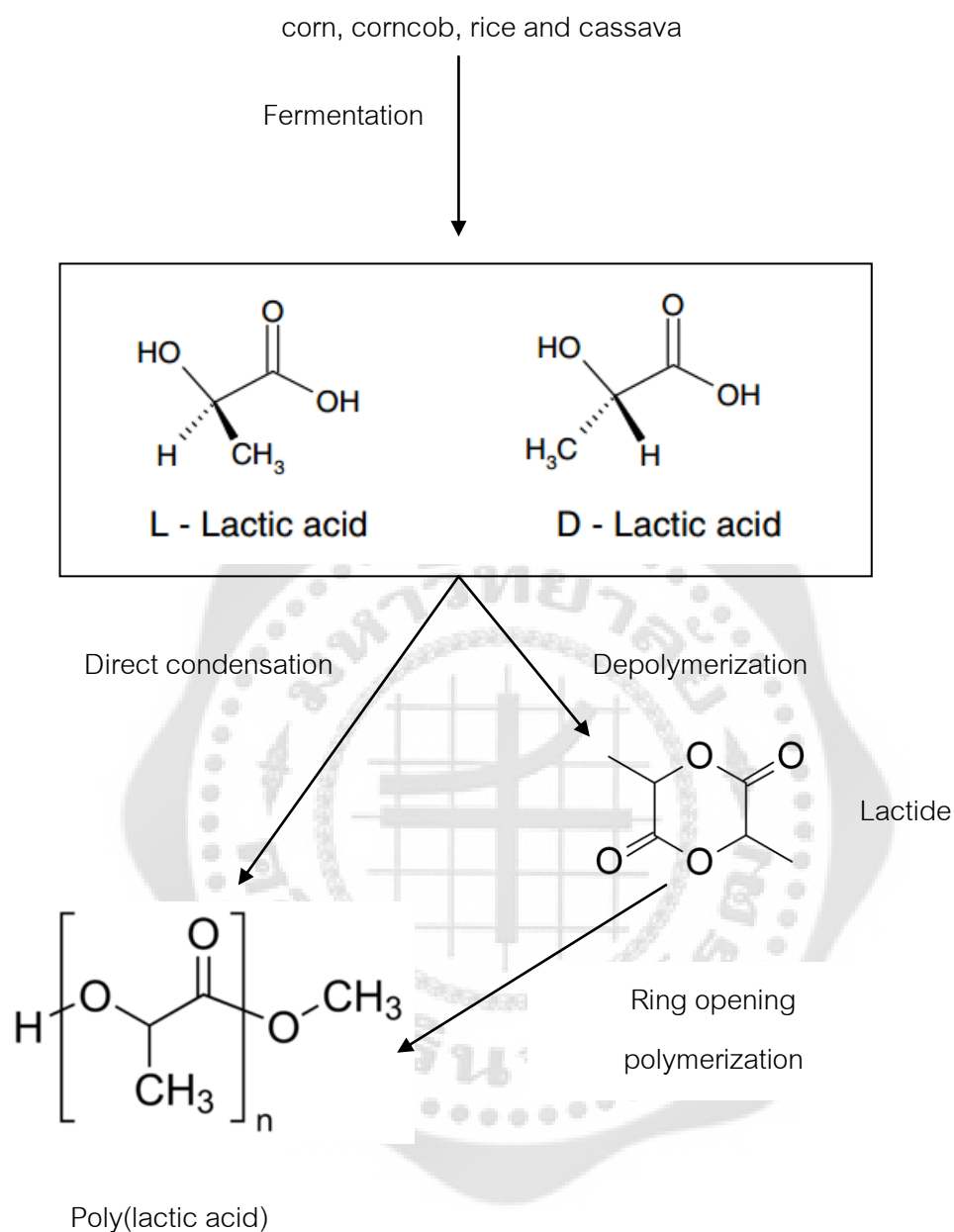
ในปี ค.ศ. 2002 Hoshino และ Isono นำเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Alcaligenes* sp. มาทดสอบการย่อยสลายพลาสติกชนิด PLA จากการทดลองพบว่าพลาสติกชนิด PLA ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ภายในระยะเวลา 20 วัน ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 8 (Hoshino; & Isono. 2002: 141-147) และในปี ค.ศ. 2005 Masaki และคนอื่นๆ นำเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Cryptococcus* sp. strain S-2 มาทดสอบการย่อยพลาสติกชนิด PLA จากการทดลองพบว่าพลาสติกชนิด PLA ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ภายในระยะเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 8 (Masaki; et al. 2005: 7548-7550) นอกจากนี้ Sukkhum และคนอื่นๆ ทำการศึกษาการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสจาก *A. keratinolytica* strain T16-1 จากการทดลองพบว่าพลาสติกชนิด PLA ที่ 70 องศาเซลเซียส พีเอช 10 สามารถย่อยสลายพลาสติกชนิด PLA ได้ (Sukkhum; et al. 2009: 459-467) จากรายงานข้างต้นจะเห็นว่าเอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์โปรติเอสมีความสามารถในการย่อยสลายพลาสติกชนิด PLA

5.2 การสังเคราะห์พลาสติกชนิด PLA โดยเอนไซม์ไลเปส

การสังเคราะห์พลาสติกชนิด PLA ส่วนใหญ่นั้นจะอาศัยวิธีทางเคมีมากกว่าวิธีทางชีวภาพ เนื่องจากสะดวก และรวดเร็วกว่า แต่ต้นทุนในการผลิตค่อนข้างสูงและอาจจะมีสารเคมีตกค้างในพอลิเมอร์ ซึ่งอาจจะส่งผลต่อผู้บริโภค ดังนั้นการสังเคราะห์พลาสติกชนิด PLA ด้วยวิธีทางชีวภาพ ดังภาพประกอบ 3 นั้น จึงเป็นที่น่าสนใจและควรที่จะมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

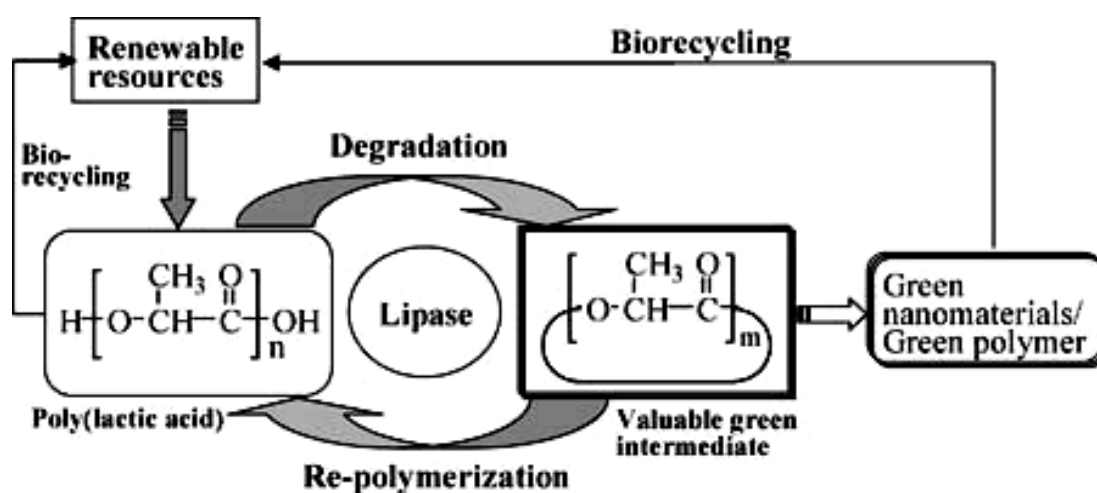
พลาสติกชนิด PLA เป็นพอลิเมอร์ชีวภาพ จัดอยู่ในกลุ่มพอลิเอสเตอร์ไครต์ (aliphatic polyester) ซึ่งสังเคราะห์จากมันสำปะหลัง ข้าวโพด และอ้อย เป็นต้น นำมาผ่านกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียในกลุ่มแลคติก เกิดเป็นกรดแลคติก ($C_3H_5O_3$) ซึ่งเป็นมอนอเมอร์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์พอลิเมอร์ในขั้นต่อไป หลังจากนั้นเติมน้ำหนักโมเลกุลซึ่งสามารถทำได้ 2 วิธี คือ การควบแน่นโดยตรงและ ring opening polymerization ซึ่งกระบวนการควบแน่นโดยตรงนั้นจะทำในสภาวะที่ไม่รุนแรง ส่วนกระบวนการ ring opening polymerization จะเกิดในสภาวะที่รุนแรง แต่น้ำหนักโมเลกุลของพลาสติกชนิด PLA ที่ได้จากกระบวนการควบแน่นโดยตรงนั้นจะมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่ากระบวนการ ring opening polymerization ส่วนพลาสติกชนิด PLA ที่เกิดขึ้นจากทั้ง 2 กระบวนการนี้มีโครงสร้างและสมบัติต่างๆ เหมือนกันทุกประการ ดังภาพประกอบ 2

ในปีค.ศ. 2008 Lassalle และ Ferreira ศึกษาการสังเคราะห์ PLA โดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา พบว่า ตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพจะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 96 ชั่วโมง ซึ่งเอนไซม์ไลเปสที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดคือ CAL-B ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ผลิตจากยีสต์ *Candida antarctica* สามารถเปลี่ยนกรดแลคติกให้เป็นพลาสติกชนิด PLA ได้ถึง 60% ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 5,000-6,200 Da ในขณะที่เมื่อใช้ Porcine pancreatic lipase (PPL) และ PCL จะเกิดเป็นพลาสติกชนิด PLA ในปริมาณต่ำ (Lassalle; & Ferreira. 2008: 1493-1502) ในปี ค.ศ. 2012 Chuensangjun และคนอื่นๆ ทำการศึกษากระบวนการพอลิเมอไรเซชันของกรดแลคติกโดยใช้เอนไซม์ไลเปสทางการค้า (Lipozyme TL IM) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและศึกษาคุณสมบัติของพอลิเมอร์ จากการทดลองพบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการเกิดกระบวนการพอลิเมอไรเซชัน คือ การใช้กรดแลคติกทางการค้าที่ความเข้มข้น 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เอนไซม์ไลเปสทางการค้า (Lipozyme TL IM) 5% (w/w) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะ nitrogen atmosphere นาน 5 ชั่วโมง และเมื่อนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักโมเลกุลพบว่ามีค่าเท่ากับ 4,515 Da (Chuensangjun; et al. 2012: 154-157) จากการทดลองข้างต้นจะพบว่าเอนไซม์ไลเปสมีความสามารถในการรีไซเคิลพลาสติกชนิด PLA ได้



ภาพประกอบ 2 กระบวนการผลิตพลาสติกชนิด PLAแบบกระบวนการควบแน่นโดยตรง (Direct condensation) (ซ้าย) และกระบวนการ Ring opening polymerization (ขวา)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Gupta; & Kumar. (2007). New emerging trends in synthetic biodegradable polymers –polylactide: A critique. *European Polymer Journal*. 43: 4055, 4057.



ภาพประกอบ 3 แผนภาพแสดงกระบวนการรีไซเคิลของพลาสติกชนิด PLA

ที่มา : Takashi; et al. (2004). Lipase-catalyzed transformation of poly(lactic acid) into cyclic oligomers. *Macromolecule Bioscience*.: 349.

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ตาราง 5 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท	รุ่น
1. เครื่องชั่งสารเคมี (Dual range analytical balance)	Denver	TC-205
2. ตู้กรองปลอดเชื้อ (Biosafety cabinet; laminar flow)	NUAIRE	NU-440
3. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)	Shel-lab	C1565
4. ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าอุณหภูมิต่ำ (Low temperature shaking incubator)	Thermo Forma	481
5. ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่าอุณหภูมิสูง (High temperature shaking incubator)	NBW	Inova4000
6. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)	TOMY	ES-315
7. ตู้อบร้อนฆ่าเชื้อ (Hot air sterilizing oven)	Fisher Scientific	ISOTemp
8. เครื่องวัดพีเอช (pH meter)	Suntex	SP-2100
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (High speed centrifuge)	Sorvell	RC-50
10. เครื่อง Ultrasonic sonicator	Labquip	FS-250
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath)	Heto	Hmt200

ตาราง 5 (ต่อ)

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	บริษัท	รุ่น
12. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Visible Spectrophotometer)	Shimadzu	UV-1700
13. เครื่องผสมสารละลาย (Vortex)	Sciencetific industry	G-560E
14. กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope)	Olympus	E202Ti/LED

2. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ตาราง 6 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	บริษัท	ยี่ห้อ
1. กัมอารบิก (Gum arabic)	Sigma-Aldrich Co.	Sigma
2. แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univar
3. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univar
4. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	VWR International	AnalarR
5. โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univar
6. เด็กโทรส (Dextrose)	Himedia Laboratories	Himedia
7. ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univar
8. ไตรตัน เอ็กซ์-100 (Triton x-100)	EMD Chemicals Inc.	Calbiochem
9. ทริปโตเน (Tryptone)	Himedia Laboratories	Himedia
10. ทวิน 80 (Tween 80)	EMD Chemicals Inc.	Calbiochem
11. ทริส (ไฮดรอกซีเมทิล)แอมโมเนียมเฟนิล ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univar
12. น้ำมันข้าวโพด (Corn oil)	Sime Darby Edible Products Limited.	ตราโกเลเด็นดรีอป

ตาราง 6 (ต่อ)

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	บริษัท	ยี่ห้อ
16. น้ำมันคาโนล่า (Canola oil)	บริษัท ล้ำสูง (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน)	ตราเนเชอรัล
17. น้ำมันงา (Sesami oil)	บริษัท เซ็นทรัล ฟู้ด รีเทล จำกัด	ตรานกกระเรียนคู่
18. น้ำมันดอกทานตะวัน (Sunflower oil)	บริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด	ตรากุ๊ก
19. น้ำมันถั่วเหลือง (Soybean oil)	บริษัท น้ำมันพืชไทย จำกัด (มหาชน)	ตรางู
20. น้ำมันมะกอก (Olive oil)	บริษัท วิทยาธรรม จำกัด	น้ำมันมะกอก บริสุทธิ์
21. น้ำมันมะพร้าว (Coconut cooking oil)	Good Me Co., Ltd.	ตราเนเจอร์ไลฟ์
22. น้ำมันเมล็ดชาคามิลเลีย (Camellia tea oil)	บริษัท ล้ำสูง (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน)	ตราเนเชอรัล
23. น้ำมันรำข้าว (Rice bran oil)	บริษัท น้ำมันบริโภคไทย จำกัด	ตราคิง
24. โบวีน ซีรัม อัลบูมิน (Bovine serum albumin, Fraction V)	EMD Chemicals Inc.	Calbiochem
25. เพปโตน (Peptone)	Himedia Laboratories	Himedia
26. โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univar
27. พารา-ไนโตรฟีนอล (para-nitrophenol)	Sigma-Aldrich Co.	Sigma
28. พารา-ไนโตรฟีนิล ปาล์มไมเตต (para-nitrophenyl palmitate)	Sigma-Aldrich Co.	Sigma
29. พอลิ แอล-แลคติก แอซิด ((Poly (L-lactic acid; PLA))		
30. ยีสต์สกัด (Yeast extract)	Himedia Laboratories	Himedia
31. แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH_4) ₂ SO ₄)	Ajax Finechem Pty, Ltd.	Univar

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินจากบริเวณที่มีการปนเปื้อนของไขมันบริเวณสวนปาล์ม และบริเวณอุทยานแห่งชาติ เพื่อนำมาคัดแยกจุลินทรีย์ในกลุ่มของแบคทีเรีย โดยทำการขุดบริเวณผิวดินที่ระดับความลึกประมาณ 5-10 เซนติเมตร (Zhang; et al. 2012: 153-160) แล้วเก็บตัวอย่างดินลงในถุงพลาสติกแบบซิปล หลังจากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตัวอย่างดินที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีจำนวน 100 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บดินมาจาก 3 จังหวัดทางภาคใต้ของประเทศไทย ดังนี้ จังหวัดเพชรบุรี 24 ตัวอย่าง จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 16 ตัวอย่าง และ จังหวัดชุมพร 60 ตัวอย่าง ดังตาราง 7

ตาราง 7 บริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างดินและรหัสที่ใช้ในงานวิจัย

สถานที่	จำนวนตัวอย่าง	รหัส
1. อุทยานแห่งชาติแก่งกระจาน จ. เพชรบุรี	24	KKCH
2. อุทยานแห่งชาติเขาสามร้อยยอด จ. ประจวบคีรีขันธ์	16	SRY
3. ต้นปาล์ม บริเวณหาดทุ่งวัวแล่น จ. ชุมพร	9	TWL
4. สวนปาล์มนาทุ่ง จ. ชุมพร	14	PNT
5. สวนปาล์ม หาดทรายรี จ. ชุมพร	17	PSR
6. ต้นปาล์ม บริเวณกรมหลวงชุมพร จ. ชุมพร	6	KLCP
7. จุดพักปาล์ม จ. ชุมพร	14	PCP
รวม	100	

2. การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

ชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ลงใน Enrichment medium ซึ่งดัดแปลงจาก Ma; et al. 2010: 429-437 (ภาคผนวก ก ข้อ 1) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย peptone ความเข้มข้น 0.05% (w/v) KH_2PO_4 ความเข้มข้น 0.15% (w/v) Na_2HPO_4 ความเข้มข้น 0.1% (w/v) MgSO_4 ความเข้มข้น 0.05% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้น 0.5% (w/v) NaCl ความเข้มข้น 0.05% (w/v) และ Tween 80 ความเข้มข้น 12% (w/v) นำไปป้อนในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบ ต่อ นาที นาน 2 วัน หลังจากนั้นนำตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (10^{-5} - 10^{-7}) แล้วนำตัวอย่างที่เจือจางในแต่ละระดับมาคัดแยกแบคทีเรียโดยวิธี spread plate บนอาหาร Tween 80 agar (ภาคผนวก ก ข้อ 2) นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปป้อนที่อุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ไลเปส โดยสังเกตบริเวณซุ่มรอบๆ โคโลนี ทำการเลือกโคโลนีที่มีสี รูปร่าง และลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันในแต่ละจานอาหารเลี้ยงเชื้อมา cross streak บนอาหาร Tween 80 agar จนได้โคโลนีเดียว แล้วนำไปจุดบน Tween 80 agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน วัดบริเวณซุ่มรอบโคโลนี เพื่อใช้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยมีวิธีการคำนวณดังนี้ (Bai; et al. 2012: 25-32)

$$\text{ดัชนีเอนไซม์} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณซุ่ม (เซนติเมตร)}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (เซนติเมตร)}}$$

เลือกโคโลนีที่มีค่าดัชนีเอนไซม์ตั้งแต่ 2.5 ขึ้นไป มาทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

3. การจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางชีวเคมี

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาเลี้ยงบนอาหาร Nutrient agar (NA) (ภาคผนวก ก ข้อ 7) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาดูรูปร่างโดยการย้อมแกรมและย้อมเอนโดสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า หลังจากนั้นนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาทดสอบทางชีวเคมี (ภาคผนวก ข ข้อ 1-7) ได้แก่ การหมักคาร์โบไฮเดรต, การทดสอบ Methyl red, Voges Proskauer, Citrate, Catalase test, Oxidase test, การเจริญบนอาหาร Triple sugar iron agar (TSI), และ API ZYM (API System; bioMérieux, Paris, France)

3.2 การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียโดยใช้ลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA gene และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis)

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ส่งวิเคราะห์เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียโดยใช้วิธีการหาลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA gene โดยใช้ Universal primer 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') และ 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') (www.dna.macrogen.com) เมื่อได้ผลลำดับเบสแล้วนำมาวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Bioedit และโปรแกรม BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) จากนั้นนำข้อมูลลำดับเบสมาจัดทำแผนภาพวิวัฒนาการของแบคทีเรีย (Phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA6 โดยเลือกลำดับเบสของแบคทีเรียที่มีความคล้ายคลึงกันมาเปรียบเทียบกับแบคทีเรียที่ทำการศึกษาที่ค่า bootstrapping 1,000 ครั้ง

