การผลิตไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa* ในระดับถังหมัก 5 ลิตรแบบไม่ต่อเนื่อง

นายอังคาร ตั้นพันธ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544
ISBN 974-03-0453-2
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF LIPASE FROM *Pseudomonas aeruginosa* IN 5 LITER BATCH CULTURE FERMENTER

Mr. Angkarn Tanphand

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Department of Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2001

ISBN 974-03-0453-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตไลเปสจาก Pseudomonas aeruginose ในระดับถังหมัก 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง
โดย	นายอังคาร ตั้นพันธ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์นภา ศิวรังสรรค์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. วิชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วบศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อังคาร ตั้นพันธ์: การผลิตไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa* ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง. (PRODUCTION OF LIPASE FROM *Pseudomonas aeruginosa* IN 5-LITER BATCH CULTURE FERMENTER)
อ. ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์, 91 หน้า. ISBN 974-03 -0453 -2.

Pseudomonas aeruginosa สามารถผลิตไลเปสได้เมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารที่ประกอบด้วย $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% (w/v), Fructose 2% (w/v), K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v) และ Yeast extract 0.01% (w/v) ในปริมาตรทั้งสิ้น 4 ลิตร ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักในการผลิตไลเปสคือ ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5% (v/v), อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm, อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 รอบต่อนาที, อุณหภูมิในการเลี้ยงเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส และควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.0 เชื้อสามารถผลิตไลเปสได้สูงสุด 1,476.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 48 นำเอนไซม์มากรองด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชั่น และทำให้เป็นผงด้วยวิธีไลโอฟิไลเซชั่น ได้แอคติวิตีของเอนไซม์ผงเท่ากับ 98.04 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ เมื่อนำเอนไซม์ผงที่ผลิตได้มากำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายร่วมกับเซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei* และ โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซับน้ำของเส้นใยได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลักสูตร .....เทคโนโลยีชีวภาพ.....	ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา .....เทคโนโลยีชีวภาพ.....	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา .....2544.....	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

4272475623: MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: LIPASE / *Pseudomonas aeruginosa* / FERMENTER

ANGKARN TANPHAND: PRODUCTION OF LIPASE FROM *Pseudomonas aeruginosa* IN 5-LITER BATCH CULTURE FERMENTER. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. NAPA SIWARUNGSON, 91 pp. ISBN 974-03-0453-2

Pseudomonas aeruginosa produced a high amount of lipase in 5-liter fermenter. Culture medium contains $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% (w/v), Fructose 2% (w/v), K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v) and Yeast extract 0.01% (w/v) in total volume of 4 liter. The optimal conditions for culturing were as follows: inoculum size at 0.5% (v/v) of the culture volume, aeration rate at 1.0 vvm, agitation speed of 250 rpm, temperature at 37°C and control pH at 7.0. This strain can produce the high amount of lipase 1,476.50 unit/ml. at 48 hours. The enzyme was filtrated by ultrafiltration and made in powder form by lyophilization. The specific activity of powder enzyme was 98.04 unit/mg powder. The enzymatic scouring of cotton fabrics treated by lipase from *Pseudomonas aeruginosa*, protease from *Bacillus subtilis* TISTR25 and cellulase from *Trichoderma reesei* made an adequate absorbency of cotton fabrics.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Program ……Biotechnology…….	Student's signature …….
Field of study….Biotechnology……..……..	Advisor's signature …….
Academic year……. 2001…….	Co-advisor's signature ……..

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์ เป็นอย่างสูงที่ได้กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา โดยให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ทั้งด้านงานวิจัยและด้านอื่น ๆ ตลอดระยะเวลาในการทำงานวิจัย ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้ง รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ ที่กรุณาเป็นกรรมการสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาเอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมี ที่ใช้ในการวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ และบุคลากรทุกท่านในภาควิชาชีวเคมี ที่ให้ความช่วยเหลือและความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้ และขอบคุณเป็นพิเศษสำหรับพี่น้อย Biotech ที่ให้คำปรึกษาในทุกๆเรื่อง

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนอุดหนุนการวิจัย

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย สำหรับความอนุเคราะห์ด้านทุนอุดหนุนการวิจัย

ขอขอบคุณนิสิตปริญญาโท-เอก ภาควิชาชีวเคมี และเทคโนโลยีทางชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่าน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญรูป..... ฏ

คำย่อ ..... ฐ

บทที่

1. บทนำ 1

2. ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์

2.1 ครุภัณฑ์..... 20

2.2 เคมีภัณฑ์..... 21

2.3 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง 22

3. วิธีการทดลอง

3.1 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง..... 23

3.2 การเลี้ยงเชื้อและการติดตามการเจริญของเชื้อ 23

3.3 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการสังเคราะห์ไลเปส 24

3.5 การวัดแอคติวิตีของไลเปส 25

3.6 การวัดปริมาณโปรตีน 25

3.7 ขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์ 25

3.8 การกำจัดสิ่งสกปรกบนเส้นใยฝ้าย 26

4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตไลเปสของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*..... 28

4.1.1 ผลของปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ใช้..... 28

4.1.2 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ 32

4.1.3 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้..... 36

4.1.4 ผลของอัตราเร็วในการกวน 40

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

4.1.5 ผลของอัตราการให้อากาศ 44

4.1.6 ผลของอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อ 48

4.1.7 ผลของ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 52

4.2 การเตรียมไลเปสให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยทำให้เข้มข้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชั่นและนำมาทำเป็นเอนไซม์ผง..... 56

4.3 การศึกษาการเก็บเอนไซม์ผงในระยะยาวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 58

4.4 การประยุกต์ใช้ไลเปสเพื่อการกำจัดสิ่งสกปรกบนเส้นใยฝ้าย 59

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 61

รายการอ้างอิง..... 72

ภาคผนวก 80

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 91

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตาราง หน้า

1. ตัวอย่างของไลเปสที่ถูกเติมลงในผลิตภัณฑ์ประเภทซีส..... 14
2. แสดงชนิดและปริมาณของสารประกอบต่างๆที่มีในเส้นใยของฝ้าย..... 16
3. การทำให้ไลเปสบริสุทธิ์ขึ้นบางส่วนด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชั่น..... 56
4. แสดง Relative activity ของเอนไซม์ผงที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส.....58
5. แสดงผลการกำจัดสิ่งสกปรกบนเส้นใยฝ้ายเปรียบเทียบระหว่างการใช้เอนไซม์กับการใช้คอสติกโซดา..... 60
6. เปรียบเทียบปัจจัยที่ศึกษาในระดับขวดเขย่า 1,000 มล. และในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร. 67
7. ต้นทุนของการผลิตตามสเกล 68
8. การเปรียบเทียบราคาต่อหน่วยระหว่างไลเปสผงที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* กับไลเปสผงของบริษัท SIGMA ที่ผลิตจาก *Pseudomonas cepacia* 68

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพประกอบ หน้า

1. เปรียบเทียบการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณของฟรุกโตสเป็น 1%, 2% และ 3% (w/v)..... 29
2. เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณของฟรุกโตสเป็น 1%, 2% และ 3% (w/v)..... 30
3. เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณของฟรุกโตสเป็น 1%, 2% และ 3% (w/v) ในชั่วโมงที่ 48 31
4. เปรียบเทียบการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.05%, 0.13%, 0.25% และ 0.50% (w/v) 33
5. เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.05%, 0.13%, 0.25% และ 0.50% (w/v) 34
6. เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.05%, 0.13%, 0.25% และ 0.50% (w/v) ในชั่วโมงที่ 48 35
7. เปรียบเทียบการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อตั้งต้นเป็น 0.25%, 0.50% และ 1.00% (v/v) 37
8. เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อตั้งต้นเป็น 0.25%, 0.50% และ 1.00% (v/v) 38
9. เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อตั้งต้นเป็น 0.25%, 0.50% และ 1.00% (v/v) ในชั่วโมงที่ 48 39
10. เปรียบเทียบการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอัตราการกวนเป็น 200 rpm, 250 rpm และ 300 rpm 41
11. เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอัตราการกวนเป็น 200 rpm, 250 rpm และ 300 rpm 42
12. เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอัตราการกวนเป็น 200 rpm, 250 rpm และ 300 rpm ในชั่วโมงที่ 48 43
13. เปรียบเทียบการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 vvm, 1.0 vvm และ 1.5 vvm 45
14. เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 vvm, 1.0 vvm และ 1.5 vvm 46

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ หน้า

15. เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 vvm, 1.0 vvm และ 1.5 vvm ในชั่วโมงที่ 48 47
16. เปรียบเทียบการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเป็น 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส 49
17. เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเป็น 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส 50
18. เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเป็น 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 48 51
19. เปรียบเทียบการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผัน pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเป็น 6, 7 และ 8 53
20. เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผัน pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเป็น 6, 7 และ 8 54
21. เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผัน pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเป็น 6, 7 และ 8 ในชั่วโมงที่ 48 55
22. แสดงการเจริญและแอคติวิตีจำเพาะในการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* 57
23. ความเสถียรของไลเปสผงเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน..... 58

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

μg	ไมโครกรัม
μl	ไมโครลิตร
mg	มิลลิกรัม
ml	มิลลิลิตร
w/v	น้ำหนักต่อปริมาตร
v/v	ปริมาตรต่อปริมาตร
BSA	Bovine Serum Albumin
U/mg	ยูนิตต่อมิลลิกรัม
U/ml	ยูนิตต่อมิลลิลิตร
rpm	รอบต่อนาที
vvm	ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที
N	นอร์มอล
°C, °ซ	องศาเซลเซียส
%	เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมา

ไลเปส หรือ อีกชื่อหนึ่งคือ Glycerol ester hydrolase หรือ Acylglycerol hydrolase (E.C. 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ได้กรดไขมันและกลีเซอรอล พบว่าไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์อาจเป็นสารตัวกลางในปฏิกิริยาได้ โดยไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันโมเลกุลยาว (long chain aliphatic acid) กับกลีเซอรอล โดยไลเปสจะทำปฏิกิริยาดังกล่าวได้เมื่อไตรกลีเซอไรด์อยู่ในสภาพ oil-water interface (Macrae, 1983)

จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีการนำไลเปสไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิดดังนี้ ในอุตสาหกรรมอาหารใช้เป็นตัวสร้างกลิ่นรส (Flavor) ของผลิตภัณฑ์เนยแข็งพวกที่มีการบ่ม (ripening) เช่น Italian cheese, blue cheese และ Roquefort cheese (Arnold และคณะ, 1975) นอกจากนี้ไลเปสยังทำให้อาหารสุนัขรสชาดดีขึ้น และช่วยขจัดเศษเนื้อและเศษไขมันที่ไม่ต้องการออกจากวัตถุดิบหนังสัตว์ก่อนจะนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์หนังด้วย (Posorske, 1984) ไลเปสยังถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก ยา เครื่องสำอาง การผลิต aliphatic fatty acid และการกำจัดน้ำเสียจากแหล่งชุมชน (Macrae, 1983)

แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่พบได้ในพืชพวก ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวไรน์ (rye) ฝ้าย ถั่วเหลือง และละหุ่ง (Arnold และคณะ, 1975) ส่วนในสัตว์จะพบในตับอ่อน (pancreatic lipase) และในนม (milk lipase) (Shahani, 1975) แต่ไลเปสจากจุลินทรีย์มีข้อดีกว่าไลเปสจากพืชและสัตว์ เพราะจุลินทรีย์เติบโตได้รวดเร็วและเลี้ยงง่ายกว่าสัตว์ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตได้รวดเร็วโดยวิธีปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์ และสามารถปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ได้ง่ายกว่าพืชและสัตว์ (ท น ง, 2522)

ไลเปสสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด แต่ละชนิดจะให้ไลเปสที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน จุลินทรีย์บางพวกจะผลิต Alkaline lipase เช่น *Bacillus subtilis* 168 (Lesuisse และคณะ, 1993) บางพวกจะผลิต neutral lipase เช่น *Aspergillus oryzae* (Toida และคณะ, 1995) และบางพวกก็จะผลิต thermostable lipase เช่น *Bacillus sp.* (Sugihara และคณะ, 1991) จากการที่จุลินทรีย์สามารถผลิตไลเปสที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันนี้เอง ทำให้สามารถเลือกไลเปสมาใช้ประโยชน์ให้เหมาะสมกับอุตสาหกรรมต่างๆได้มากมาย (Yamane, 1987)

การทำงานของไลเปสจากจุลินทรีย์

ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ 3 ชนิด (Yamane, 1987) คือ

1. ไฮโดรไลซ์เอสเทอร์
2. สังเคราะห์เอสเทอร์
3. ทรานเอสเทอริฟิเคชัน ซึ่งแบ่งได้เป็น
   3.1 Acidolysis
   3.2 Alcoholysis
   3.3 Ester exchange (interesterification)
   3.4 Aminolysis

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสร้างไลเปสของจุลินทรีย์

ภาวะของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่สุดสำหรับกระบวนการหมักแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไปขึ้นกับลักษณะเฉพาะของการหมัก แต่โดยทั่วไปจะต้องมีส่วนประกอบดังนี้คือ น้ำ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ วิตามิน และออกซิเจน นอกจากนี้ในกระบวนการผลิตสารบางอย่างก็อาจจำเป็นต้องมีการเติมสารเริ่มต้น (precursor) สารยับยั้ง (inhibitor) สารชักนำ (inducer) บัฟเฟอร์ (buffer) และสารกำจัดฟอง (antifoam) ลงไปอีกด้วย

เมื่อพิจารณาช่วงการเจริญ (Growth phase) ที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสจากจุลินทรีย์ พบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะผลิตไลเปสได้สูงสุดในช่วงปลาย logarithmic phase ทั้งแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* (Stuer และคณะ, 1986) และยีสต์ *Candida deformans* (Zach) (Muderhwa และ Ratamahenina, 1985) แต่จุลินทรีย์บางชนิดจะผลิตไลเปสได้สูงสุดเมื่อเลย logarithmic phase ไปแล้ว (อยู่ในช่วง stationary phase) เช่น *Candida parolipolytica* (Sugiura & Isobe , 1975), *Rhizopus japonicus* (Aisaka & Terada, 1979), *Alcaligenes sp.* No.679 (Kokusho และคณะ, 1982) และ *Pseudomonas aeruginosa* EF2 (Gilbert และคณะ, 1991) โดยในการผลิต extracellular enzyme นั้น ถ้าเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในสภาพเกือบอดอาหาร (semi-starved) จะเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์มาก เนื่องจาก extracellular enzyme ส่วนมากถูกปล่อยออกมามากที่สุดในช่วง late หรือ post exponential growth phase ซึ่งสภาพขณะนั้นสับสเตรทที่สำคัญจะเริ่มขาดแคลนแล้ว (Suzuki และคณะ, 1988)

Derewenda (1994) กล่าวว่าไลเปสจากเชื้อจุลชีพโดยทั่วไปเป็นโปรตีนที่ประกอบขึ้นจากเส้นเปปไทด์ที่ม้วนตัวเป็นโครงสร้างแบบผสม α / β โดยส่วนกลางของโมเลกุลโปรตีนประกอบด้วยโครงสร้างแบบแผ่น แบบผสมจำนวน 11 แผ่น ที่ขนานกันโดยมีแผ่น β ขนาดเล็ก 3 แผ่น ตั้งฉากกับแผ่น β 3 แผ่นขนาดใหญ่ ที่ตรงกลางของโมเลกุลและแต่ละปลายของแผ่น β แผ่นใหญ่จะ

มีส่วนของเปปไทด์ที่มีโครงสร้างแบบเฮลิกซ์ ซึ่งจะอยู่ในลักษณะขนานกับแผ่น β และมีลูป (loop) สั้นที่ก่อให้เกิดลิด (lid) ที่บริเวณใกล้ๆ ปลายคาร์บอกซิลของโปรตีนและตลอดโครงสร้างของโปรตีนประกอบด้วยเฮลิกซ์จำนวน 16 อัน นอกจากนี้ยังพบว่าไลเปสมีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์กลุ่มซีรีนโปรตีเอสกับเอนไซม์กลุ่มโครีนเอสเทอเรสโดยกลุ่มเอนไซม์ทั้งสามมีบริเวณที่เรียกว่า catalytic triad ซึ่งประกอบด้วย Asp(Glu)-His- Ser จากการศึกษาส่วนที่เหมือนกันและต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ ยีนไลเปส ยีนซีรีนโปรตีเอสและยีนเอสเทอเรส ชี้ให้เห็นว่าโปรตีนทั้งสามกลุ่มอาจมีการพัฒนามาจากโปรตีนชนิดเดียวกันและลำดับของกรดอะมิโนรอบๆ กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของ catalytic triad มีความคล้ายคลึงกันมากในเอนไซม์ทั้งสามชนิด

แหล่งคาร์บอน

นอกจากช่วงการเจริญแล้ว สูตรอาหารซึ่งประกอบด้วยส่วนสำคัญคือ แหล่งคาร์บอน คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 10 เปอร์เซนต์ในการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 50-55 เปอร์เซ็นต์ในการสังเคราะห์เซลล์ และจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะมีแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสต่างกัน สารที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่างๆ เช่น กลูโคส ฟรุกโตส แป้ง กลูโคสในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยให้เซลล์มีการเจริญเติบโตที่เหมาะสม การสร้างเอนไซม์ของเชื้อก็จะดำเนินไปตามปกติ (สุพจน์, 2530) แต่เมื่อมีปริมาณของกลูโคสมากเกินไปจะทำให้เกิด Catabolite repression โดยกลูโคส (Doi, 1973) จะกดการทำงานของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ไม่ให้มีการสร้างเอนไซม์ออกมาหรือทำให้สร้างช้าลง (Bernhohr, 1964) เช่นการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* NRLL-B3411 จะลดลงทันทีเมื่อเติมกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Heineken & Conner, 1972) แต่ก็มีเชื้อบางชนิดที่ไม่ถูกยับยั้งการผลิตไลเปสเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น *Pseudomonas sp*. สามารถผลิตไลเปสได้โดยการชักนำของสารจำพวกไตรกลีเซอไรด์ และสารลดแรงตึงผิว และถูกยับยั้งการผลิตไลเปสจากสารจำพวกกรดไขมันสายยาว (Long chain fatty acid) เช่น กรดโอเลอิก (Gilbert, E.J. และ คณะ, 1991; Marcin, C. และคณะ, 1993; Chartrain, M. และคณะ, 1993) จุลินทรีย์บางชนิดต้องการแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว เช่น *Pseudomonas aeruginosa* EF2 ต้องการ Tween 80 (Gilbert และคณะ, 1991), *Candida rugosa* ต้องการกาแลกโตส (Dalmau, E และคณะ, 2000) หรือ *Bacillus subtilis* TISTR25 ต้องการแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน (วรรณวิมล ทรัพย์ดี, 2540) ขณะที่ *Chromobacterium viscosum* ต้องการแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม 2 ชนิด คือ soluble starch และ soybean meal (Yamaguchi และคณะ, 1973)

แหล่งไนโตรเจน

เซลล์จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณ 8-10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดก็แตกต่างกัน บางชนิดต้องการแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์อาจใช้ในรูปกรดอะมิโน โปรตีน หรือยูเรีย โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าในอาหารที่มีอนินทรีย์ไนโตรเจนเช่น *Chromobacterium viscosum* ต้องการยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน (Yamaguchi และคณะ, 1973) และจุลินทรีย์บางชนิดจะเจริญได้เฉพาะในอาหารที่มีกรดอะมิโนชนิดที่มันต้องการอยู่ด้วยเท่านั้น ส่วนแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมักได้แก่ เกลือแอมโมเนียม (แอมโมเนียมซัลเฟต) ซึ่งปกติจะทำให้เกิดสภาวะที่เป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อ NH_4^+ ถูกใช้ไป เพราะจะเกิด SO_4^{2-} ขึ้น ในทางตรงกันข้ามแหล่งไนโตรเจนที่เป็นก๊าซแอมโมเนียและไนเตรทเมื่อถูกเมตาโบไลซ์แล้วจะทำให้เกิดสภาวะที่เป็นด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นอนินทรีย์ เช่น *Alcaligenes sp.* ต้องการโซเดียมไนเตรต (Kokusho และคณะ, 1982), *Candida rugosa* ต้องการแอมโมเนียมซัลเฟต (Gordillo และคณะ, 1998) ซึ่งเป็นสารอนินทรีย์เป็นแหล่งไนโตรเจน

วัตถุดิบอื่นๆ ที่นิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอุตสาหกรรมการหมักได้แก่ น้ำแช่ข้าวโพด, ถั่วเหลือง, กากถั่วเหลือง, กากถั่วลิสง, casein hydrolysate, fish meal และ yeast extract

แร่ธาตุ

นอกจากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนแล้ว แร่ธาตุก็มีความสำคัญเช่นกัน โดยจะพบว่า K_2HPO_4 และ $MgSO_4.7H_2O$ เป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด ทั้งใน *Pseudomonas aeruginosa* EF2 (Gilbert และคณะ, 1991), *Bacillus sp.* Strain 398 (Kim และคณะ, 1994) *Aspergillus oryzae* (Toida และคณะ, 1995) และ *Candida rugosa* (Gordillo และคณะ, 1998) ซึ่งจากการทดลองของ Moon & Parrulekar ในปี 1991 พบว่าฟอสเฟตที่ผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์สารพันธุกรรม (DNA, RNA) และโปรตีน การย่อยสลายคาร์โบไฮเดรท, การหายใจของเซลล์รวมทั้งควบคุมระดับ ATP ในกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ อีกทั้งยังมีส่วนช่วยในการเพิ่มความเสถียรของ mRNA โดยการยับยั้งการทำงานของ RNase และช่วยให้เอนไซม์ที่สร้างขึ้นถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ได้ดีขึ้น แต่ถ้าเริ่มต้นด้วยปริมาณฟอสเฟตที่มากเกินไปจะมียับยั้งการเจริญและกดดันการสร้างเอนไซม์ ส่วนหน้าที่ของแมกนีเซียมนั้น ในปี 1979 Aisaka และ Terada พบว่าการเติมแมกนีเซียมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีส่วยช่วยในการปลดปล่อยไลเปสที่ติดอยู่กับผนังเซลล์ของ *Geotrichum candidum* ได้

นอกจากแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุแล้ว สารเคมีที่สำคัญที่ถูกกล่าวถึงเสมอว่ามีบทบาทต่อการผลิตไลเปสก็คือ ไตรกลีเซอไรด์ โดยบทบาทของไตรกลีเซอร์ไรด์ที่มีต่อการ

ผลิตไลเปสในจุลินทรีย์ต่างชนิดกันจะแตกต่างกันมาก เช่น เชื้อรา *Humicola lanuginosa* จะผลิตไลเปสได้น้อยมากถ้าปราศจากไตรกลีเซอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพราะไตรกลีเซอไรด์ปริมาณเล็กน้อยจะทำหน้าที่เป็น inducer ตัวสำคัญในการกระตุ้นให้จุลินทรีย์ผลิตไลเปสได้สูง (Omar และคณะ, 1987) และยังพบในจุลินทรีย์อีกหลายชนิด เช่น *Geotrichum candidum* (Iwai และ 1973), *Pseudomonas mephitica* (Kosugi & Kamibayashi, 1971) และ *Candida parolipolytica* (Sugiura & Isobe, 1975) ซึ่งไตรกลีเซอไรด์เหล่านี้ได้แก่ น้ำมันมะกอก (Olive oil), น้ำมันจากเมล็ดฝ้าย (Cottonseed oil) น้ำมันจากเมล็ดถั่ว (Ground-nut) หรืออาจเป็นพวกกรดไขมัน เช่น กรดโอเลอิก (Oleic acid) แต่ในทางตรงกันข้ามมีรายงานว่าไตรกลีเซอไรด์จะไปยับยั้งการผลิต alkaline lipase จาก *Pseudomonas fragi* (Watanabe, 1977) จากรายงานดังกล่าวคาดว่าจุลินทรีย์ที่ผลิตไลเปสจะแบ่งได้เป็น 2 พวก พวกแรกเป็นพวกที่ผลิตไลเปสในรูป constitutive enzyme ที่ไม่จำเป็นต้องเติมไตรกลีเซอไรด์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อก็สามารถผลิตไลเปสได้สูง อีกพวกหนึ่งจะผลิตได้ทั้ง constitutive lipase และ inducible lipase แต่ inducible lipase จะมีปริมาณมากกว่ามากจึงจำเป็นต้องมีไตรกลีเซอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเหนี่ยวนำการผลิตไลเปส อย่างไรก็ตามถ้ามีไตรกลีเซอไรด์ในปริมาณที่มากเกินไปก็จะยับยั้งการผลิตไลเปสได้เช่นกัน (Suzuki และคณะ, 1988)

อิทธิพลของภาวะแวดล้อมในการหมัก

ภาวะแวดล้อมในระหว่างการหมักที่มีผลต่อการผลิตไลเปส มีดังต่อไปนี้

1. **ค่าความเป็นกรด-ด่าง** (pH)

ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญมากต่อการเจริญและการผลิตผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ และด้วยเหตุที่ค่าความเป็นกรด-ด่างมีความสำคัญมากนี้เองจึงจำเป็นที่ในระหว่างกระบวนการหมักจะต้องมีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างโดยการเติมบัฟเฟอร์หรือด้วยระบบอัตโนมัติของเครื่องก็ตาม ซึ่งความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมของแบคทีเรียส่วนใหญ่จะอยู่ที่ 4-8, ยีสต์ 3-6 และด้วยค่าความเป็นกรด-ด่างที่ต่างกันในแต่ละชนิดของจุลินทรีย์นี้เองที่ทำให้บางครั้งมีการป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรียในการหมักยีสต์ โดยการเลี้ยงยีสต์ในภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3 เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อชนิดอื่นๆ

ในระหว่างการหมัก ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อมีแนวโน้มที่เปลี่ยนไปบ้างเนื่องมาจากหลายเหตุผล เช่น เมื่อใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจน แนวโน้มของค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลง เนื่องจากแอมโมเนียในสารละลายจะอยู่ในรูป NH_4^+ แต่แบคทีเรียจะเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของ $R\text{-}NH_3^+$ แล้ว H^+ จะถูกปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเป็นเหตุให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง ในกรณีที่ใช้ไนเตรท ไฮโดรเจนที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะไปรีดิวซ์ NO_3^{2-} ให้เป็น

$R\text{-}NH_3^+$ ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น หรืออีกสาเหตุหลักอย่างหนึ่งคือเกิดจากผลิตภัณฑ์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นนั่นเอง

นอกจากค่าความเป็นกรด-ด่างจะมีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์แล้วยังมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ที่สร้างขึ้นและมีผลต่อกระบวนการส่งสารผ่านเข้าผนังเซลล์ (Roger และ Bermard, 1972)

2.อุณหภูมิ (Temperature)

การสร้างสารผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์นั้นก็จำเป็นที่จะต้องมีอุณหภูมิที่เหมาะสมด้วยเช่นกันซึ่งก็เหมือนกับการเจริญของเชื้อที่จะต้องมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อแต่ละชนิด แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมของการสร้างสารผลิตภัณฑ์ไม่จำเป็นจะต้องเป็นอุณหภูมิเดียวกันกับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อนั้นๆ และในปี 1991 Jaroslave และคณะ ได้ทำการศึกษาใน *Bacillus megaterium* โดยอุณหภูมิจะมีอิทธิพลต่อการถอดรหัสของ mRNA ในการผลิตเอนไซม์ด้วย อีกทั้งอุณหภูมิยังมีผลต่อการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อสูงการละลายของออกซิเจนจะต่ำ

3. อัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ (Agitation and Aeration)

จุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักส่วนใหญ่ เป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ การให้ออกซิเจนแก่จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักตามปกตินิยมให้ในรูปของอากาศ โดยการให้อากาศ มีวัตถุประสงค์เพื่อให้จุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ ส่วนการกวนมีวัตถุประสงค์เพื่อให้จุลินทรีย์และสารอาหารในถังหมักกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ซึ่งปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมจะมีผลให้จุลินทรีย์เจริญและสร้างเอนไซม์ได้ ถ้าปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าต่ำเกินไปจะทำให้เชื้อใช้กลูโคสไม่สมบูรณ์ทำให้อัตราการเจริญของเชื้อลดลง (Moon & Parulekar, 1991)

4. ปริมาณเชื้อตั้งต้น (Inoculum)

ปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรมการหมัก มีความสำคัญมาก เพราะจะมีผลต่อการกระบวนการหมักทั้งหมด ระยะเวลาการหมัก และต้นทุนการผลิตด้วย โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการหมักควรมีคุณสมบัติดังนี้คือ (สมใจ ศิริโภค, 2537)

1. อยู่ในสภาพที่แข็งแรงและว่องไวเพื่อให้มีระยะ lag phase ในการหมักสั้นที่สุด
2. มีปริมาณมากพอที่จะใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นสำหรับถังหมักขนาดใหญ่ได้ตามต้องการ
3. มีรูปแบบโครงสร้าง (Morphological form) ที่เหมาะสมต่อกระบวนการผลิต

4. ปราศจากการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ
5. คงความสามารถในการสร้างผลผลิตที่ต้องการได้ดี

ปัจจัยสำคัญที่จะทำให้ได้เชื้อเริ่มต้นที่มีคุณสมบัติดังกล่าวมาแล้วนี้ ได้แก่ อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ อาหารที่เหมาะสมในการเตรียมเชื้อตั้งต้นนั้น จะขึ้นอยู่กับบทบาทของเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการหมักด้วย นอกจากจะพิจารณาความต้องการธาตุอาหารของจุลินทรีย์แล้ว ยังต้องพิจารณาปัจจัยอื่นๆ ที่ทำให้สร้างผลผลิตได้สูงด้วย แต่การสร้างผลผลิตเอนไซม์ไม่ใช่วัตถุประสงค์ของการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น ดังนั้นส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ในการเตรียมเชื้อเริ่มต้น จึงอาจแตกต่างไปจากส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ในกระบวนการผลิต อย่างไรก็ตามระยะเวลาช่วง lag phase ในกระบวนการหมักสามารถทำให้สั้นที่สุดได้โดยการเตรียมเชื้อเริ่มต้นให้มีสูตรอาหารเหมือนกับอาหารที่ใช้ในกระบวนการผลิต ดังนั้นสูตรอาหารที่ใช้ในการเตรียมเชื้อเริ่มต้นจึงควรใกล้เคียงกับสูตรอาหารที่ใช้ในกระบวนการผลิต เพื่อช่วยลดระยะเวลาที่จุลินทรีย์ต้องใช้ในการปรับตัวในอาหารที่ใช้ในกระบวนการผลิต ทำให้ lag phase สั้นและใช้ระยะเวลาในการผลิตน้อยลง

การเตรียมเชื้อตั้งต้นของแบคทีเรียเพื่อใช้ในกระบวนการหมัก มีวัตถุประสงค์ที่สำคัญอย่างหนึ่งคือ เพื่อให้ได้เชื้อเริ่มต้นที่ว่องไว ซึ่งจะทำให้ lag phase ในกระบวนการการหมักสั้นที่สุดเท่าที่จะเป็นไปได้ เพราะถ้า lag phase ใช้เวลานานจะทำให้เสียเวลาและสิ้นเปลืองอาหารในการรักษาสภาพของเชื้อก่อนที่จะมีการเจริญเพิ่มจำนวน

ระยะเวลาช่วง lag phase จะขึ้นอยู่กับปริมาณและสภาพทางสรีรวิทยาของเชื้อเริ่มต้นด้วย สำหรับสภาพทางสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นควรอยู่ในระยะ log phase ของการเจริญซึ่งเป็นระยะที่มีเมตาโบลิสมสูง

ในการทดลองนี้เชื้อจะถูกเลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำ (Minimum medium) ที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนมาก่อน เมื่อเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนที่ใช้มาเป็นฟรุกโตส เชื้อจึงมีช่วงปรับตัวมีช่วง lag phase ในขณะที่เมื่อเลี้ยงโดยใช้น้ำมันมะกอก เชื้อจะเข้าสู่ log phase ทันที (รักชนก, 2539) และเชื้อใช้ฟรุกโตสได้ช้ากว่าเนื่องจาก carrier protein ที่เมมเบรนมีความสามารถในการลำเลียงฟรุกโตสได้ช้ากว่ากลูโคสและกรดไขมัน และการทำงานของ hexokinase ต่อฟรุกโตสในวิถีไกลโคไลซิสสูงกว่า 20 เท่า (Stryer, 1988) ทำให้การเจริญของเชื้อที่เลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่มีฟรุกโตสมีช่วง lag phase ในขณะที่เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเชื้อจะเข้าสู่ระยะ log phase ทันที และการที่ฟรุกโตสสามารถกระตุ้นให้เกิดการผลิตไลเปสได้สูงนั้นอาจเนื่องมาจากเชื้อใช้ฟรุกโตสได้ช้ากว่าน้ำมันมะกอกและกลูโคส ทำให้ภายในเซลล์ที่เลี้ยงด้วยฟรุกโตสมีปริมาณ acetyl CoA และ citrate ต่ำกว่าเซลล์ที่เลี้ยงในน้ำมันมะกอกและกลูโคส จึงกระตุ้นการหลั่ง

ไลเปสออกนอกเซลล์มากขึ้น ทำให้ตรวจพบการทำงานของเอนไซม์ในอาหารที่มีฟรุกโตสสูงกว่าแหล่งคาร์บอนอื่นๆ (รักชนก, 2539)

ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการทำงานของไลเปส

1. อุณหภูมิและความเป็นกรดด่าง

ไลเปสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน จุลินทรีย์บางชนิดผลิตไลเปสที่มี optimum pH อยู่ในช่วงเป็นกลางเช่น *Aspergillus oryzae* (Toida และคณะ, 1995) และ *Humicola lanuginosa* No. 3 (Omar และคณะ, 1987) บางชนิดมี optimum pH ในช่วงเป็นกรดเช่น *Bacillus sp.* (Sugihara และคณะ, 1991) และ *Rhizopus niveus* (Kohno และคณะ, 1994) และบางชนิดมี optimum pH อยู่ในช่วงเป็นด่างเช่น *Bacillus subtilis* 168 (Lesuisse และคณะ, 1993) และ *Pseudomonas fluorescens* AK102 (Kojima และคณะ, 1994)

ในทำนองเดียวกัน จุลินทรีย์ต่างชนิดกันก็จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่างกัน บางชนิดมีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่อุณหภูมิสูงเช่น *Bacillus sp.* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 60°ซ (Sugihara และคณะ, 1991) บางชนิดมีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่อุณหภูมิปานกลางเช่น *Aspergillus oryzae* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 30°ซ (Toida และคณะ, 1995)

อุณหภูมิและความเป็นกรดด่าง นอกจากจะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์แล้ว ยังมีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ด้วย ไลเปสจาก *Humicola lanuginosa* No.3 จะคงตัวอยู่ในช่วงความเป็นกรดด่าง 5-9 ที่อุณหภูมิ 45°ซ เป็นเวลา 24 ชม. และเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 60°ซ นาน 20 ชม. เอนไซม์ก็ยังคงมีแอคติวิตีอยู่ (Omar และคณะ, 1987) ไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* AK102 คงตัวในช่วงความเป็นกรดด่าง 4-10 แต่จะคงตัวที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50°ซ นาน 1 ชม. (Kojima และคณะ, 1994) ส่วนไลเปสจาก *Aspergillus oryzae* จะคงตัวในช่วงความเป็นกรดด่าง 6-9 ที่ 25°ซ นาน 18ชม. และจะคงตัวที่อุณหภูมิประมาณ 30°ซ นาน 3ชม. จากข้อมูลจะเห็นได้ว่า ไลเปสแต่ละชนิดจะคงตัวที่อุณหภูมิไม่กว้างนัก แต่จะมีความคงทนในช่วงความเป็นกรดด่างที่กว้าง

2. แคลเซียมไอออน

จากการศึกษาไลเปสจากยีสต์ *Candida deformans* (Zach) (Muderhwa และ Ratamahenina, 1995) จากเชื้อรา *Humicola lanuginosa* No.3 (Omar และคณะ, 1987) และจากแบคทีเรียพวก *Pseudomonas aeruginosa* (Stuer และคณะ, 1986) พบว่าถ้ามีการเติมแคลเซียมไอออนลงไปในปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์จะสามารถช่วยให้ไลเปสเหล่านี้ทำงานได้ดีขึ้น ซึ่งอธิบายได้ว่ากรดไขมันซึ่งเป็นผลผลิตจากการทำงานของไลเปสจะทำให้ reaction mixture

มีความเป็นกรดมากขึ้นทำให้ไลเปสทำงานได้ลดลง แต่แคลเซียมไอออนจะทำปฏิกิริยากับกรดไขมันเกิดเป็นเกลือแคลเซียมในรูปสบู่ (insoluble calcium soap) แล้วตกตะกอนทำให้กรดไขมันลดลง ความเป็นกรดด่างของ reaction mixture ไม่เปลี่ยนแปลง ดังนั้นการทำงานของไลเปสจึงเป็นไปอย่างต่อเนื่อง

นอกจากนี้ยังพบว่าแคลเซียมไอออนยังสามารถช่วยให้ไลเปสจากจุลินทรีย์ทำงานได้มากขึ้นก็ต่อเมื่อใน reaction mixture มีการสะสมกรดโอเลอิค เพราะกรดโอเลอิคจะทำหน้าที่กระตุ้นให้แคลเซียมไอออนทำงาน แคลเซียมไอออนนี้จะทำงานได้ก็ต่อเมื่อสับสเตทเป็นไตรกลีเซอไรด์พวกที่เป็น higher fatty acid เท่านั้น ถ้าสับสเตทเป็นไตรกลีเซอไรด์พวก lower fatty acid พบว่าแคลเซียมไอออนจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แทนที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงาน สรุปว่าแคลเซียมไอออนจะช่วยให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้นในบางกรณีเท่านั้น การที่แคลเซียมไอออนจะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ได้นั้น ไม่ได้ขึ้นกับความคงตัวของเอนไซม์ ไม่ได้ขึ้นกับการขจัดกรดไขมันออกจากระบบของปฏิกิริยา รวมทั้งไม่ได้ขึ้นกับการเปลี่ยนรูปเป็นเกลือแคลเซียมด้วย แต่จะขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ emulsion state ของ reaction mixture ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้เนื่องมาจากการทำงานของเกลือแคลเซียมที่มาจากการกระตุ้นของกรดไขมัน (Tsujisaka และคณะ, 1972)

Wang และคณะ (1988) ได้สรุปถึงสมมุติฐานความเป็นไปได้ของกลไกการทำงานของแคลเซียมไอออนที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของไลเปสได้ว่ามี 3 ประการคือ

1. แคลเซียมไอออนช่วยเปลี่ยนรูปร่าง (conformation) ของเอนไซม์ให้ทำงานได้ดีขึ้น
2. แคลเซียมไอออนเพิ่มการดูดซึม (adsorption) ของไลเปสที่ interface oil/water
3. แคลเซียมไอออนช่วยขจัดไขมันออกจาก oil/water interface ทำให้ไลเปสทำงานได้ดีขึ้น

อย่างไรก็ตามเกลือแคลเซียมไม่ได้ช่วยการทำงานของไลเปสเสมอไป โดยแคลเซียมไอออนจะยับยั้งการทำงานของไลเปสจากยีสต์ *Candida rugosa* (Kohr และคณะ, 1986) แต่แคลเซียมไอออนกลับไม่มีผลต่อการทำงานของไลเปสจากเชื้อรา *Rhizopus japonicus* NR400 (Suzuki และคณะ, 1986)

3. Physical state **ของสับสเตรท** (oil/water interface)

ไลเปสจะทำงานย่อยสับสเตรทก็ต่อเมื่ออยู่ในรูปอีมัลชัน (oil/water interface) และไลเปสถูกดูดซึมระหว่าง oil/water interface เนื่องจากสภาพสับสเตรทต้องอยู่ในรูปไม่ละลายน้ำ อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาอาจขึ้นอยู่กับจำนวนโมเลกุลที่ถูกดูดซับไว้ใน interface และพื้นที่ผิวระหว่างน้ำกับสับสเตรท

4. **ความถ่วงจำเพาะของไลเปสต่อสับสเตรท**

Macrae (1983) แบ่งไลเปสจากจุลินทรีย์ตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

1. ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ไลเปสพวกนี้จะย่อยไตรกลีเซอไรด์ได้สมบูรณ์ ดังนั้นจะได้กรดไขมันและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ แต่อาจจะพบไดกลีเซอไรด์และโมโนกลีเซอไรด์เป็นตัวกลาง (intermediate) ในปฏิกิริยาได้ ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ ไลเปสจาก *Candida cylindracea, Corynebacterium acnes* และ *Staphylococcus aureus*
2. ไลเปสที่จำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งไตรกลีไรด์ที่ถูกเอนไซม์กลุ่มนี้ย่อยจะได้ผลิตภัณฑ์คือ กรดไขมัน, 1,2 (2,3)-diglyceride และ 2-monoglyceride แต่ 1,2(2,3)-diglyceride และ 2-monoglyceride นั้นเป็นพวกที่ไม่คงตัว (unstable) ถ้ามีการบ่มไว้เป็นเวลานานพอจะมีการเกิด acyl migration ทำให้ได้ 1,3-diglyceride และ 2-monoglyceride นั้นเป็นพวกที่ไม่คงตัว (unstable) ถ้ามีการบ่มไว้เป็นเวลานานพอจะมีการเกิด acyl migration ทำให้ได้ 1,3-diglyceride และ 1(3)-monoglyceride ซึ่งจะถูกย่อยสลายได้อย่างสมบูรณ์ได้กรดไขมันกับกลีเซอรอล ไลเปสที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ ไลเปสจากจุลินทรีย์พวก *Aspergillus niger, Mucor javanicus* และในพวก rhizopus อีกหลาย species
3. ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งไลเปสจากจุลินทรีย์ทั่วไปไม่มีคุณสมบัติข้อนี้ ยกเว้นไลเปสจากจุลินทรีย์บางพวก เช่น ไลเปสจาก *Geotrichum candidum* ที่จะย่อยไตรกลีเซอไรด์ที่มี cis double bond ตรงตำแหน่งที่ 9 ได้ดี แต่จะย่อยสลายกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) กับกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ที่ไม่มี double bond ตรงตำแหน่งที่ 9 ได้ไม่ดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อย่างไรก็ตาม Yamane (1987) จะแบ่งไลเปสออกเป็น 2 กลุ่มเท่านั้น คือ พวกที่มีคุณสมบัติจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 ของไตรกลีเซอไรด์ และพวกที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนไตรกลีเซอไรด์ ไลเปสทั้ง 2 กลุ่มนี้จะไม่ถูกแบ่งออกจากกันโดยเด็ดขาด

Okumura และคณะ (1981) พบว่าไลเปสพวกที่มีความจำเพาะจะมีการ esterify (reverse hydrolysis) ทำให้มีการไฮโดรไลซ์ได้ดีกว่า และเชื่อว่าเพราะเหตุนี้จึงทำให้ไลเปสพวกที่ไม่มีความจำเพาะสามารถย่อยสลายสับสเตรทได้รวดเร็วกว่าพวกที่มีความจำเพาะ

5. Lipase activator

Uyeda และคณะ (1983) ได้แยกเชื้อ *Strptomyces* No. NB.BR-1381 ซึ่งสามารถผลิตโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการเป็น activator ของไลเปสได้ โปรตีนชนิดนี้มีชื่อว่า LAV ซึ่งมีคุณสมบัติคงตัวที่ pH 3.7 ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 20 ชม. และจะคงตัวที่ pH ดังกล่าวที่ 4°ซ เป็นเวลา 5 วัน LAV ที่บริสุทธิ์จะทนความร้อนได้สูง แต่จะไม่มีผลต่อการทนความร้อนของไลเปสจาก *Phycomyces niten* LAV จะสามารถกระตุ้นไลเปสจากจุลินทรีย์ได้หลายชนิดเช่น ไลเปสจาก *Phycomyces niten, Chromobacterium viscosum* และ *Geotrichum candidum* ส่วนกลไกการทำงานของ LAV นั้นเชื่อว่าเป็นเพราะกรดโอเลอิคซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการทำงานของไลเปสนั้นจะไปยับยั้งการทำงานของไลเปสได้ เนื่องจากกรดโอเลอิคจะทำให้ pH ลดลง แต่ถ้ามี LAV ในระบบ LAV จะดูดซับกรดโอเลอิคไว้ ทำให้ไม่เกิด product inhibition ขึ้นดังนั้น LAV จึงป้องกันการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากกรดไขมันได้ ทำให้เอนไซม์มีการทำงานดีขึ้น

6. Lipase inhibitors

6.1 สารลดแรงตึงผิว (Surfactants)

อิทธิพลของสารลดแรงตึงผิวต่อการทำงานของไลเปสแอคติวิตีมีผลให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนและการทำให้เกิดการคลายตัวของโปรตีน ซึ่งชนิดของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิดจะส่งผลต่อไลเปสต่างกัน เช่น สารลดแรงตึงผิวชนิดที่มีประจุบวก (Anionic surfactants) จำพวก Sodium dodecyl sulphate (SDS) และ Linear alkyl benzene sulphonate (LAS) จะมีผลทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพ (denaturing) (Hayakawa, K., Ohara, K. และ Satake, I., 1980) ถ้าเป็นสารลดแรงตึงผิวในกลุ่มที่ไม่มีประจุ (Non-ionic surfactant) เช่น alcohol ethoxylate พบว่าถ้ามีสารเหล่านี้ปนอยู่ในปริมาณน้อยๆ จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายของ *Mucor* lipase ได้บ้าง แต่ถ้าพบในปริมาณมากเกินไปจะมีผลไปยับยั้งแอคติวิตีของไลเปสได้ (Sugiura, M. และ Ogiso,T., 1969) ส่วนในกลุ่มของสารลดแรงตึงผิวที่มีประจุบวก (Cationic surfactants) เช่น quaternary ammonium salts พบว่ามีส่วนช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายน้ำมัน

มะกอกของ *Mucor* lipase แต่ต้องขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของน้ำมันต่อสารลดแรงตึงผิวด้วย ถ้ามีส่วนผสมของสารลดแรงตึงผิวที่มากเกินไปจะมีผลไปยับยั้งแอคติวิตีของไลเปสได้

6.2 Bile salts

Bile salts หรือ Choleic acid ซึ่งเป็นอนุพันธุ์ของ cholesterol อย่างหนึ่ง มีอิทธิพลต่อแอคติวิตีของไลเปสทั้งในการกระตุ้นและยับยั้งแอคติวิตีของไลเปส ในส่วนของการกระตุ้นนั้นพบว่า bile salts จะทำหน้าที่ป้องกันการจับกันของ SDS กับไลเปสได้ ซึ่งทำให้โปรตีนไม่เกิดการเสียสภาพแต่ถ้ามี bile salts ในปริมาณมากๆ bile salts อาจไปจับที่บริเวณผิวหน้าของไลเปส มีผลทำให้ลดประสิทธิภาพการทำปฏิกิริยากับสับสเตรทได้ (Momsen, W.E. และ Brockman, H.L., 1976) หรือในอีกกรณีหนึ่ง bile salts อาจไปสะสมรวมกันที่ผิวหน้าของสับสเตรท ซึ่งเป็นผลทำให้ไลเปสไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสับสเตรทได้ (Borgstrom, B. และ Erlanson, C., 1973)

6.3 Proteins

ได้มีรายงานหลายเรื่องที่มีกล่าวไว้เกี่ยวกับโปรตีนที่ยับยั้งการทำงานของไลเปสจากหลายแหล่ง เช่น *Rhizopus microsporus* (Bezborobov, A.M., Davranov, K.D. และ Akhmedova, 1985), Mycobacteria (Kiyotani, K และคณะ, 1983), Sunflower seed (Chapman, G.W., 1987), Oil seed (Wang, S. และ Huang, A.H.C., 1984) และ Melanoma cell live (Mori, M., Yamaguchi, K และ Abe, K., 1989) โดยที่ปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับเอนไซม์นี้เป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ และยังพบอีกว่าโปรตีนสามารถควบคุมการสร้าง intracellular lipase ได้อีกด้วย ซึ่งปฏิกิริยานี้ก็เกิดกับโปรตีเอสด้วยเช่นกัน (Laskowski, M. และ Kato, I., 1980) แต่ยังไม่มีรายงานแน่ชัดเกี่ยวกับการยับยั้งการทำงานของไลเปส แต่มีการตั้งสมมุติฐานเกี่ยวกับกลไกไว้ว่า โปรตีนหรือโพลีเปปไทด์จะถูกดูดซับไว้ที่ผิวหน้าของเอนไซม์แล้วชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการทำงานของเอนไซม์ อีกสมมุติฐานคือ โปรตีนไปทำปฏิกิริยาโดยตรงกับตัวเอนไซม์ทำหน้าที่เป็นตัวแก่งแย่งของสับสเตรทอย่างหนึ่ง (Competitive Substrate)

7. ปัจจัยอื่น ๆที่มีผลต่อการทำงานของไลเปส

ไอออนของโลหะบางชนิดที่จับอยู่กับเอนไซม์ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงแอคติวิตีของเอนไซม์ไม่ว่าจะเป็นการเพิ่มความเสถียรหรือลดความเสถียรของโครงสร้างโปรตีนก็ตาม ซึ่งไอออนของโลหะบางชนิดอาจทำหน้าที่เป็นตัวขจัดกรดไขมันอิสระออกจากผิวหน้าของเอนไซม์, ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา หรือทำหน้าที่เป็นตัวลดการเกิดยับยั้งจากกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา โดยทั่วไปแล้วไอออนของโลหะหนักพวก Cu^{2+}, Ni^{2+}, Pb^{2+}, Sn^{2+} และ Co^{2+} จะไปยับยั้งการทำงานของไลเปสไม่ว่าจะมาจากแหล่งเชื้อ *Chromobacterium sp.* (Yamaguchi และคณะ, 1973) หรือ *Humicola lanuginosa* No.3 (Omar และคณะ, 1987) ขณะที่ไลเปสจากบางแหล่งอาจจะทนการ