4. การเตรียมหัวเชื้อและการผลิตเอนไซม์

นำแบคทีเรียที่คัดแยกมาเลี้ยงในอาหาร Tween 80 broth (ภาคผนวก ก ข้อ 3) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงใน inoculum medium (ภาคผนวก ก ข้อ 4) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 1 วัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร โดยให้อยู่ในช่วง 0.8-1.0 หลังจากนั้นถ่ายหัวเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงใน production medium (ภาคผนวก ก ข้อ 5) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 2 วัน หลังจากนั้นนำไปใช้เป็นหัวเชื้อในการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสต่อไป

5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

5.1 ศึกษาผลของระยะเวลาและการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ PSR5631 และสายพันธุ์ KKCH8611 ที่คัดแยกได้มาทำการศึกษาผลของระยะเวลาค่อยการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยการถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงใน production medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง โดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงวันที่ 5 หลังจากนั้นนำมาศึกษาการเจริญของแบคทีเรียโดยนำตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (10^{-4} - 10^{-6}) แล้วนำตัวอย่างที่เจือจางในแต่ละระดับมาคั่งแยกแบคทีเรียโดยวิธี spread plate บนอาหาร NA หรือ plate count agar นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียทั้งหมด และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีข้อ 6

5.2 ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไขมัน

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ PSR5631 และสายพันธุ์ KKCH8611 ที่คัดแยกได้มาทำการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยนำหัวเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ถ่ายลงใน production medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยแหล่งไขมันชนิดต่างๆ ดังนี้ น้ำมันมะกอก (olive oil) น้ำมันข้าวโพด (corn oil) น้ำมันคาโนล่า (canola oil) น้ำมันงา (sesame oil) น้ำมันดอกทานตะวัน (sunflower oil) น้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil) น้ำมันมะพร้าว (coconut cooking oil) น้ำมันเมล็ดชาคามิลเลีย (camellia tea oil) และ น้ำมันรำข้าว (rice bran oil) ที่มีความเข้มข้น 0.5% (v/v) CASO ความเข้มข้น 0.12% (v/v) และ NaCl ความเข้มข้น 0.16% (w/v) (Liu; et al. 2011: 96-102) หลังจากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีข้อ 6 ทำการเลือกแหล่งไขมันที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณที่สูงที่สุด มาศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไขมัน

ตามวิธีการทดลองข้างต้น โดยศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไขมัน เท่ากับ 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5% (v/v) ตามลำดับ

5.3 ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ PSR5631 และสายพันธุ์ KKCH8611 ที่คัดแยกได้มาทำการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยนำหัวเชื้อปริมาณ 5 มิลลิลิตร ถ่ายลงใน production medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยแหล่งและความเข้มข้นของคาร์บอนที่เหมาะสมจากการทดลองที่ผ่านมา NaCl ความเข้มข้น 0.16% (w/v) และใช้ CASO ซึ่งประกอบด้วย yeast extract, peptone, tryptone, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 และ NH_4Cl ความเข้มข้น 0.12% (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นของ CASO เท่ากับ 0.02, 0.12, 0.22, 0.32, 0.42 และ 0.52% (w/v) ตามลำดับ หลังจากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีข้อ 6

5.4 ศึกษาความเข้มข้นของ NaCl

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ PSR5631 และสายพันธุ์ KKCH8611 ที่คัดแยกได้มาทำการศึกษาความเข้มข้นของ NaCl ในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยนำหัวเชื้อปริมาณ 5 มิลลิลิตร ถ่ายลงใน production medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย ชนิดและความเข้มข้นของไขมันและไนโตรเจนที่เหมาะสม และศึกษาความเข้มข้นของ NaCl ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0, 0.16, 0.32, 0.48 และ 0.64% (w/v) ตามลำดับ หลังจากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีข้อ 6

5.5 ศึกษาค่าพีเอช

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ PSR5631 และสายพันธุ์ KKCH8611 ที่คัดแยกได้มาทำการศึกษาผลของค่าพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยทำการปรับค่าพีเอชของ production medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ผ่านการศึกษาแหล่งไขมัน, ไนโตรเจน และ โซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมแล้ว โดยปรับให้มีค่าเท่ากับ 5, 5.5, 6.0, 6.5, 7, 7.5 และ 8 หลังจากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีข้อ 6

5.6 ศึกษาผลของอุณหภูมิ

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ PSR5631 และสายพันธุ์ KKCH8611 ที่คัดแยกได้มาทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยนำ production medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ผ่านการศึกษาแหล่งไขมัน, ไนโตรเจน, NaCl และค่าพีเอชที่เหมาะสมแล้ว โดยนำไปป้อนในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีข้อ 6

6. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

นำเอนไซม์ที่ได้จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็วรอบ 14,000 xg เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดูดส่วนใสเพื่อใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ซึ่งการวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสนั้นดัดแปลงจาก Anbu; et al. 2011: 4147-4156 ทำโดยใช้เอนไซม์ไลเปสปริมาตร 70 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารละลาย *p*-nitrophenylpalmitate ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95 % ปริมาตร 560 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร แล้วนำมาเทียบกับกราฟมาตรฐานของ *p*-nitrophenol โดยกำหนดให้ 1 หน่วย หนึ่งของเอนไซม์ไลเปส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อย *p*-nitrophenylpalmitate ให้ได้ *p*-nitrophenol 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทดลอง

7. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ ด้วยวิธี one way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LSD ที่ระดับความน่าจะเป็น ($p < 0.05$)

8. การนำเอนไซม์ไลเปสไปมาประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์พลาสติกชนิด LA ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

การศึกษากการสังเคราะห์ PLA โดยใช้กรดแลคติกทางการค้า และเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* สายพันธุ์ KKCH8611 เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการรีพอลิเมอไรเซชัน ปริมาตร 6.75 มิลลิลิตร กรดแลคติกทางการค้าความเข้มข้น 85% (w/v) ปริมาตร 52.94 มิลลิลิตร Toluene ปริมาตร 40.31 มิลลิลิตร ทำได้โดยต่อชุดควบแน่น ชุดให้ก๊าซไนโตรเจน เทอร์โมมิเตอร์ และหัวกรวนเข้ากับขวดก้นกลมแบบ 4 คอ และทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้อัตราการไหลของก๊าซไนโตรเจน 0.1 vvm (volume per volume per minute) ทำการกรวนตัวอย่างอย่าง

ต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำ reaction mixture ที่ได้ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งมี โอลิโก เมอร์ของ PLA ผสมอยู่ มาเติม methanol แล้วนำไปควบแน่นเพื่อทำการระเหย toluene ได้สารละลายคล้ายน้ำมันสีใส ประมาณ 8 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำตัวอย่างวิเคราะห์หาน้ำหนัก โมเลกุล โดยใช้ Liquid Chromatography Mass Spectrometer (LC/MS) (Finningan LC-Q mass spectrophotometer) โดยใช้วิธีมาตรฐาน



บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนของไขมันบริเวณสวนปาล์ม และบริเวณอุทยานแห่งชาติ จำนวน 100 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บดินมาจาก 3 จังหวัดทางภาคใต้ของประเทศไทย ดังนี้ จังหวัดเพชรบุรี 24 ตัวอย่าง จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 16 ตัวอย่าง และ จังหวัดชุมพร 60 ตัวอย่าง เพื่อนำมาคัดแยก จุลินทรีย์ในกลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยนำตัวอย่างดินใส่ลงใน Enrichment medium นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำตัวอย่างมาคัดแยก แบคทีเรียโดยวิธี spread plate บนอาหาร Tween 80 agar นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่ผลิต เอนไซม์ไลเปส โดยสังเกตบริเวณชุ่นรอบๆ โคโลนี จากการทดลองสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 662 ไอโซเลท หลังจากทำการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสในเบื้องต้นแล้ว นำไอโซเลทที่คัด แยกได้มาทำการจุด (spot inoculation) บนอาหาร Tween 80 agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน วัดบริเวณชุ่นรอบๆ โคโลนี แล้วนำมาคำนวณค่าดัชนีเอนไซม์ ดังแสดงในตาราง 8 หลังจากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มีค่าดัชนีเอนไซม์ตั้งแต่ 2.5 ขึ้นไป ซึ่งมีทั้งหมด 74 ไอโซเลท มาวัดกิจกรรม ของเอนไซม์ ไลเปส โดยใช้สับสเตรทเป็นสารละลาย p -nitrophenylpalmitate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้ว นำมาเทียบกับกราฟมาตรฐานของ p -nitrophenol จากผลการ ทดลองพบว่ามี 5 ไอโซเลทที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่สูง คือ ไอโซเลท KKCH8611 มีกิจกรรม ของเอนไซม์ ไลเปส สูงสุด เป็น 8.96 U/mL รองลงมาคือไอโซเลท PSR5631 มีกิจกรรมของเอนไซม์ ไลเปสคือ 8.89 U/mL ส่วนไอโซเลท TWL962, PNT7521 และ PNT1153 มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส เท่ากับ 7.69, 7.51 และ 7.45 U/mL ตามลำดับ ดังแสดงในตาราง 8 ไอโซเลท KKCH8611 และ ไอโซเลท PSR5631 ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด จึงนำไปใช้ในการวิเคราะห์ในขั้นตอน ต่อไป

ตาราง 8 แสดงกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสและค่าดัชนีเอนไซม์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

Parameter	Strains				
	KKCH8611	PSR5631	TWL962	PNT7521	PNT1153
Lipase activity (U/mL)	8.96	8.89	7.69	7.51	7.45
Enzyme index	3.00 ± 0.16	3.30 ± 0.50	4.65 ± 0.00	3.04 ± 0.20	3.13 ± 0.45

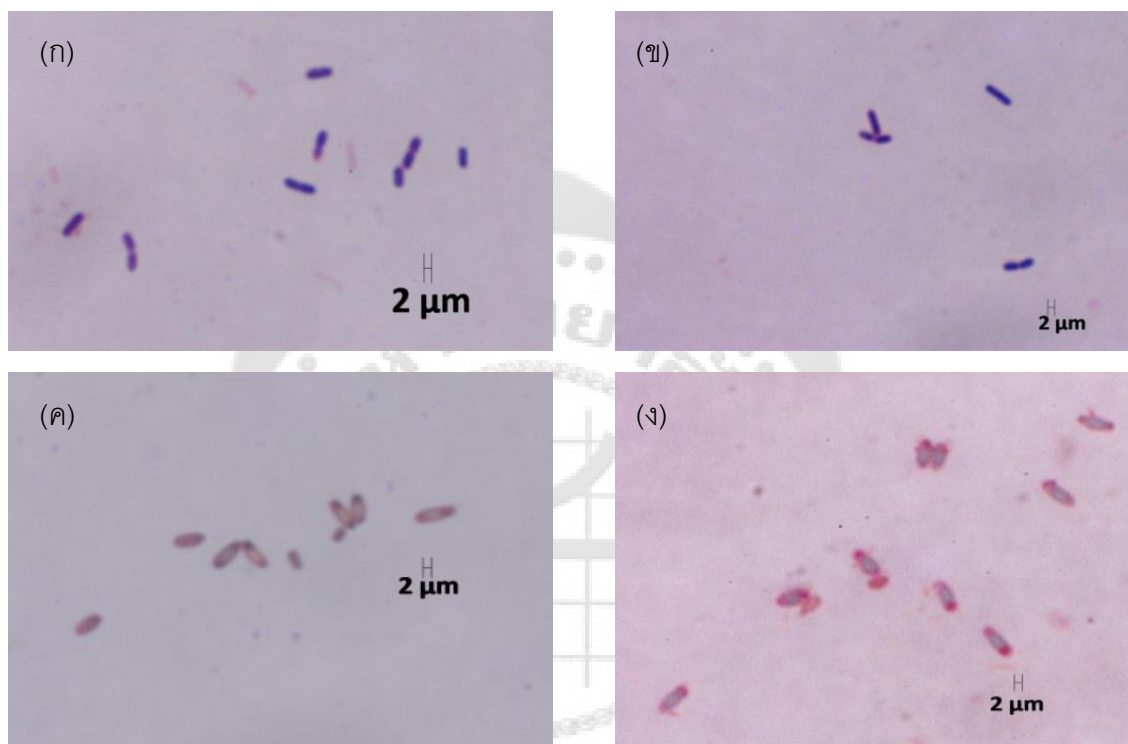
2. การจัดจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างดิน โดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางชีวเคมี ลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA gene และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

จากการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสพบว่า มี 5 ไอโซเลท คือ ไอโซเลท KKCH8611, PSR5631, TWL962, PNT7521 และ PNT1153 ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด ในการศึกษาขั้นต่อมา คัดเลือกไอโซเลทที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด 2 อันดับแรก คือ ไอโซเลท KKCH8611 และ PSR5631 นำมาจัดจำแนกโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางชีวเคมี ลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA gene และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางชีวเคมี

นำไอโซเลท KKCH8611 และ ไอโซเลท PSR5631 มาเลี้ยงบนอาหาร Nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และศึกษาลักษณะโคโลนี พบว่า ลักษณะโคโลนีของไอโซเลท KKCH8611 มีขนาดเล็กโค้งนูนเล็กน้อย (convex) ขอบเรียบ (entire) มีสีน้ำตาล และโคโลนีของ ไอโซเลท PSR5631 มีขนาดเล็กโคโลนีนูน (convex) ขอบหยักเล็กน้อย (undulate) มีสีน้ำตาล และเมื่อนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) ด้วยกำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าทั้ง ไอโซเลท KKCH8611 และ ไอโซเลท PSR5631 ย้อมติดสีม่วงของ crystal violet แสดงว่าทั้งสองไอโซเลทจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อน (rod shape) โดยที่ทั้งสองไอโซเลทมีความยาวของตัวเซลล์เท่ากับ

4-6 ไมโครเมตร และความกว้างของตัวเซลล์เท่ากับ 2-3 ไมโครเมตร ดังแสดงในภาพประกอบ 4 (ก) และ (ข) และไอโซเลททั้งสองสามารถ สร้างเอนโดสปอร์ (endospore) ได้โดยที่ลักษณะของเอนโดสปอร์มีลักษณะวงรีอยู่บริเวณกึ่งกลางเซลล์ (central endospore) และมีความยาวของเอนโดสปอร์เท่ากับ 2-3 ไมโครเมตร และความกว้างของเอนโดสปอร์เท่ากับ 1-2 ไมโครเมตร ดังแสดงในภาพประกอบ 4 (ค) และ (ง) ตามลำดับ



ภาพประกอบ 4 ลักษณะพื้นฐานของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทเมื่อทำการย้อมแกรมและย้อมเอนโดสปอร์ ภายใต้ กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) ด้วยกำลังขยาย 1,000 เท่า

- (ก) ลักษณะเซลล์ของไอโซเลท KKCH8611เมื่อทำการย้อมแกรม
- (ข) ลักษณะเซลล์ของไอโซเลท PSR5631เมื่อทำการย้อมแกรม
- (ค) ลักษณะเซลล์ของไอโซเลท KKCH8611เมื่อทำการย้อมเอนโดสปอร์
- (ง) ลักษณะเซลล์ของไอโซเลท PSR5631เมื่อทำการย้อมเอนโดสปอร์

หลังจากนั้นนำ ไอโซเลท KKCH8611 และ ไอโซเลท PSR5631 มาทำการศึกษาลักษณะทางชีวเคมี โดยการนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ดังแสดงในวิธีการข้อ 3.1 แล้วนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับการจัดจำแนกแบคทีเรียได้จากในหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1st edition ปี 1986 Volume 2 และ 2nd edition ปี 2009 Volume 3

ผลจากการศึกษาพบว่า ไอโซเลท KKCH8611 สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ pH 5-8 เมื่อทดสอบด้วยอาหารจำเพาะให้ผลบวก (+) ในการทดสอบ Voges Proskauer, การหมักน้ำตาล glucose และ mannitol, Starch hydrolysis, Casein hydrolysis, Gelatin hydrolysis, Citrate, Oxidase, Decarboxylase และ Catalase และให้ผลลบ (-) ในการทดสอบ Indole, Methyl red, และการหมักน้ำตาล lactose นอกจากนี้ยังศึกษาการสร้างเอนไซม์โดยใช้ API ZYM test พบว่า ไอโซเลท KKCH8611 สามารถสร้าง Alkaline phosphatase, Esterase, Esterase lipase, Phosphohydrolase และ β -Glucosidase เมื่อนำผลการศึกษามาเปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (Rekha; et al. 2007: 447-451, Sanghi; et al. 2008: 633-640, Murillo; & Villamil. 2011: 1-5, Khianggam; et al. 2014: 090-096) พบว่า ไอโซเลท KKCH8611 คือ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* ดังแสดงในตาราง 9

ส่วนไอโซเลท PSR5631 สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอุณหภูมิ 37 °C ที่ pH 5-8 เมื่อทดสอบด้วยอาหารจำเพาะให้ผลบวก (+) ในการทดสอบ Voges Proskauer, การหมักน้ำตาล glucose และ mannitol, Gelatin hydrolysis, Starch hydrolysis, Citrate, Oxidase และ Catalase ให้ผลลบ (-) ในการทดสอบ Indole, Methyl red, การหมักน้ำตาล lactose, Casein hydrolysis และ Decarboxylase นอกจากนี้ยังศึกษาการสร้างเอนไซม์โดยใช้ API ZYM test พบว่า ไอโซเลท PSR5631 สามารถสร้าง Esterase, Esterase lipase, Valine aminopeptidase, Phosphohydrolase และ β -Glucosidase เมื่อนำผลการศึกษามาเปรียบเทียบกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (Satami; et al. 2006: 1735-1740, Khianggam; et al. 2014: 090-096) พบว่า ไอโซเลท PSR5631 คือ *Bacillus safensis* ดังแสดงในตาราง 9

ตาราง 9 ลักษณะทางชีวเคมีของ ไอโซเลท KKCH8611 และ ไอโซเลท PSR5631 เทียบกับ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* และ *Bacillus safensis* ตามลำดับ

Characterization	KKCH8611 1	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> ¹	PSR5631	<i>Bacillus safensis</i> ²
Growth condition				
Optimum temp. (°C)	37	37	37	37
Optimum pH	5-8	5-9	5-8	5-9
Biochemical				
Indole	-	-	-	-
Voges Proskauer	+	+	+	+
Methyl red	-	-	-	-
Triple sugar iron agar	K/A	ND	K/A	ND
Carbohydrate fermentation				
Glucose	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	+
Hydrolysis of				
Casein	+	+	-	-
Gelatin	+	+	+	+
Starch	+	+	+	+
Utilization of citrate	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+
Decarboxylase (lysine, arginine, ornithine)	+	ND	-	-
Catalase	+	+	+	+
API ZYM test				
Aklaline phosphatase	+	-	±	+
Esterase (C-4)	+	-	+	+
Esterase lipase (C-8)	+	+	+	ND
Lipase (C-14)	-	+	-	-

ตาราง 9 (ต่อ)

Characterization	KKCH8611	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> ¹	PSR5631	<i>Bacillus safensis</i> ²
Leucine arylamidase	±	+	-	-
Valine arylamidase	±	+	±	-
Cystine arylamidase	±	ND	±	-
Trypsin	±	-	±	-
Chymotrypsin	±	-	±	ND
Acid phosphatase	-	+	-	-
Phosphohydrolase	+	ND	+	+
α-Galactosidase	-	-	-	-
β-Galactosidase	-	-	+	+
β-Glucuronidase	-	ND	-	-
α-Glucosidase	-	ND	±	+
β-Glucosidase	+	ND	+	+
N-Acetyl-β-glucosaminidase	±	ND	-	-

หมายเหตุ + คือ มีการเปลี่ยนแปลง, - คือ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง, ± คือ มีการเปลี่ยนแปลงไม่ชัดเจน และ ND คือ ไม่มีข้อมูลในการทดสอบ

¹ Sanghi, A.; et al. (2008). Optimization of xylanase production using inexpensive agro-residues by alkalophilic *Bacillus subtilis* ASH in solid-state fermentation. *World J Microbiology Biotechnology*. 24: 633-640.