ยับยั้งการทำงานจากโลหะบางชนิดได้ แต่ก็ยังถูกยับยั้งจากไอออนของโลหะอีกหลายชนิดเช่น ไลเปสจาก *Candida deformans* (Zach) ทนต่อ Co^{2+} แต่ถูกยับยั้งโดย Cu^{2+}และ Zn^{2+} (Muderhwa และ Ratamahenina, 1985) หรือไลเปสจาก *Pseudomonas fragi* 22.39B ถูกยับยั้งจาก Sn^{2+}, Pb^{2+}, Cu^{2+} และ Hg^{2+} น้อย แต่ถูกยับยั้งมากถ้าเป็น Zn^{2+}, Fe^{2+} และ Fe^{3+} (Nishio และคณะ, 1987) ส่วน ไลเปสจาก *Rhizopus japonicus* NR400 จะทนโลหะหนักได้ทั้ง Co^{2+}, Cu^{2+} , Ni^{2+} และ Sn^{2+} (Suzuki และคณะ, 1986) และยังมีการค้นพบอีกว่า Hg^{2+} สามารถยับยั้ง Adipose tissue lipase จากหนู เพราะจากรายงานที่กล่าวไว้ว่า Hg^{2+} จะมีความจะเพาะต่อการจับกับกรดอะมิโน cysteine มีผลทำให้แอคติวิตีของไลเปสลดลง และจากผลของ Hg^{2+} นี้แสดงให้เห็นว่า Thiol group ของกรดอะมิโน cysteine มีความสำคัญต่อแอคติวิตีของไลเปส ซึ่งอาจแก้ปัญหานี้ได้โดยการเติมสาร Dithioerythritol ลงไป (Fredrikson, G. และคณะ, 1981), Platinum chloride มีผลต่อการยับยั้งแอคติวิตีของ *Geotricum candidum* (Hata, Y. และคณะ, 1979) โดยยังไม่มีรายงานใดเลยที่พบว่าโลหะหนักจะช่วยเพิ่มการทำงานของไลเปส

ในทางตรงกันข้ามกับไอออนของโลหะหนัก ไอออนบางชนิดจะสามารถช่วยเพิ่มการทำงานของไลเปสบางชนิดได้ เช่น Mg^{2+}, Mn^{2+}, Na^{+} และ Li^{+} ช่วยเพิ่มการทำงานของไลเปสจาก *Chromobacterium* ได้ (Yamaguchi และคณะ, 1973) ทำนองเดียวกัน Li^{+}, K^{+} และ Ca^{2+}ช่วยเพิ่มการทำงานของไลเปสจาก *H. lanuginosa* (Omar และคณะ, 1987) อย่างไรก็ตาม ไอออนของโลหะไม่ได้เพิ่มการทำงานของไลเปสเสมอไปโดยพบว่า Ca^{2+} และ Mg^{2+} ยับยั้งการทำงานของไลเปสจาก *C. deformans* (Zach) (Muderhwa และ Ratamahenina, 1985)

ประโยชน์และความสำคัญของไลเปสในด้านอุตสาหกรรม

ในการวิจัยเกี่ยวกับไลเปสนั้น โดยส่วนใหญ่แล้วจะมุ่งเน้นไปในแง่ของการประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมต่างๆ แต่ถึงกระนั้นก็ตามสัดส่วนของการซื้อขายเอนไซม์ชนิดนี้ก็ยังมีการซื้อขายกันอยู่ในระดับประมาณ 20 ล้านเหรียญสหรัฐ คิดเป็น 4 เปอร์เซ็นต์ ของการซื้อขายเอนไซม์ต่างๆ ทั่วโลก (รวมทั้งหมด 600 ล้านเหรียญสหรัฐ) (Arbige, M.V. และ Pitcher,W.H., 1989) ถึงแม้จะมีการค้นคว้าและปรับปรุงคุณสมบัติของไลเปสให้ดีและเหมาะสมกับงานในปัจจุบันมากขึ้น แต่ก็ยังไม่สามารถเทียบได้กับไฮโดรไลติกเอนไซม์ต่างๆ (โปรตีเอสและคาร์โบไฮเดรส) ที่มีการขยายตลาดออกไปมากกว่าตลาดของไลเปสถึง 10 เท่า ซึ่งเหตุผลที่เป็นเช่นนี้ก็เพราะว่าการศึกษาและการนำไลเปสมาใช้อย่างจริงจังนั้นเพิ่งจะเริ่มมีมาไม่นานมานี้เอง และอีกเหตุผลหนึ่งคือการประยุกต์ใช้ไลเปสในระดับอุตสาหกรรมยังอยู่ในมุมแคบคือมีจุดประสงค์ในการใช้ไม่หลากหลายเมื่อเทียบกับเอนไซม์ประเภทโปรตีเอสและคาร์โบไฮเดรส แต่อุปสรรคสำคัญที่แท้จริงที่เกิดขึ้นในทางปฏิบัติในการผลิตไลเปสคือราคาต้นทุนในการผลิตนั่นเอง (Falch, E.A., 1991) อย่างไรก็ตามด้วยความก้าว

หน้าทางด้านปรับปรุงพันธุกรรมจึงทำให้ได้เอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมกับงานมากขึ้นและยังสามารถลดต้นทุนการผลิตลงได้อีกด้วย และจริงๆ แล้วการปรับปรุงพันธุกรรมนั้นมักเน้นในด้านการเพิ่มความสามารถในการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ให้มากขึ้นกว่าเดิม เราสามารถจำแนกประโยชน์ของไลเปสในการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมได้ดังนี้

- ไลเปสที่ใช้กับอุตสาหกรรมอาหาร: ในปัจจุบันได้มีการนำไลเปสมาใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่งผลิตภัณฑ์ที่ทำจากนม รวมทั้งการเพิ่มกลิ่นรสให้กับชีสเพื่อให้เกิดกลิ่นเฉพาะตัว (Bech, A.M., 1992) เกี่ยวกับอุตสาหกรรมการผลิตชีสนั้นเริ่มมีมาตั้ง แต่สมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 โดยเริ่มแรกไลเปสที่นำมาใช้นั้นสกัดได้มาจากตับอ่อนของสัตว์ประเภทหมูและวัวเป็นส่วนใหญ่ หลังจากนั้นมีการศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์มากขึ้นจึงมีการหันมาใช้ไลเปสที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์มากขึ้นโดยจุลินทรีย์ที่นิยมใช้ได้แก่สายพันธุ์ *Mucor michei*, *Aspergillus niger* และ *Aspergillus oryzae* ไลเปสจากจุลินทรีย์เหล่านี้ไม่เพียงแต่ไปช่วยเพิ่มกลิ่นรสเท่านั้น แต่ยังไปเร่งปฏิกิริยาในการบ่ม blue cheese อีกด้วย ส่วนทางด้านอุตสาหกรรมนมไลเปสที่ถูกเติมลงไปในนมวัวดิบจะช่วยในการแต่งกลิ่นรสให้เหมือนกับนมแพะหรือนมอูฐได้

ตารางที่ 1 : แสดงตัวอย่างของไลเปสที่ถูกเติมลงในผลิตภัณฑ์ประเภทเนยแข็ง

Cheese type	Lipase source
Romano Domiati Feta	Kid/lamb pre-gastric *Mucor miehei*
Monzarelle Parmesan Provolone	Calf/kid pre-gastric
Fontina Ras Romi	*Mucor miehei*
Cheddar Manchego Blue	*Aspergillus oryzae / niger*

(ที่มา: E. Vulfson, 1994)

- ไลเปสที่ใช้กับอุตสาหกรรมผงซักฟอก: อุตสาหกรรมสารซักล้างยังเป็นตลาดซื้อขายเอนไซม์ที่ใหญ่ที่สุดสำหรับอุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์ (Arbige, M.V., 1989) (Falch, E.A., 1991) แต่ในปัจจุบันการนำไลเปสมาใช้กับอุตสาหกรรมประเภทนี้ยังมีอยู่น้อยมาก เนื่องจากยังไม่สามารถหาเอนไซม์ที่เหมาะสมและทนต่อสภาพการทำงานในภาวะที่เป็นด่างได้อย่างมีประสิทธิภาพ ถึงอย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้มีการคัดเลือกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ นำมาทำการตัดแต่งพันธุกรรมเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของเอนไซม์ให้มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น หรือเพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์ให้สูงขึ้น เช่น Lipolase ของ Novo Nordisk เป็นการนำเอาคุณสมบัติของการผลิตไลเปสจาก *Humicola* ให้มาแสดงออกใน *Aspergillus oryzae* ซึ่งเป็นที่คาดหมายกันว่าตลาดทางด้านนี้ยังสามารถเจริญไปได้อีกมาก ยิ่งโดยเฉพาะเมื่อมีเทคนิคพันธุวิศวกรรมเข้ามาช่วยในการปรับแต่งคุณสมบัติของเอนไซม์ให้ดียิ่งขึ้น

- การใช้ไลเปสในการสังเคราะห์สารประกอบสำคัญในผลิตภัณฑ์ที่ใช้กับร่างกาย: ไลเปสถูกนำมาใช้ในการผลิต Isopropyl myristate , Isopropyl palmitate และ 2-ethyhexyl palmitate ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างผลิตภัณฑ์ที่ใช้กับร่างกาย เช่น ครีมทาผิว หรือครีมกันแดด

- การใช้ไลเปสในการกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้าย: เส้นใยฝ้ายเป็นเส้นใยประเภทเซลล์เดี่ยว โครงสร้างแต่ละชั้นของเซลล์เรียงจากชั้นนอกไปชั้นในมีดังนี้ cuticle, primary wall, secondary wall และ lumen ซึ่งแต่ชั้นจะมีโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกันไป ชั้น cuticle ซึ่งเป็นชั้นนอกสุดของเส้นใยประกอบไปด้วยสารประกอบประเภทโปรตีน ขี้ผึ้ง และ เพคติน ในอัตราส่วนต่างๆ กันดังแสดงในตารางที่ 2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงชนิดและปริมาณของสารประกอบต่างๆ ที่มีในเส้นใยของฝ้าย

Constituent	*Composition of Fiber*			*Composition of the*
	Typical %	*Low %*	*High %*	*Cuticle %*
Cellulose	94.0	88.0	96.0	
Protein	1.3	1.1	1.9	30.4
Pectin substances	0.9	0.7	1.2	19.6
Wax	0.6	0.4	1.0	17.4
Mineral matter	1.2	0.7	1.6	6.5
Other organic acid	0.8	0.5	1.0	9.8
Total sugar	0.3			7.4
Cutin				8.7

(ที่มา: Li, Y. และ Hardin, R., 1997)

การกำจัดสิ่งสกปรก (Scouring) เป็นกระบวนการทำความสะอาดเส้นใยด้วยการใช้ด่าง เช่น โซดาไฟ โซดาแอช เป็นต้น เมื่อผ่านกระบวนการนี้แล้วเส้นใยจะสะอาด มีความสามารถในการดูดซึมน้ำได้ดี เปียกได้ง่าย ขั้นตอนการกำจัดสิ่งสกปรกเป็นขั้นตอนที่จำเป็นสำหรับเส้นใยทุกประเภท เนื่องจากเส้นใยทุกชนิดมีสิ่งสกปรกเจือปนติดมาเสมอไม่ว่าจะเป็นสิ่งสกปรกที่ติดมาตามธรรมชาติ หรือสิ่งที่ติดมาจากขั้นตอนการผลิต สิ่งสกปรกต่างๆจำเป็นต้องกำจัดออกไปเพื่อให้เส้นใยสะอาดมีความสามารถในการดูดซึมน้ำได้ดี ดูดติดสารเคมีต่างๆได้สม่ำเสมอ เป็นการเตรียมเส้นใยให้มีคุณสมบัติเหมาะสมกับกระบวนการผลิตขั้นต่อไป เช่น การย้อม การพิมพ์ เป็นต้น กรรมวิธีการกำจัดสิ่งสกปรกในเส้นใยแต่ละชนิดไม่เหมือนกัน โดยปกติแล้วเส้นใยธรรมชาติมีสิ่งสกปรกเจือปนมากกว่าเส้นใยประดิษฐ์เพราะฉะนั้นจึงมีวิธีการกำจัดสิ่งสกปรกที่รุนแรงกว่า โดยทั่วไปการกำจัดสิ่งสกปรกบนเส้นใยฝ้ายทำได้โดยการต้มด้วยสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้อยู่ในราว 2-5 % ของน้ำหนักผ้า อุณหภูมิอย่างต่ำ 85^{o}ซ เวลา 45-60 นาที สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ร้อนทำให้ฝ้ายพองตัว สิ่งสกปรกในเส้นใยบางส่วนถูกเปลี่ยนเป็นสารที่ละลายน้ำได้บางส่วน ถูกกำจัดออกไปเป็นสารแขวนลอย การต้มผ้าฝ้ายด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ร้อน สารคาร์โบไฮเดรทได้แก่สารไซซิ่งประเภทแป้งที่เหลือมาจากขั้นการลอกแป้งถูกไฮโดรไลซ์เป็นสารที่ละลายน้ำง่าย สารเพคตินถูกย่อยเป็นเมธิลแอลกอฮอล์และกรดกาแลคตูโรนิค สารโปรตีนถูกย่อยเป็นกรดอะมิโน พวกกรดไขมันถูกทำปฏิกิริยากลายเป็นสบู่ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ นอกจาก

ทำหน้าที่ย่อยสลายสิ่งสกปรกต่างๆ ที่อยู่บนเส้นใยแล้วบางส่วนต้องไปทำปฏิกิริยากับกรดที่เกิดจากการย่อยสลายของสิ่งสกปรก บางส่วนยังถูกเส้นใยฝ้ายดูดซับไว้ด้วย ดังนั้นการกำจัดสิ่งสกปรกบนฝ้ายให้สมบูรณ์จึงต้องใช้ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มากเกินพอ พร้อมทั้งเติมสารอื่นๆ ที่จำเป็นลงไปด้วย และด้วยเหตุนี้เองทำให้น้ำเสียที่ถูกปล่อยออกจากขั้นตอนนี้มีความเป็นด่างและอุณหภูมิสูงจำเป็นต้องมีการปรับสภาวะของน้ำเสียก่อนที่จะถูกปล่อยออกสู่แหล่งชุมชน การใช้เอนไซม์จึงนับเป็นทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจในการนำมาใช้ในการกำจัดสิ่งสกปรกบนเส้นใยของฝ้ายจึงได้มีการหันมาใช้เอนไซม์ในการกำจัดสิ่งสกปรกแทน โดยเอนไซม์ที่ใช้ได้แก่ ไลเปส โปรตีเอส (Hartzell, M. และ Hsieh, L. , 1998) เพคติเนส (Buchert, J. และคณะ, 2000) และ เซลลูเลส (Li, Y. และ Hardin, R., 1997)

พันธุวิศวกรรมของไลเปส

ในปัจจุบันตลาดสำคัญที่ไลเปสเข้าไปมีส่วนเกี่ยวข้องด้วยมากที่สุดคือ อุตสาหกรรมผงซักฟอก โดยเป็นส่วนผสมในสารซักล้างส่วนใหญ่ ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายไขมันและน้ำมันธรรมชาติ ซึ่งยากต่อการกำจัดในภาวะที่ไม่ใช้อุณหภูมิสูง (Gormsen, E. และ Malmos, H., 1991) อย่างไรก็ตามส่วนประกอบสำคัญอีกอย่างหนึ่งของสารซักล้างคือโปรตีเอส และมีความเป็นไปได้ว่าโปรตีเอสอาจจะย่อยไลเปสได้ เป็นเหตุให้ประสิทธิภาพการทำงานของไลเปสลดลง ในปี 1985 Estell, A. และคณะได้บ่งชี้ถึงตำแหน่งภายในของไลเปสจากแบคทีเรีย *Pseudomonas* ที่ถูกย่อยโดยโปรตีเอสที่ผสมอยู่ในสารซักล้าง และได้ทำการปรับแต่งพันธุกรรมของเอนไซม์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทนทานต่อการย่อยของโปรตีเอส การปรับแต่งพันธุกรรมนั้นรวมถึงการแทนที่และการเติมกรดอะมิโนลงไปในตำแหน่งที่โปรตีเอสเข้าทำปฏิกิริยาหรือตำแหน่งใกล้เคียงซึ่งเป็นการเพิ่มความทนทานต่อการย่อยของโปรตีเอสได้ ซึ่งมีหลายวิธีที่สามารถแสดงให้เห็นว่าเราสามารถเพิ่มความสามารถในการทนทานต่อการย่อยของโปรตีเอสได้เช่น (1) ในตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีการถูกย่อยสลาย (Cleavage) โดยโปรตีเอสอาจแทนที่ด้วยกรดอะมิโนชนิดโพรลีน (2) อาจมีการแทนที่ด้วยกรดอะมิโนที่มีประจุหรือกรดอะมิโนที่มีความเป็นขั้วสูงกว่าในตำแหน่งที่ห่างจากตำแหน่งที่ถูกแยกห่างออกไปประมาณ 2 หรือ 4 ตำแหน่ง (3) อาจมีการเปลี่ยนแปลงศักย์ไฟฟ้าของกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ถูกแยกให้มีค่าเพิ่มขึ้นโดยการเติมหรือแทนที่ด้วยกรดอะมิโนที่มีประจุเป็นบวกมากกว่า หรือ (4) ทำการตัดขาด (deletion) กรดอะมิโนออกไป 1, 2 หรือ 3 ตำแหน่งตรงส่วนที่มีเกิดการย่อยสลาย

คุณสมบัติของเอนไซม์ที่เป็นที่ต้องการในอุตสาหกรรมผงซักฟอกก็คือ ความสามารถในการทนต่อปฏิกิริยา Oxidative Degradation ที่เกิดจากสารฟอกขาวที่ผสมอยู่ในสูตรของผงซักฟอก ซึ่งกรดอะมิโน Methionine ที่อยู่ในสายโพลีเปปไทด์จะเป็นจุดที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ใน

ขณะเดียวกันถ้าเราสามารถขจัด methionine ออกไปได้ อาจทำให้เอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้น หรือทำการแทนที่ methionine ด้วยกรดอะมิโนชนิดอื่นที่สามารถทนได้ต่อปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้ ซึ่งในเรื่องคล้ายๆกันนี้ได้มีการนำมาใช้กับโปรตีเอสที่ผสมในผงซักฟอกแล้ว (Estell และ Wells, 1988) และกำลังพัฒนาเพื่อนำมาใช้กับไลเปสด้วย (Batenburg, A.M. และคณะ, 1991) ส่วนอีกคุณสมบัติหนึ่งของไลเปสที่จำเป็นต่ออุตสาหกรรมผงซักฟอกคือความสามารถในการทำงานได้ดีที่ภาวะด่างหรือมีค่า pI อยู่ในช่วงที่เป็นด่าง ซึ่งการตัดแต่งพันธุกรรมสามารถเพิ่มค่า pI ของเอนไซม์โดยการเพิ่มประจุสุทธิของเอนไซม์ให้เป็นบวก เช่น ทำการตัด (Deletion) กรดอะมิโนบางตัวที่มีประจุลบออกไปหรือแทนที่ด้วยกรดะมิโนที่มีประจุเป็นกลาง หรือแทนที่กรดอะมิโนที่มีประจุเป็นลบหรือเป็นกลางให้เป็นกรดอะมิโนที่มีประจุบวก หรืออาจเพิ่มกรดอะมิโนบางตัวที่มีประจุบวกลงไป เป็นต้น

ที่สถาบัน Genencor International ได้ทำการศึกษา *Pseudomonas mendocina* ซึ่งผลิตไลเปสที่มีความสามารถในการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ได้เป็นอย่างดี (Sebastian, J. และ Kolatukudy, P.E., 1988) โดยทำการโคลนยีนที่ควบคุมการผลิตไลเปสของ *P.mendocina* ให้มาแสดงออกใน *E.coli* รวมทั้งยังทราบถึงลำดับกรดอะมิโนของไลเปสจากลำดับเบสบนยีนได้อีกด้วย (Gray, G., Poulose, A.J. และ Power, S., 1988)

ก่อนที่เราจะทราบถึงโครงสร้างของเอนไซม์ ในสมัยก่อนได้มีวิธีทดสอบที่บ่งชี้ถึงบริเวณเร่งการทำงานของไลเปสโดยวิธี Chemical Modification และ Site-specific Mutagenesis (Poulose, J. และคณะ, 1990) Diethyl p-nitrophenyl phosphate เป็นสารที่สามารถยับยั้งแอคติวิตีของไลเปสได้ โดยเข้าไปเปลี่ยนกรดอะมิโนเซอรีนในตำแหน่งที่ 126 ให้เป็นกรดอะมิโนชนิดอะลานีน ทำให้เกิดเป็น inactive protein ได้ ซึ่งผลจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าไลเปสมีเซอรีนอยู่ที่บริเวณเร่งคล้ายๆ กับเอนไซม์ประเภทไฮโดรเลสอื่นๆ และโดยวิธี Site-specific Mutagenesis ทำให้ทราบเพิ่มเติมอีกว่ามี Histidine และ Aspartic acid อยู่ที่บริเวณเร่งอีกด้วย เมื่อทำการแทนที่ His ทุกตัวที่อยู่ในสายโพลีเปปไทด์ด้วย Glu แล้วตรวจหาแอคติวิตี พบว่าเมื่อแทนที่ His ที่ตำแหน่ง 206 ด้วย Glu แล้วจะทำให้เอนไซม์สูญเสียแอคติวิตีไป แสดงให้เห็นว่า His 206 เป็นส่วนหนึ่งที่อยู่ที่บริเวณเร่ง และด้วยกระบวนการเดียวกันนี้เองทำให้เราทราบอีกว่า Aspartic acid ก็เป็นกรดอะมิโนที่อยู่ในบริเวณเร่งเดียวกัน นอกจากนี้ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ของ *P. aeruginosa* ได้ถูกแยกออกมาเพื่อไปรวมกับยีนของ *E.coli* ซึ่งมีผลให้ *E.coli* สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณเพิ่มขึ้นมากกว่า 42% ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ *E.coli* ผลิตออกมา (Oshima และคณะ, 1993)

เอนไซม์ไลเปสมีความสำคัญในแง่ใช้เป็นองค์ประกอบของผลิตภัณฑ์และเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในขบวนการผลิตผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมหลายประเภทดังกล่าวข้างต้น การศึกษาหา

แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผลิตไลเปสชนิดที่ต้องการในปริมาณสูง หรือเพื่อค้นหาเอนไซม์ชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติที่ดีขึ้น หรือเหมาะสมมากขึ้นในการใช้งานแต่ละด้านจึงเป็นงานวิจัยที่นอกจากจะมีความสำคัญต่อความรู้ความเข้าใจในการศึกษาวิทยาศาสตร์พื้นฐานแล้ว ยังอาจเกิดศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ได้

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาสภาวะของการผลิตไลเปสในเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร และทำเอนไซม์ให้อยู่ในรูปผงเพื่อใช้กำจัดสิ่งสกปรกบนเส้นใยของผ้าฝ้าย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2
ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์

1.ครุภัณฑ์

ครุภัณฑ์	รุ่นที่ผลิต	บริษัท/ประเทศ
1.ถังหมัก (Fermenter) ขนาด 5 ลิตร	BIO FLO II C	New Brunswick Scientific Co.,Inc, Edison, N.J., U.S.A.
2.เครื่องวัดและบันทึกการดูดกลืนแสง (UV Spectrophotometer)	DU 650	Backman, U.S.A.
3.เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	Spectronic 20 D	Baush&Lomb, U.S.A.
4.เครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Refrigerated Microcentrifuge)	Sigma 2MK	Sigma Laboratory, Western Germany
5.เครื่องปั่นความเร็วสูงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Refrigerated Microcentrifuge)	J-21C	Beckman, U.S.A
6.เครื่องอบนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)	HA-30	Hirayama Manufacturing Coperation, Japan
7.ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)	Heraeus TypeB 5050E	Heraeus, Germany
8.เครื่องเหวี่ยงตะกอน (Centrifuge)	H-103 N Series	Kokusan, Japan
9.เครื่องเขย่าให้อากาศควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำ (Gyrotary Water Bath Shaker)	G76D	New Brunswick Scientific Co.,Inc, Edison, N.J., U.S.A.
10.เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำ (Controlled Environment Incubator Shaker Psychotherm)	G760	New Brunswick Scientific Co.,Inc, Edison, N.J., U.S.A.

11.เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter)	PHM 83 Autocal	Radiometer, Copenhagen, Denmark
12.เครื่องชั่งสาร	AE-200S	Mettler Instrument AG., Switzerland
13.เครื่องหาปริมาณไนโตรเจน (Kjeldathem)		Gerhardt , Germany
14.เครื่องระเหยไอน้ำอุณหภูมิต่ำ (Lyophilizer)	Lyph-Lock 1L	LABCONCO, U.S.A.

2.เคมีภัณฑ์

เคมีภัณฑ์	**บริษัท/ประเทศ**
Fructose Gum arabic Tributyrin	SIGMA Chemical Co., U.S.A.
Oleic acid	BDH Laboratory Chemical Division England.
Ammonium Sulphate	Fluka AG. Buch, Switzerland.
Phenolphtalein Calcium Chloride dihydrate Manganese Chloride	May&Baker Ltd., England.
Yeast extract	Oxiod Laboratories, U.S.A.
Bacto-agar Bacto-peptone	Difco Laboratories, U.S.A.
Lipase (Porcine Pancreas), Protease (*Aspergillus oryzae*) and Cellulase (*Aspergillus niger*)	Tokyo Chemical Industry.
Ethanol Sodium Chloride Di-potassium hydrogen phosphate, anhydrous Potassium dihydrogen phosphate	E.Merck Ag. Darmstadt, Germany.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

ได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ โดย คุณเปรมสุดา สมาน เป็นผู้คัดแยกได้จากส่วนของน้ำและดินจากบ่อเลี้ยงกุ้ง อำเภอระโนด จังหวัดสงขลา ประเทศไทย เมื่อส่งไปตรวจแยกสายพันธุ์ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยพบว่าเป็นเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง

เก็บใน LB ในหลอดที่มีฝาเกลียวปิดและปิดทับด้วยพาราฟิล์ม เก็บไว้ที่ -20°ซ เมื่อต้องการใช้เชื้อให้นำมาเลี้ยงบน minimum medium plateใหม่

3.2 การเลี้ยงเชื้อและการติดตามการเจริญของเชื้อ

3.2.1 <u>การเตรียมเชื้อตั้งต้น (Starter inoculum)</u>

เขี่ยเชื้อในอาหารวุ้น 1 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรปรับต่ำ เขย่าในเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ 37°ซ ความเร็ว 250 รอบ/นาที นาน 15 ชม.

3.2.2 <u>การเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เพื่อผลิตไลเปสในระดับถังหมัก 5 ลิตร</u>

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากการเตรียมเชื้อตั้งต้นลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีปริมาตรเริ่มต้น 4,000 มิลลิลิตร ใช้หัวเชื้อซึ่งมีปริมาตร 40 มิลลิลิตร (คิดเป็น 1% (v/v) ของอาหารที่ใช้ในการผลิต) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไลเปสซึ่งประกอบด้วย Ammonium sulfate 0.13% (w/v), K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v) และ Fructose 2% (w/v) ควบคุมภาวะในการหมักที่อุณหภูมิ 37°ซ อัตราเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm. ควบคุมความเป็นกรด-ด่างด้วย 1M NaOH โดยควบคุมให้อยู่ในช่วง 7.0 ควบคุมการเกิดฟองด้วย Antifoam A ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:3

<u>3.2.3 การติดตามการเจริญของเชื้อ</u>

นำน้ำหมักที่เก็บทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 84 ชั่วโมงออกมาวัดการเจริญ (ความขุ่น) ด้วยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

3.3 การศึกษาภาวะที่เหมะสมในการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์ไลเปส

3.3.1 การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตไลเปส

เลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.2 โดยมีแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของแหล่งไนโตรเจนต่างๆ กันได้แก่ 0.05%, 0.13%, 0.26% และ 0.50% (w/v) วัดการเจริญของเชื้อและวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ

3.3.2 การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตไลเปส

เลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.2 โดยมีแหล่งคาร์บอนคือน้ำตาลฟรุกโตสที่ความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำตาล ฟรุกโตสต่างๆ กันได้แก่ 1%, 2% และ 3% (w/v) วัดการเจริญของเชื้อและวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ

3.3.3 การศึกษาอิทธิพลของปริมาณเชื้อตั้งต้น

เลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.2 โดยเปรียบเทียบผลของการผลิตไลเปสที่ปริมาณเชื้อตั้งต้นต่างๆคือ 0.25%, 0.50% และ 1.00% วัดการเจริญของเชื้อและวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ

3.3.4 การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตไลเปส

เลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.2 โดยเปรียบเทียบผลของการผลิตไลเปสที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 30, 37, 40 องศาเซลเซียส วัดการเจริญของเชื้อและวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ

3.3.5 การศึกษาอิทธิพลของปริมาณเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมในการผลิตไลเปส

เลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.2 โดยเปรียบเทียบผลของปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.25%, 0.50% และ 1.00% (v/v) วัดการเจริญของเชื้อและวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ

3.3.6 การศึกษาอิทธิพลของอัตราการกวนที่เหมาะสมในการผลิตไลเปส

เลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.2 โดยเปรียบเทียบผลของการผลิตไลเปสโดยแปรผันอัตราการกวนเป็น 150 rpm., 200 rpm และ 250 rpm วัดการเจริญของเชื้อและวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ

3.3.7 การศึกษาอิทธิพลของอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมในการผลิตไลเปส

เลี้ยงเชื้อตามข้อ 3.2 โดยเปรียบเทียบผลของการผลิตไลเปสโดยแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 vvm, 1.0 vvm และ 1.5 vvm วัดการเจริญของเชื้อและวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ที่เวลาต่างๆ

3.4 การวัดแอคติวิตีของไลเปส

บ่มสารละลายเอนไซม์ 0.5 มล. กับอิมัลชั่นของสับสเตรท 15 มล. และโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ที่อุณหภูมิ 37°ซ ที่ความเร็ว 50 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติม 95% เอทิลแอลกอฮอล์ ซึ่งมีฟีนอฟทาลีนละลายอยู่ในสัดส่วน 0.43% ปริมาณ 20 มล. แล้วนำไปไตเตรทกับ 0.025 M KOH จนฟีนอฟทาลีนเปลี่ยนสีเป็นสีชมพู เพื่อหาปริมาณกรดไขมันที่ถูกปลดปล่อยออกมา เนื่องจากการย่อยน้ำมันมะกอก

1 หน่วยของเอนไซม์คือ ปริมาณกรดไขมันที่เกิดจากการย่อยน้ำมันมะกอกที่ 35°ซ ในเวลา 30 นาที ในภาวะที่ทำการทดลองโดยคิดเป็นไมโครโมลของกรดไขมัน

3.5 การวัดปริมาณโปรตีน

ใช้สารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 0.1 มล. ผสมกับสารละลายโปรตีนรีเอเจนต์ 1 มล. เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร อ่านค่าปริมาณโปรตีนในสารละลายตัวอย่างเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานที่มีโปรตีน 0-60 ไมโครกรัม

3.6 ขั้นตอนการเตรียมเอนไซม์

3.6.1 <u>การเตรียมเอนไซม์ในรูป crude enzyme</u>

เลี้ยงเชื้อในทำนองเดียวกับข้อ 3.3 ในภาวะที่เหมาะสมตามผลที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.4 หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปปั่นที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่ 4°ซ นาน 30 นาที แยกเก็บส่วนน้ำใส เรียกส่วนนี้ว่า Crude enzyme นำไปเก็บไว้ที่ 4°ซ เพื่อจะนำไปศึกษาและทำให้บริสุทธิ์ต่อไป

3.6.2 <u>การทำให้เข้มข้นด้วยวิธีอัลตราฟิวเตรชั่น (Ultrafiltration)</u>

กรอง Crude enzyme ผ่านอัลตราฟิวเตรชั่นยูนิตซึ่งใช้แผ่นกรอง (membrane) เบอร์ YM10 ซึ่งกรองโมเลกุลที่มีขนาด 10,000 ดาลตันขึ้นไป โดยมีก๊าซไนโตรเจนช่วยดันที่ความดัน 40 psi เริ่มกรองตั้งแต่ปริมาตรเริ่มต้น 2,500 มล. จนเหลือปริมาตร 300 มล.

3.6.3 <u>การทำเอนไซม์ในรูปผง (Powder Enzyme)</u>

เก็บสารละลายเอนไซม์เข้มข้นที่เหลือจากการทำอัลตราฟิวเตรชั่นไปทำให้เป็นผงด้วยวิธี Lyophilization ที่อุณหภูมิ -50°ซ จนได้เอนไซม์แห้ง

3.7 การกำจัดสิ่งสกปรกบนเส้นใยฝ้าย

สำหรับงานวิจัยนี้มีการกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้าย 2 วิธีคือ วิธีใช้ด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์และวิธีที่ใช้เอนไซม์

3.7.1 การกำจัดสิ่งสกปรกด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

นำผ้าดิบที่ผ่านการลอกแป้งแล้ว มาต้มในสารละลายที่ประกอบด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 3% (w/v) และ Womine TE 1% (w/v) ที่อัตราส่วน 1:20 (w/v) อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างผ้าในน้ำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และตากแห้ง

3.7.2 การกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์

เอนไซม์ที่ใช้ในการกำจัดสิ่งสกปรกสำหรับงานวิจัยนี้คือ โปรตีเอส ไลเปส และเซลลูเลส ทั้งที่สั่งซื้อจากบริษัท Tokyo Chemical Industrial และที่ผลิตขึ้นเองคือ ไลเปสจาก *P. aeruginosa* (อังคาร, 2544) โปรตีเอสจาก *B.subtilis* TISTR25 (วรรณวิมล, 2540) และเซลลูเลสจาก *T. reesei* โดยทำการทดลองกับผ้าดิบขนาด 2 กรัม, อัตราส่วน 1:50 (w/v), ในสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์แต่ละชนิดคือ

3.7.2.1 การกำจัดสิ่งสกปรกด้วยไลเปสจาก Porcine Pancreas (15 ยูนิต/กรัม)

นำผ้าดิบ 2 กรัม ใส่ลงในสารละลายที่มีไลเปส 0.5 g/l และ Womine TE 1 g/l ใน 0.05 M ทริส-ไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ pH 8.0, อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำ 80°ซ เป็นเวลา 20 นาที และตากแห้ง

3.7.2.2 การกำจัดสิ่งสกปรกด้วยไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa* (98,040 ยูนิต/กรัม)

นำผ้าดิบ 2 กรัม ใส่ลงในสารละลายที่มีไลเปส 0.5 g/l และ Womine TE 1 g/l ใน 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5, อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำ 80°ซ เป็นเวลา 20 นาที และตากแห้ง

3.7.2.3 การกำจัดสิ่งสกปรกด้วยโปรตีเอสจาก *Aspergillus oryzae* (14,000 ยูนิต/กรัม)

นำผ้าดิบ 2 กรัม ใส่ลงในสารละลายที่มีโปรตีเอส 0.5 g/l และ Womine TE1 g/l ใน 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0, อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำ 80°ซ เป็นเวลา 20 นาที และตากแห้ง

3.7.2.4 การกำจัดสิ่งสกปรกด้วยโปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 (16.36 ยูนิต/กรัม)

นำผ้าดิบ 2 กรัม ใส่ลงในสารละลายที่มีโปรตีเอส 0.5 g/l และ Womine TE 1 g/l ในไบ-คาร์บอเนตบัฟเฟอร์ pH 10.5, อุณหภูมิ 45°ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำ 80°ซ เป็นเวลา 20 นาที และตากแห้ง

3.7.2.5 การกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* (25,000 ยูนิต/กรัม)

นำผ้าดิบ 2 กรัม ใส่ลงในสารละลายที่มีเซลลูเลส 0.5 g/l และ Womine TE 1 g/l ในอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 4.5, อุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำ 80°ซ เป็นเวลา 20 นาที และตากแห้ง

3.7.2.5 การกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei* (246 ยูนิต/มิลลิลิตร)

นำผ้าดิบ 2 กรัม ใส่ลงในสารละลายที่มีเซลลูเลส 0.5 g/l และ Womine TE 1 g/l ในอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 4.5, อุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำ 80°ซ เป็นเวลา 20 นาที และตากแห้ง

3.7.2.6 การกำจัดสิ่งสกปรกด้วยไลเปสจาก Porcine Pancreas, โปรตีเอสจาก *Aspergillus oryzae* และเซลลูเลสจาก *Aspergillus niger*

นำผ้าดิบ 2 กรัม ใส่ลงในสารละลายที่มีไลเปสและโปรตีเอสอย่างละ 0.25 g/l และ Womine TE 1 g/l ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5, อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำ 80°ซ เป็นเวลา 20 นาที กำจัดสิ่งสกปรกต่อด้วยสารละลายที่มีเซลลูเลส 0.5 g/l และ Womine TE 1 g/l ในอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 4.5 อุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำ 80°ซ เป็นเวลา 20 นาที แล้วตากแห้ง

3.7.2.7 การกำจัดสิ่งสกปรกด้วยไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa*, โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 และเซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei*

นำผ้าดิบ 2 กรัม ใส่ลงในสารละลายที่มีไลเปสและโปรตีเอสอย่างละ 0.25 g/l และ Womine TE 1 g/l ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5, อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วยน้ำ 80°ซ เป็นเวลา 20 นาที กำจัดสิ่งสกปรกต่อด้วยสารละลายที่มีเซลลูเลส 0.5 g/l และ Womine TE 1 g/l ในอะซีเตตบัฟเฟอร์ pH 4.5 อุณหภูมิ 40°ซ เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำ 80°ซ เป็นเวลา 20 นาที แล้วตากแห้ง

ผ้าที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกแล้วจะถูกทดสอบสมบัติของการดูดซึมน้ำ (Absorbency of fabric) ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ใช้กำหนดคุณภาพของผ้าดิบ ก่อนนำไปผ่านกระบวนการย้อมสีที่ต้องคำนึงถึงความสม่ำเสมอทั่วทั้งผืนผ้า ตามมาตรฐานการทดสอบ (AATCC Test Method 79) คือ หยดน้ำลงบนผ้าดิบที่ผ่านการกำจัดสิ่งสกปรกแล้ว บันทึกเวลาที่หยดน้ำซึมลงในเส้นใยผ้า โดยเส้นใยที่มีการดูดซึมน้ำได้ภายใน 5 วินาที ถือเป็นเส้นใยที่มีคุณภาพดีพอที่จะผ่านเข้าสู่กระบวนการย้อมสีต่อไป

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

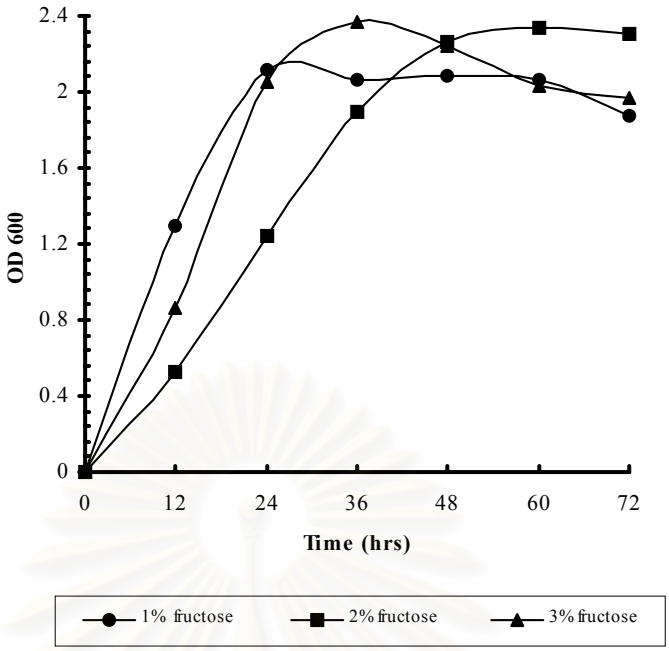
4.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตไลเปสของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

รักชนก ธีรกวินสกุล (2539) ได้ศึกษาการผลิตไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa* โดยการคัดเลือกสูตรอาหารในระดับขวดเขย่าและพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ประกอบด้วย $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% (w/v), K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v) และ ฟรุกโตส 2% (w/v) อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ 37°ซ อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที ซึ่งข้อมูลเบื้องต้นนี้ได้นำมาเป็นภาวะเริ่มแรกของการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสในระดับถังหมัก 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง

4.1.1 ผลของปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ใช้

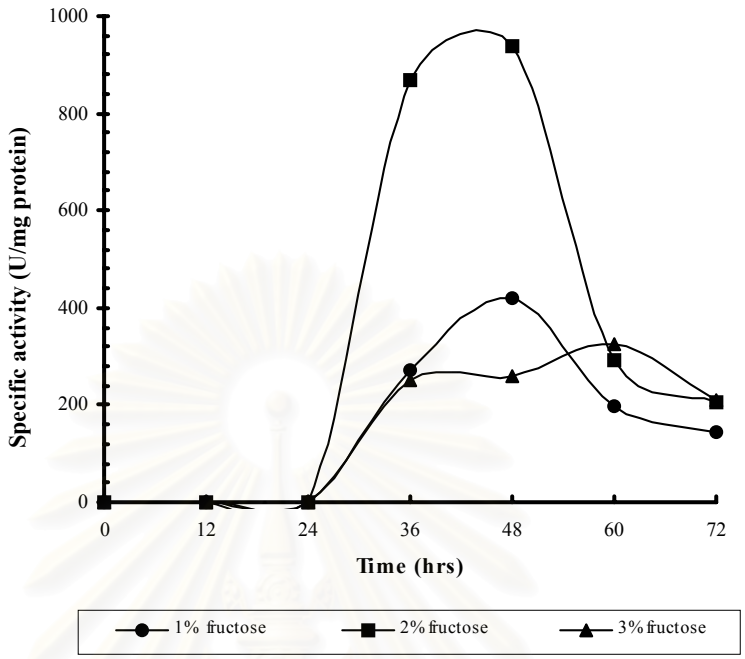
การเพิ่มการเจริญของเซลล์วิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันคือ การเพิ่มปริมาณสารอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการทดลองนี้ได้ศึกษาถึงผลของปริมาณฟรุกโตสซึ่งถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอน จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* ในสูตรอาหารที่กล่าวไว้ข้างต้น แล้วแปรผันปริมาณฟรุกโตสเป็น 1%, 2% และ 3% (w/v) ตามลำดับ ติดตามการเจริญและการผลิตไลเปส โดยการเก็บน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงในกราฟรูปที่ 1, 2 และ 3 จากกราฟรูปที่ 1 พบว่าที่ปริมาณฟรุกโตสแต่ละความเข้มข้นมีการเจริญของเชื้อใกล้เคียงกัน โดยจะเจริญเข้าสู่ระยะ log phase ในชั่วโมงที่ 0-24 และที่ความเข้มข้นของปริมาณฟรุกโตสเท่ากับ 2% (w/v) พบว่าเชื้อผลิตไลเปสให้แอคติวิตีสูงสุด ดังแสดงในกราฟรูปที่ 2 และเมื่อนำแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสในชั่วโมงที่ 48 ของแต่ละปริมาณฟรุกโตสมาเปรียบเทียบกัน พบว่าที่ปริมาณฟรุกโตส 2% (w/v) สามารถผลิตไลเปสให้แอคติวิตีจำเพาะสูงสุดคือ 938.48 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3 ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณฟรุกโตสเท่ากับ 2% (w/v) เป็นความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในการทดลองต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



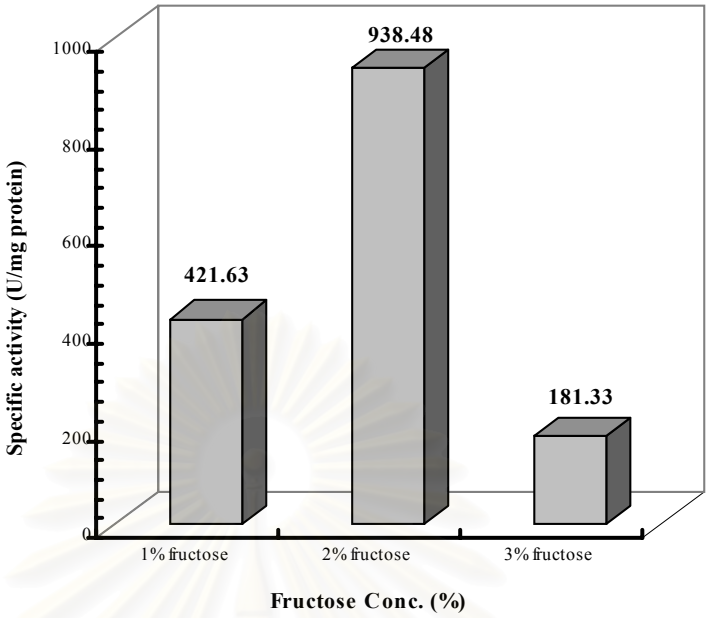
รูปที่ 1 เปรียบเทียบการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณของฟรุกโตสเป็น 1%, 2% และ 3% (w/v) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v) และ $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% (w/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1% (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm, อัตราเร็วในการกวน 250 rpm, อุณหภูมิในการเลี้ยง 37°ซ และ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณของฟรุกโตสเป็น 1%, 2% และ 3% (w/v) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v) และ $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% (w/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1% (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm, อัตราเร็วในการกวน 250 rpm, อุณหภูมิในการเลี้ยง 37°ซ และ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



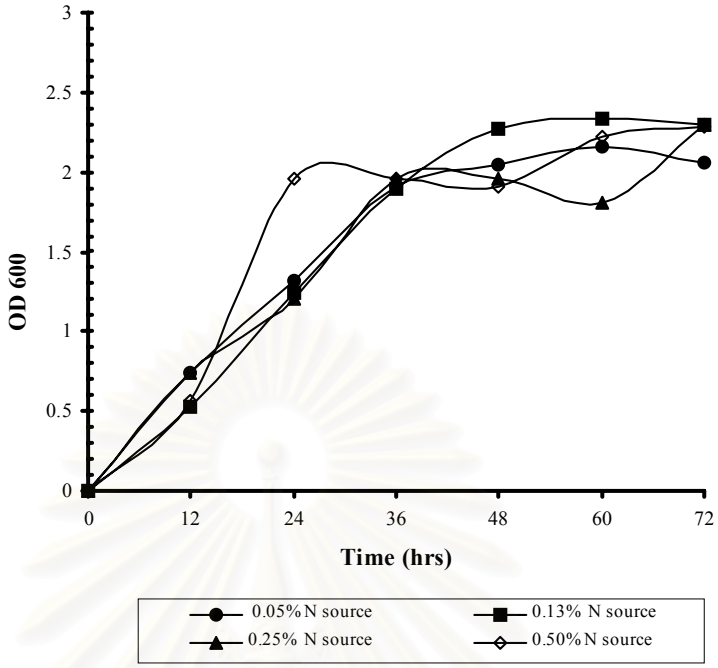
รูปที่ 3 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณของฟรุกโตสเป็น 1%, 2% และ 3% (w/v) ในชั่วโมงที่ 48 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v) และ $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% (w/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1% (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm, อัตราเร็วในการกวน 250 rpm, อุณหภูมิในการเลี้ยง 37°ซ และ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.2 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่ใช้

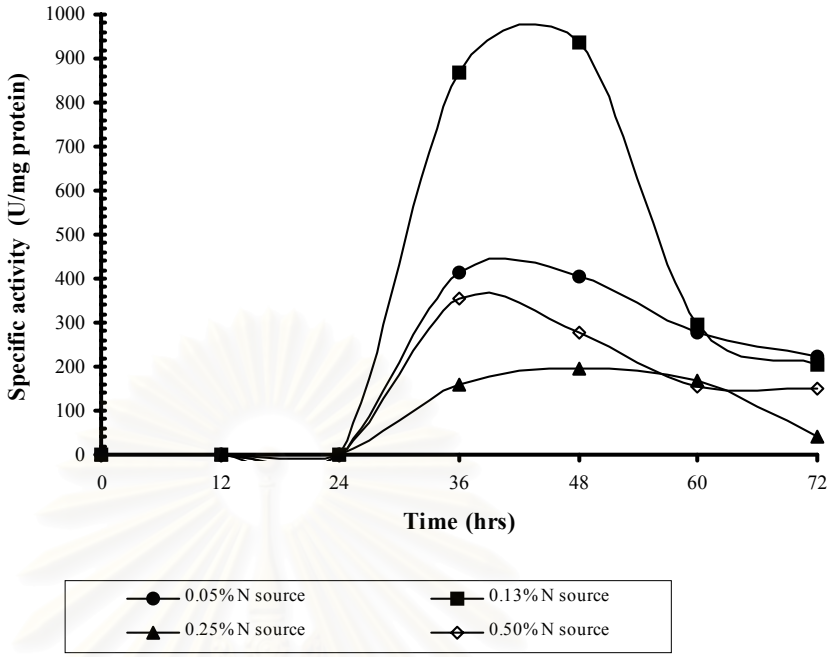
อีกวิธีหนึ่งในการเพิ่มการเจริญเติบโตและการผลิตไลเปสคือ การศึกษาถึงผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจน ในการทดลองนี้ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต โดยเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* ตามวิธีและภาวะเดียวกับข้อ 4.1.1 แล้วแปรผันปริมาณไนโตรเจนเป็น 0.05%, 0.13%, 0.25% และ 0.50% (w/v) ตามลำดับ ติดตามการเจริญและการผลิตไลเปสเช่นเดียวกับข้อ 4.1.1 ผลการทดลองดังแสดงในกราฟรูปที่ 4, 5 และ 6 จากกราฟรูปที่ 4 พบว่าที่ปริมาณไนโตรเจนแต่ละความเข้มข้นจะให้การเจริญของเชื้อไม่แตกต่างกัน แต่ที่ความเข้มข้น 0.50% (w/v) จะให้อัตราการเจริญที่เร็วกว่าความเข้มข้นอื่นๆ เมื่อดูการผลิตไลเปสจากกราฟรูปที่ 5 จะพบว่าที่ปริมาณเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนเท่ากับ 0.13% (w/v) จะมีการผลิตไลเปสสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 และเมื่อพิจารณาถึงแอคติวิตีจำเพาะของ ไลเปสในชั่วโมงที่ 48 ของแต่ละปริมาณไนโตรเจนมาเปรียบเทียบกันพบว่าที่ความเข้มข้นของไนโตรเจนเท่ากับ 0.13% (w/v) จะมีการผลิตไลเปสแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด ดังแสดงในกราฟรูปที่ 6 ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.13% (w/v) ในการทดลองครั้งต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