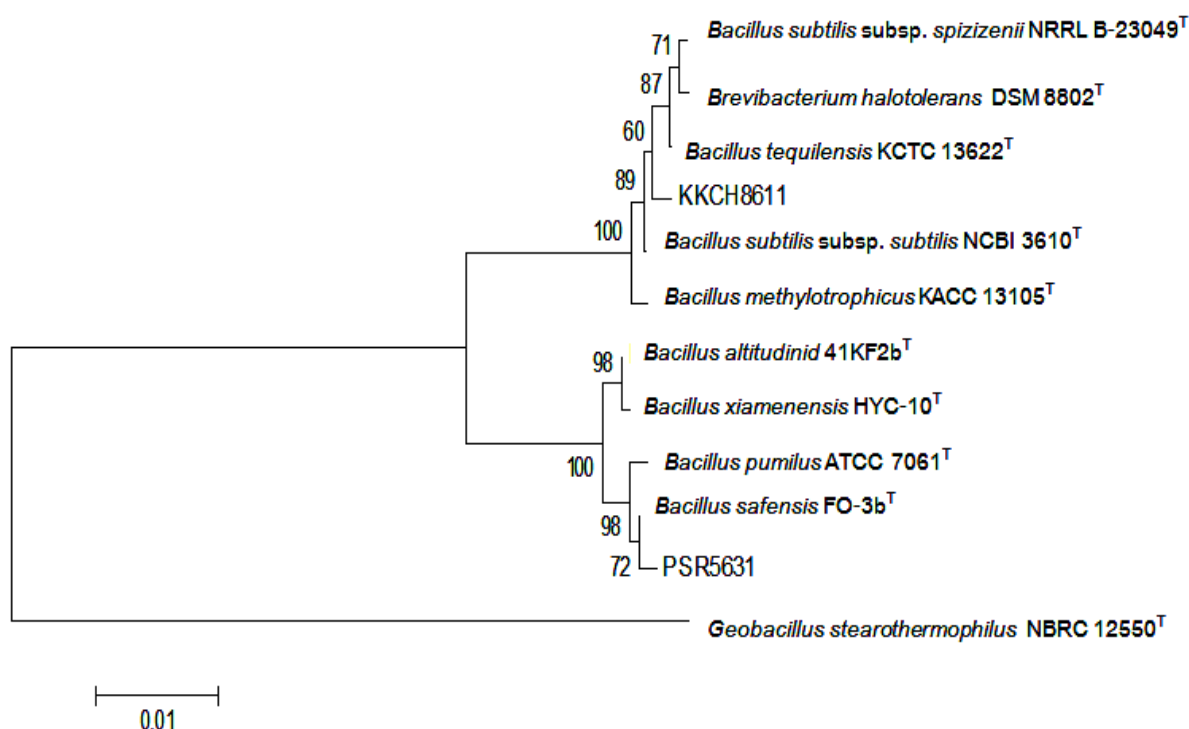
¹ Murillo, I.; & Villamil, L. (2011). *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* used as probiotics in rotifer (*Brachionus plicatilis*) cultures. *Probiotic & Prebiotic Applications in Aquaculture*.: 1-5.

² Satami, M. et al. (2006). *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from space craft and assembly-facility surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56: 1739.

² Khiangnam, S. et al. (2014). Screening and identification of cellulase producing bacteria isolated from oil palm meal. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 4 (04): 093.

2.2 การศึกษาลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA gene และความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis)

นำไอโซเลท KKCH8611 และ ไอโซเลท PSR5631 ส่งวิเคราะห์ที่บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลีใต้เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียโดยใช้วิธีการหาลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA gene โดยใช้ Universal primer 27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') และ 1492R (5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3') และเมื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA gene โดยนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank (National Center for Biotechnology Information (NCBI)) ด้วยโปรแกรม BLAST พบว่า ไอโซเลท KKCH8611 มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* เท่ากับ 99.93% similarity โดยลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง type strain มี accession number เป็น ABQL01000001 ดังนั้นจึงระบุได้ว่าเป็นเชื้อ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* สายพันธุ์ KKCH8611 และไอโซเลท PSR5631 มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus safensis* เท่ากับ 99.66% similarity โดยลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง type strain มี accession number เป็น ASJD01000027 ดังนั้นจึงระบุได้ว่าเป็นเชื้อ *Bacillus safensis* สายพันธุ์ PSR5631 ดังแสดงในภาพประกอบ 5



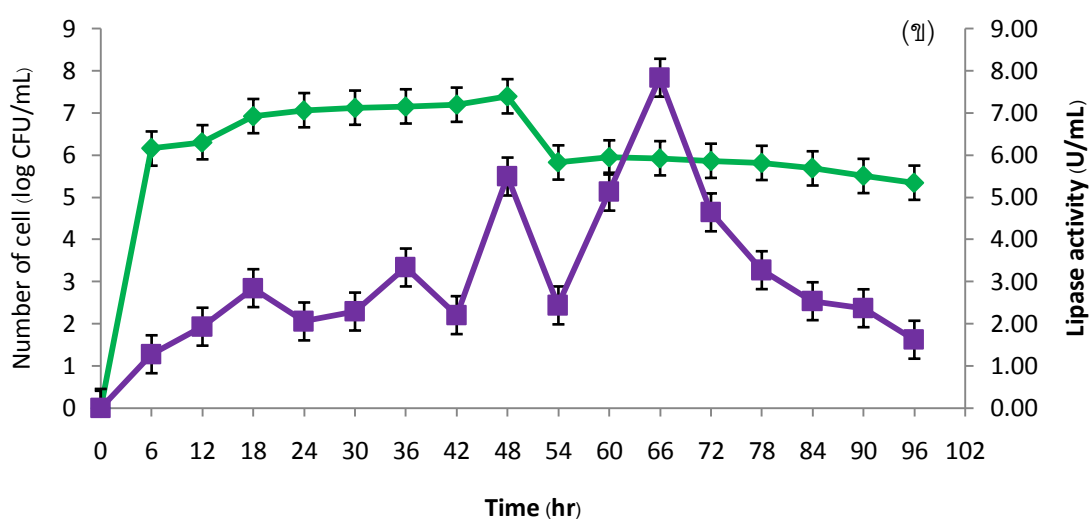
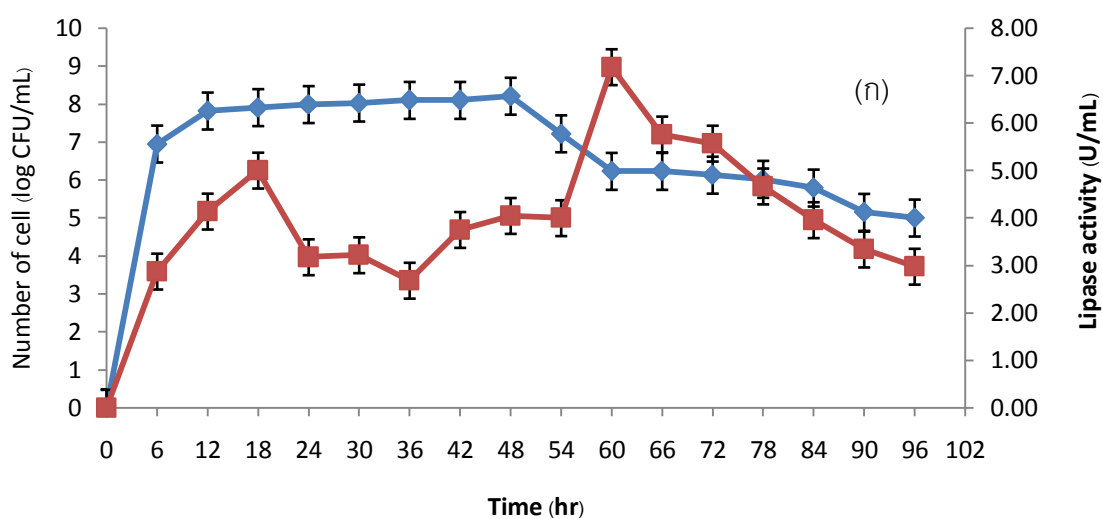
ภาพประกอบ 5 แผนภูมิทางวิวัฒนาการของลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA gene ของแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Genbank ที่ค่า bootstrapping 1,000 ครั้ง

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากการจัดจำแนกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุดทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ KKCH8611 และสายพันธุ์ PSR5631 ในขั้นต่อมาได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยทำการศึกษาระยะเวลาและการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไขมัน ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของ NaCl ค่าพีเอช และ อุณหภูมิ

3.1 ผลของระยะเวลาและการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด คือ สายพันธุ์ KKCH8611 และสายพันธุ์ PSR5631 ทำการศึกษาที่สภาวะดังนี้ น้ำมันมะกอก ความเข้มข้น 0.5% (v/v), CASO ความเข้มข้น 0.12% (w/v) และ NaCl ความเข้มข้น 0.16% (w/v) พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน ซึ่งเป็นสภาวะเดียวกับการศึกษาผลของระยะเวลาและการเจริญของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ KKCH8611 และสายพันธุ์ PSR5631 แต่การศึกษาลักษณะระยะเวลาได้ทำการ เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง โดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงวันที่ 5 นำตัวอย่างมาคัดแยกแบคทีเรียโดยวิธี spread plate บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน นับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียทั้งหมด และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส จากการทดลองพบว่า ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ PSR5631 พบว่า ในช่วงระยะ lag phase และ log phase กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสนั้นมีค่าไม่คงที่ เมื่อระยะเวลา 60 ชั่วโมง เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 7.18 U/mL และเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสลดลงอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้ สายพันธุ์ PSR5631 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ 2 ช่วงของการเจริญ โดยช่วงที่ 1 ผลิตเอนไซม์ไลเปสพร้อมกับการเจริญในช่วง log phase และช่วงที่ 2 ผลิตเอนไซม์ไลเปสในช่วงปลาย stationary phase ดังแสดงในภาพประกอบ 6 (ก) และสายพันธุ์ KKCH8611 พบว่า ในช่วงระยะ lag phase และ log phase กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่ง ที่ระยะเวลา 66 ชั่วโมง เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 7.83 U/mL และเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญของเชื้อที่อยู่ในช่วงของ death phase ดังแสดงในภาพประกอบ 6 (ข)

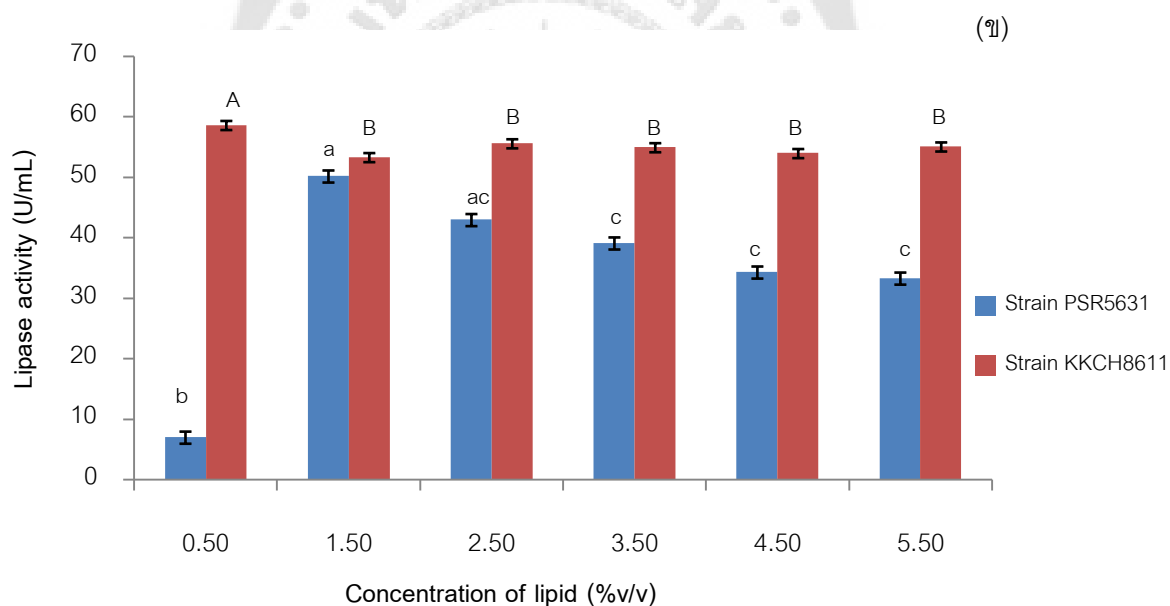
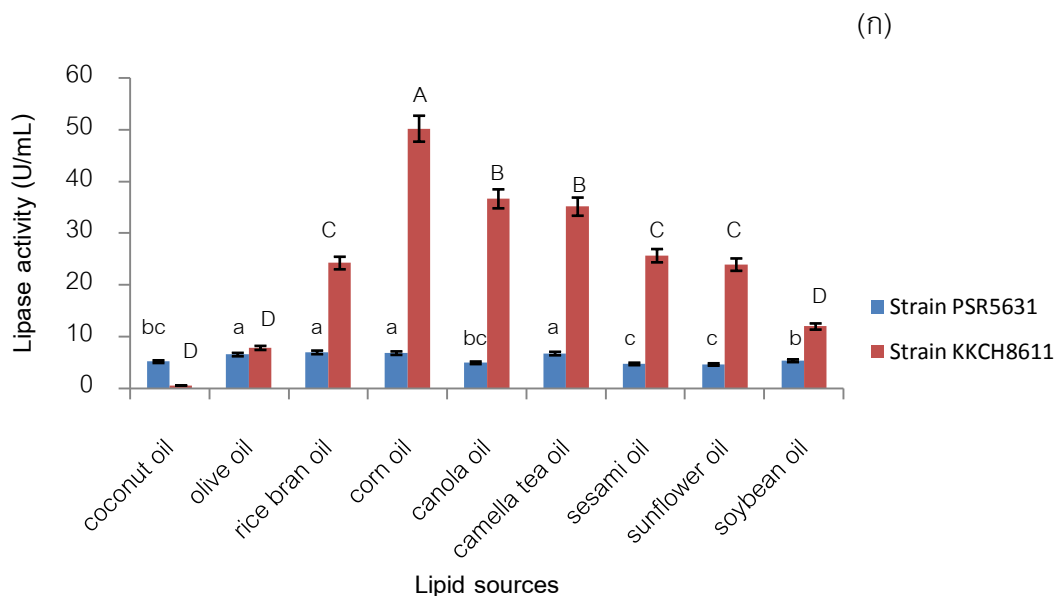


ภาพประกอบ 6 ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส (ก) *Bacillus safensis* สายพันธุ์ PSR5631 (◆ Cell number (log CFU/mL) และ ■ Lipase activity (U/mL))

(ข) *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* สายพันธุ์ KKCH8611 (◆ Cell number (log CFU/mL) และ ■ Lipase activity (U/mL))

3.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไขมัน

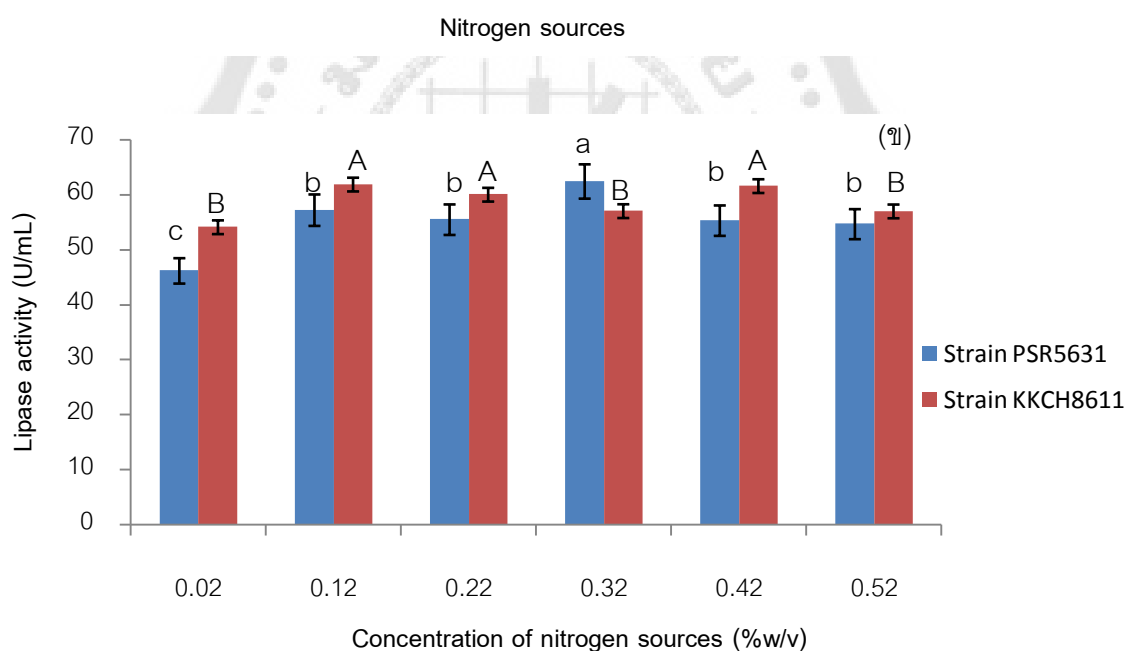
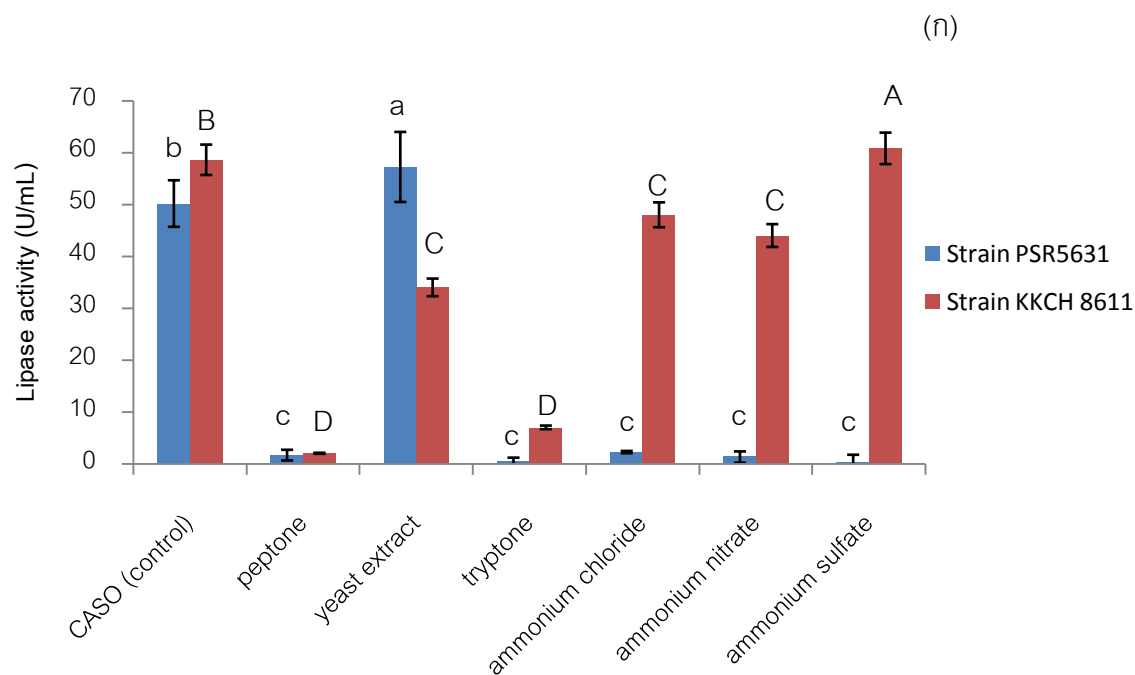
จากการศึกษาผลของระยะเวลาและการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ PSR5631 และสายพันธุ์ KKCH8611 มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดที่ระยะเวลา 60 และ 66 ชั่วโมงตามลำดับ ขึ้นต่อมาทำการศึกษานิตและความเข้มข้นของแหล่งไขมันในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยนำหัวเชื้อถ่ายลงใน production medium ซึ่งประกอบด้วยแหล่งไขมันชนิดต่างๆ ดังนี้ น้ำมันมะกอก (olive oil) น้ำมันข้าวโพด (corn oil) น้ำมันคาโนล่า (canola oil) น้ำมันงา (sesami oil) น้ำมันดอกทานตะวัน (sunflower oil) น้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil) น้ำมันมะพร้าว (coconut cooking oil) น้ำมันเมล็ดชา ดอกคามิลเลีย (camellia tea oil) และ น้ำมันรำข้าว (rice bran oil) ที่ความเข้มข้น 0.5% (v/v), CASO ความเข้มข้น 0.12% (v/v) และ NaCl ความเข้มข้น 0.16% (w/v) พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่ระยะเวลา 60 และ 66 ชั่วโมง หลังจากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส จากการศึกษาพบว่า สายพันธุ์ PSR5631 เมื่อใช้น้ำมันรำข้าว น้ำมันข้าวโพด น้ำมันเมล็ดชาดอกคามิลเลีย และน้ำมันมะกอกสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่ากับ 6.94, 6.82, 6.74 และ 6.54 U/mL ตามลำดับ ดังแสดงในภาพประกอบ 7 (ก) ดังนั้นจึงเลือกน้ำมันรำข้าวเป็นแหล่ง ไขมันเนื่องจากมีราคาถูกกว่าน้ำมันข้างต้น ส่วนสายพันธุ์ KKCH8611 สามารถใช้น้ำมันข้าวโพด ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด คือ 50.24 U/mL รองลงมาคือ น้ำมันคาโนล่า และน้ำมันเมล็ดชาดอกคามิลเลีย สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่ากับ 36.67 และ 35.16 U/mL ตามลำดับ แต่ในขณะที่น้ำมันมะพร้าวสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้น้อยที่สุดคือ 0.55 U/mL ดังแสดงในภาพประกอบ 7 (ก) ดังนั้นจึงเลือกน้ำมันข้าวโพดเป็นแหล่งไขมัน ต่อมาทำการศึกษาค้นคว้าความเข้มข้นของ น้ำมันข้าวโพดและ น้ำมันรำข้าว ที่ความเข้มข้นของแหล่งไขมัน เท่ากับ 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5 และ 5.5% (v/v) ตามลำดับ พบว่าสายพันธุ์ KKCH8611 สามารถใช้น้ำมันข้าวโพด ที่ความเข้มข้น 0.5% (v/v) ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุด โดยผลิตเอนไซม์ได้ เท่ากับ 58.61 U/mL รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 2.5% (v/v) และ 5.5% (v/v) ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่ากับ 55.58 และ 55.06 U/mL ตามลำดับ ดังแสดงในภาพประกอบ 7 (ข) และ สายพันธุ์ PSR5631 สามารถใช้น้ำมันรำข้าว ที่ความเข้มข้น 1.5% (v/v) ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุด โดยผลิตเอนไซม์ ไลเปสได้เท่ากับ 50.17 U/mL รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 2.5% (v/v) และ 3.5% (v/v) ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่ากับ 42.96 และ 39.09 U/mL ตามลำดับ ดังแสดงในภาพประกอบ 7 (ข) จากการศึกษา ข้างต้นได้ทำการคัดเลือกชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไขมันของสายพันธุ์ PSR5631 และสายพันธุ์ KKCH8611 คือ น้ำมันรำข้าว ที่ความเข้มข้น 1.5% (v/v) และน้ำมันข้าวโพดที่ความเข้มข้น 0.5% (v/v) ตามลำดับ เพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป การผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ KKCH8611 สามารถใช้แหล่งไขมันผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าสายพันธุ์ PSR5631