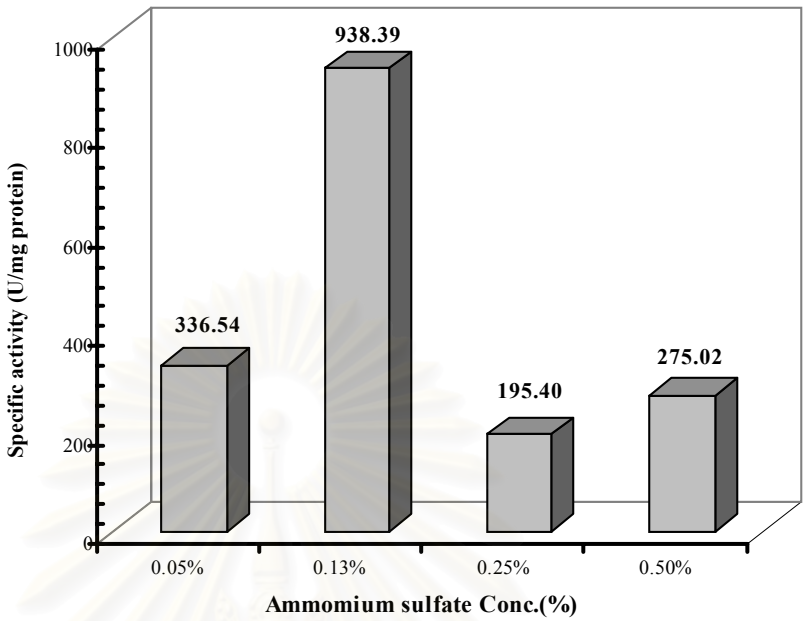
รูปที่ 4 เปรียบเทียบการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.05%, 0.13%, 0.25% และ 0.50% (w/v) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v) และปริมาณฟรุกโตส 2% (w/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1% (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm, อัตราเร็วในการกวน 250 rpm, อุณหภูมิในการเลี้ยง 37°ซ และ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.05%, 0.13%, 0.25% และ 0.50% (w/v) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v) และ ปริมาณฟรุกโตส 2% (w/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1% (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm, อัตราเร็วในการกวน 250 rpm, อุณหภูมิในการเลี้ยง 37°ซ และ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



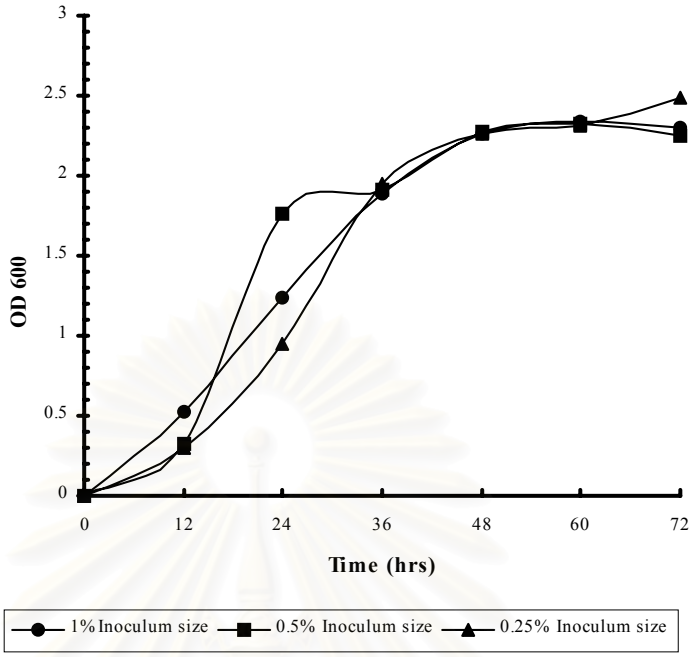
รูปที่ 6 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.05%, 0.13%, 0.25% และ 0.50% (w/v) ในชั่วโมงที่ 48 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v) และปริมาณฟรุกโตส 2% (w/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากัน 1% (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm, อัตราเร็วในการกวน 250 rpm, อุณหภูมิในการเลี้ยง 37°ซ และ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.3 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้

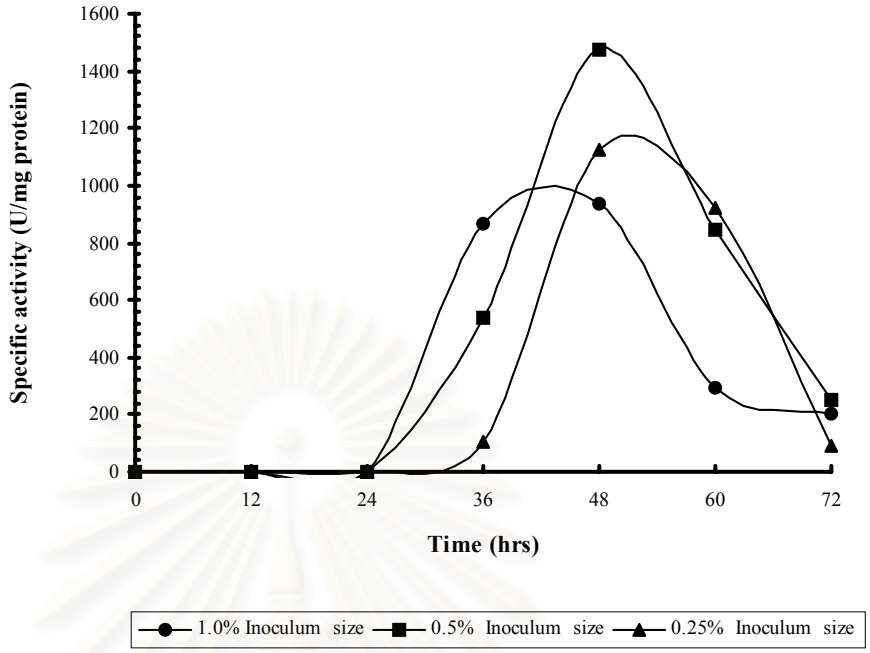
การผลิตเอนไซม์ในถังหมักจะทำให้ได้ผลผลิตในปริมาณสูง ซึ่งจะต้องหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต ปัจจัยหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงก็คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น โดยเมื่อเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* ในสูตรอาหารที่กล่าวไว้ข้างต้น โดยใช้ฟรุกโตส 2% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และ $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมี pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ควบคุมอุณหภูมิที่ 37°ซ ใช้อัตราเร็วในการกวน 250 rpm. อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm. แล้วแปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้นตั้งแต่ 0.25%, 0.50% และ 1.00% (v/v) ตามลำดับ ติดตามการเจริญเติบโตและการผลิตไลเปสผลการทดลองแสดงดังกราฟรูปที่ 7, 8 และ 9 ตามลำดับ จากกราฟรูปที่ 7 จะพบว่าในชั่วโมงที่ 0-24 จะมีการเจริญของเชื้อแบบทวีคูณในช่วง log phase และพบว่าที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.25% - 1.00% (v/v) การเจริญสูงสุดจะใกล้เคียงกัน แต่ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.50% (v/v) พบว่าเชื้อสามารถผลิตไลเปสได้สูงโดยเริ่มผลิตหลังชั่วโมงที่ 24 และจะผลิตได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ดังแสดงในกราฟรูปที่ 8 และเมื่อนำแอคติวิตีจำเพาะในชั่วโมงที่ 48 ของแต่ละปริมาณเชื้อตั้งต้นมาเปรียบเทียบกัน พบว่าที่ปริมาณเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 0.50% (v/v) สามารถผลิตไลเปสได้แอคติวิตีจำเพาะสูงสุดซึ่งผลิตได้ประมาณ 1,476.50 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งแสดงดังรูปที่ 9 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.50 % (v/v)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



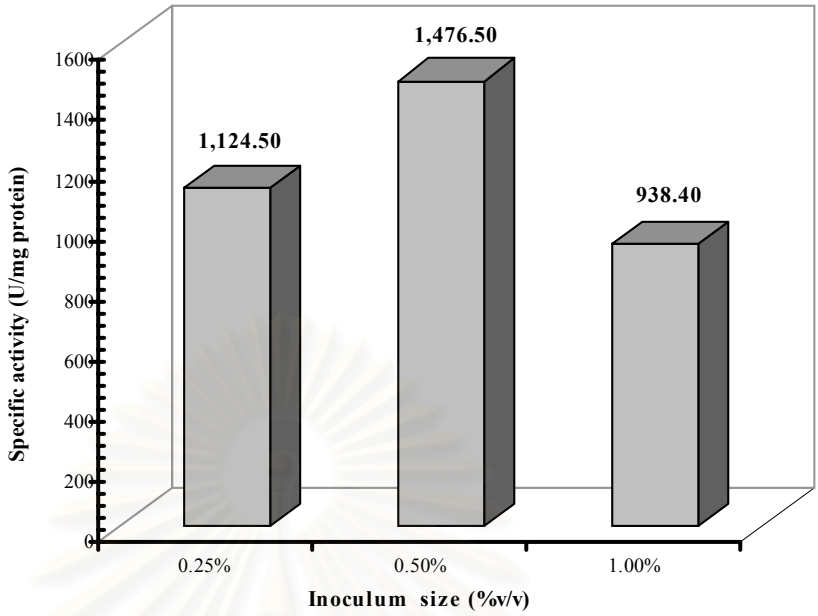
รูปที่ 7 เปรียบเทียบการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อตั้งต้นเป็น 0.25%, 0.50% และ 1.00% (v/v) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v) และ $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% (w/v), ปริมาณฟรุกโตสเท่ากับ 2% (w/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm, อัตราเร็วในการกวน 250 rpm, อุณหภูมิในการเลี้ยง 37°ซ และ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อตั้งต้นเป็น 0.25%, 0.50% และ 1.00% (v/v) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v), $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% (w/v), ปริมาณฟรุกโตสเท่ากับ 2% (w/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm, อัตราเร็วในการกวน 250 rpm, อุณหภูมิในการเลี้ยง 37°ซ และ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



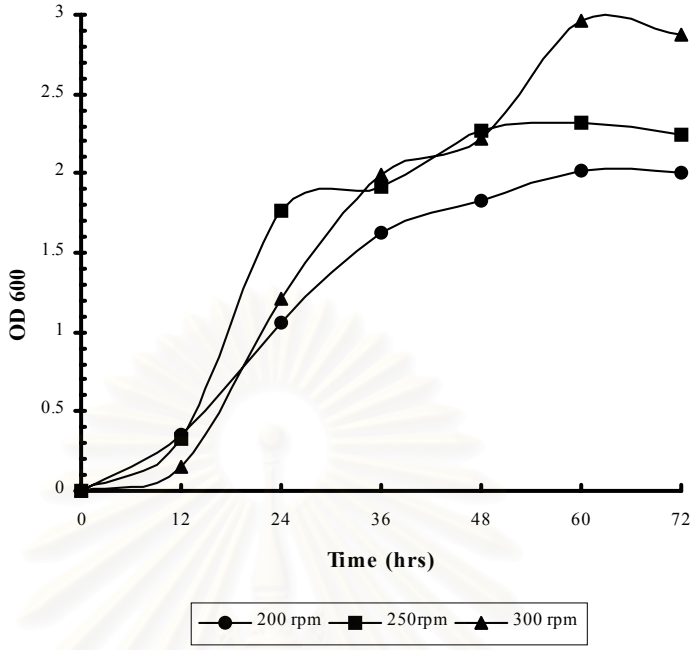
รูปที่ 9 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อตั้งต้นเป็น 0.25%, 0.50% และ 1.00% (v/v) ในชั่วโมงที่ 48 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v), $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% (w/v), ปริมาณฟรุกโตส 2% (w/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm, อัตราเร็วในการกวน 250 rpm, อุณหภูมิในการเลี้ยง 37°ซ และ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.4 ผลของอัตราเร็วในการกวน

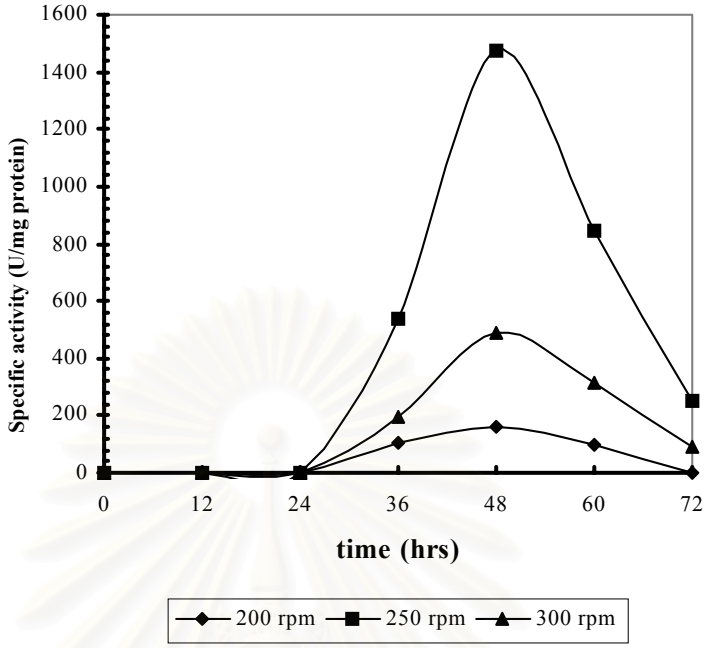
อัตราเร็วในการกวนก็มีปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่ออัตราการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งใบกวนในถังหมักทำหน้าที่ในการตีฟองอากาศที่ผ่านเข้าไปจากก้นถังหมักให้เป็นฟองขนาดเล็กและแตกกระจายไปยังส่วนต่างๆ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้การกวนยังมีส่วนทำให้จุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ตกตะกอนเกิดการผสมและสัมผัสกันอย่างสม่ำเสมอ จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* ตามวิธีและภาวะเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 4.1.1, 4.1.2 และ 4.1.3 โดยมีการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm แล้วแปรผันอัตราเร็วในการกวนเป็น 200, 250 และ 300 rpm ตามลำดับ ติดตามการเจริญของเชื้อและการผลิตไลเปสเช่นเดียวกับข้อ 4.1.1, 4.1.2 และ 4.1.3 ผลการทดลองแสดงในกราฟรูปที่ 10, 11 และ 12 ตามลำดับ จากกราฟรูปที่ 10 พบว่าที่อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 300 rpm จะมีการเจริญของเชื้อสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 60 เป็นต้นไป ในขณะที่อัตราเร็วในการกวน 200 และ 250 rpm การเจริญของเชื้อจะใกล้เคียงกัน แต่ที่อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm เชื้อจะผลิตไลเปสได้สูงที่สุด ในขณะที่อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 200 rpm จะพบว่าเชื้อจะผลิตไลเปสได้ต่ำที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 11 และเมื่อนำแอคติวิตีจำเพาะในชั่วโมงที่ 48 ของแต่ละอัตราเร็วในการกวนมาเปรียบเทียบกัน พบว่าที่อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm เชื้อจะมีแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุดคือ 1,476.50 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งแสดงดังรูปที่ 12 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



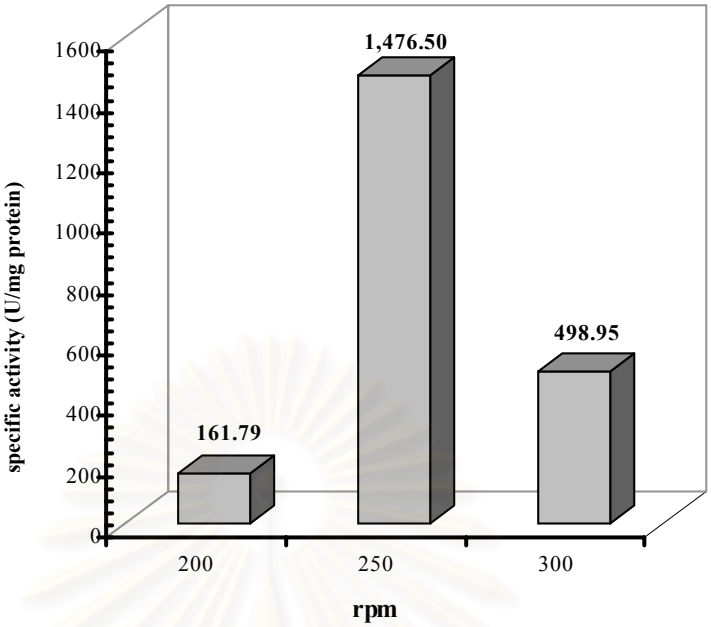
รูปที่ 10 เปรียบเทียบการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอัตราการกวนเป็น 200 rpm, 250 rpm และ 300 rpm โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v), $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% (w/v), ปริมาณฟรุกโตส 2% (w/v), ปริมาณเชื้อตั้งต้น 0.5% (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm, อุณหภูมิในการเลี้ยง 37°ซ และ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอัตราการกวนเป็น 200 rpm, 250 rpm และ 300 rpm โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v), $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% (w/v), ปริมาณฟรุกโตส 2% (w/v), ปริมาณเชื้อตั้งต้น 0.5% (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm, อุณหภูมิในการเลี้ยง 37°ซ และ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



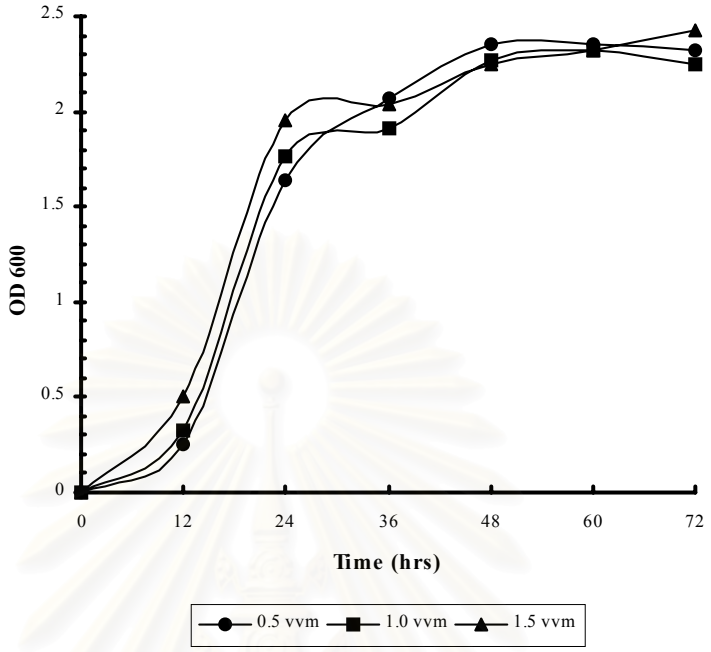
รูปที่ 12 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอัตราการกวนเป็น 200 rpm, 250 rpm และ 300 rpm ในชั่วโมงที่ 48 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v), $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% (w/v), ปริมาณฟรุกโตส 2% (w/v), ปริมาณเชื้อตั้งต้น 0.5% (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm, อุณหภูมิในการเลี้ยง 37°ซ และ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 7.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.5 ผลของอัตราการให้อากาศ

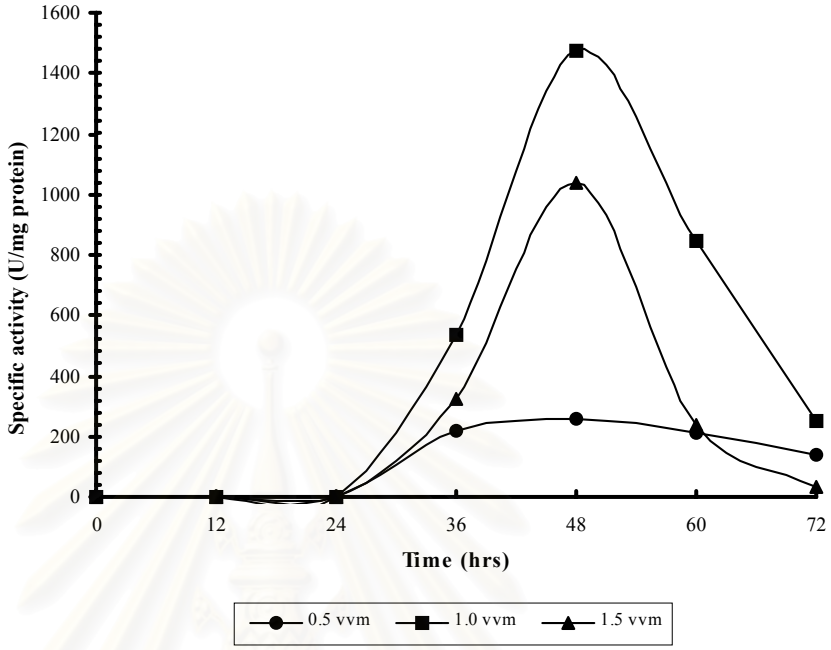
เนื่องจากปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรีย ซึ่งปัจจัยที่มีผลโดยตรงต่ออัตราการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ อัตราการให้อากาศและอัตราเร็วในการกวน จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* ตามวิธีและภาวะเดียวกับที่กล่าวไว้แล้วในข้อ 4.1.4 โดยให้มีปริมาณเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 0.5% (v/v), อัตราเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที, ปริมาณของฟรุกโตสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 2% (w/v), ปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เป็นแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 0.13% (w/v) แล้วแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 vvm, 1.0 vvm และ 1.5 vvm ตามลำดับ ติดตามการเจริญและการผลิตไลเปสเช่นเดียวกับข้อ 4.1.4 ผลการทดลองดังแสดงในกราฟรูปที่ 13, 14 และ 15 ตามลำดับ พบว่าที่อัตราการให้อากาศแต่ละชนิดให้ผลการเจริญของเชื้อไม่ต่างกัน แต่ที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm เชื้อจะผลิตไลเปสได้สูงที่สุด ในขณะที่อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 0.5 vvm จะพบว่าเชื้อจะผลิตไลเปสได้ต่ำที่สุด ดังแสดงในรูปที่ 14 และเมื่อนำแอคติวิตีจำเพาะในชั่วโมงที่ 48 ของแต่ละอัตราการให้อากาศมาเปรียบเทียบกัน พบว่าที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm เชื้อจะมีแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุดคือ 1,476.50 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งแสดงดังรูปที่ 15 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



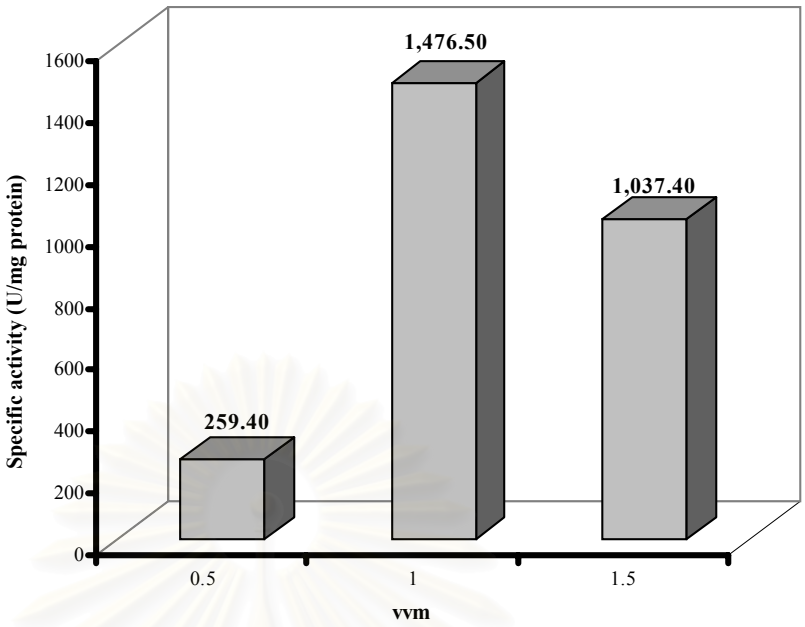
รูปที่ 13 เปรียบเทียบการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 vvm, 1.0 vvm และ 1.5 vvm โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v), $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% (w/v), ปริมาณฟรุกโตส 2% (w/v), ปริมาณเชื้อตั้งต้น 0.5% (v/v), อุณหภูมิในการเลี้ยงเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส, อัตราเร็วในการกวน 250 rpm และ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 vvm, 1.0 vvm และ 1.5 vvm โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v), $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% (w/v), ปริมาณฟรุกโตส 2% (w/v), ปริมาณเชื้อตั้งต้น 0.5% (v/v), อุณหภูมิในการเลี้ยงเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส, อัตราเร็วในการกวน 250 rpm และ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



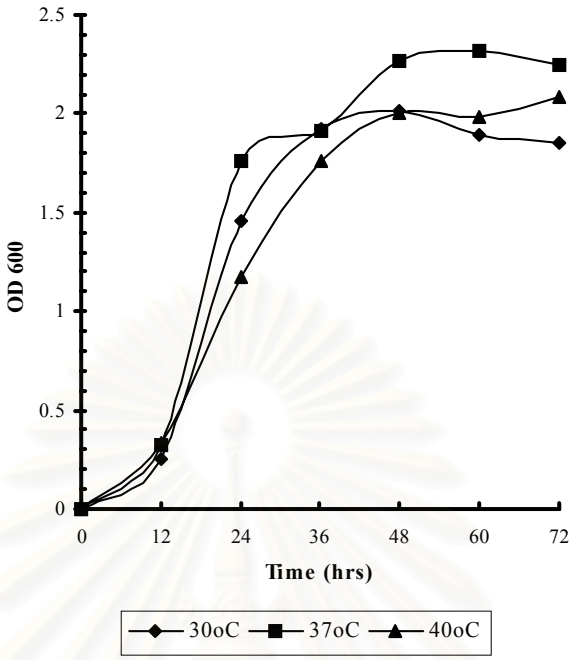
รูปที่ 15 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 vvm, 1.0 vvm และ 1.5 vvm ในชั่วโมงที่ 48 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v), $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% (w/v), ปริมาณฟรุกโตส 2% (w/v), ปริมาณเชื้อตั้งต้น 0.5% (v/v), อุณหภูมิในการเลี้ยงเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส, อัตราเร็วในการกวน 250 rpm และ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.6 ผลของอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อ

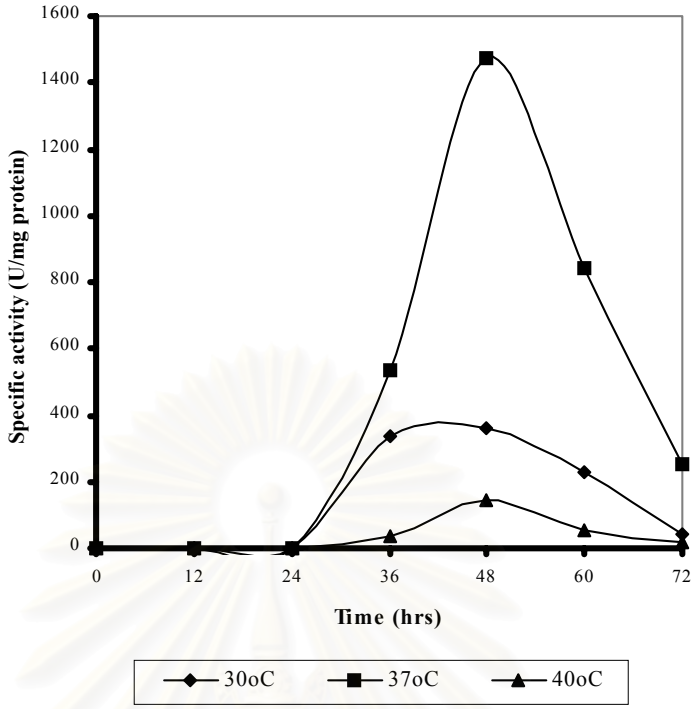
เมื่อทดลองเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* ในภาวะเดียวกับที่ใช้ในข้อ 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3 และ 4.1.4 ทำการแปรผันอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 30, 37 และ 40 ตามลำดับ แล้วติดตามการเจริญและการผลิตไลเปส จะได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 16, 17 และ 18 ตามลำดับ จากกราฟรูปที่ 13 แสดงให้เห็นถึงการเจริญของเชื้อที่ค่อนข้างใกล้เคียงกันในแต่ละอุณหภูมิที่ทำการทดลอง แต่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเชื้อจะมีการเจริญสูงที่สุด ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 เป็นต้นไป และยังพบอีกว่ามีแอคติวิตีของไลเปสมากที่สุด ในขณะที่เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อสามารถผลิตไลเปสได้น้อยมากจนเกือบไม่มีเลย แต่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสยังสามารถพบแอคติวิตีของไลเปสได้บ้าง ดังแสดงในรูปที่ 14 เมื่อนำเอาค่าแอคติวิตีจำเพาะของแต่ละอุณหภูมิในขณะทำการทดลองมาเปรียบเทียบกันที่ชั่วโมง 48 ซึ่งเป็นชั่วโมงที่มีแอคติวิตีสูงสุดในช่วงของการเลี้ยง พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสยังคงเป็นอุณหภูมิที่ให้แอคติวิตีสูงสุด ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปจึงเลือกใช้อุณหภูมิในการทดลองคือ 37 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



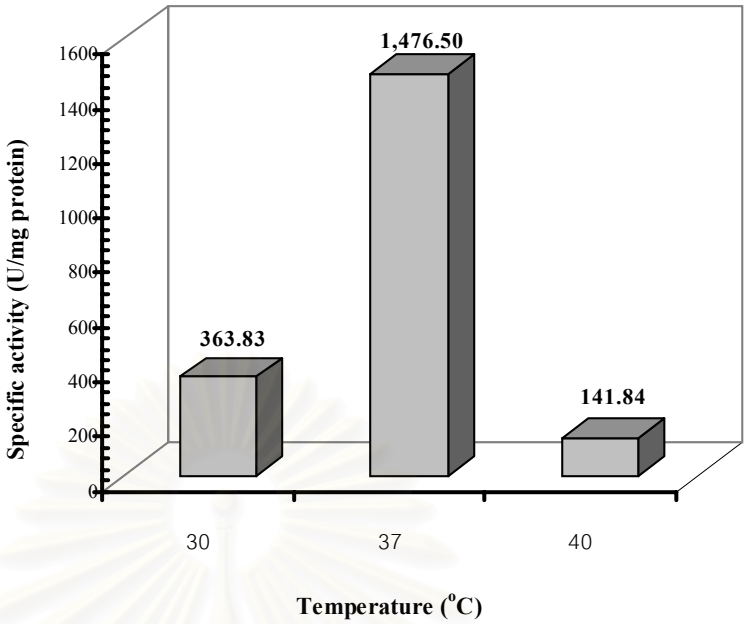
รูปที่ 16 เปรียบเทียบการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเป็น 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v), $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% (w/v), ปริมาณฟรุกโตส 2% (w/v), ปริมาณเชื้อตั้งต้น 0.5% (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm, อัตราเร็วในการกวน 250 rpm และ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 17 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเป็น 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v), $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% (w/v), ปริมาณฟรุกโตส 2% (w/v), ปริมาณเชื้อตั้งต้น 0.5% (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm, อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm และ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



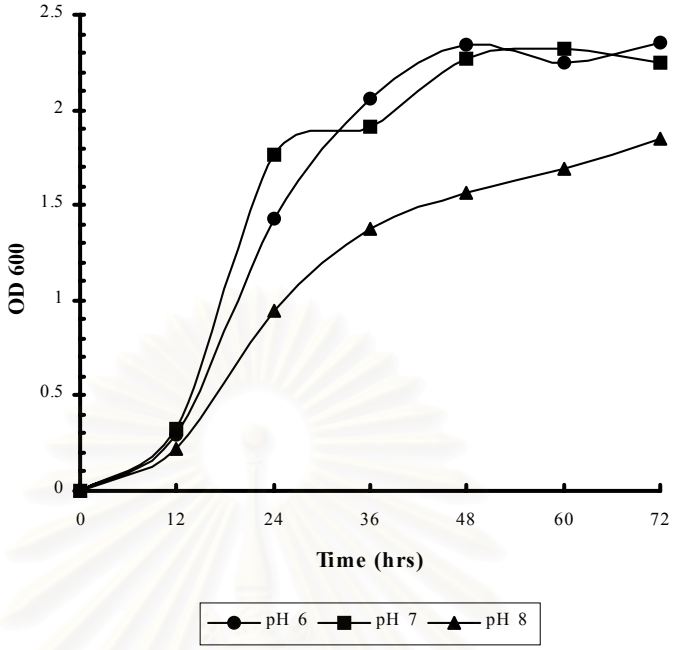
รูปที่ 18 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเป็น 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 48 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v), $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% (w/v) , ปริมาณฟรุกโตส 2% (w/v), ปริมาณเชื้อตั้งต้น 0.5% (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm, อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm และ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.7 ผลของ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

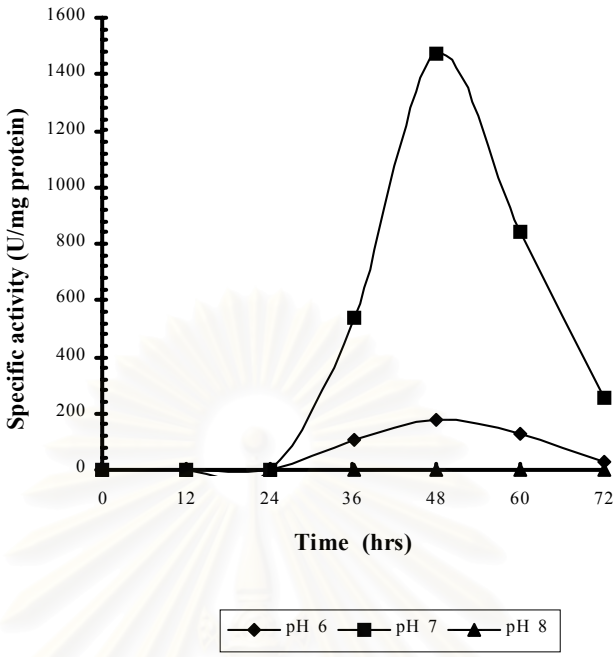
pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์และการส่งผ่านเซลล์เมมเบรน ซึ่งเมื่อเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* ในภาวะเดียวกับที่ใช้ในข้อ 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4 และ 4.1.5 แต่ทำการแปรผัน pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.0, 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ โดยใช้ 1N NaOH เป็นตัวควบคุมความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อในขณะทดลอง แล้วติดตามการเจริญและการผลิตเอนไซม์ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 19, 20 และ 21 ตามลำดับ จากรูปที่ 19 การเจริญของเชื้อในแต่ pH ที่กำหนดให้มีการเจริญที่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน โดยมีการเจริญในช่วง log phase ในชั่วโมงที่ 0-24 จากกราฟรูปที่ 20 แสดงแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสในชั่วโมงต่างๆกัน พบว่าที่ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0 และ 7.0 เชื้อจะเริ่มมีการผลิตไลเปสในชั่วโมงที่ 36 และเพิ่มขึ้นสูงที่สุดเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 48 แต่ที่ pH เท่ากับ 6.0 จะมีการผลิตไลเปสได้น้อยมากเมื่อเทียบกับที่ pH เท่ากับ 7.0 ในขณะที่เมื่อควบคุมให้ pH ในระหว่างทำการทดลองเป็น 8.0 แม้เชื้อจะสามารถเจริญเติบโตได้ แต่ไม่พบว่าเชื้อสามารถผลิตไลเปสได้เลย และเมื่อดูจากรูปที่ 21 ซึ่งเปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะในชั่วโมงที่ 48 พบว่าที่ pH 7.0 เชื้อสามารถผลิตไลเปสได้สูงกว่าอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปจึงเลือกใช้ pH เริ่มต้นในและควบคุมให้เท่ากับ 7.0 ตลอดการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



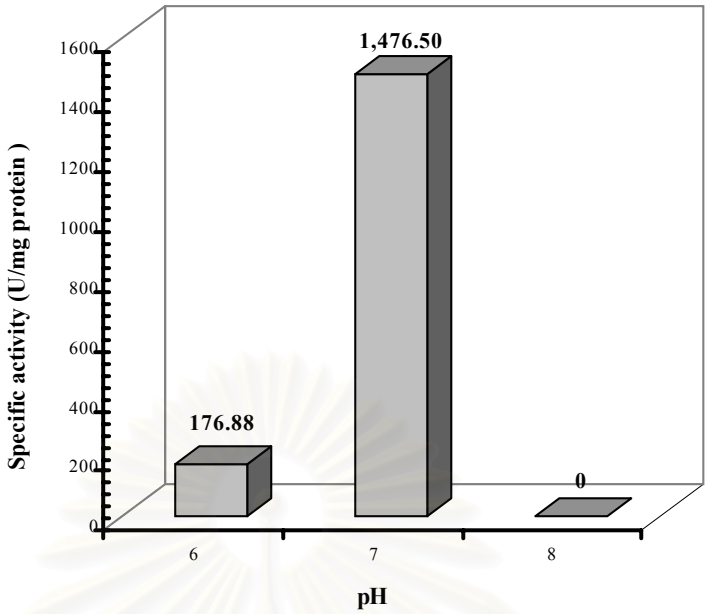
รูปที่ 19 เปรียบเทียบการเจริญของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผัน pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเป็น 6, 7 และ 8 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v), $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% (w/v), ปริมาณฟรุกโตส 2% (w/v), ปริมาณเชื้อตั้งต้น 0.5% (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm, อัตราเร็วในการกวน 250 rpm และควบคุมอุณหภูมิในขณะทดลองเป็น 37 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 20 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผัน pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเป็น 6, 7 และ 8 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v), $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% (w/v), ปริมาณฟรุกโตส 2% (w/v), ปริมาณเชื้อตั้งต้น 0.5% (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm, อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm และควบคุมอุณหภูมิในขณะทดลองเป็น 37 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 21 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผัน pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเป็น 6, 7 และ 8 ในชั่วโมงที่ 48 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v), $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% (w/v), ปริมาณฟรุกโตส 2% (w/v), ปริมาณเชื้อตั้งต้น 0.5% (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm, อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm และควบคุมอุณหภูมิในขณะทดลองเป็น 37 องศาเซลเซียส

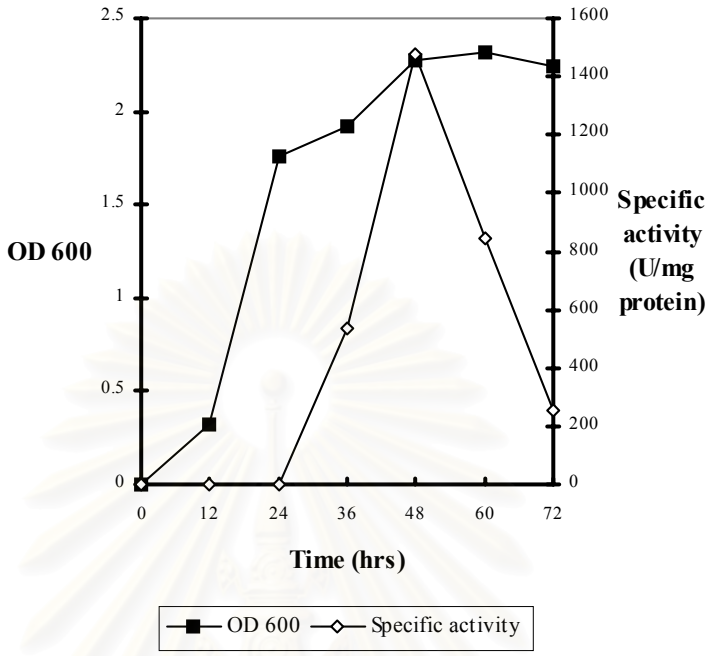
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การเตรียมไลเปสให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการทำให้เข้มข้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชั่นและนำมาทำเป็นเอนไซม์ผง

เมื่อทำการศึกษาได้ภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตไลเปสในระดับถังหมัก 5 ลิตร ได้แล้ว ดังแสดงในกราฟรูปที่ 22 จึงทดลองเลี้ยงตามภาวะดังกล่าวคือ เลี้ยงในอาหารสูตรปรับต่ำที่ประกอบด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต 0.13% (w/v), K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v) และฟรุกโตส 2% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเลี้ยงโดยใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้น 0.5% (v/v) อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm, อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 รอบต่อนาที, อุณหภูมิระหว่างการทดลองเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส และควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างในระหว่างการทดลองให้เท่ากับ 7.0 พบว่าเชื้อมีการเจริญแบบทวีคูณในระยะ log phase ในชั่วโมงที่ 0-24 จากนั้นการเจริญของเชื้อจะเริ่มเข้าสู่ภาวะ stationary phase ส่วนการผลิตไลเปสของเชื้อนั้นจะเริ่มในช่วงชั่วโมงที่ 24-36 ซึ่งเป็นช่วงเริ่มต้นของ stationary phase และจะสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 หลังจากนั้นจะเริ่มลดลงเรื่อยๆ นำเอนไซม์ในช่วงชั่วโมงที่ 48 มาปั่นแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนน้ำใสที่เรียกว่า crude enzyme มาหาไลเปสแอคติวิตีได้ 245.10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 166 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 1,476.50 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นนำ crude enzyme มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชั่น (ซึ่งมี molecular weight cut off ที่ 10,000 ดาลตัน) เนื่องจากได้มีการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของไลเปสพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 185,000 ดาลตัน นำสารละลายเอนไซม์ที่ปั่นเก็บเซลล์แล้วปริมาตร 2,500 มล. มากรองผ่านเมมเบรนให้เหลือปริมาตรประมาณ 300 มล. นำเอนไซม์ที่เข้มข้นที่เหลือมาทำให้เป็นผงด้วยวิธี Lyophilization เอนไซม์ผงที่ได้มีน้ำหนักทั้งสิ้น 4 กรัมต่อน้ำหมัก 4 ลิตร นำมาหาแอคติวิตีได้ 98.04 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ และมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 50 มิลลิกรัม พบว่ามีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 1,960.80 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเอนไซม์เท่ากับ 40% และสารละลายเอนไซม์ที่ได้มีแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้น 1.36 เท่า (ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.36 เท่า) ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การทำให้ไลเปสบริสุทธิ์ขึ้นบางส่วนด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชั่น

Sample	*Total activity*	*Protein*	*Specific activity (U/mg protein)*	*% Yield*	*Purify (fold)*
Crude	$2.451 * 10^5$ U/l	166 (mg/ml)	1,476.50	100	1.00
Powder	$9.804 * 10^4$ U/g	50 (mg protein/mg)	1,960.80	40	1.36



รูปที่ 22 แสดงการเจริญและแอคติวิตีจำเพาะในการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* ในสูตรอาหารที่ประกอบด้วย K_2HPO_4 0.09% (w/v), KH_2PO_4 0.06% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% (w/v), Yeast extract 0.01% (w/v), $(NH_4)_2SO_4$ 0.13% (w/v), ปริมาณฟรุกโตส 2% (w/v), ปริมาณเชื้อตั้งต้น 0.5% (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm, อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm, pH 7.0 และควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

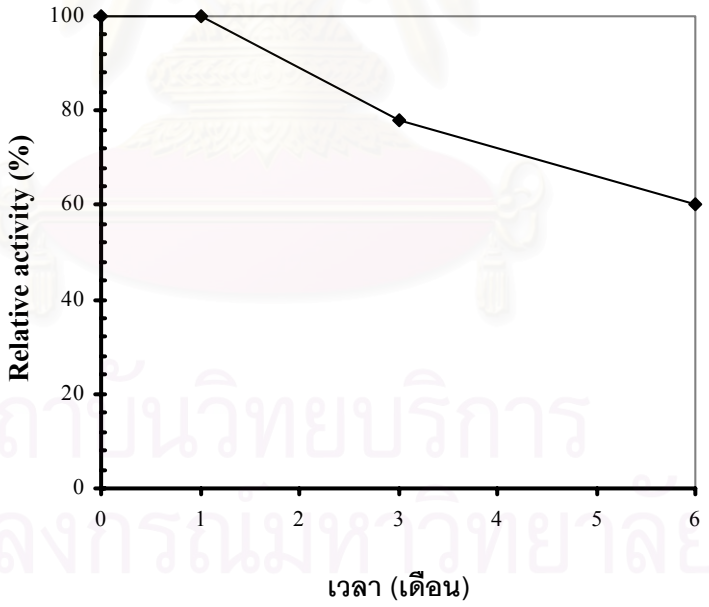
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การศึกษาการเก็บเอนไซม์ผงในระยะยาวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

นำเอนไซม์ผงที่ได้จากข้อ 4.2 มาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆคือ 1, 3 และ 6 เดือน โดยเปรียบเทียบกับแอคติวิตีเริ่มต้น พบว่าไลเปสผงที่เก็บไว้เป็นระยะเวลา 1 เดือน เป็นช่วงเวลาที่เอนไซม์ยังไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีเลย แต่จะสูญเสียแอคติวิตีไป 22% เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 3 เดือน ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดง Relative activity ของเอนไซม์ผงที่ระยะเวลาต่างๆเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ระยะเวลา (เดือน)	0	1	3	6
Activity(U/mg enzyme)	98.04	98.04	76.47	58.82
Relative activity(%)	100	100	78	60



*แอคติวิตีของเอนไซม์ผง 98.04 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ = Relative activity 100%

รูปที่ 23 ความเสถียรของไลเปสผงเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน

4.4 การประยุกต์ใช้ไลเปสเพื่อการกำจัดสิ่งสกปรกบนเส้นใยของผ้าฝ้าย

ในการวิจัยนี้ได้มีการนำไลเปสที่ผลิตได้จาก *Pseudomonas aeruginosa* โดยทำการเลี้ยงในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรในภาวะที่เหมาะสม 2% (w/v) fructose, 0.13% (w/v) ammonium sulfate, อัตราเร็วในการกวน 250 rpm, อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm, อุณหภูมิ 37 °ซ, pH 7.0 และปริมาณเชื้อตั้งต้น 0.5% (v/v) มาทำงานร่วมกับเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น โดยตรวจสอบประสิทธิภาพของการกำจัดสิ่งสกปรกจากใยฝ้ายด้วยการตรวจดูคุณสมบัติในการดูดซับน้ำของผ้าที่ถูกนำมาผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์แล้วเปรียบเทียบกับการใช้คอสติกโซดาในการกำจัดสิ่งสกปรกในอุตสาหกรรมสิ่งทอ ซึ่งผ้าที่สามารถดูดซับหยดน้ำได้ภายในเวลา 3 วินาที หลังจากที่หยดน้ำลงบนผ้าถือว่าผ้านั้นมีความสามารถในการดูดซับน้ำได้ดีพอที่จะนำไปเข้าสู่กระบวนการขั้นต่อไปได้ เนื่องจากการกำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าฝ้ายด้วย 2 วิธีนี้จำเป็นต้องมีการเติมสารช่วยเปียกเพื่อลดแรงตึงผิวของผ้าลงและทำให้สารต่างๆสามารถซึมเข้าผ้าได้ดีขึ้นจึงมีการศึกษาผลของสารช่วยเปียกต่อการดูดซึมน้ำของผ้า โดยนำผ้าฝ้ายมาแช่ในสารละลายที่มีสารช่วยเปียก (Womine TE) ความเข้มข้น 1, 3, 5, 8 และ 10 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37-40°ซ และที่ 80°ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและ 1 ชั่วโมง ซึ่งเป็นอุณหภูมิและเวลาที่ใช้สำหรับการกำจัดสิ่งสกปรกด้วยเอนไซม์และด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ตามลำดับ พบว่าผ้าไม่ดูดซึมน้ำทันทีแต่ดูดซึมหลังหยดน้ำลงบนผ้าแล้วมากกว่า 1 นาที ฉะนั้นสารช่วยเปียกนี้ไม่มีผลโดยตรงต่อการกำจัดสิ่งสกปรกเพื่อให้ผ้าดูดซึมน้ำแต่เป็นเพียงสารช่วยกำจัดสิ่งสกปรกให้เกิดสมบูรณ์ และทำนองเดียวกันด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์และเอนไซม์อย่างเดียวในการกำจัดสิ่งสกปรกก็ไม่สามารถทำให้ผ้าดูดซึมน้ำได้ทันที ผลการทดลองกำจัดสิ่งสกปรกด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และเอนไซม์ได้แสดงในตารางที่ 5

จากผลการทดลองดังตารางที่ 5 ได้แสดงให้เห็นถึงความสามารถของคอสติกโซดาในการกำจัดสารขี้ผึ้ง (wax) และสารประกอบต่างๆ ที่เคลือบอยู่ตามเส้นใยให้หลุดออกไปได้ ทำให้ผ้ามีการดูดซึมน้ำได้ทันที ซึ่งบอกถึงความสามารถของเส้นใยที่มีประสิทธิภาพในการดูดซับของเหลวได้ดี ในขณะที่เมื่อใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียวไม่ว่าจะเป็นเซลลูเลส ไลเปส หรือโปรตีเอสทั้งที่นำเข้าและผลิตเองนั้นไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซับของเหลวให้ดีขึ้นได้ แต่เมื่อใช้เอนไซม์ทั้งสามชนิดคือ เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* โปรตีเอสจาก *Aspergillus oryzae* และไลเปสจาก Porcine Pancreas ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ พบว่าสามารถทำให้ผ้าดูดซับน้ำได้ทันทีเช่นเดียวกับการใช้คอสติกโซดา แต่เมื่อทดสอบกับเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นเองคือ เซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei* โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 และไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa* พบว่าผ้าฝ้ายดิบสามารถดูดซับน้ำได้ช้ากว่าคือ ภายใน 3 วินาที แต่ผลการทดลองที่ได้นี้เมื่อเทียบตามมาตรฐานของ American Association Textile Chemist and Colorist แล้วถือ