ภาพประกอบ 7 ผลของ ชนิดและความเข้มข้นของไขมัน ต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus safensis* สายพันธุ์ PSR5631 และ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* สายพันธุ์ KKCH8611 (ก) การเปรียบเทียบ ชนิดของแหล่ง ไขมันที่ความเข้มข้น 0.5% (v/v) (ข) การเปรียบเทียบ ความเข้มข้นของแหล่งไขมันโดยสายพันธุ์ PSR5631ใช้น้ำมันรำข้าว และสายพันธุ์ KKCH8611 ใช้น้ำมันข้าวโพด เป็นแหล่ง ไขมัน ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกัน แสดงความแตกต่างของ ค่าเฉลี่ยปริมาณเอนไซม์ไลเปสในแต่ละการทดลองที่ $p < 0.05$

3.3 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสายพันธุ์ PSR5631 และสายพันธุ์ KKCH8611 สามารถใช้น้ำมันรำข้าว ที่ความเข้มข้น 1.5% (v/v) และน้ำมันข้าวโพดที่ความเข้มข้น 0.5% (v/v) ที่ระยะเวลา 60 และ 66 ชั่วโมง ตามลำดับ ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด ต่อมา ทำการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยนำหัวเชื้อถ่ายลงใน production medium ที่มีการแปรผันแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ดังนี้ CASO, yeast extract, peptone, tryptone, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 และ NH_4Cl ที่ความเข้มข้น 0.12% (v/v) โดยใช้ NaCl ความเข้มข้น 0.16% (w/v), น้ำมันรำข้าวความเข้มข้น 1.5% (v/v) สำหรับสายพันธุ์ PSR5631 และน้ำมันข้าวโพด ความเข้มข้น 0.5% (v/v) สำหรับสายพันธุ์ KKCH8611 ที่เอช 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่ระยะเวลา 60 และ 66 ชั่วโมง ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่า สายพันธุ์ PSR5631 เมื่อใช้ yeast extract สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดอย่างมีระดับนัยสำคัญ เท่ากับ 57.23 U/mL รองลงมาคือ CASO มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 50.17 U/mL ในขณะที่แหล่งไนโตรเจน อื่นๆ มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ต่ำมาก ดังแสดงในภาพประกอบ 8 (ก) ส่วน สายพันธุ์ KKCH8611 สามารถใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CASO, NH_4Cl และ NH_4NO_3 ในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้เท่ากับ 60.81, 58.61, 48.00 และ 44.00 U/mL ตามลำดับ แต่เมื่อใช้ peptone และ tryptone ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสนั้นมีค่าที่ต่ำ คือ 2.00 และ 7.00 U/mL ดังแสดงในภาพประกอบ 8 (ก) จากการศึกษาข้างต้น สายพันธุ์ PSR5631 และสายพันธุ์ KKCH8611 สามารถใช้ yeast extract และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดตามลำดับ หลังจากนั้นศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.02, 0.12, 0.22, 0.32, 0.42 และ 0.52% (w/v) ตามลำดับ พบว่าสายพันธุ์ PSR5631 ที่ความเข้มข้น 0.32% (w/v) สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดอย่างมีระดับนัยสำคัญเท่ากับ 62.45 U/mL รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 0.12% และ 0.22% (w/v) สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่ากับ 57.23 และ 55.50 U/mL ตามลำดับ ดังแสดงในภาพประกอบ 8 (ข) และสายพันธุ์ KKCH8611 ที่ความเข้มข้น 0.12% (w/v) สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่ากับ 61.89 U/mL รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 0.42% และ 0.22% (w/v) สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่ากับ 61.61 และ 60.05 U/mL ตามลำดับ ดังแสดงในภาพประกอบ 8 (ข) จากการศึกษาข้างต้นพบว่าชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส จากแบคทีเรียสายพันธุ์ PSR5631 และสายพันธุ์ KKCH8611 คือ yeast extract ที่ความเข้มข้น 0.32% (w/v) และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ความเข้มข้น 0.12% (w/v) ตามลำดับ โดยจะเห็นว่าสายพันธุ์ KKCH8611 สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ได้ดีและสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงกว่าสายพันธุ์ PSR5631 ซึ่งแหล่งไนโตรเจนนี้เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่มีราคาถูก



ภาพประกอบ 8 ผลของ ชนิดและความเข้มข้นของไขมัน ต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก

Bacillus safensis สายพันธุ์ PSR5631 และ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* สายพันธุ์ KKCH8611

(ก) การเปรียบเทียบชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 0.12% (w/v) (ข) การเปรียบเทียบความ

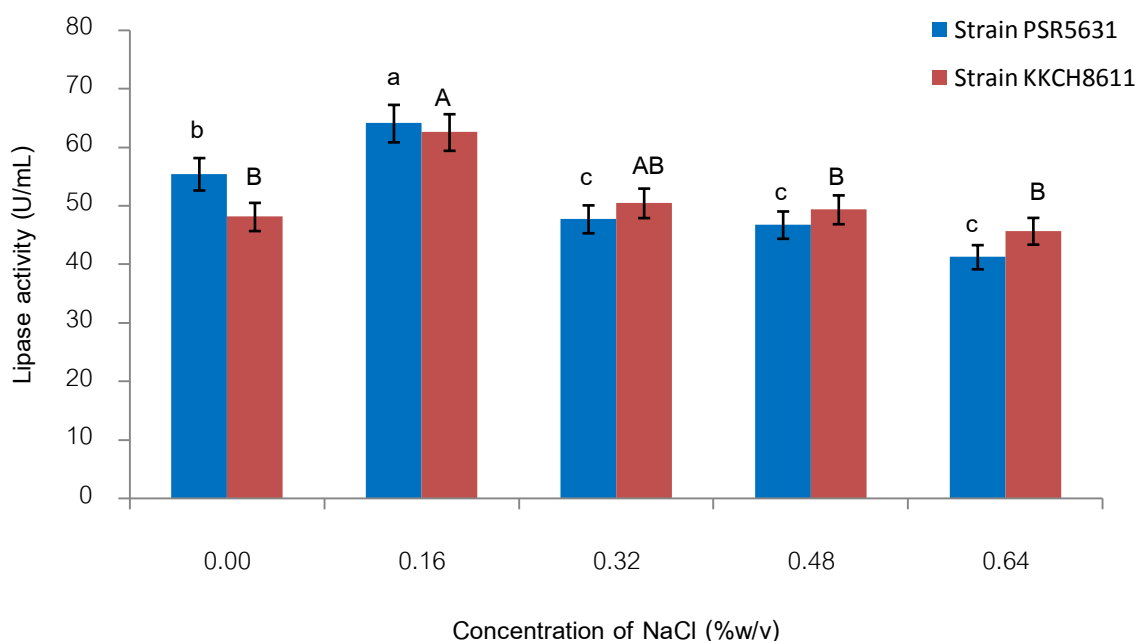
เข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนโดยสายพันธุ์ PSR5631 ใช้ yeast extract และ สายพันธุ์ KKCH8611 ใช้

($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างของ

ค่าเฉลี่ยปริมาณเอนไซม์ไลเปสในแต่ละการทดลองที่ $p < 0.05$

3.4 ผลของความเข้มข้นของ NaCl

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสายพันธุ์ SR5631 สามารถใช้น้ำมันรำข้าว ที่ความเข้มข้น 1.5% (v/v) เป็นแหล่งไขมัน, yeast extract ที่ความเข้มข้น 0.32% (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ระยะเวลา 60 ชั่วโมง และสายพันธุ์ KKCH8611 สามารถใช้น้ำมันข้าวโพดที่ความเข้มข้น 0.5% (v/v) เป็นแหล่งคาร์บอน, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ความเข้มข้น 0.12% (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ระยะเวลา 66 ชั่วโมง และ NaCl ความเข้มข้น 0.16% (w/v) พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด ต่อมาทำการศึกษาความเข้มข้นของ NaCl ในการผลิตเอนไซม์ไลเปส เนื่องจากใน production medium นั้นมีองค์ประกอบของ NaCl จึงทำการศึกษาผลของ NaCl ต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยนำหัวเชื้อ ถ่ายลงใน production medium ซึ่งมีองค์ประกอบดังกล่าวข้างต้น ของทั้งสองสายพันธุ์ และศึกษาความเข้มข้นของ NaCl ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0, 0.16, 0.32, 0.48 และ 0.64% (w/v) ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่า เมื่อทำการเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ SR5631 ในอาหาร production medium ที่ประกอบด้วย NaCl ความเข้มข้น 0.16% (w/v) สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุด คือเท่ากับ 64.09 U/mL รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 0%, 0.32%, 0.48% และ 0.64% (w/v) สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่ากับ 55.43, 47.73, 46.74 และ 41.25 U/mL ตามลำดับ ซึ่ง กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจะลดลงอย่างต่อเนื่อง เมื่อความเข้มข้นของ NaCl เพิ่มขึ้น ดังแสดงในภาพประกอบ 9 ส่วนสายพันธุ์ KKCH8611 ที่ความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 0.16% (w/v) สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงคือ 62.57 U/mL รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 0.32%, 0.48%, 0% และ 0.64% (w/v) สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่ากับ 50.46, 49.35, 48.13 และ 45.68 U/mL ตามลำดับ เมื่อความเข้มข้นของ NaCl เพิ่มขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังแสดงในภาพประกอบ 9 จากการศึกษาพบว่าทั้งสายพันธุ์ KKCH8611 และสายพันธุ์ SR5631 เป็นสายพันธุ์ที่ต้องการ NaCl เพียงเล็กน้อย เท่านั้น คือที่ความเข้มข้น 0.16% (w/v) ในการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปส

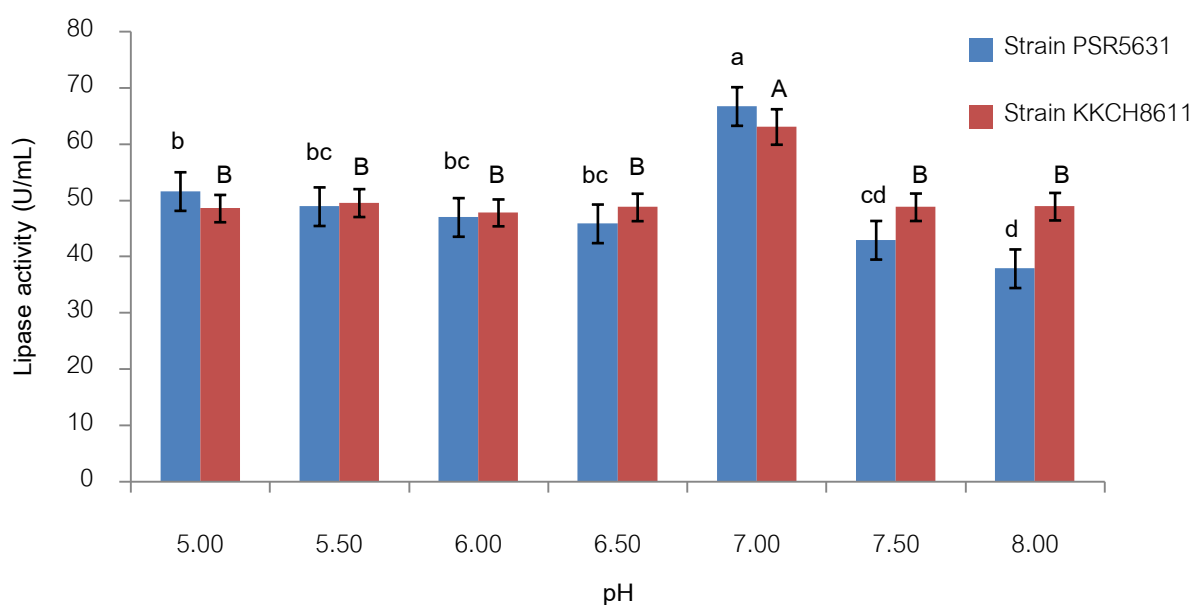


ภาพประกอบ 9 ผลของความเข้มข้นของ NaCl ต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus safensis* สายพันธุ์ PSR5631 และ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* สายพันธุ์ KKCH8611 ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณเอนไซม์ไลเปสในแต่ละการทดลองที่ $p < 0.05$

3.5 ผลของค่าพีเอช

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสายพันธุ์ SR5631 สามารถใช้น้ำมันรำข้าว ที่ความเข้มข้น 1.5% (v/v) เป็นแหล่งไขมัน yeast extract ที่ความเข้มข้น 0.32% (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน NaCl ที่ความเข้มข้น 0.16% (w/v) พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 60 ชั่วโมง และสายพันธุ์ KKCH8611 สามารถใช้น้ำมันข้าวโพดที่ความเข้มข้น 0.5% (v/v) เป็นแหล่งไขมัน $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ความเข้มข้น 0.12% (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน NaCl ที่ความเข้มข้น 0.16% (w/v) พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดต่อมาทำการศึกษาผลของค่าพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยทำการปรับค่าพีเอชของ production medium ที่ผ่านการศึกษาแหล่งไขมัน ไนโตรเจน และ NaCl ที่เหมาะสมแล้ว โดยปรับให้มีค่าเท่ากับ 5, 5.5, 6.0, 6.5, 7, 7.5 และ 8 พบว่าเมื่อทำการปรับค่าพีเอชของ production medium ที่พีเอช 7.0 แล้วนำมาใช้เลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์ PSR5631 พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอช 7.0 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือเท่ากับ 66.71 U/mL รองลงมาคือพีเอชเท่ากับ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.5 และ 8.0 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่ากับ 51.59, 48.90, 46.99, 45.85, 42.93 และ 37.87 U/mL ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เมื่อค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มมากขึ้นความสามารถในการผลิต

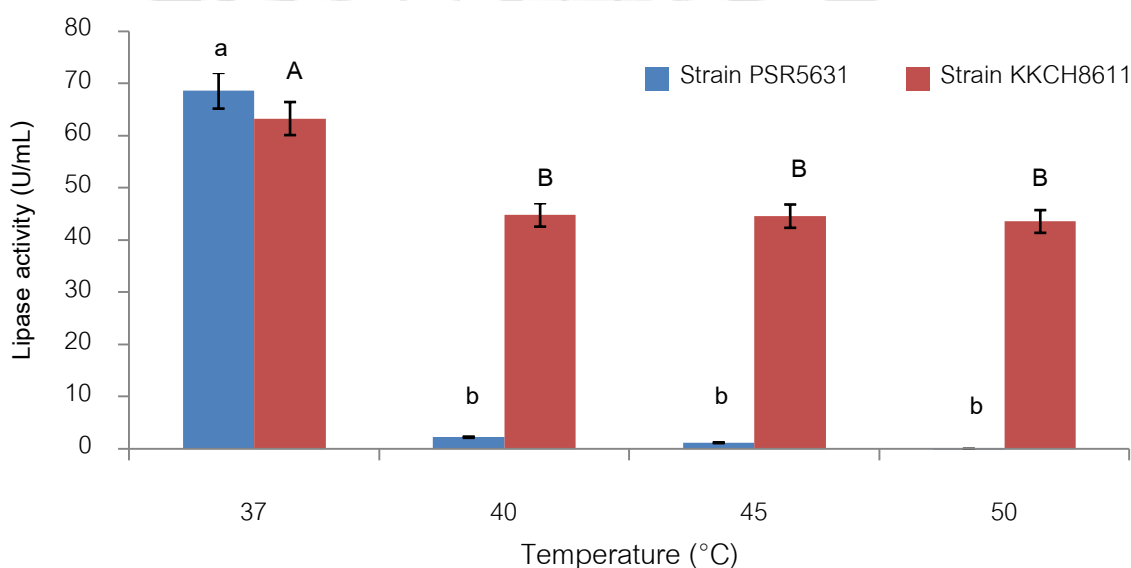
เอนไซม์ไลเปสของ สายพันธุ์ PSR5631 จะลดลง ส่วนสายพันธุ์ KKCH8611 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด คือเท่ากับ 63.01 U/mL รองลงมาคือพีเอชเท่ากับ 5.5, 8.0, 7.5, 6.5, 5.0 และ 6.0 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่ากับ 49.54, 48.90, 48.80, 48.76, 48.56 และ 47.80 U/mL ตามลำดับ และจากการศึกษาพบว่าทั้งสองสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ที่ช่วงพีเอช ค่อนข้างกว้าง คือ พีเอช 5-8 ดังแสดงในภาพประกอบ 10



ภาพประกอบ 10 ผลของ pH ต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส จาก *Bacillus safensis* สายพันธุ์ PSR5631 และ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* สายพันธุ์ KKCH861 ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณเอนไซม์ไลเปสในแต่ละการทดลองที่ $p < 0.05$

3.6 ผลของอุณหภูมิ

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสายพันธุ์ PSR5631 สามารถใช้น้ำมันรำข้าว ที่ความเข้มข้น 1.5% (v/v) เป็นแหล่งไขมัน yeast extract ที่ความเข้มข้น 0.32% (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน NaCl ที่ความเข้มข้น 0.16% (w/v) พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 60 ชั่วโมง และสายพันธุ์ KKCH8611 สามารถใช้น้ำมันข้าวโพดที่ความเข้มข้น 0.5% (v/v) เป็นแหล่งไขมัน $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ความเข้มข้น 0.12% (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน NaCl ที่ความเข้มข้น 0.16% (w/v) พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดต่อมาทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยนำ production medium ที่ผ่านการศึกษาแหล่งคาร์บอน, ไนโตรเจน, โซเดียมคลอไรด์ และค่าพีเอชที่เหมาะสมแล้วตามข้างต้น นำไปบ่มในเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 37, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่าสายพันธุ์ PSR5631 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด คือเท่ากับ 68.80 U/mL ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเป็น 45 และ 50 องศาเซลเซียส ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในภาพประกอบ 11 ซึ่งสอดคล้องกับ สายพันธุ์ KKCH8611 ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด คือเท่ากับ 63.27 U/mL ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในช่วง 37-50 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพประกอบ 11



ภาพประกอบ 11 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus safensis* สายพันธุ์ PSR5631 และ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* สายพันธุ์ KKCH8611 ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่ แตกต่าง กัน แสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณเอนไซม์ไลเปสในแต่ละการทดลองที่ $p < 0.05$

4. การประเมิน การนำ crude เอนไซม์ไลเปส ที่ผลิตจากสายพันธุ์ KKCH8611 ไปประยุกต์ใช้ ในการสังเคราะห์พลาสติกชนิด PLA ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ

การศึกษาการสังเคราะห์พลาสติกชนิด PLA โดยใช้ crude เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* สายพันธุ์ KKCH8611 เนื่องจาก สายพันธุ์ KKCH8611 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุดในสภาวะที่หลากหลาย และใช้อาหารในการผลิตเอนไซม์ไลเปสราคาถูกที่สุดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 70 U/mL กรดแลคติกทางการค้า ที่ความเข้มข้น 85% (w/v) ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วย toluene ทำการศึกษาการสังเคราะห์พอลิเมอร์ชนิด PLA โดยใช้วิธีการทางชีวภาพ ซึ่งใช้เอนไซม์ไลเปส ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่แยกได้ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และทำปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้อัตราการไหลของก๊าซไนโตรเจน 0.1 vvm หลังจากดำเนินปฏิกิริยาเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ได้สารละลายคล้ายน้ำมันสีใส ประมาณ 8 มิลลิลิตร จึงนำ สารละลาย ไปทำการวิเคราะห์ น้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ LC/MS โดยอาศัยความแตกต่างของประจุไอออนของสาร ในการแยก LC/MS นอกจากนี้จะได้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่สารใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์กับค่าการดูดกลืนแสงของสารแล้ว ยังได้ Mass Spectrum กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่ามวลต่อประจุของสาร (m/z) กับค่าความอุดมสมบูรณ์ (Relative abundance) (ชุดีมา. 2548: 1-14) จากการทดลองพบว่า พีคที่มีค่า relative abundance สูงมีทั้งหมด 6 พีค ด้วยกันคือ พีค A, B, C, D, E และ F

โดยที่พีค A มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 491.5 ซึ่งเป็นค่าน้ำหนักโมเลกุลของ PLA เตตระเมอร์ (tetramer)

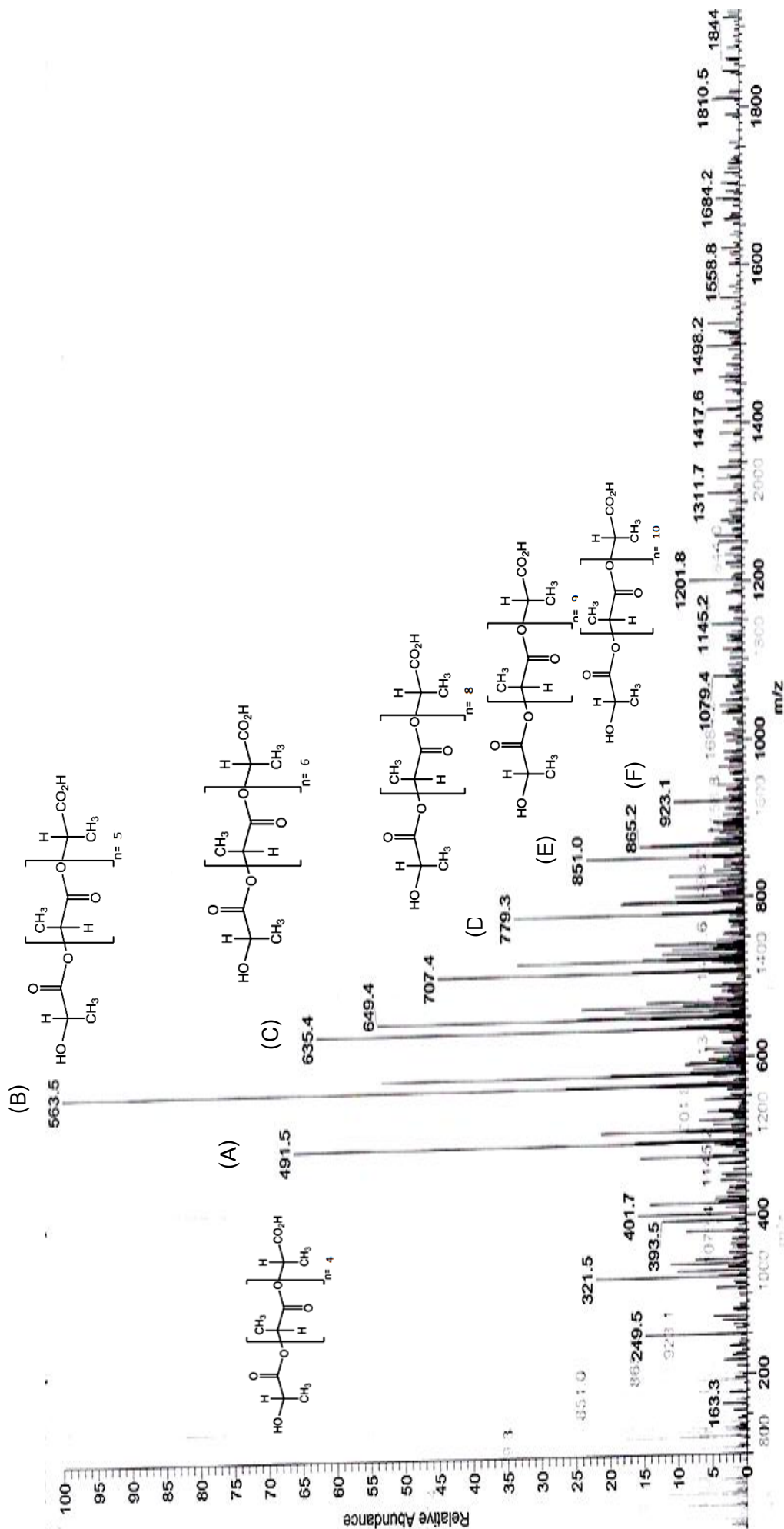
พีค B มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 563.5 ซึ่งเป็นค่าน้ำหนักโมเลกุลของ PLA เพนตะเมอร์ (pentamer)

พีค C มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 635.4 ซึ่งเป็นค่าน้ำหนักโมเลกุลของ PLA เฮกซะเมอร์ (hexamer)

พีค D มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 707.3 ซึ่งเป็นค่าน้ำหนักโมเลกุลของ PLA ออกตะเมอร์ (octamer)

พีค E มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 779.3 ซึ่งเป็นค่าน้ำหนักโมเลกุลของ PLA โนเนเมอร์ (nonamer)

และพีคสุดท้าย คือพีค F มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 923.1 ซึ่งเป็นค่าน้ำหนักโมเลกุลของ PLA เดคะเมอร์ (decamer) ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลที่ได้นั้นเป็นน้ำหนักโมเลกุลที่รวมน้ำหนักของโฟสเฟสเทียมไอออน $[M+K]^+$ ที่อยู่ในระบบวิเคราะห์ ดังแสดงในภาพประกอบ 12 ดังนั้นสรุปได้ว่า จำนวน n ของกรดแลคติกที่เชื่อมต่อกันเป็นโพลิโเมอร์ นั้นมี n ตั้งแต่ 4 ไปจนถึง n สูงที่สุดเท่ากับ 10



ภาพ 12 น้ำหนักโมเลกุลของโพลิแลกติกที่ได้จากการสังเคราะห์ PLA ด้วยกระบวนการทางชีวภาพ โดยใช้ LC/MS

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยการนำตัวอย่างดินที่มีการปนเปื้อนของไขมันบริเวณสวนปาล์ม และบริเวณอุทยานแห่งชาติ จำนวน 100 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บดินมาจาก 3 จังหวัดทางภาคใต้ของประเทศไทย ดังนี้ จังหวัดเพชรบุรี 24 ตัวอย่าง จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 16 ตัวอย่าง และ จังหวัดชุมพร 60 ตัวอย่าง เพื่อนำมาคัดแยก จุลินทรีย์ในกลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยนำตัวอย่างมาคัดแยกแบคทีเรียโดยวิธี spread plate บนอาหาร Tween 80 agar สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 662 ไอโซเลท หลังจากนั้นนำไอโซเลทที่คัดแยกได้มาทำการจุด (spot inoculation) บนอาหาร Tween 80 agar วัดบริเวณขอบๆ โคโลนี เพื่อคัดเลือกโคโลนีที่มีค่าดัชนีเอนไซม์ตั้งแต่ 2.5 ขึ้นไป ซึ่งมีทั้งหมด 74 ไอโซเลท หลังจากนั้นนำไอโซเลทที่ถูกคัดเลือกมา วัดกิจกรรมของเอนไซม์ ไลเปส โดยใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัววัดผลทางชีวภาพ ทำปฏิกิริยากับสารละลาย *p*-nitrophenylpalmitate (*p*NPP) เป็นสับสเตรท ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% (v/v) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร พบว่า ไอโซเลทที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่สูงคือ ไอโซเลท KKCH8611 มีกิจกรรมของเอนไซม์ ไลเปส สูงสุดคือ 8.96 U/mL รองลงมาคือไอโซเลท PSR5631 มีกิจกรรมของเอนไซม์ ไลเปส คือ 8.89 U/mL หลังจากนั้นนำ ไอโซเลท KKCH8611 และไอโซเลท PSR5631 มาทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่า ลักษณะโคโลนีของทั้งสองไอโซเลท มีขนาดเล็ก ขอบเรียบ (entire) และขอบหยักเล็กน้อย (undulate) โคโลนีนูน (convex) มีสีนวล และเมื่อนำมาศึกษาสัณฐานวิทยาโดยการย้อมแกรมและย้อมเอนโดสปอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) ด้วยกำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าทั้งสองไอโซเลท ย้อมติดสีม่วงของ crystal violet แสดงว่าเป็น แบคทีเรียแกรมบวก (positive bacteria) มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อน (rod shape) และสร้างเอนโดสปอร์แบบกึ่งกลางเซลล์ (central endospore) นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีและ ลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA gene พร้อมกับศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่า ไอโซเลท KKCH8611 และ ไอโซเลท PSR5631 มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* และ *Bacillus safensis* ตามลำดับ

หลังจากนั้นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส พบว่า สายพันธุ์ PSR5631 สามารถใช้น้ำมันรำข้าว ความเข้มข้น 1.5% (v/v) เป็นแหล่งและความเข้มข้นไขมัน yeast extract ความเข้มข้น 0.32% (w/v) เป็นแหล่งและความเข้มข้นไนโตรเจน และ NaCl ความเข้มข้น 0.16% (v/w) พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อที่คือ 60 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส จากสภาวะข้างต้นสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 68.60 U/mL และสายพันธุ์ KKCH8611 สามารถใช้น้ำมันรำข้าว โปด ความเข้มข้น 0.5% (v/v) เป็นแหล่งและความเข้มข้นไขมัน $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้น 0.12% (w/v) เป็นแหล่งและความเข้มข้นไนโตรเจน และ NaCl ความเข้มข้น 0.16% (v/w) พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 66 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 63.27 U/mL จากสภาวะข้างต้นพบว่า สายพันธุ์ PSR5631 มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงกว่าสายพันธุ์ KKCH8611 เพียงเล็กน้อย

เมื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ต่อมาทำ การศึกษาการสังเคราะห์พลาสดิกชนิด PLA โดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* สายพันธุ์ KKCH8611 เนื่องจากองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อของสายพันธุ์ KKCH8611 ดังที่กล่าวมาข้างต้น นั้น ประกอบด้วยสูตรอาหารอย่างง่าย และที่ใช้ความเข้มข้นต่ำในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง นอกจากนี้ สายพันธุ์ KKCH8611 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในช่วงพีเอชของอาหารเริ่มต้นค่อนข้างกว้าง และช่วงของอุณหภูมิค่อนข้างกว้างเช่นกัน เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ PSR5631 พบว่าการผลิตเอนไซม์จะลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อพีเอชของอาหารเริ่มต้น และอุณหภูมิเพิ่มขึ้น หลังจากนั้นนำเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก สายพันธุ์ KKCH8611 มาทำการศึกษาการสังเคราะห์พอลิเมอร์ชนิด PLA โดยใช้วิธีการทางชีวภาพ โดยการใช้ crude เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรียที่แยกได้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้อัตราการไหลของก๊าซไนโตรเจน 0 vvm ดำเนินปฏิกิริยาเป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำไปทำการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ Liquid Chromatography Mass Spectrometer (LC/MS) พบว่าโอลิโกเมอร์ของ PLA ที่สังเคราะห์ได้มีน้ำหนักโมเลกุลสูงสุดคือเท่ากับ 923.1 ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลที่ได้นั้นเป็นน้ำหนักโมเลกุลที่รวมน้ำหนักของโพแทสเซียมไอออน $[\text{M}+\text{K}]^+$ ที่อยู่ในระบบวิเคราะห์และมีจำนวนโอลิโกเมอร์สูงสุดเท่ากับ 12 โมเลกุล จากการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าการใช้ crude เอนไซม์ไลเปสในการสังเคราะห์พลาสดิกชนิด PLA นั้น สามารถทำได้และเป็นโอลิโกเมอร์สายสั้นๆ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ต่อไปในอนาคต

ในการศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกแบคทีเรียจากดิน เนื่องจากดินเป็นแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์ เหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์ ดังนั้นในการศึกษาในครั้งนี้จึงทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณที่มีการปนเปื้อนของไขมันเนื่องจากต้องการคัดเลือกแบคทีเรียที่ต้องการผลิตเอนไซม์ไลเปส นำตัวอย่างมาคัดเลือกแบคทีเรียโดยวิธี spread plate บนอาหาร Tween 80 agar เช่นเดียวกับการศึกษาของ Aly และคนอื่นๆ ทำการคัดเลือก *Streptomyces exfoliates* LP10 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากดินที่มีการปนเปื้อนของไขมัน โดยใช้ Tween 80 agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก (Aly; et al. 2012: 1125-1137) ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วในการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส (Ma; et al. 2010: 429-437) โดยที่แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจะสร้างบริเวณขุ่นรอบๆ โคโลนี เนื่องจาก Tween 80 ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นสามารถเคลื่อนที่ผ่านเข้าออกเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ซึ่งจะนำสารอาหารเข้าสู่ภายในเซลล์ จึงเกิดการกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์ไลเปส และหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (extracellular lipase) เอนไซม์ไลเปสที่หลั่งออกมาจะทำปฏิกิริยากับ Tween 80 เกิดเป็นกรดไขมัน ซึ่งกรดไขมันที่เกิดขึ้นจะรวมตัวกับ CaCl_2 เกิดเป็นตะกอนของ Calcium oleate รอบๆ โคโลนี (Corzo; & Revah. 1999: 173-180, Slifkin. 2000: 4626-4628, Papagora; Roukas; & Kotzekidou. 2013: 413-420, Liu; et al. 2012; 511-516) เมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้แล้ว จึงนำไอโซเลทที่ถูกคัดเลือกมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดย colorimetric method ซึ่งเป็นวิธีที่รวดเร็วและมีความไวต่อปริมาณ กรดไขมันอิสระที่เพิ่มขึ้น (Lowry; & Tinsley. 1976: 470-472) จากการศึกษาก่อนหน้านี้ได้ทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยใช้ *p*-nitrophenyl ester ที่มีความยาวของหมู่ alkyl แตกต่างกัน ดังนี้ *p*NPA (C2), *p*NBP (C4), *p*NPM (C14) และ *p*NPP (C16) พบว่าเมื่อใช้ *p*NPP (C16) เป็นสับสเตรทจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสูงสุด (Lima; et al. 2004: 65-71, Bussamara; et al. 2010: 268-275) ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวคะตะลิสต์ทางชีวภาพ ทำปฏิกิริยากับสารละลาย *p*-nitrophenylpalmitate (*p*NPP) เป็นสับสเตรทที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยา Hydrolysis ของ *p*-nitrophenyl ester ของกรดไขมันกับความยาวของคาร์บอนอะตอม ($C > 10$) ปฏิกิริยา hydrolysis ที่เกิดขึ้นนั้น เกิดจากหมู่ carboxylic ester ของ *n*-naphthol, *p*-nitrophenol หรือ 2,4-dinitrophenol ซึ่งจะปล่อยหมู่ alcohol ทำให้สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (Stuer; et al. 1986: 1070-1074, Vorderwulbecke; et al. 1992: 631-639, Lee; et al. 2004: 5074-5078) จากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสพบว่าสายพันธุ์ PSR5631 และสายพันธุ์ KKCH8611 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด จึงนำแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ในการผลิตเอนไซม์ไลเปส (extracellular lipase) โดยที่แบคทีเรียแต่ละชนิดนั้นมีความสามารถแตกต่างกันไปซึ่งขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ และค่าพีเอช (Aly; et al. 2012: 1125-1137) นำสายพันธุ์

PSR5631 และสายพันธุ์ KKCH8611 มาศึกษาระยะเวลาและการเจริญของแบคทีเรียโดยเก็บตัวอย่าง ทุกๆ 6 ชั่วโมง โดยเริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงวันที่ 5 และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส พบว่า ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส ของสายพันธุ์ PSR5631 และสายพันธุ์ KKCH8611 ในช่วงระยะ lag phase และ log phase กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสค่อยๆ เพิ่มขึ้น เนื่องจากในระยะเริ่มแรกแบคทีเรียมีการปรับตัวในอาหารเลี้ยงเชื้อและเริ่มมีการเจริญเติบโต จนกระทั่ง ระยะเวลา 60 ชั่วโมง แบคทีเรียสายพันธุ์ PSR5631 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 7.18 U/mL ส่วนที่ระยะเวลา 66 ชั่วโมง แบคทีเรียสายพันธุ์ KKCH8611 เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้สูงสุดคือ 7.83 U/mL พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ซึ่งผลิตได้จากแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ ลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญของเชื้อที่อยู่ในช่วงของ death phase เนื่องจากมีอาหาร จำกัดในขณะที่แบคทีเรียมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น (Priest. 1997: 711-753) จากงานวิจัยของ Ma และคนอื่นๆ พบว่า *Burkholderia cepacia* ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 72 ชั่วโมง สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 10.5 U/mL (Ma; et al. 2010: 429-437) ในขณะที่ยานวิจัยของ Kaushik และคนอื่นๆ พบว่าเชื้อ *Aspergillus carneus* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 12.7 U/mL ที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง (Kaushik; et al. 2006: 121-126) ส่วนงานวิจัยของ Marimuthu พบว่าที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง เชื้อ *Staphylococcus hominis* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด คือ 7.8 U/mL (Marimuthu. 2013: 252-256) หลังจากนั้นนำสายพันธุ์ PSR5631 และสายพันธุ์ KKCH8611 มาทำการศึกษานิด และความเข้มข้นของแหล่งไขมันในการผลิตเอนไซม์ไลเปส เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก แบคทีเรียส่วนใหญ่เป็น inducible enzyme โดยใช้ไขมันพืชเป็นแหล่งไขมัน เนื่องจากน้ำมันพืช ส่วนใหญ่ (98%) เป็นไตรกลีเซอไรด์ที่ประกอบด้วย กลีเซอรอลกับกรดไขมันอิสระสายยาว โดยทั่วไปมี จำนวนคาร์บอนอะตอม 18 อะตอม (oleic, linoleic และ linolenic) ที่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว ซึ่งจะพบในไขมันสัตว์ (Zarevucka. 2012: 457-470) เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส พบว่า สายพันธุ์ PSR5631 เมื่อใช้น้ำมันรำข้าว น้ำมันข้าวโพด น้ำมันเมล็ดชาดอกคามิลเลียและน้ำมันมะกอก สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงเลือกน้ำมันรำข้าว เป็นแหล่งไขมัน เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาตร 1 ลิตร พบว่า น้ำมันรำข้าวมีราคา 60 บาท น้ำมันข้าวโพด มีราคา 99 บาท น้ำมันเมล็ดชาดอก คามิลเลียมีราคา 169 บาท และน้ำมันมะกอก มี ราคา 392 บาท ดังนั้นจึงเลือกน้ำมันรำข้าวเป็นแหล่งไขมันเนื่องจาก มีราคาถูกกว่าน้ำมัน ข้างต้น ส่วน สายพันธุ์ KKCH8611 สามารถใช้น้ำมันข้าวโพด ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ สูงสุด ดังนั้นจึงเลือกน้ำมัน ข้าวโพดเป็นแหล่งไขมัน แต่ในขณะที่น้ำมันมะพร้าวผลิตเอนไซม์ไลเปสได้น้อยที่สุด ต่อมาทำการศึกษา ความเข้มข้นของน้ำมันรำข้าว และ น้ำมันข้าวโพด ที่ความเข้มข้นของแหล่งไขมัน เท่ากับ 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5 และ 5.5% (v/v) ตามลำดับ พบว่าสายพันธุ์ PSR5631 สามารถใช้น้ำมันรำข้าวที่ความเข้มข้น