ว่าเป็นผ้าฝ้ายดิบที่มีความสามารถในการดูดซึมน้ำได้ดีเพียงพอที่จะผ่านเข้าสู่กระบวนการย้อมสีต่อไปได้

ตารางที่ 5 แสดงผลของการกำจัดสิ่งสกปรกบนเส้นใยฝ้ายเปรียบเทียบระหว่างการใช้เอนไซม์กับการใช้คอสติกโซดา

วิธีการทดลอง	***ผลการทดลอง***
คอสติกโซดา	+ (ผ้าดูดซึมน้ำทันที)
เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger*	-
เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger*	-
ไลเปสจาก Porcine Pancreas	-
ไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa*	-
โปรตีเอสจาก *Aspergillus oryzae*	-
โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25	-
ไลเปสจาก Porcine Pancreas + โปรตีเอสจาก *Aspergillus oryzae* + เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger*	+ (ผ้าดูดซึมน้ำได้ทันที)
ไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa* + โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 + เซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei*	+ (ผ้าดูดซึมน้ำภายใน 3 วินาที)

+ หมายถึง ผ้าสามารถดูดซึมน้ำได้

- หมายถึง ผ้าไม่สามารถดูดซึมน้ำได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากรายงานการวิจัยของ รักชนก ธีรกวินสกุล (2539) ซึ่งได้ทำการทดลองหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ในระดับขวดเขย่า โดยงานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยต่อเนื่องโดยนำ *Pseudomonas aeruginosa* มาทำการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไลเปสในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์ให้มีปริมาณมากขึ้น โดยขั้นตอนเริ่มต้นจะใช้สูตรอาหารชนิดเดียวกับที่ใช้ในระดับขวดเขย่า คือ ใช้สูตรอาหาร Minimum medium ประกอบด้วย $(NH_4)_2SO_4$ 1.3% (w/v), KH_2PO_4 0.9% (w/v), K_2HPO_4 0.6% (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.2% (w/v), Yeast extract 0.1% (w/v) และ ฟรุกโตส 2% (w/v)

ปัจจัยแรกที่ทำการศึกษาคือ ปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปส ซึ่งทำการแปรผันปริมาณของฟรุกโตสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนตั้งแต่ 1%, 2% และ 3% (w/v) โดยควบคุมภาวะต่างๆ ให้คงที่ เช่น ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เป็นแหล่งไนโตรเจนมีความเข้มข้น 0.13% (w/v), อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm., อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อุณหภูมิในระหว่างการทดลองเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส, ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 และปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ใช้เท่ากับ 1% (v/v) พบว่าการเจริญของเชื้อจะเพิ่มขึ้นตามลำดับ โดยที่การเจริญของเชื้อที่ความเข้มข้นของฟรุกโตสต่างๆ จะมีค่าใกล้เคียงกัน แต่ที่ความเข้มข้นของฟรุกโตสเท่ากับ 1% (w/v) การเจริญของเชื้อจะมีค่าต่ำที่สุด ในขณะที่เชื้อจะมีการเจริญมากที่สุดเมื่อความเข้มข้นของฟรุกโตสเท่ากับ 2% (w/v) และเมื่อพิจารณาถึงการผลิตไลเปสที่ชั่วโมงที่ 48 พบว่าที่ปริมาณ ฟรุกโตสเท่ากับ 2% (w/v) จะมีการผลิตไลเปสได้สูงที่สุดคือ 938.40 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเพิ่มปริมาณฟรุกโตสให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 3% (w/v) พบว่าการผลิตไลเปสจะลดลงแม้จะมีการเจริญใกล้เคียงกับที่ 2% ก็ตาม อาจเป็นเพราะว่าฟรุกโตสสามารถเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิสได้มากทำให้ acetyl CoA และ Citrate ในเซลล์สูงไปด้วย เป็นสัญญาณให้เกิด Fatty acid synthesis และไปยับยั้งการผลิตไลเปส (Stryer, 1988) ในขณะที่ความเข้มข้นของฟรุกโตส 2% (w/v) มีการผลิตไลเปสได้ดีที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะฟรุกโตสที่ความเข้มข้นต่ำจะสามารถเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิสได้น้อยส่งผลให้ปริมาณของ acetyl CoA และ Citrate ในเซลล์ต่ำไปด้วย ซึ่งเป็นสัญญาณให้เกิด Fatty acid degradation เพื่อผลิตพลังงานและ Carbon Skeleton แก่เซลล์เพื่อนำไปใช้ในการสร้างส่วนประกอบของเซลล์และใช้ในการเจริญ ดังนั้นการให้ฟรุกโตสความเข้มข้นต่ำเป็นแหล่งคาร์บอนเดียวจึงเป็นการกระตุ้นให้เซลล์ผลิตไลเปสซึ่งเป็นเอนไซม์ในระบบ Fatty acid degradation ได้ นอกจากนี้การให้ปริมาณฟรุกโตสที่เหมาะสมยังกระตุ้นให้เกิด

การสังเคราะห์เอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันกับคาร์โบไฮเดรทได้ โดยมีรายงานว่าไลเปสจาก *Candida cylindracea* กระตุ้นการสังเคราะห์เอสเทอร์ระหว่างกรดไขมันกับฟรุกโตสได้ (Seino, 1984) ดังนั้นถ้าเกิดเอสเทอร์ระหว่างฟรุกโตสและกรด ไขมันขึ้น จะทำให้กรดไขมันซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากการย่อยของไลเปสถูกดึงออกจากระบบเพื่อไปสร้างเป็นเอสเทอร์จึงเป็นการกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาของไลเปสให้สร้างกรดไขมันเพิ่มขึ้น และในอาหารที่มีฟรุกโตสเข้มข้น 2% (w/v) ก็อาจเป็นสัดส่วนที่เหมาะสมในการเกิดเอสเทอร์จึงกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยาของไลเปสได้ดีที่สุด

จุลินทรีย์ที่เลี้ยงเพื่อประโยชน์ทางอุตสาหกรรมต่างๆ มีทั้งที่ใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปของสารประกอบอนินทรีย์และสารประกอบอินทรีย์แตกต่างกันไป เช่น Dimitris Papaparaskevas และคณะ (1992) ได้ทำการเลี้ยง *Rhodotorula glutinis* โดยใช้แหล่งชนิดต่างๆ ทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ (แอมโมเนียมคลอไรด์, แอมโมเนียมไนเตรท, แอมโมเนียมฟอสเฟต, แอมโมเนียมซัลเฟต, เคซีน, เปปโตน, ทริปโตน, ยูเรีย และ สารสกัดจากยีสต์) พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 1% (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อจะสามารถผลิตไลเปสได้ดีที่สุด (1.8 ยูนิต/มิลลิลิตร)โดยที่เชื้อจะนำแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อไปใช้เพื่อสร้างกรดอะมิโนเริ่มต้น, กรดนิวคลีอิก, โปรตีน และส่วนประกอบของผนังเซลล์ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้เป็น 0.05, 0.13, 0.25 และ 0.50% (w/v) พบว่าการเจริญของเชื้อในแต่ละความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตมีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกัน แต่ที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 0.50% (w/v) จะมีการเจริญของเชื้อในช่วง log phase สูงกว่าความเข้มข้นอื่นๆทั้งนี้อาจเป็นเพราะมีความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่มากเพียงพอกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี แต่เมื่อพิจารณาถึงการผลิตไลเปส พบว่าเชื้อจะผลิตไลเปสได้สูงสุดที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 0.13% (w/v) ในขณะที่เมื่อให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.50% (w/v) พบว่าการผลิตไลเปสจะมีค่าลดลง ซึ่งอาจเป็นเพราะปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่มากเกินไปทำให้เกิด Catabolite repression ดังนั้นจึงใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 0.13% (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจนในการทดลองต่อไป

ปริมาณเชื้อตั้งต้นเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญมากต่อการผลิตไลเปสของเชื้อ โดยในการทดลองระดับขวดเขย่าใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1% (v/v) โดยสูตรอาหาร Minimum medium แต่ในระดับถังหมักได้ทำการแปรผันปริมาณเชื้อตั้งต้นเป็น 0.25%, 0.50% และ 1.00% (v/v) พบว่าที่ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น 0.25% (v/v) มีการเจริญของเชื้อสูงสุดเมื่อดูจากค่า OD_{600} แต่เมื่อพิจารณาถึงการผลิตไลเปสแล้วพบว่าที่ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น 0.50% (v/v) จะมีการ

ผลิตไลเปสมากที่สุด ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าปริมาณของเชื้อและปริมาณสารอาหารที่ให้มีความเหมาะสมกันสำหรับการผลิตไลเปส ซึ่งถ้าให้ปริมาณของเชื้อตั้งต้นมากเกินไปจะทำให้เชื้อไม่สามารถรับสารอาหารได้ในปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญและการนำสารอาหารนั้นไปสร้างเป็นสารผลิตภัณฑ์ก็จะน้อยลงไปด้วย ในขณะที่เมื่อให้ปริมาณเชื้อตั้งต้นน้อยเกินไปจะทำให้เชื้อได้รับสารอาหารอย่างเต็มที่จึงมีการเจริญของเชื้อสูงที่สุด แต่เมื่อพิจารณาถึงธรรมชาติของเชื้อที่จะผลิตไลเปสเมื่ออยู่ในภาวะกึ่งอดอาหารแล้วจะพบว่าที่ปริมาณเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 0.25% (v/v) เชื้อสามารถได้รับสารอาหารอย่างเต็มที่ จึงทำให้มีการผลิตไลเปสได้ไม่มากเท่าที่ควร

ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมักผสมเป็นเนื้อเดียวกันอย่างสม่ำเสมอ จุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ ทำให้เชื้อมีการเจริญและมีการผลิตเอนไซม์ได้ดีคือ อัตราการเร็วในการกวนและอัตราการให้อากาศ โดยเริ่มจากการแปรผันอัตราเร็วในการกวนเป็น 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที (rpm.) พบว่าที่ความเร็วในการกวนเท่ากับ 300 รอบต่อนาที เชื้อมีการเจริญสูงสุด อาจเนื่องมาจากการผสมของสารอาหารเป็นเนื้อเดียวกันและต่อเนื่องทำให้อากาศมีฟองเล็กและมีพื้นที่ผิวมาก ซึ่งทำให้เชื้อได้รับอาหารอย่างเต็มที่ทำให้มีการเจริญเติบโตได้ดี แต่เมื่อพิจารณาถึงการผลิตไลเปส พบว่าที่ความเร็วในการกวนเท่ากับ 250 รอบต่อนาที เชื้อสามารถผลิตไลเปสได้สูงที่สุด แต่ที่ความเร็วในการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที พบว่าเชื้อไม่สามารถผลิตไลเปสได้สูงเท่าที่ควร ซึ่งเป็นเพราะที่อัตราเร็วในการกวนช้าทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อผสมกันไม่สม่ำเสมอ และการตีฟองอากาศไม่สามารถกระจายตัวในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีเท่าที่ควรจึงทำให้เชื้อไม่สามารถได้รับออกซิเจนในปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ ส่วนเหตุผลที่เมื่อปรับอัตราเร็วในการกวนให้เท่ากับ 300 รอบต่อนาที แต่มีการผลิตเอนไซม์ได้ไม่ดีเท่าเมื่อให้อัตราเร็วในการกวนเป็น 250 รอบต่อนาทีนั้น อาจเนื่องมาจากที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที เชื้อสามารถได้รับสารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอน, แหล่งไนโตรเจนรวมทั้งอากาศได้มากที่สุด เชื้อจึงนำสารอาหารเหล่านั้นไปใช้ในการเจริญมากกว่าซึ่งสังเกตได้จากค่า OD_{600} ที่สูงที่สุด จึงทำให้มีการนำเอาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนมาใช้ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ได้ไม่มากเท่าที่ควร

อีกปัจจัยหนึ่งที่ควรพิจารณาควบคู่ไปกับการอัตราการกวนคืออัตราการให้อากาศ ซึ่งทำการแปรผันเป็น 0.5 vvm, 1.0 vvm และ 1.5 vvm พบว่าแม้ที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm จะมีการเจริญของเชื้อสูงที่สุด แต่ว่าเมื่อพิจารณาการผลิตไลเปส พบว่าที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm มีการผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดและที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm มีการผลิตไลเปสได้ต่ำที่สุด ซึ่งคล้ายกับการทดลองของ Lazic และคณะ (1993) ที่กล่าวว่าเมื่อให้อากาศมาก

เกินปริมาณที่เหมาะสมจะทำให้เชื้อสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้น้อยลง แต่กลับมีการเจริญที่มากขึ้น และในขณะเดียวกัน Chan และคณะ (1999) ได้ทำการเลี้ยง *Acinetobactor radioresistens* เพื่อผลิตไลเปสพบว่า ที่ภาวะการให้อากาศ 1.0 vvm และ 1.5vvm นั้น การให้อากาศ 1.5 vvm สามารถผลิตไลเปสได้เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และ Chan ยังกล่าวเพิ่มอีกว่าอัตราเร็วในการกวน (Agitation) จะมีผลต่อการผลิตไลเปสได้มากกว่าอัตราการให้อากาศ (Aeration) เพราะอัตราเร็วในการกวนมีผลต่อค่าอัตราการส่งผ่านออกซิเจน (Rate of Oxygen Transfer) มากกว่าอัตราการให้อากาศ โดยสามารถดูได้จากสมการของ Van't Riet (1979)

$$K_La = 0.002 (P_m/ V)^{0.7} v_s^{0.2}$$

โดยที่ K_La คือ Rate of oxygen transfer

P_m คือ Power dissipated by impeller

V คือ Liquid volume

v_s คือ Superficial gas velocity

จะเห็นได้ว่าเทอมของอัตราการกวนคือ (P_m/ V) นั้นมีอิทธิพลต่อการส่งผ่านออกซิเจนมากกว่า เทอมของการให้อากาศ (v_s) ซึ่งจากการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm. และอัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 รอบต่อนาที เป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการละลายของออกซิเจนและการผสมของสารอาหารในถังหมักจึงทำให้เชื้อสามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Moon และ Parulekar (1991) พบว่าการที่จะทำให้เซลล์สังเคราะห์ผลิตภัณฑ์มากจะต้องลดปริมาณการให้ออกซิเจนลงให้เหมาะสม

การเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อเป็นผลที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมีภายในเซลล์ซึ่งก็คล้ายกับปฏิกิริยาเคมีทั่วๆ ไปที่อุณหภูมิมักมีส่วนสำคัญต่อการเกิดปฏิกิริยา การเจริญและการตายของจุลินทรีย์ก็เช่นเดียวกัน ซึ่งการเจริญของจุลินทรีย์แบ่งตามอุณหภูมิได้ 3 แบบด้วยกันคือ Psychrophilic เป็นจุลินทรีย์พวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส, Mesophilic เป็นจุลินทรีย์พวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นประเภทเดียวกันกับที่ใช้ในการทดลองนี้ และ Thermophilic เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสขึ้นไป จากการเลี้ยงเชื้อในถังหมักนั้นพบว่าที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส การเจริญเติบโตของเชื้อใกล้เคียงกัน แต่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อจะมีการเจริญสูงกว่าเล็กน้อย และเมื่อพิจารณาถึงการผลิตไลเปสก็ยังพบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสยังเป็นอุณหภูมิที่ดีที่สุดในการ

ผลิตเอนไซม์ของเชื้อซึ่งอาจเนื่องมาจากเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อและการผลิตเอนไซม์ ส่วนที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียสนั้นเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ออกมาได้น้อยมาก ซึ่งเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิเลยจุดที่เหมาะสม (Optimum temperature) อัตราการเจริญของเชื้อจะลดลงอย่างรวดเร็วซึ่งสามารถอธิบายสาเหตุได้จากสมการความสัมพันธ์ของ Arrhenius ดังนี้

$$\mu = A^{\circ} e^{-Ea/RT}$$

$$\alpha = A^{\circ} e^{-E'a/RT}$$

เมื่อเราให้ μ คือ Specific growth rate, α คือ Specific death rate, A° เป็นค่าคงที่, E_a และ E'_a คือ Activation energies, R คือ gas constant (R = 1.98 cal/mol-K°) และ T คือ อุณหภูมิมีหน่วยเป็น เคลวิน (K°) ซึ่งค่า Activation energies (E_a) สำหรับการเจริญมีค่าประมาณ 15-20 kcal/mol และสำหรับอัตราการตายมีค่าประมาณ 60-70 kcal/mol ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิเพียงเล็กน้อยจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ จะส่งผลต่อค่าอัตราการตายของเชื้ออย่างรวดเร็ว ในขณะเดียวกันอุณหภูมิก็ส่งผลต่อผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากจุลินทรีย์ในลักษณะคล้ายๆกับการเจริญของจุลินทรีย์เช่นกัน ในขณะเดียวกันอุณหภูมิยังส่งผลต่อปัจจัยอื่นๆของเซลล์ด้วย เช่น อุณหภูมิจะส่งผลต่อการแพร่ของสารอาหารเข้า-ออกเซลล์ ในกรณีที่อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม การดูดซึมสารอาหารของจุลินทรีย์อาจทำได้ไม่ดีเท่าที่ควร และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นจะพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของอัตราการใช้แหล่งคาร์บอนเป็นพลังงาน ทำให้มีการเจริญและสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้เพิ่มมากขึ้น

สภาพความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อก็มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และการผลิตเอนไซม์ ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อนั้นผลิตภัณฑ์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นจากเมตาโบลิซึม อาจมีผลไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ได้ ในกรณีศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์มักมีปัญหาเกี่ยวกับการควบคุม pH และมักไม่อาจทำให้ pH เป็นปัจจัยที่คงที่ได้ เพื่อหลีกเลี่ยงการเปลี่ยนแปลง pH จึงจำเป็นต้องควบคุม pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดการทดลอง ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาผลของ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเมื่อควบคุม pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 7.0 จะมีการเจริญเติบโตสูงสุด และที่ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.0 จะมีการ

เจริญของเชื้อน้อยที่สุดซึ่งอาจเป็น pH ที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ ส่วนที่ pH เท่ากับ 6.0 นั้น เชื้อสามารถเจริญได้ใกล้เคียงกับที่ pH เท่ากับ 7.0 เมื่อพิจารณาถึงการผลิตไลเปสพบว่าที่ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เชื้อสามารถผลิตไลเปสได้สูงที่สุดซึ่งอาจเป็นเพราะ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์และการขนส่งของสารต่างๆ ผ่านเซลล์เมมเบรน การแปรผันของ pH นั้นมีผลต่อสมดุลย์กรด-ด่าง มีผลต่อสรีรวิทยาเฉพาะบางอย่างของจุลินทรีย์ได้อีกด้วย (สุพจน์ ใช้เทียมวงศ์, 2530) และเป็นสภาวะที่ใกล้เคียงกับแหล่งที่อาศัยของเชื้อซึ่งแยกมาจากดินในบ่อเลี้ยงกุ้ง

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนนั้นสามารถทำได้หลายวิธีด้วยกันแล้วแต่ความเหมาะสมของการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์เช่น การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต, การdialysis, การตกตะกอนด้วยเอทานอล, การกรองด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชั่น เป็นต้น แต่ในการทดลองนี้ได้ทำการทดลองโดยใช้วิธีอัลตราฟิลเตรชั่น เพราะเป็นวิธีที่สะดวก ไม่ยุ่งยากซับซ้อนและใช้เวลาน้อยที่สุด อีกทั้งยังได้แอคติวิตีของเอนไซม์ไม่น้อยจนเกินไป พบว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะหลังจากทำการอัลตราฟิวเตรชั่นแล้วนำไปทำให้เป็นผงด้วยวิธี Lyophilization นำเอนไซม์ผงที่ได้มาหาแอคติวิตีได้เท่ากับ 98.04 ยูนิตต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ และมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.05 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิกรัมเอนไซม์ มีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 1,960.80 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.36 เท่าเท่านั้น เพราะเป็นการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เพียงขั้นตอนเดียวกันเท่านั้นแต่ถ้าต้องการให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นควรนำเอนไซม์ไปผ่านขั้นตอนของการตกตะกอนด้วยเอทานอลหรือเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตหลังจากกรองด้วยอัลตราฟิลเตรชั่นแล้ว ซึ่งจะทำให้ได้เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นได้

จากการทดลองหาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* ในถังหมักขนาด 5 ลิตรแบบไม่ต่อเนื่อง การผลิตเอนไซม์นั้นถ้าเปรียบเทียบแอคติวิตีกับการทดลองของรักชนก ธีรกวินสกุล (2539) แล้วจะพบว่าการผลิตเอนไซม์โดยใช้ถังหมักจะมีค่าแอคติวิตีสูงกว่ามาก เนื่องมาจากในถังหมักมีการให้อากาศและมีการกวนในอัตราเร็วที่เหมาะสมทำให้เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีอีกทั้งยังผลิตเอนไซม์ได้มาก ซึ่งเมื่อเทียบกับระดับขวดเขย่าแล้วปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ในขวดเขย่านั้นจะลดลงเรื่อยๆ จนไม่เพียงพอต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ รวมไปถึงการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างในขวดเขย่าไม่สามารถทำได้ดี แต่ในถังหมักสามารถควบคุมความเป็นกรด-ด่างได้ตลอดระยะเวลาการหมักจะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อคงที่อยู่เสมอ ซึ่งจะทำให้การส่งผ่านของสารอาหารเข้าออกเซลล์เป็นไปได้อย่างคงที่ จากการทดลองพบว่าระดับขวดเขย่าเชื้อสามารถผลิตไลเปสให้แอคติวิตีเท่ากับ 40 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วน

ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรเชื้อสามารถผลิตไลเปสได้สูงถึง 245.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตรแสดงให้เห็นว่าการผลิตไลเปสในระดับถังหมักมีประสิทธิภาพในการช่วยเพิ่มทั้งผลผลิตคือเอนไซม์ให้มีมากขึ้นด้วย ในขณะที่ภาวะเหมาะสมในระดับถังหมักก็ไม่ได้แตกต่างจากภาวะเหมาะสมในระดับขวดเขย่าไปมากนัก ดังแสดงใน ตารางที่ 6

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบปัจจัยที่ศึกษาในระดับขวดเขย่า 1,000 มล. และในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ปัจจัยที่ศึกษา	ระดับขวดเขย่า*	ระดับถังหมัก 5 ลิตร**
ปริมาตรอาหาร (ml)	250	4,000
ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (%v/v)	3.0	0.5
อัตราการให้อากาศ (vvm)	-	1.0
อัตราเร็วในการกวน (rpm)	250	250
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	7.0 (ไม่ควบคุม)	7.0 (ควบคุม)
อุณหภูมิในการเลี้ยง ($^{\circ}$C)	37	37
ปริมาณแหล่งคาร์บอน (% w/v)	2	2
ปริมาณแหล่งไนโตรเจน (% w/v)	0.13	0.13
ไลเปสแอคติวิตี (U/ml)	40.0	245.1
Total activity (U)	1.0×10^4	9.8×10^5

*(รักชนก, 2539)

**(อังคาร, 2544)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากงานวิจัยทั้งหมดนี้ถ้าเรานำมาคำนวณต้นทุนการผลิตไลเปสพบว่าในระดับถังหมักจะถูกกว่าในระดับขวดเขย่า เมื่อพิจารณาจากปริมาณวัตถุดิบและปริมาณเชื้อที่ใช้ ค่าใช้จ่ายในการผลิตในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรแบบไม่ต่อเนื่อง โดยมีปริมาตรน้ำหมัก 4 ลิตรต่อการหมัก 1 ครั้ง แสดงดังตารางที่ 7 และได้แสดงการเปรียบเทียบราคาต่อหน่วยระหว่างไลเปสผงที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* กับไลเปสผงของบริษัท SIGMA ที่ผลิตจาก *Pseudomonas cepacia* ดัง ตารางที่ 8

ตารางที่ 7 ต้นทุนของการผลิตต่อสเกล

Cost Element	*Cost*
Medium (บาท)	205
ค่าไฟฟ้าและสาธารณูปโภค (บาท)	1,075
Total cost (บาท)	1,280
Enzyme yield per batch* (Unit)	$3.9*10^5$
Unit cost (U/บาท)	306.375

*ปริมาตรรวม 4 ลิตร

ตารางที่ 8 การเปรียบเทียบราคาต่อหน่วยระหว่างไลเปสผงที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* กับไลเปสผงของบริษัท SIGMA ที่ผลิตจาก *Pseudomonas cepacia*