1.5% (v/v) และสายพันธุ์ KKCH8611 สามารถใช้น้ำมันข้าวโพด ที่ความเข้มข้น 0.5% (v/v) ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง สุดที่ระดับ นัยสำคัญทางสถิติ สายพันธุ์ PSR5631 สามารถใช้น้ำมันรำข้าว ซึ่งประกอบด้วย C18:1 ความเข้มข้น 42.3% และ C18:2 ความเข้มข้น 31.9% น้ำมันข้าวโพด ซึ่งประกอบด้วย C18:1 ความเข้มข้น 20-33.1% และ C18:2 ความเข้มข้น 57.8-62% น้ำมันเมล็ดชาดอกคามิลเลีย ที่ประกอบด้วย C18:1 ความเข้มข้น 67.7-76.7% และน้ำมันมะกอก ที่ประกอบด้วย C18:1 ความเข้มข้น 55-83% และ C18:2 ความเข้มข้น 3.5-21% (Gunstone. 2002: 1-331, Ma; et al. 2011: 9-12) ในการเป็น สารเหนียวนาที่ดี เนื่องจากน้ำมันที่กล่าวมานั้นประกอบด้วย กรดโอเลอิก (oleic acid, C18:1) และกรดไลโนเลอิก (linoleic acid, C18:2) และสายพันธุ์ KKCH8611 สามารถใช้น้ำมันข้าวโพดซึ่ง ประกอบด้วย C18:1 ความเข้มข้น 20-33.1% และ C18:2 ความเข้มข้น 57.8-62% (Gunstone. 2002: 1-331, Ma; et al. 2011: 9-12) เป็นสารเหนียวนาได้ดี เนื่องจากน้ำมันข้าวโพด ประกอบด้วยกรดโอเลอิก (oleic acid, C18:1) และกรดกรดไลโนเลอิก (linoleic acid, C18:2) ซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ 1 และ 2 ตำแหน่งตามลำดับ แต่เมื่อใช้น้ำมันมะพร้าวเป็นสารเหนียวนา กลับพบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ต่ำ เนื่องจากน้ำมันมะพร้าว ประกอบด้วยกรดคาพริก (caprylic acid, C8:0) กรดคาพริก (capric acid, C10:0) และกรดลอริก (lauric acid, C12:0) (Gunstone. 2002: 1-331) ซึ่งเป็นกรดไขมันอิ่มตัว จึงเกิดปฏิกิริยาได้ยากกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัว ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสต่ำ เมื่อศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไขมันพบว่าสายพันธุ์ KKCH8611 ที่ความเข้มข้นต่ำ สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณสูง ในขณะที่สายพันธุ์ PSR5631 ที่ความเข้มข้นต่ำ มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ต่ำ อาจเนื่องมาจากสายพันธุ์ KKCH8611 มี substrate affinity สูงกว่าสายพันธุ์ PSR5631 เพราะสายพันธุ์ KKCH8611 ที่ความเข้มข้นต่ำสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดี ในขณะที่สายพันธุ์ PSR5631 ต้องใช้แหล่งไขมันที่มีความเข้มข้นสูงกว่าในการผลิตเอนไซม์ไลเปส จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของ ไขมัน ในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ซึ่งพบว่าชนิดและความเข้มข้นของ ไขมัน นั้น มีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ เช่น งานวิจัยของ Hamid และคนอื่นๆ พบว่า *Bacillus* sp. สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงถึง 4.58 U/mL โดยใช้น้ำมันมะกอกความเข้มข้น 10% (v/v) เป็นแหล่งคาร์บอน (Hamid; et al. 2003: 961-968) เช่นเดียวกับ Fabiszewska และคนอื่นๆ พบว่าแหล่งไขมันที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส จาก *Yarrowia lipolytica* KKP 379 คือ น้ำมันมะกอกความเข้มข้น 1% (v/v) ซึ่ง สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 2.87 U/mL (Fabiszewska; et al. 2014: 404-410) แต่จากการทดลองของ Ma และคนอื่นๆ พบว่า *Burkholderia cepacia* สามารถใช้น้ำมันถั่วลิสงที่ความเข้มข้น 2% (v/v) ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 10.5 U/mL (Ma; et al. 2010: 429-437) ส่วนการทดลองของ Burkert และคนอื่นๆ พบว่าเมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองที่ความเข้มข้น 0.6% (v/v) สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส

ได้สูงสุดคือ 20 U/mL แต่เมื่อใช้น้ำมันมะกอกที่ความเข้มข้น 0.6% (v/v) สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เพียง 17 U/mL (Burkert; Maugeri; & Rodrigues. 2004: 77-84) จากการทดลองและจากงานวิจัยข้างต้นพบว่าแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีความต้องการแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของคาร์บอนที่แตกต่างกัน ซึ่งแบคทีเรียส่วนใหญ่จะสามารถใช้แหล่งคาร์บอน C18:n ของกรดไขมันอิสระสายยาว เนื่องจากสามารถชักนำการเกิดผลิตภัณฑ์และการเกิดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสได้ โดยทั่วไปกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของไขมัน แต่ถ้าความเข้มข้นมากเกินไปอาจเกิด substrate inhibition ส่วนกลไกการหลั่งเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียนั้นมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย (Zarevucka. 2012: 457-470) จากการทดลอง สรุปได้ว่าสายพันธุ์ PSR56318 ใช้น้ำมันรำข้าว ที่ความเข้มข้น 1.5% (v/v) และสายพันธุ์ KKCH8611 ใช้น้ำมันข้าวโพด ที่ความเข้มข้น 0.5% (v/v) เท่านั้น ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงถึง 50.17 และ 58.61 U/mL ตามลำดับ

ต่อมาทำการศึกษานิตและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ซึ่งประกอบด้วยชนิดและความเข้มข้นของไขมันที่เหมาะสมจากการทดลองที่ผ่านมา พบว่าสายพันธุ์ PSR5631 เมื่อใช้ yeast extract สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด คือเท่ากับ 57.23 U/mL ในขณะที่แหล่งไนโตรเจนอื่นๆ มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ต่ำมาก ส่วนสายพันธุ์ KKCH8611 สามารถใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด คือเท่ากับ 60.81 U/mL แต่เมื่อใช้ peptone ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสนั้นน้อยมาก คือ 2.00 U/mL จากการศึกษาข้างต้น สายพันธุ์ PSR5631 และสายพันธุ์ KKCH8611 สามารถใช้ yeast extract และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดตามลำดับ หลังจากนั้นศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.02, 0.12, 0.22, 0.32, 0.42 และ 0.52% (w/v) ตามลำดับ พบว่า สายพันธุ์ PSR5631 พบว่าที่ความเข้มข้น 0.32% (w/v) สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ สูงสุดเท่ากับ 62.45 U/mL และสายพันธุ์ KKCH8611 ที่ความเข้มข้น 0.12% (w/v) สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่ากับ 61.89 U/mL สายพันธุ์ PSR5631 ใช้ yeast extract ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด เนื่องจากองค์ประกอบใน yeast extract ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนทั้งหมด 10.9% กรดอะมิโน 6.0% แหล่งคาร์โบไฮเดรต 163.3 มิลลิกรัมต่อกรัม และวิตามินที่ละลายน้ำ (BD Biosciences. 2006: 1-27) ซึ่งเป็นแหล่งสารอาหารพื้นฐานที่จำเป็นต่อเมแทบอลิซึมและส่งเสริมต่อการเจริญเติบโตของสายพันธุ์ PSR5631 ส่วนสายพันธุ์ KKCH8611 สามารถใช้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ได้ดีกว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ เนื่องจาก เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เชื้อแบคทีเรียสามารถนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมได้ง่าย และเมื่อ เปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ พบว่าเมื่อใช้ NH_4NO_3 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสมีค่าน้อย กว่า $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ NH_4Cl อาจเนื่องมาจากในขั้นตอนการเปลี่ยน NO_3^- ไปเป็น NH_4^+ นั้นมีการสูญเสีย ATP ไประหว่างการเจริญ ทำให้นำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ลดลง นอกจากนี้ทั้งสอง

สายพันธุ์มีความสามารถในการใช้ peptone และ tryptone ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ต่ำ อาจเกิดจาก สายพันธุ์ PSR5631 เลือกใช้สารอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งอาหารที่มีแหล่งอาหารครบถ้วน โดยเฉพาะแหล่งคาร์โบไฮเดรต โดย peptone ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนทั้งหมด 15.4% กรดอะมิโน 3.5% แหล่งคาร์โบไฮเดรต 6.29 มิลลิกรัมต่อกรัม และ tryptone ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนทั้งหมด 13.3% กรดอะมิโน 4.5% แหล่งคาร์โบไฮเดรต 10.56 มิลลิกรัมต่อกรัม (BD Biosciences. 2006) และสายพันธุ์ KKCH8611 เลือกสารอาหารที่สามารถใช้ได้ง่ายก่อนที่จะเลือกสารอาหารที่โครงสร้างที่ซับซ้อน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Marimuthu พบว่าเมื่อใช้ yeast extract ที่ความเข้มข้น 0.5% (w/v) ส่งผลให้ *Staphylococcus hominis* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 19.5 U/mL (Marimuthu. 2013: 252-256) เช่นเดียวกับ Liu และคนอื่นๆ พบว่าเชื้อ *Burkholderia* sp. C20 ใช้ yeast extract 2.175 กรัมต่อลิตร และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 16.7 U/mL แต่เมื่อเพิ่มปริมาณ yeast extract จะส่งผลให้การผลิตเอนไซม์ไลเปสลดลง ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบใน yeast extract จะไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์ไลเปส (Liu; et al. 2012: 511-561) แต่งานวิจัยของ Salihu และคนอื่นๆ ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea* ในโรงหมักน้ำมันปาล์ม พบว่าเมื่อใช้ peptone ที่ความเข้มข้น 0.45% (w/v) จะสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 20.26 U/mL (Salihu; et al. 2012: 36-44.) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Kaushik และคนอื่นๆ ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus carneus* โดยใช้การออกแบบทดลองด้วยวิธีพินผิวตอบสนอง จากการทดลองพบว่าเมื่อใช้ peptone ที่ความเข้มข้น 0.8% (w/v) สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 12.7 U/mL (Kaushik; et al. 2006: 121-126.) จากการศึกษาข้างต้นพบว่าชนิดและความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจนของสายพันธุ์ PSR5631 และสายพันธุ์ KKCH8611 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส ได้ดีที่สุดคือ yeast extract ที่ความเข้มข้น 0.32% (w/v) และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ความเข้มข้น 0.12% (w/v) จากการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า แหล่งไนโตรเจนส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยที่จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนได้หลากหลายไม่ว่าจะเป็นสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ โดยพบว่าสายพันธุ์ KKCH8611 สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนที่หาง่ายและราคาถูกในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้อย่างมีประสิทธิภาพ

หลังจากนั้นทำการศึกษาความเข้มข้นของ NaCl ในการผลิตเอนไซม์ไลเปส เนื่องจากในสูตรอาหาร production medium มี NaCl เป็นองค์ประกอบ พบว่า สายพันธุ์ PSR5631 และสายพันธุ์ KKCH8611 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดที่ความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 0.16% (W/V) คือ 64.09 และ 62.57 U/mL ตามลำดับ สายพันธุ์ PSR5631 กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ NaCl เพิ่มขึ้น ในขณะที่สายพันธุ์ KKCH8611 เมื่อความเข้มข้นของ NaCl เพิ่มขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสค่อนข้างคงที่ จากการศึกษาพบว่าทั้งสองสายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์ที่ต้องการ NaCl เพียงเล็กน้อยเท่านั้น คือที่ความเข้มข้น 0.16% (w/v) ในการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปส ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยของ Liu และคนอื่นๆ พบว่าเมื่อใช้ NaCl ที่ความเข้มข้น 0.16% (w/v) เชื้อ *Burkholderia* sp. C20 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดเท่ากับ 3.9 U/mL (Liu; Lu; & Chang. 2006: 1940-1944.) ในขณะที่งานวิจัยของ Wolski และคนอื่นๆ พบว่าเมื่อใช้ NaCl 5.0 g/L เชื้อ *Penicillium* sp. สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดเท่ากับ 9.5 U/mL (Wolski; et al. 2009: 60-66) จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า การเติม NaCl ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อของ *Bacillus natto* จะช่วยชักนำในการผลิตเอนไซม์ไลเปสและส่งผลให้ผลิตเอนไซม์ไลเปสในระยะเวลาที่สั้นลง ซึ่งโซเดียมไอออน และคลอไรด์ไอออนสามารถผ่านเข้าไปภายในเยื่อหุ้มเซลล์ได้อย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ไลเปสเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นของ NaCl ต่ำ (Hasan; Shah; & Hameed. 2009:782-798, Papagora; Roukas; & Kotzekidou. 2013: 413-420.)

จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่าค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียได้ โดยเมื่อค่าพีเอชของอาหารเริ่มต้นมีค่าเท่ากับ 6.0 จะผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 22.67 U/mL แต่ในขณะที่ไม่มีการควบคุมค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่งผลให้การผลิตเอนไซม์ไลเปสมีค่าที่ต่ำ คือเท่ากับ 10 U/mL (Liu; et al. 2012; 511-516) ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาผลของค่าพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยทำการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของ production medium พบว่าทั้งสองสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่พีเอช 7.0 โดยที่สายพันธุ์ PSR5631 และสายพันธุ์ KKCH8611 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือเท่ากับ 66.71 และ 63.01 U/mL ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่าทั้งสองสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง (Neutrophilic Bacteria หรือ Neutrophiles) นอกจากนี้ สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ที่ช่วงพีเอชค่อนข้างกว้าง คือ พีเอช 5-8 ซึ่งสอดคล้องกับ *Staphylococcus hominis* พบว่าที่พีเอช 7.0 ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด คือ 14.7 U/mL (Marimuthu. 2013: 252-256) *Pseudomonas* sp. ZBC1 ที่ พีเอช 7.0 ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 19.5 U/mL (Xing; et al. 2013: 949-957.) และ *Burkholderia cepacia* ที่พีเอช 7.0 ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 50.0

U/mL (Rathi; et al. 2002; 930-936) แต่จากงานวิจัยของ Ertugrul และคนอื่นๆ พบว่าค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของ *Bacillus* sp. คือพีเอช 6.0 (moderate acidic) ส่วนงานวิจัยของ Ma และคนอื่นๆ พบว่า *Burkholderia cepacia* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 10.5 U/mL ที่ พีเอช 8.0 (Ma; et al. 2010: 429-437.) และงานวิจัยของ Liu และคนอื่นๆ พบว่าที่ พีเอช 9.0 *Burkholderia* sp. C20 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่ากับ 3.9 U/mL (Liu; Lu; & Chang. 2006: 1940-1944) จากงานวิจัยข้างต้นพบว่าค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส เนื่องจากพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยดูดซึมสารอาหารเข้าสู่ภายในเซลล์และกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเพื่อผลิตเอนไซม์ โดยผ่านทาง signaling pathway ซึ่งจะส่งผลให้มีการปล่อยเอนไซม์ออกสู่ภายนอกเซลล์ แต่ถ้าเซลล์อยู่ในสภาวะที่มีค่าพีเอชสูง หรือต่ำกว่าสภาวะเหมาะสมต่อการเจริญจะส่งผลให้ permease ที่ทำหน้าที่ลำเลียงสารอาหารสร้าง extracellular enzyme บนเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย ส่งผลให้ H^+ และ OH^- เคลื่อนที่ผ่านเข้าสู่เซลล์ ทำให้เอนไซม์ต่างๆ ภายในเซลล์เสื่อมสภาพและส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด (Dheeman; Frias; & Henahan. 2010: 1-17) จากการรายงานข้างต้นพบว่าแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีความต้องการค่าพีเอชที่แตกต่างกัน ซึ่งแบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.0-7.0 (Anbu; et al. 2011: 4147-4156)

หลังจากนั้น ศึกษาผลของอุณหภูมิในการผลิตเอนไซม์ไลเปส สายพันธุ์ PSR5631 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ สูงสุดเท่ากับ 68.80 U/mL ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเป็น 45 และ 50 องศาเซลเซียส ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสลดลง ส่วนสายพันธุ์ KKCH8611 ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด เท่ากับ 63.27 U/mL ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในช่วงอุณหภูมิ 37-50 องศาเซลเซียส ดังนั้นทั้งสายพันธุ์ KKCH8611 และ สายพันธุ์ PSR5631 เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม mesophile ชอบเจริญในที่ที่มีอุณหภูมิปานกลาง ซึ่งสอดคล้องกับวิจัยของ Ma และคนอื่นๆ พบว่า *Burkholderia cepacia* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 10.5 U/mL ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Ma; et al. 2010: 429-437.) และงานวิจัยของ Kaushik และคนอื่นๆ พบว่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส *Aspergillus carneus* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 12.7 U/mL (Kaushik; et al. 2006: 121-126.) แต่ในขณะที่งานวิจัยของ Burkert และคนอื่นๆ พบว่า *Geotrichum* sp. ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงถึง 20 U/mL (Burkert; Maugeri; & Rodrigues. 2004: 77-84) ส่วนงานวิจัยของ Liu และคณะ *Burkholderia* sp. C20 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่ากับ 3.9 U/mL (Liu; Lu; & Chang. 2006: 1940-1944) และงานวิจัยของ Xing และคนอื่นๆ พบว่าที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส *Pseudomonas* sp. ZBC1 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 19.5 U/mL (Xing;

et al. 2013: 949-957.) จากงานวิจัยข้างต้น แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์สามารถผลิต เอนไซม์ไลเปสได้ที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน โดยที่อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อนั้นส่งผลต่ออัตราการแพร่ ของสารอาหารและไอออนของแร่ธาตุต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตเข้าภายในเซลล์ ดังนั้น ถ้าเลี้ยงเชื้อในอุณหภูมิที่เหมาะสมอัตราการแพร่ของสารต่างๆ จะผ่านเข้าภายในเซลล์ได้เป็นอย่างดี ในขณะที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมจะส่งผลให้เกิดพลังงานจลน์ที่ต่ำ และถ้าอุณหภูมิสูงเกินไป จะส่งผลต่อ permease ที่ทำหน้าที่ลำเลียงสารอาหาร และสร้าง extracellular enzyme บนเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย เนื่องจาก permease เป็นโปรตีนจึงถูก denature ได้ที่อุณหภูมิสูง

เมื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ต่อมาจึงทำ การศึกษาการ สังเคราะห์พลาสติกชนิด PLA การศึกษาขั้นต่อไปเลือก ใช้เอนไซม์ ไลเปส ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* สายพันธุ์ KKCH8611 เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ไลเปสในสภาวะที่หลากหลาย ใช้อาหารผลิตเอนไซม์ไลเปสราคาถูก และผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง จากการสังเคราะห์พลาสติกชนิด PLA โดยใช้ crude เอนไซม์ไลเปส จากสายพันธุ์KKCH8611 พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นโพลิเมอร์ที่มีจำนวนโมเลกุลของพอลิเมอร์ชนิด PLA สูงสุดเท่ากับ 10 โมเลกุล (decamer) และวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ LC/MS พบว่า โพลิเมอร์ของ PLA ที่สังเคราะห์ได้ มีน้ำหนักโมเลกุลสูงที่สุด คือเท่ากับ 923.1 ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลที่ได้นั้นน้ำหนักโมเลกุลที่รวมน้ำหนัก ของโพแทสเซียมไอออน $[M+K]^+$ ที่อยู่ในระบบวิเคราะห์

จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่า เอนไซม์ไลเปสที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดคือ CAL-B ซึ่งเป็นเอนไซม์ ที่ผลิตจากเชื้อ *Candida antarctica* lipase B จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 96 ชั่วโมง สามารถเปลี่ยนกรดแลคติกให้เป็นพลาสติกชนิด PLA ได้ถึง 60% และได้พลาสติกชนิด PLA 55% ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 5,000-6,200 Da ในขณะที่เมื่อใช้ Porcine pancreatic lipase (PPL) และ PCL จะเกิดเป็นพลาสติกชนิด PLA ในปริมาณต่ำ (Lassalle; & Ferreira. 2008: 1493-1502) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Chanfreau และคนอื่นๆ พบว่า lipase B จากเชื้อ *Candida antarctica* (Novozyme 435) สามารถเพิ่มผลผลิตของ PLLA ได้สูงสุดถึง 63% และมีน้ำหนักโมเลกุล เท่ากับ 37.8×10^3 g/mol ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส (Chanfreau; et al. 2010: 629-638) จากรายงานข้างต้นพบว่าเอนไซม์ไลเปสสามารถเกิดปฏิกิริยาพอลิเมอไรเซชันได้ เนื่องจากเอนไซม์ ไลเปสสามารถเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันเป็นปฏิกิริยาผันกลับของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยจะเกิด การสร้างพันธะเอสเทอร์ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล ($-OH$ group) ของ กรดแลคติกตัวที่หนึ่ง กับหมู่ คาร์บอกซิล ($-COOH$ group) ของกรดแลคติกตัวที่สองต่อกันเป็นโซ่ยาวกลายเป็นพลาสติกชนิด PLA ได้ (Yu; et al. 2012: 1027-1036) การสังเคราะห์พลาสติกชนิดPLA โดยใช้เอนไซม์ไลเปสนั้นเป็นกระบวนการ ทางชีวภาพที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมโดยที่กระบวนการสังเคราะห์นั้นเกิดในสภาวะที่ไม่รุนแรงเมื่อเทียบ

กับกระบวนการทางเคมี มีความจำเพาะเจาะจงและสามารถควบคุมการเกิดปฏิกิริยาได้ (Lassalle; & Ferreira. 2008: 1493-1502) แต่พลาสติกชนิด PLA ที่เกิดขึ้นนั้นมีน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างต่ำ อาจเนื่องมาจากปริมาณน้ำในขั้นตอนการควบแน่นโดยตรงอาจจะมีมากเกินไป จึงส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสมากกว่าการเกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน โดยที่ปริมาณน้ำที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 1-4% ซึ่งจะช่วยกระตุ้นให้เกิดกระบวนการพอลิเมอไรเซชันได้ เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสสามารถเกิดปฏิกิริยาบริเวณผิวหน้าระหว่างชั้นไขมันและชั้นน้ำ โดยที่พื้นผิวของชั้นน้ำนั้น เป็นบริเวณที่ประกอบด้วย α -helical ซึ่งเป็น active site จะถูกปิดทำให้สับสเตรทไม่สามารถเข้าจับกับเอนไซม์ไลเปสได้ แต่ในขณะที่บริเวณชั้นไขมัน α -helical ที่เป็น active site สามารถจับกับสับสเตรทเกิดเป็น ES complex แต่ถึงอย่างไรก็ตามการสังเคราะห์ aliphatic polyester ควรมีน้ำในการเกิดปฏิกิริยา เนื่องจากน้ำมีความสามารถในการสร้างพันธะไฮโดรเจน (Varma; et al. 2005: 949-981, Lassalle; & Ferreira. 2008: 1493-1502) การเลือกตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น n-hexane ที่ความเข้มข้น 1.1 mM ที่ 20 องศาเซลเซียส สามารถเพิ่มผลผลิตการเกิดผลิตภัณฑ์ได้ดีกว่าเมื่อใช้ acetone dioxane และ acetonitrile เป็นตัวทำละลาย (Torres; & Otero. 2001: 3-12) ความเข้มข้นของเอนไซม์ไลเปสไม่เพียงแต่ส่งผลต่อผลผลิต ยังส่งผลต่อน้ำหนักโมเลกุลอีกด้วย เช่น เมื่อใช้ CAL-B ที่ถูกตรึงเอนไซม์ และ PPL ที่ความเข้มข้น 54 mg/mmol ช่วยเพิ่มผลผลิตของ PLA และน้ำหนักโมเลกุล และระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา โดยทั่วไประยะเวลาที่เหมาะสมในการเกิดพอลิเมอร์ไรเซชัน คือ 96 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับการใช้ CAL-B ที่ถูกตรึงเอนไซม์ และ PPL แต่เมื่อใช้ PCL ที่เวลาเดียวกันพบว่า น้ำหนักโมเลกุลมีค่าที่ต่ำ (Lassalle; & Ferreira. 2008: 1493-1502) ดังนั้นในการศึกษากระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชัน ควรคำนึงถึงปัจจัยที่กล่าวมาข้างต้น

นอกจากนี้ยังพบว่า crude เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจาก *Bacillus subsp. subtilis* สายพันธุ์ KKCH8611 นำไปใช้ในการสังเคราะห์ พอลิเมอร์ชนิด PLA ได้ M_w น้อยกว่าเมื่อใช้เอนไซม์ไลเปสทางการค้า แต่การใช้ crude เอนไซม์ไลเปสสามารถลดต้นทุนในการสังเคราะห์พอลิเมอร์ชนิด PLA ได้ จากงานวิจัยของ Chuensangjun และคนอื่นๆ ใช้เอนไซม์ไลเปสทางการค้า (Lipozyme TL IM) 5% (w/w) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และใช้กรดแลคติกทางการค้า ปริมาตร 250 มิลลิกรัมต่อมิลลิ ตร เป็นสับสเตรท ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะ nitrogen atmosphere นาน 5 ชั่วโมง และเมื่อนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักโมเลกุลพบว่า มีค่าเท่ากับ 4,515 Da (Chuensangjun; et al. 2012: 154-157) น้ำหนักโมเลกุลของพลาสติกชนิด PLA ที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ไลเปสจากสายพันธุ์ KKCH8611 มีค่าที่ต่ำ อาจเนื่องมาจากปริมาณน้ำในขั้นตอนการควบแน่นโดยตรง อาจจะมีมากเกินไป ส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสมากกว่าการเกิด ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน หรือเกิดจากระยะเวลาในการควบแน่นน้อยเกินไป ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนั้นเป็นโอลิโกเมอร์สายสั้นๆ

ของพลาสติกชนิด PLA แต่ถึงอย่างไรก็ตามโพลิเมอร์ของพลาสติกชนิด PLA สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้หลากหลายด้าน เช่น ด้านการแพทย์ ได้นำมาใช้เป็นวัสดุในการตรึงกระดูกภายในร่างกาย อุปกรณ์ฝังในร่างกาย เนื่องจากมีความยืดหยุ่นสูงกว่าโลหะ สามารถเข้ากับเนื้อเยื่อและดูดซึมได้โดยวิธีการทางชีวภาพ นำมาใช้ในการผลิตหนังเทียมเพื่อตกแต่งบาดแผลที่เกิดจากไฟไหม้ นอกจากนี้ยังสามารถเป็นวัสดุที่ควบคุมการปล่อยตัวยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ และด้านการเกษตร ได้นำมาปรับปรุงคุณภาพของดิน เนื่องจากย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติเกิดเป็นกรดแลคติก ซึ่งจะช่วยปรับปรุงคุณภาพของดินที่เป็นดินต่างได้ (Lasprilla; et al. 2012: 321-328) ในการศึกษาขั้นต่อไป ควรนำผลิตภัณฑ์ที่เหลือใช้ในระดับอุตสาหกรรมมาเป็นแหล่งไขมันและแหล่งไนโตรเจน เพื่อลดต้นทุนในการผลิต ควรศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่คัดแยกได้จากสายพันธุ์ KKCH8611 และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการพอลิเมอไรเซชันพลาสติกชนิด PLA เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตพลาสติกชนิด PLA ต่อไปในอนาคต





บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- ธีรยุทธ วิไลวัลย์ ; และ วรวรรณ พันธุมนาวิน. (2548). อินฟาเวดสเปกโตรสโคปี. กรุงเทพฯ :
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปราวณี พัฒนพิพิธไพศาล. (2556). เอนไซม์เทคโนโลยี. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่ง
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย:13-16.
- พิชามัก สมบูรณ์ทรัพย์. (2553). บทควมวิชาการ เรื่องพลาสติกชีวภาพ : นวัตกรรมของผลิตภัณฑ์
สีเขียว. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 26 (2): 177-195.
- จำไพ สิริมนกุล. (2535). เคมีอินทรีย์เบื้องต้น .พิมพ์ครั้งที่ 10. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยรามคำแหง :
119-158.
- Abdel-Fattah, Y. R.; et al. (2012). Application of experimental designs to optimize medium
composition for production of thermostable lipase/esterase by *Geobacillus*
thermodenitrificans AZ1. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 10:
193-200.
- Abuin, E.; et al. (2007). Kinetics of *p*-nitrophenyl acetate hydrolysis catalyzed by *Mucor*
javanicus lipase in AOTrReverse micellar solutions formulated in different organic
solvents. *The Protein Journal*. 2(7): 475-479.
- Ahmed, E. H.; Raghavendra, T.; & Madamwar, D. (2010). A thermostable alkaline lipase
from a local isolate *Bacillus subtilis* EH 37: Characterization, partial purification,
and Application in organic synthesis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*.
160: 2102-2113.
- Almeida, A. F.; & Taulk-Tornisielo, S. M. (2013). Influence of carbon and nitrogen sources on
lipase production by a newly isolated *Candida viswanathii* strain. *Annual*
Microbiology. 63: 1225–1234.
- Alquati, C. G., et al. (2002). The cold-active lipase of *Pseudomonas fragi* heterologous
expression, biochemical characterization and molecular modeling. *European Journal*
of Biochemistry. 269: 3321-3328.
- Aly, M. M.; et al. (2012). Production of lipase from genetically improved *Streptomyces*
exfoliates LP10 isolated from oil contaminated soil. *African Journal of Microbiology*
Research. 6: 1125-1137.

- Anbu, P.; et al. (2011). Screening and optimization of extracellular lipase by *Acinetobacter* species isolation from oil-contaminated soil in South Korea. *African Journal of Biotechnology*. 10: 4147-4156.
- Anguita, J.; Rodriguez-Aparicio, L. B.; & Naharro, G. (1993). Purification, gene cloning, amino acid sequencing analysis and expression of an extracellular lipase from an *Aeromonas hydrophila* human isolate. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 2411-2417.
- Antczak, T.; et al. (2004). Sugar ester synthesis by a mycelium-bound *Mucor circinelloides* lipase in a micro-reactor equipped with water activity sensor. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 29: 155-161.
- Bai, N. S.; et al. (2012). Cuticle degrading enzyme production by some isolates of the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae* (METSCH.). *Journal of Bio-Science*. 20: 25-32.
- BD Biosciences. (2006). BD Bionutrients™ Technical Manual Advanced Bioprocessing. Third Edition. U.S.A.: 1-72.
- Bel, G.; et al. (1995). Biocatalyst behaviour in low-water systems. *Trends in Biotechnology*. (13)11: 468-473.
- Bernard, C. (1865). Introduction à l'Etude de la Médecine Expérimentale. Paris, J.B. Baillie&re. English translation: *An Introduction to the Study of Experimental Medicine* (Green, H. C., tr.). New York, Dover.
- Boekema, B.; et al. (2007). Hexadecane and tween 80 stimulate lipase production in *Burkholderia glumae* by different mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology*. (73)12: 3838-3844.
- Burkert, J. F. M.; Maugeri, F.; & Rodrigues, M. I. (2004). Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresource Technology*. 91: 77-84.
- Bussamara, R. (2010). Isolation of lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. *Bioresource Technology*. 101: 268-275.

- Chakraborty, K.; & Raj, R. P. (2008). An extra-cellular alkaline metalloproteinase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824 purification and biochemical characterization. *Food Chemistry*. 109: 727-736.
- Chanfreau, S.; et al. (2011). Enzymatic synthesis of poly-L-lactide and poly-L-lactide-co-glycolide in an ionic liquid. *Bioprocess and Biosystem Engineering*. 33: 629–638.
- Chen, Y. J.; Wen, C. M.; & Chen, T. L. (1999). Effect of oxygen transfer on lipase production by *Acinetobacter radoresistens*. *Biotechnology and Bioengineering*. 62: 311-316.
- Chuensangjun, C.; et al. (2012). Lipase-catalyzed polymerization of lactic acid and the properties of the polymer. *Advanced Materials Research*. 506: 154-157.
- Corzo, G. (1999). Production and characterization of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. *Bioresource Technology*. 70: 173-180.
- Dalmau, E.; Montesinos, J. L.; Lotti, M.; & Casas, C. (2000). Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. *Enzyme Microbial Technology*. 26(9–10): 657–663.
- Dheeman, D. S.; Frias, J. M.; & Henehan, G. T. M. (2010). Influence of cultivation conditions on the production of a thermostable extracellular lipase from *Amycolatopsis mediterranei* DSM 43304. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 37: 1-17.
- Diogo, M. M.; et al. (1999). Hydrophobic interaction chromatography of *Chromobacterium viscosum* lipase on polypropylene glycol immobilized on sepharose. *Journal of Chromatography A*. 849: 413-419.
- Dordick, J. S.; & Gorman, L. A. S. (1992). Organic solvents strip water off enzymes. *Biotechnology and Bioengineering*. 39(4): 392-397.
- Dutta, S.; & Ray, L. (2009). Production and characterization of an alkaline thermostable crude lipase from an isolated strain of *Bacillus cereus* C7. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 159: 142–154.
- El-Sawah, M. M. A.; Sherief, A. A.; & Bayoumy, S. M. (1995). Enzymatic properties of lipase and characteristic production by *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 67: 356-362.

- Elibol, M.; & Ozer, D. (2002). Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochemistry*. 38: 367-372.
- Eltaweel, M. A.; et al. (2005). An organic solvent-stable lipase from *Bacillus* sp. strain 42. *Annals of Microbiology*. 55: 187-192.
- Ertugrul, S.; Dönmez, G.; & Takaç, S. (2007). Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials*. 149: 720–724.
- Fabiszewska, A. U.; et al. (2014). Carbon source impact on *Yarrowia lipolytica* KKP 379 lipase production. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 50(4): 404–410.
- Gandhi, N. N. (1997). Applications of lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 74(6): 621-634.
- Ghanem, E. H.; Al-Sayed, H. A.; & Saleh, K. M. (2000). An alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 16: 459-464.
- Ghosh, P. K.; et al. (1996). Microbial lipases: production and applications. *Science Progress*. 79: 119-157.
- Guillou, C.; et al. (1995). Growth temperature is involved in the regulation of extracellular lipase at two different levels in *Pseudomonas fluorescens* strain MFO. *Biotechnology Letters*. 17: 377-382.
- Gunstone, D. F. (2002). Vegetable oils in food technology. Composition, properties and uses. Blackwell Publishing Ltd., CRC Press.:1-331.
- Gupta, R.; Gupta N.; & Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64: 763-781.
- Gupta, N.; Sahai, V.; & Gupta, R. (2007). Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. *Process Biochemistry*. 42: 518-526.
- Gupta, A. P.; & Kumar, V. (2007). New emerging trends in synthetic biodegradable polymers–polylactide: A critique. *European Polymer Journal*. 43: 4053-4074.

- Hamid, N. S. A.; et al. (2003). Screening and identification of extracellular lipase-producing thermophilic bacteria from a Malaysian hot spring. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 19: 961-968.
- Hanriot, M. (1896). Sur un nouveau ferment du sang. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et des ses Filiales (Paris)*. 3: 925-926.
- Hasan, F.; Shah, A.; & Hameed, A. (2009). Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*. 27: 782–798.
- Hiol, A.; et al. (2000). Purification and characterization of an extracellular lipase from a thermophilic *Rhizopus oryzae* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: pp. 421-430.
- Hoshino, A.; & Isono, Y. (2002). Degradation of aliphatic polyester films by commercially available lipases with special reference to rapid and complete degradation of poly(L-lactide) film by lipase PL derived from *Alcaligenes* sp. *Biodegradation*. 13: 141-147.
- Hou, C. T. (1994). pH dependence and thermostability of lipases from cultures from ARS culture collection. *Journal of Industrial Microbiology*. 13: 242-248.
- Hun, C. J.; et. al. (2003). A newly isolated organic solvent tolerant *Bacillus sphaericus* 205Y producing organic solvent-stable lipase. *Biochemical Engineering Journal* 15: 147-151.
- Hwang, S.; et al. (2004). Stability analysis of *Bacillus stearothermophilus* L1 lipase immobilized on surface-modified silica gels. *Biochemical Engineering Journal*. 17: 85-90.
- Iwai, M.; Okumura, S.; & Tsujisaka, Y. (1975). The comparison of the properties of two lipases from *Penicillium cyclopium* westring. *Agricultural and Biological Chemistry*. 39(5): 1063-1070.
- Jaeger, Karl-Erich; & Reetz, M. T. (1988). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 16: 396-403.
- Janssen, P. H; Monk, C. R; & Morgan, H. W. (1994). A thermophilic, lipolytic *Bacillus* sp. and continuous assay of its *p*-nitrophenyl-palmitate esterase activity. *The Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. 120: 195–200.

- Jinwal, U. K.; et al. (2003). Purification and characterization of an alkaline lipase from a newly isolated *Pseudomonas mendocina* PK-12CS and chemoselective hydrolysis of fatty acid ester. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 11: 1041-1046.
- Kapoor, M.; & Gupta, M. N. (2012). Lipase promiscuity and its biochemical application. *Process Biochemistry*. 47: 555-569.
- Kaushik, R.; et al. (2006). Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 40: 121–126.
- Khiangnam, S.; et al. (2014). Screening and identification of cellulase producing bacteria isolated from oil pal meal. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 4(04): 090-096.
- Kiran, G. S.; et al. (2008). Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas* sp. (MSI057). *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 31: 483–492.
- Klein, R. R.; et al. (1997). Altered acyl chain length specificity of *Rhizopus delemar* lipase through mutagenesis and molecular modeling. *Lipids*. 32: 123-130.
- Klibanov, A. M. (1997). Why are enzymes less active in organic solvents than in water?. *Trends in Biotechnology*. 15(3): 97-101.
- Knezevic, Z.; et al. (2006). Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit®C supports by covalent attachment. *Biochemical Engineering Journal*. 30: 269- 278.
- Koayashi, S. (2010). Lipase-catalyzed polyester synthesis-A green polymer chemistry. *Proceedings of the Japan Academy Series B*. 86: 338-365.
- Kumar, R.; et al. (2011). Identification of variable and value optimization for optimum lipase producing by *Bacillus pumilus* RK 31 using statistical methodology. *New Biotechnology*. 28(1): 65-71.
- Kumar, A.; Parihar, S. S.; & Batra, N. (2012). Enrichment, isolation and optimization of lipase-producing *Staphylococcus* sp. from oil mill waste (oil cake). *Journal of Experimental Sciences*. 3(8): 26-30.

- Kumar, S.; et al. (2005). Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression and Purification*. 41: 38-44.
- Lacointe, C.; Dubreucq, E.; & Galzy, P. (1996). Ester synthesis in aqueous media in the presence of various lipases. *Biotechnology Letters*. 18: 869-874.
- Larsen, M. D.; & Jensen, K. (1999). The effects of environmental conditions on the lipolytic activity of strains of *Penicillium roqueforti*. *International Journal of Food Microbiology*. 46: 159-166.
- Lasprilla, J. R. A.; et al. (2012). Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices-A review. *Biotechnology Advances*. 30: 321-328.
- Lassalle, V. L.; & Ferreira, M. L. (2008). Lipase-catalyzed synthesis of polylactic acid: An overview of the experimental aspects. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 83: 1493-1502.
- Lau, H. L.; et al. (2011). Production and optimization of alkalostable lipase by alkalophilic *Burkholderia cenocepacia* ST8. *African Journal of Biotechnology*. 10: 7002-7009.
- Lima, V. K. N.; et al. (2004). Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 31: 53- 61.
- Lee, C. Y.; & Yandolo, J. J. (1986). Lysogenic conversion of staphylococcal lipase is caused by insertion of the bacteriophage L54a into the lipase structural gene. *Journal Bacteriology*. 166: 385-391.
- Lee, D.-W.; et al. (2001). Purification and characterization of two distinct thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *Enzyme and Microbial Technology*. 29: 363-371.
- Lee, S. Y.; & Rhee, J. (1993). Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. *Enzyme and Microbial Technology*. 15(7): 617-623.
- Lin, S. F.; et al. (1996). Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 1093-1095.

- Line, K.; Isupov, M. N.; & Littlechild, J. A. (2004). The crystal structure of a Lactamase from an *Aureobacterium* species reveals a tetrahedral intermediate in the active site. *Journal of Molecular Biology*. 338: 519-532.
- Liu, C.-H.; Lu, W.-B.; & Chang, J.-S. (2006). Optimizing lipase production of *Burkholderia* sp. by response surface methodology. *Process Biochemistry*. 41: 1940-1944.
- Liu, C.-H.; et al. (2011). Fermentation strategies for the production of lipase by an indigenous isolate *Burkholderia* sp. C 20. *Biochemical Engineering Journal*. 58–59: 96–102.
- Liu, C.-H.; et al. (2012). Optimizing lipase production from isolated *Burkholderia* sp. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 43: 511-516.
- Long, K.; et al. (1998). Substrate preference of mycelium-bound lipase from a strain of *Aspergillus flavus* link. *Biotechnology Letters*. 20: 369-372.
- Lopes, Maria de Fa'tima Silva; et al. (2002). Characterization of a highly thermostable extracellular lipase from *Lactobacillus plantarum*. *International Journal of Food Microbiology*. 76: 107-115.
- Lowry, R. R.; & Tinsley, J. I. (1976). Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 53: 470-472.
- Ma, J.; et al. (2011). Fatty acid composition of camellia oleifera oil. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. 6: 9–12.
- Ma, J.; et al. (2006). Overexpression and characterization of lipase from *Bacillus subtilis*. *Protein Expression and Purification*. 45: 22-29.
- Ma, Q.; et al. (2010). Screening and identification of a highly lipolytic bacterial strain from barbecue site in Hainan and characterization of its lipase. *Annals of Microbiology*. 60: 429-437.
- Macrae, A. R. (1983). Lipase-catalyzed interesterification of oils and fats. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 60(2): 291-294.
- Macrogen. (2005). Template preparation guideline. Retrieved December 19, 2012, from http://dna.macrogen.com/eng/help/Macrogen_Sample_Submission.pdf.

- Maeda, H.; et al. (2005). Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 67: 778-788.
- Mahadik, N. D.; et al. (2002). Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 38: 715-721.
- Mahler, G. F.; et al. (2000). Effects of carbon sources on extracellular lipase production and lip A transcription in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*. 24: 25-30
- Masaki, K.; et al. (2005). Cutinase-like enzyme from the yeast *Cryptococcus* sp. strain S-2 hydrolyzes polylactic acid and other biodegradable plastics. *Applied and environmental microbiology*. 71: 7548-7550.
- Manco, G.; et al. (1998). Overexpression and properties of a new thermophilic and thermostable esterase from *Bacillus acidocaldarius* with sequence similarity to hormone-sensitive subfamily. *Biochemistry Journal*. 332: 203-212.
- Markossian, S.; et al. (2000). Isolation and characterization of lipid-degrading *Bacillus thermoleovorans* IHI-91 from an icelandic hot spring. *Extremophiles*. 4: 365-371.
- Marimuthu, K. (2013). Isolation and characterization of *Staphylococcus hominis* JX961712 from oil contaminated soil. *Journal of Pharmacy Research*. 7: 252-256.
- Martinelle, M.; Holmquist, M.; & Hult, K. (1995). On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1258: 272-276.
- Massadeh, M. I.; & Sabra, F. M. (2011). Production and characterization of lipase from *Bacillus stearothermophilus*. *African Journal of Biotechnology*. 10(61): 13139-13146.
- Miranda, O. A.; et al. (1999). Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. *Bioresource Technology*. 69: 145-147.
- Murillo, I.; & Villamil, L. (2011). *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* used as probiotics in rotifer (*Brachionus plicatilis*) cultures. *Probiotic & Prebiotic Applications in Aquaculture*.: 1-5.
- Muralidhar, R. V.; et al. (2001). A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. *Biochemical Engineering Journal*. 9: 17-23.

- Mustranta, A. (1992). Use of lipases in the resolution of racemic ibuprofen. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 38(1): 61-66.
- Nagao, T.; et al. (2001). Use of thermostable *Fusarium heterosporum* lipase for production of structured lipid containing oleic and palmitic acids in organic solvent-free system. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 78(2): 167-172.
- Nakashima, T.; et al. (1988). Culture conditions for intracellular lipase production by *Rhizopus chinensis* and its immobilization within biomass support particles. *Journal of Fermentation Technology*. 66: 441-448.
- Nawani, N.; & Kaur, J. (2000). Purification, characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 206: 91-96.
- Pan, S.; et al. (2010). Esterification activity and conformation studies of *Burkholderia cepacia* lipase in conventional organic solvents, ionic liquids and their co-solvent mixture media. *Bioresource Technology*. 101: 9822-9824.
- Papagora, C.; Roukas, T.; & Kotzekidou, P. (2013). Optimization of extracellular lipase producing by *Debaryomyces hansenii* isolates from dry-salted olives using response surface methodology. *Food and Bioproducts processing*. 91: 413-420.
- Pranamuda, H.; Tsuchii, A.; & Tokiwa, Y. (2001). Poly (l-lactide)-degrading enzyme produced by *Amycolatopsis* sp. *Macromolecular Bioscience*. 1: 25-29.
- Prazeres, J. N. D.; Cruz, J. A. B.; & Pastore, G. M. (2006). Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37: 505-509.
- Priest, F. (1977). Extracellular enzyme synthesis in the Genus *Bacillus*. *Bacteriological Reviews*. 41(3): 711-753.
- Rajendran, A.; & Thangavelu, V. (2010). Optimization and Modeling of process parameters for lipase production by *Bacillus brevis*. *Food Bioprocess Technology*. 5: 310-322.
- Rashid, N.; et al. (2001). Low-temperature lipase from Psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A. *Applied and Environmental Microbiology*.: 4064-4069.
- Rathi, P.; Saxena, R. K.; & Gupta, R. (2001). A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochemistry*. 37: 187-192.

- Rekha, P. D.; et al. (2007). Effect of free and encapsulated *Pseudomonas putida* CC-FR2-4 and *Bacillus subtilis* CC-pg104 on plant growth under gnotobiotic conditions. *Bioresource Technology*. 98: 447–451.
- Rigo, E.; et al. (2010). Lipase production by solid fermentation of soybean meal with different supplement. *LWT-Food Science and Technology*. 43: 1132-1137.
- Ruchi, G.; Anshu, G.; & Khare, S. K. (2008). Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Production optimization by response surface methodology and application. *Bioresource Technology*. 99: 4796-4802.
- Ruiz, C.; et al. (2002). Analysis of *Bacillus megaterium* lipolytic system and cloning of Lip A, a novel subfamily I.4 bacterial lipase. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters*. 217: 263-267.
- Salihu, A.; et al. (2012). Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues. *Resources, Conservation and Recycling*. 58: 36-44.
- Sanghi, A.; et al. (2008). Optimization of xylanase production using inexpensive agro-residues by alkalophilic *Bacillus subtilis* ASH in solid-state fermentation. *World K Microbiology Biotechnology*. 24: 633-640.
- Satayanarayan, T.; & Johri, B. N. (1981). Lipolytic activity of thermophilic fungi of paddy straw compost. *Current Science*. 50: 680-682.
- Satami, M.; et al. (2006). *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56: 1735-1740.
- Sharon, C.; et al. (1998). Purification and characterization of a lipase from *Pseudomonas aeruginosa* KKA-5 and its role in castor oil hydrolysis. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 20: 304-307.
- Sidhu, P.; et al. (1998). Effect of cultural conditions on extracellular lipase production by *Bacillus* sp. RS-12 and its characterization. *Indian Journal of Microbiology*. 38: 9-12.
- Simons, J. W.; et al. (1998). Cloning purification and characterization of the lipase from *Staphylococcus epidermidis*-comparison of the substrate selectivity with those of other microbial lipases. *European Journal Biochemistry*. 253: 675-683.

- Slifkin, M. (2000). Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *Journal of clinical microbiology*.: 4626-4628.
- Sugihara, A.; et al. (1995). Purification and characterization of a lipase from *Pichia burtonii*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 43: 277-281.
- Sukkhum, S.; et al.(2009). A novel poly(L-lactide) degrading actinomycetes isolated from Thai forest soil, phylogenic relationship and the enzyme characterization. *Journal of general microbiology*. 55: 456-467.
- Sztajer, H.; Maliszewska, I.; & Wieczorek, J. (1988). Production of exogenous lipase by bacteria, fungi and actinomycetes. *Enzyme Microbiology Technology*. 10: 492-497.
- Tahoun, M. K.; E-Kady, I.; & Wahba, A. (1995). Production of lipases from microorganisms. *Microbiology Letters*. 28: 133-139.
- Takahashi, Y.; et al. (2004). Lipase-catalyzed transformation of poly(lactic acid) into cyclic oligomers. *Macromolecular Bioscience*. 4: 346-353.
- Takahashi, S.; et al. (1998). Extracellular production of active *Rhizopus oryzae* lipase by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 86: 164-168.
- Talon, R.; et al. (1995). Purification and characterization of extracellular *Staphylococcus warneri* lipase. *Current Microbiology*. 30: 6-11.
- Tan, T.; et al. (2003). Screening of high lipase producing *Candida* sp. and production of lipase by fermentation. *Process Biochemistry*. 39: 454-465.
- Tokiwa, Y.; & Jarerat, A. (2004). Biodegradation of poly(L-lactide). *Biotechnology Letters*. 26: 771-777.
- Torres, C.; & Otero, C. (2001). Part III: Direct enzymatic esterification of lactic acid with fatty acids. *Enzyme and Microbial Technology*. 29: 3-12.
- Tsai, Shau-Wei; & Wei, Hwa-Jou. (1994). Enantioselective esterification of racemic naproxen by lipases in organic solvent. *Enzyme and Microbial Technology*. 16(4): 328-333.

- Varma, K. I.; et al. (2005). Enzyme catalyzed synthesis of polyesters. *Progress in Polymer Science*. 30: 949-981.
- Van, K. M. D; et al. (1998). The phospholipase activity of *Staphylococcus hyicus* lipase strongly depends on a single Ser to Val mutation. *Chemistry and Physics of Lipids*. 93: 39-45.
- Vanot, G.; et al. (2001). Optimal design for the maximization of *Penicillium cyclopium* lipase production. *Applied Microbiology Biotechnology*. 57: 342-345.
- Verger, R.; & Haas, G. H. (1973). Enzyme reactions in a membrane model 1. A new technique to study enzyme reactions in monolayers. *Chemistry and Physics of Lipids* 10: 127-136.
- Wolski, E.; et al. (2009). Production and partial characterization of lipases from a newly isolated *Penicillium* sp. using experimental design. *Letters in Applied Microbiology* 49: 60-66.
- Xing, C.; et al. (2013). Screening of thermophile neutral lipase-producing *Pseudomonas* sp. ZBC1 and improving its enzymatic activity. *Africa Journal of Biotechnology*. 12(9): 949-957.
- Yamane, T. (1987). Enzyme technology for the lipids industry: An engineering overview. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 64(12): 1657-1662.
- Yang, J.; et al. (2000). In vitro analysis of roles of a disulfide bridge and a calcium binding site in activation of *Pseudomonas* sp. strain KWI 56 lipase. *Journal of Bacteriology*. 182: 295-302.
- Yu, Y.; et al. (2012). Lipase/esterase-catalyzed synthesis of aliphatic polyester via polycondensation: A review. *Process Biochemistry*. 47: 1027-1036.
- Zarevucka, M. (2012). Olive oil as inductor of microbial lipase. *Olive oil-Constituents, Quality, Health Properties and Bioconversions*.: 457-470.
- Zhang, A. J.; et al. (2009). Cloning expression and characterization of an organic solvent tolerant lipase from *Pseudomonas fluorescens* JCM5963. *Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic*. 56(2-3): 78-84.

Zhang, B.; et al. (2012). Soil microbial community dynamics over a maize (*Zea mays* L.) growing season under conventional- and no-tillage practices in a rainfed agro ecosystem. *Soil & Tillage Research*. 124: 153-160.







ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหาร

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Enrichment medium

Peptone	0.05	เปอร์เซ็นต์
Na_2HPO_4	0.10	เปอร์เซ็นต์
KH_2PO_4	0.15	เปอร์เซ็นต์
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05	เปอร์เซ็นต์
NaCl	0.05	เปอร์เซ็นต์
(NH_4) $_2\text{SO}_4$	0.50	เปอร์เซ็นต์
Tween 80	12.00	เปอร์เซ็นต์

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกรอง และ ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ± 1 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Tween 80 agar

Peptone	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
Agar	15	กรัม
H_2O	900	มิลลิลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ± 1 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาทีตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงจนพอจับขวดอาหารได้ประมาณ 45 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำไปรวมกับสารที่ทำการฆ่าเชื้อแยกไว้ คือ

Tween 80	10	กรัม
H_2O	900	มิลลิลิตร

3. Tween 80 broth

Peptone	10	กรัม
NaCl	5	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
Tween 80	10	กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกรองให้มีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ± 1 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Inoculum medium

Olive oil	2	มิลลิลิตร
Tween 80	1	มิลลิลิตร
Glucose	0.5	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
Peptone	0.5	กรัม

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกรองจนครบ 1 ลิตร และละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไป
 นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ± 1 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Production medium

Olive oil	0.5	เปอร์เซ็นต์
NaCl	0.16	เปอร์เซ็นต์
Stock CASO	0.12	เปอร์เซ็นต์

(ประกอบด้วย tryptone 17 กรัมต่อลิตร glucose 2.5 กรัมต่อลิตร peptone 3 กรัมต่อลิตร)

ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกรอง และ ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน นำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่
 อุณหภูมิ 121 ± 1 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. Nutrient agar

Peptone	5	กรัมต่อลิตร
Beef extract	3	กรัมต่อลิตร
Agar	15	กรัมต่อลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกรองให้มีปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ± 1
 องศาเซลเซียสความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
บัพเฟอร์และวิธีการเตรียมสาร



ภาคผนวก ข

บัฟเฟอร์และวิธีการเตรียมสาร

1. อาหารทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต

1.1 เตรียมอาหารพื้นฐาน Nutrient broth ประกอบด้วย

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
จากนั้นเติม Bromthymol blue	0.03	กรัม

1.2 เตรียมสารละลายน้ำตาลเข้มข้น 5% ได้แก่ glucose, mannitol และ lactose ผสมลงในอาหารพื้นฐานให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5% ถึง 1% เทใส่หลอดทดลองพร้อมหลอดดักก๊าซ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2. Methyl red- Voges - Proskauer medium (MR-VP)

Peptone	7.0	กรัม
Dextrose	5.0	กรัม
Dipotassium phosphate	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ปรับ pH ให้เป็น 6.9 ± 0.2		

3. สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ MR

3.1 สารเคมีที่ใช้ทดสอบ MR

Methyl red	0.8	กรัม
Ethanol 95%	300	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายสี Methyl red ใน 95% Ethanol แล้วจึงเติมน้ำกลั่น

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ VP (Voges- Proskauer test solution)

Solution A:

Alpha naphthol	10.0	กรัม
Ethanol 95%	100	มิลลิลิตร

ละลาย Alpha naphthol ใน 95% Ethanol เก็บในขวดสีชา

Solution B:

KOH	20	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลาย KOH ในน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา

4. Triple sugar iron agar (TSI)

Peptone	20	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Sucrose	10.0	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Ferrous ammonium sulfate	0.2	กรัม
Sodium thiosulfate	0.2	กรัม
Phenol red	0.025	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ต้มส่วนผสมทั้งหมดเพื่อละลาย agar แบ่งใส่หลอดปริมาตร 10 มิลลิลิตร หนึ่งหลอด
โดยใช้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำออกมาให้แข็งตัวในลักษณะเป็น agar
deep หรือ agar tall

5. Citrate agar

Sodium chloride	5.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Ammonium dihydrogen phosphate	1.0	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	1.0	กรัม
Sodium citrate	2.0	กรัม
Bromothymol blue	0.08	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

(ปรับ pH ให้เป็น 6.9 ± 0.2) ผสมสารและต้มอุ่นให้ละลายบรรจุใส่หลอดหลอดละ 3 มิลลิลิตร นำไปนั่งฆ่าเชื้อแล้ววางเรียง

6. การทดสอบแคตาเลส (catalase test)

3% Hydrogen peroxide solution H_2O_2	3.0	กรัม
H_2O	100	มิลลิลิตร

7. การทดสอบออกซิเดส (oxidase test) สารเคมีที่ใช้ทดสอบ

Tetramethyl- <i>p</i> -phenyldiamine HCl	10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย tetramethyl-*p*-phenyldiamine HCl ในน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา และเก็บในตู้เย็น ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินไม่สามารถทดสอบได้

8. 50 mM Tris-HCl pH 8

Tris-HCl	6.057	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ด้วย 0.1N HCl

9. การเตรียมสารละลาย *p*-nitrophenylpalmitate

9.1 Solution A

<i>p</i> -nitrophenylpalmitate (<i>p</i> NPP)	0.03	กรัม
Isopropanol	10	มิลลิลิตร

9.2 Solution B

เตรียม Triton x-100	0.4	มิลลิลิตร
---------------------	-----	-----------

ลงใน 50 mM Tris-HCl pH 8 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร หลังจากนั้นชั่ง

Gum arabic	0.1	กรัม
------------	-----	------

10. การเตรียมสารละลาย *p*-nitrophenol

<i>p</i> -nitrophenol	0.139	กรัม
Isopropanol	900	ไมโครลิตร



ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวภัทรภร พิกุลขวัญ
วันเดือนปีเกิด	9 ธันวาคม พ.ศ. 2528
สถานที่เกิด	อ.เมือง จ.นครปฐม
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	420 ถ.โชติรวี ต. สนามจันทร์ อ.เมือง จ. นครปฐม 73000
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2552	จบการศึกษาในระดับปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร จากสถาบันเทคโนโลยีพระจอม เกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร
พ.ศ. 2558	ศึกษาในระดับปริญญาโท สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร
ผลงาน	เข้าร่วมการประชุมงานวิชาการระดับนานาชาติ The 6 th Congress of European Microbiologists (FEMS) ณ ประเทศเนเธอร์แลนด์ และตีพิมพ์บทความในวารสาร วิทยาศาสตร์ มศว ปีที่32 ฉบับที่ 1 เดือนมิถุนายน พ.ศ.2559