	งานวิจัยนี้	*ผลิตโดยบริษัท SIGMA*
แบคทีเรีย	*P. aeruginosa*	*P. cepacia*
*แอคติวิตีของเอนไซม์ (ยูนิต/กรัม)	3,266	50
ราคา (บาท)	1,280	13,700
Unit cost (ยูนิต/บาท)	2.552	0.003

*Unit definition คือ 1 ยูนิตของเอนไซม์สามารถผลิต 1 ไมโครโมลกลีเซอรอลจากการย่อยไตรกลีเซอไรด์ ภายในเวลา 1 นาที ที่ภาวะเหมาะสมของแต่ละเอนไซม์ (pH 6.5, อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สำหรับ *P. aeruginosa* และ pH 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับ *P. cepacia*)

เมื่อคิดมูลค่าของเอนไซม์ที่ผลิตได้จาก *Pseudomonas aeruginosa* ในเชิงการค้าแล้ว พบว่ามีต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูง ในขณะเดียวกันเราสามารถปรับราคาต้นทุนให้ต่ำลงกว่านี้ได้อีก เพราะในการทดลองนี้มีการใช้ D-fructose ที่จัดเป็นสารเคมีประเภทใช้ทดลองในห้องปฏิบัติการ (Lab grade) จึงทำให้มีต้นทุนสูง ไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม ถ้าต้องการจะผลิตในเชิงพานิชย์อาจต้องมีการทดลองเพื่อเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเป็นการลดต้นทุนลง ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่ใช้อาจเป็นน้ำตาลฟรุกโตสที่ผลิตในอุตสาหกรรมซึ่งมีราคาถูกกว่า lab grade

จากผลการทดลองการกำจัดสิ่งสกปรกบนเส้นใยฝ้ายโดยเปรียบเทียบการใช้คอสติกโซดากับการใช้เอนไซม์ในการกำจัดสิ่งสกปรก พบว่าเมื่อใช้คอสติกโซดาเพื่อการกำจัดสิ่งสกปรกโดยกระทำที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ซึ่งการต้มสารละลายนี้ทั้งน้ำ สารช่วยเปียก (Surfactant) และด่างจะช่วยกันทำงาน กล่าวคือ สารช่วยเปียกจะเป็นตัวลดแรงตึงผิวระหว่างน้ำกับเส้นใย ทำให้น้ำซึ่งมีสารละลายด่างอยู่ด้วยสามารถนำด่างเข้าไปทำปฏิกิริยาบริเวณเส้นใยและไขมันในเส้นใยก็จะถูกละลายออกมากับน้ำ ในขณะเดียวกันสารช่วยเปียกจะทำหน้าที่กระจายไขมันที่ละลายออกมารวมทั้งสิ่งสกปรกอื่นๆ ด้วยให้กระจายตัวหลุดลอยไปกับน้ำมีผลทำให้ผ้าสามารถดูดซับน้ำได้ทันทีเมื่อหยดน้ำลงไป ซึ่งถือเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมในการที่จะนำผ้าไปเข้าสู่กระบวนการฟอกและย้อมสีต่อไป ในส่วนของการนำเอนไซม์มาใช้กำจัดสิ่งสกปรกบนผ้าดิบ พบว่าทั้งเซลลูเลส ไลเปส และโปรตีเอส ถ้าเลือกใช้เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งในการกำจัดสิ่งสกปรกแล้ว จะไม่สามารถทำให้ผ้ามีคุณสมบัติของการดูดซับน้ำได้ดีขึ้นเลย ทั้งนี้ในส่วนของเซลลูเลสนั้นเซลลูเลสไม่สามารถแทรกผ่านชั้น cutin เข้าทำปฏิกิริยากับเส้นใยได้ ในขณะที่ไลเปสสามารถกำจัดสารประกอบจำพวกไขมันได้แต่ไม่สามารถกำจัดสารประกอบจำพวกโปรตีนบางส่วนบนผิวของเส้นใยให้หลุดออกไปได้ และโปรตีเอสก็ทำหน้าที่ในการย่อยสารประเภทโปรตีน แต่ไม่สามารถย่อยไขมันที่เคลือบอยู่บนผิวของเส้นใยได้ ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองนำเอนไซม์ทั้งสามชนิดมาทำงานร่วมกันโดยเริ่มจากการทดลองกับเอนไซม์ที่มีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์ แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนคือ ขั้นแรกเป็นการใช้ไลเปสจาก Porcine Pancreas โปรตีเอสจาก *Aspergillus oryzae* ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดคอยทำหน้าที่ในการย่อยไขมันและโปรตีนที่เคลือบอยู่บนผิวของเส้นใยตามลำดับ และหลังจากหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำร้อนแล้วจึงต่อด้วยการใช้เซลลูเลสที่ผลิตจาก *Aspergillus niger* เพื่อเข้าทำปฏิกิริยากับเส้นใย ทำให้เส้นใยมีความอ่อนตัวและช่วยเพิ่มช่องว่างระหว่างเส้นใยให้เพิ่มมากขึ้น ทำให้ผ้าสามารถดูดซับน้ำได้ทันทีในการทดสอบความสามารถในการดูดซับ ในขณะเดียวกันก็ได้ทำการทดลองกับเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นเองโดยการใช้ไลเปสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ร่วมกับการทำงานของโปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 และเซลลูเลสจาก

Trichoderma reesei นั้น พบว่าสามารถช่วยให้ผ้าฝ้ายดิบมีความสามารถในการดูดซับน้ำได้ภายใน 3 วินาที ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากสาเหตุที่เอนไซม์ที่ผลิตขึ้นเองมีแอคติวิตีของเอนไซม์น้อยกว่าเอนไซม์ที่ใช้ในเชิงพาณิชย์ แต่ถึงแม้ประสิทธิภาพในการดูดซับของเหลวจะช้ากว่าการดูดซับของเหลวเมื่อใช้คอสติกโซดาและเอนไซม์ทางการค้าก็ตามแต่ผลที่ได้สามารถยอมรับได้ว่าสามารถทำให้ผ้าดิบที่ผ่านกระบวนการกำจัดสิ่งสกปรกมาแล้วดูดซับน้ำได้ดีพอที่จะนำไปผ่านเข้าสู่กระบวนการต่อไป เอนไซม์แต่ละชนิดก็ทำหน้าที่ในการย่อยสารประกอบต่างๆ ที่เคลือบอยู่บนผิวเส้นใย ในส่วนของ ไลเปสนั้นจะทำหน้าที่ในการย่อยสารประกอบประเภทขี้ผึ้ง (wax) ซึ่งมีปริมาณ 0.6% ของน้ำหนักผ้าดิบ สารประกอบประเภทขี้ผึ้งประกอบไปด้วย กลีเซอไรด์ (glyceride), ไฮโดรคาร์บอนบางชนิด (n-hentriacontane และ n-dotriacontane) (Knecht และ Allan, 1911) และกรดไขมัน (palmitic acid, strearic acid, carnaubic acid, gossypic acid, geddic acid และ oleic acid) แต่กรดไขมันส่วนใหญ่จะเป็น palmitic acid (C_{16}) และ stearic acid (C_{18}) (Tulloch, 1976) ซึ่งไลเปสจะเข้าทำปฏิกิริยาตรงตำแหน่งที่จับกันอยู่ด้วยพันธะ Hydroxy fatty acid ของกรดไขมันแต่ละชนิด (Kolattukudy, 1975) ทำให้สารเคลือบผิวบนเส้นใยหลุดออกและโมเลกุลของน้ำและเอนไซม์ชนิดอื่นๆที่ทำงานร่วมกันสามารถแทรกเข้าไปทำปฏิกิริยาระหว่างเส้นใยของฝ้ายได้ จากประโยชน์ของการทำงานร่วมกันของเอนไซม์แต่ละชนิดนี้เองที่น่าจะเป็นก้าวใหม่ของการประยุกต์ใช้ความรู้ด้านเอนไซม์เข้ามามีบทบาทในอุตสาหกรรมสิ่งทอเพื่อมีส่วนช่วยปริมาณและปัญหามลภาวะในน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมสิ่งทอลงเป็นอย่างมาก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลอง

1. ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa* ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่องในอาหารสูตร minimum medium โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5% (v/v), ปริมาณฟรุกโตสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน 2% (w/v), ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน 0.13% (w/v), อัตราเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที, อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm, อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส, ควบคุมความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เชื้อสามารถผลิตไลเปสแอคติวิตีสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 มีแอคติวิตี 254.01 ยูนิต/มิลลิลิตร

2. ไลเปสผงที่ผลิตได้มีแอคติวิตี 98,040 ยูนิตต่อกรัมเอนไซม์ มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.36 เท่า และสามารถเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่อุณหภูมิ 4°ซ เป็นเวลา 30 วันโดยไม่สูญเสียแอคติวิตี

3. ไลเปสผงที่ผลิตได้ถูกนำไปใช้ในการกำจัดสิ่งสกปรกบนเส้นใยฝ้ายร่วมกับโปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 และ เซลลูเลสจาก *Trichoderma reesei* พบว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดสิ่งสกปรกได้ใกล้เคียงกับเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตในเชิงการค้า คือสามารถทำให้ผ้าดูดซึมน้ำได้ดีพอที่จะผ่านเข้าสู่กระบวนการต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

หนังสือ

ทนง ภัครัชพันธ์.เอนไซม์ในอุตสาหกรรม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์:,2522.

สุพจน์ ใช้เทียมวงศ์. เทคโนโลยีการหมัก. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง. 2530.

Derewenda, Z.S., Structure and Function of Lipases. Advances in Protein Chemical. New York: Academic Press. Inc, 1994.

Macrae, A.R. In Willium M. Forgarty. Extracellular Microbial Lipase. Microbial enzyme and biotechnology. New York: Applied Science Publishers, 1983.

Stuer, I. Entry of Fructose and Galactose into Glycolysis. Biochemistry, 3rd ed., New York: W.H. Freeman and Company, 1988.

Technical Manual of the American Association of Textile Chemists and Colorists. Research Triangle Park, USA, 1989.

บทความในหนังสือ

Aisaka, K and Terada, O. Extracellular Microbial Lipase. In Macrae A., Microbial Enzyme and Biotechnology, 228. New York: Applied Science Publishers, 1983.

Bezborodov, A.M.; Davranov, K.D. and Akhmedova. Lipase Inhibitor in *Rhizopus Microsporus* cultures. In F.E.M.S. symposium 23, Kuleav, I.S.; Dawes, E.A. and Tempest, D.W. (eds.), Environ. Regul. Microb. Metab.145-149. London: Academic Press. 1985.

Iwai, M.; Tsujisaka, Y.; Okamoto,Y. and Fugumoto, J. In Macrae A., Microbial Enzyme And Biotechnology, 228. New York: Applied Science Publishers, 1983.

Knecht, E. and Allan, J. In A.H. Warth (ed.), The Chemistry and Technology of Waxes, 203-207. New York: Reinhold Publishing Corporation, 1956.

Kolattukudy, P.E, Biochemistry of Cutin, Suberin and Waxes the Lipid Barrier on Plants. In: Galliand, T. and Mercer, E.I. (eds), Recent Advances in the Chemistry and Biochemistry of Plants Lipid. 203-246, New York, Academic Press. 1975.

Kosugi, Y. and Kamibayashi, A. In Macrae A., Microbial Enzyme and Biotechnology, 228. New York: Applied Science Publishers, 1983.

Shihani, K.M. In G. Reed (ed.), Lipases and Esterases. Enzyme in Food Processing. 2nd ed, New York, Academic Press, 1975.

Sugihara, A. and Isobe, M. In Macrae A., Microbial Enzyme and Biotechnology, 228. New York: Applied Science Publishers, 1983.

Tulloch, A.P. Chemistry of Waxes of Higher Plants. In: Kolattukudy P.E. (ed.) Chemistry and Biochemistry of Natural Waxes. 235-287. Amsterdam: Elsevier, 1976.

Vulfson, E.N. Industrial Application of Lipases. In: Woolley, P. and Petersen, S. (eds.) Lipases-Their Structure, Biochemistry and Application. 273. Melbourne: Cambridge University Press, 1994.

บทความในวารสาร

Arbige, M.V. AND Pitcher, W.H. Industrial Enzymology: A Look Toward the Future. Trends. Biotech. 7(1989): 330-335.

Arnold, R.G., Shahani, R.M. and Dwivedi, B.K. Application of Lipolytic Enzymes to Flavor Development in Dairy Products. J.Dairy Sci. 58(1975): 1127-1143.

Batenberg, A.M.; Egmond, M.R.; Frenken, L.G.J. and Verrips, C.T. Enzymes and Enzymatic. Detergent Compositions. European Patent Application EP 0407225. 1991.

Bernlohr, W.R. Postlogarithmic Phase Metabolism of Sporulating Microorganism I. Protease of Bacillus licheniformis. J. Biol. Chem. 239(1964): 538-543.

Borgstrom, B. and Erlanson, C. Pancreatic Lipase and Colipase: Interaction and Effect of Bile Salts and Other Detergents. Eur. J. Biochem., 37 (1973): 60-68.

Buchert, J.; Pere, J.; Arja, P. and Nousiainen, P. Scouring of Cotton with Pectinases, Proteases and Lipases. Textile Chemist and Colorist & American Dyestuff Reporter. 32 (2000): 48-52.

Chapman, G.W. Jr. A Proteinaceous Competitive Inhibitor of Lipase Isolated from *Heilianthus* Seeds. Phytochemistry. 26 (1987): 3127-3131.

Chartrain, M., et al. Enhancement of Lipase Production During Fed-Batch Cultivation of *Pseudomonas aeruginosa* MB5001. J.Ferment. Bioeng. 76 (1993): 487-492.

Chen, J.Y.; Wen, C.M. and Chen, T.L. Effect of Oxygen Transfer on Lipase Production by *Acinetobacter radioresistens*. Biotech. Bioeng. 62 (FEB 1999): 3.

Dalmau, E.; Montesinos, J.L.; Lotti, M. and Casas, C. Effect of Different Carbon Source on Lipase Production by *Candida rugosa*. Enz. Microbial. Technol. 26 (2000): 657-663.

Dempsey, A.C. and Kitting, C.L. Characterizations of a Bacteria Isolated from Penaeid Shrimp. Crustaceana. 52 (1987): 90-94.

Doi, J.W. Rule of Protease in Sporulation. Current Topic in Cellular Regulation. 7 (1973): 1-20.

Estell, D.A.; Graycar, T.P. and Wells, J.A. Engineering an Enzyme to be Resistant to Chemical Oxidation. J.Biol.Chem. 260 (1985): 6518-6521.

Estell, D.A. and Wells, J.A. Modified Enzymes and Methods for Marking Same. US Patent 4760025. 1988.

Falch, E.A. Industrial Enzymes – Developments in Production and Application. Biotech. Advan. 9(1991): 643-658.

Fedrikson, G.; Stralfors, P.; Nisson, N.O. and Belfrage, P. Hormone Sensitive Lipase of Rat Adipose Tissue: Purification and Some Properties. J. Biol. Chem. 256 (1981): 6311- 6320.

Gilbert, E.J., Cornish, A. and Jones, C.W. Purification and Properties of Extracellular Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2. J.Gen. Microbiology. 137 (1991): 2223-2229.

Gilbert, E.J., Drozd, J.W. and Jones, C.W. Physiological Regulation and Optimization of Lipase Activity in *Pseudomonas aeruginosa* EF2. J. Gen. Microbiol. 137 (1991): 2215-2221.

Gordillo, M.A.; Sanz, A.; Sanchez, A.; Valero, F.; Montesinos, J.L. and Lafuente, J. Enhancement of *Candida rugosa* Lipase Production by Using Different Control Fed-Batch Operation Strategies. Biotechnol. Bioeng. 60 (1998): 156-168.

Gormsen, E. and Malmos, H. A New Lipase for the Detergent Industry. Household and Personal Products Industry (happi). October 1991: 122-125.

Gray, G., Power, S. and Poulose, A.J. Novel Hydrolase and Method of Production. European Patent Application EP0268452. 1988.

Hartzell, M.M. and Hsieh, Y.L. Enzymatic Scouring to Improve Cotton Fabric Wettability. Textile. Res. J. 68 (1998): 233-241.

Haya, Y., et. Al. Low Resolution Crystal Structure of Lipase from *Geotrichum candium* (ATCC34614). J. Biochem. 86 (1979): 1821-1827.

Hayakawa, K., Ohara, K. and Satake, I. The Stepwise Conformational Change of poly (L-lysine) in Aqueous Solution of Sodium 1-Octane Sulphate. Chemistry Letter (Chem.Soc Janpan) 1980: 647-635.

Heineken, F.B. and O'Conner, R.J. Continuous Culture Studies on the Biosynthesis of Alkaline Protease, Neutral Protease and α-Amylase by *Bacillus subtilis* NRRL-B3411. J. Gen. Microbiol. 73 (1972): 35-44.

Iwai, M., Tsujisaka, Y. and Fugumoto, J. Studies on Lipase V. Effect of Iron Ions on the *Aspergillus niger* Lipase. J. Gen. Appl. Microbiol. 16 (1970): 81-90.

Kgandopulo, G.B. and Ruben, E.L. Effect of Various Activators and Inhibitors on the Lipase activity of Fungi of the Genus *Geotrichum*. Microbiologiya. 43 (1974): 814-819.

Kiyotani, K.; Tasaka, H.; Tsukiyama, F. and Matsuo, Y. Lipase Activity in Guineapig Peritonal Macrophages and Mycobacterial Lipase Inhibitor. Hiroshima J. Medical Sci. 32 (1983): 267-271.

Kohno, M.; Kugimiya, W.; Hashimoto, Y. and Moriyama, Y. Purification, Characterization and Crystallization of Two Types of Lipase from *Rhizopus niveus*. Biosci. Biotech.Biochem. 58 (1994): 1007-1012.

Kohr, H.T.; Tan, N.H. and Chua, C.L. Lipase-Catalyzed Hydrolysis of Palm Oil. J. Amer. Oil.Chem. Soc. 63 (1986): 538-540.

Kojima,Y.; Yokoe, M. and Mase, T. Purification and Characterization of an Alkaline Lipase from *Pseudomonas fluorescems* AK102. Biosci. Biotech. Biochem. 58 (1994): 1564-1568.

Kokusho, Y.; Machihida, H. and Iwasaka, S. Studies on Alkaline lipase: Isolation and Identification of Lipase Producing Microorganism. Agr.Biol.Chem. 46 (1982): 1159-1164.

Kim, H.K.; Sung, M.H.; Kim, H.M. and Oh, T.K. Occurrence of Thermostable lipase in Thermophilic *Bacillus sp.* Strain 398. Biosci. Biotech. Biochem. 58(1994): 961-962.

Laskowski, M. and Kato, I. Protein Inhibitors of Proteinases. Annu. Rev. Biochem. 49 (1980): 593-626.

Lazic, M.L.; Veljkovic, V.B.; Vucetic, J.I. and Vrvic, M.M. Effect of pH and aeration on dextran production by *Leuconostoc mesenteroides*. Enzyme. Microb. Technol. 15(April 1993): 1546.

Lesuisse, E.; Schanck, K. and Colsen, C. Purification and Preliminary Characterization of the Extracellular Lipase of *Bacillus subtilis* 168, An Extremely Basic pH-Tolerant Enzyme. Eur. J.Biochem. 216 (1993): 155-160.

Li, Y. and Hardin, I.R. Enzymatic Scouring of Cotton: Effect on Structure and Properties. Textile Chemist and Colorist. 29 (1997) 71-76.

Marcin, C.; Katz, L.; Greasham, R. and Chartrian, M. Optimization of Lipase Production by *Pseudomonas aeruginosa* MB5001 in Batch Cultivation. J. Ind. Microbiol. 12 (1993): 29-34.

Momsen, W.E. and Brockman, H.L. Inhibition of Pancreatic Lipase B Activity by Taurodeoxy Colate and Its Reversal by Colipase. J. Biol. Chem. 251 (1976): 384-388.

Moon, S.H. and Parulekar, S.J., A Paramatric Study of Protease in Batch and Fed-Batch Cultures of *Bacillus firmus*. Biotech. Bioeng. 37 (1991): 467-483.

Mori, M.; Yamaguchi, K. and Abe, K. Purification of a Lipoprotein Lipase Inhibiting Protein Produced by a Melanoma Cell Live Associated with Cancer Cachexia. Biochem.Biophy. Res. Commum. 160 (1989): 1085-1092.

Muderhwa, J.M.; Ratomahenina, R.; Pina, M.; Graille, J. and Galzy, P. Purification and Properties of the Lipase from *Candida deformans* (Zach) Langeron and Guerr. JAOCS. 62 (1985) 1031-1036.

Nishio, T.; Chikano, T. and Kamimura, M. Purification and Some Properties of Lipase Produced by *Pseudomonas fragi* 22.39B. Agric. Biol. Chem. 51 (1987): 181-186.

Okumura, S.; Iwai, M. and Tsujisaka, Y. The Effect of Reverse Action on Triglyceride Hydrolysis by Lipase. Agric. Biol.Chem. 45 (1981): 185-189.

Omar, I.C.; Hayashi, M. and Nagai, S. Purification and Some Properties of a Thermostable Lipase from *Humicola lanuginosa* No.3. Agr. Bio. Chem. 51 (1987): 37-45.

Papaparaskevas, D.; Christakopoulos, P.; Kekos, D. and Macris B.J. Optimization Production of Extracellular Lipase from *Rhodotorula glutinis*. Biotech. Lett.14 (1992). 397-402.

Posorske, L.H. Industrial-Scale Application of Enzyme to Fats and Oils Industry. J. Amer. Oil.Soc. 61 (1984): 1758-1760.

Poulose, A.J.; Van Beilen, J.; Power, S.; Shew, B.; Gray, G. and Norton, S. Protein Engineering of a Lipase from *Pseudomonas* sp. Presented at the 81st. Annual meeting of the American Oil Chemists Society. May 1990, Baltimore. Inform, 1 (4), 318.

Roger, R.B. and Bernard, O. Process for the Preparation of Protease Active in Alkaline Medium. US Patent 3. 661,715,1972.

Sebastian, J. and Kolattukudy, P.E. Purification and Characterization of Cutinase from Fluorescent *Pseudomonas putida* Bacterial Strain Isolated from Phyllosphere. Arch.Biochem.Biophys. 263 (1988): 77-85.

Seino, H.; Uchibori, T.; Nishitani, T. and Inamasu, S. Enzymatic Synthesis of Carbohydrate Ester of Fatty Acid (1) Esterification of Sucrose, Glucose, Fructose and Sorbitol. JAOCS. 61 (1984): 1761-1765.

Sugiura, A and Ogiso, T. Studies on Bile-sensitive lipase VII. Effect of Surfactants on *Mucor* Lipase (Studies on enzymes XLVIII). Yakukaku Zasshi. 89 (1969) 1284-1296.

Sugihara, A.; Tani, T. and Tominaga, Y. Purification and Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Bacillus sp.* J.Biochem. 109 (1991): 211-216.

Sugihara, A.; Ueshima, M.; Shimada, Y.; Tsunasawa, S. and Tominaga, T. Purification and Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Pseudomonas cepacia*. J. Biochem. 112 (1992): 598-603.

Suzuki, T.; Mushiga, Y.; Yamane, T. and Shimizu, S. Mass Production of Lipase by Fed-Batch Culture of *Pseudomonas fluorescens*. Appl.Microbiol. Biotechnol. 27 (1988): 417-422.

Toida, J.; Kondoh, K.; Fukuzawa, M.; Onishi, K. and Sekiguchi, J. Purification and Characterization of a Lipase from *Aspergillus oryzae*. Biosci. Biotech. Biochem. 59(1995): 1199-1203.

Tsujisaka, Y.; Iwai, M. and Tominaga, Y. A Comparative Study on Some Properties of Fungal Lipases. Ferment. Technol. Today. 1972. 315-320.

Uyeda, M.; Hirotsu, M.; Itonaga, M.; Urata, S.; Susuki, K. and Shibata, M. Purification and Properties of Lipase Activator Produced by *Streptomyces sp*. Strain No.BR-1381. Agric. Biol. Chem. 47 (1983): 2739-2746.

Van't Riet, K. Review of Measuring Methods and Results in Nonviscous Gas–Liquid Mass Transfer in Stirred Vessels. Ind.Eng. Chem Proc. Des. Dev. 18 (1979): 357-364.

Wang, S. and Huang, A.H.C. Inhibitors of Lipase Activities in Soyabean and Other Oil Seeds. Plant.Physiol. 76 (1984): 929-934.

Wang, Y.J.; Sheu, J.Y.; Wang, E.F. and Shaw, J.F. Lipase-Catalyzed Oil Hydrolysis in the Absence of Added Emulsifier. Biotech. Bioeng. 31 (1988): 628-633.

Watanabe, N.; Ota, Y.; Minoda, Y. and Yamada, K. Isolation and Identification of Alkaline Lipase Production Microorganism, Cultural Condition and Some Properties of Crude Enzyme. Agric. Biol. Chem. 41 (1977): 1353-1358.

Yamaguchi, T.; Muroya, N.; Isobe, M. and Sugiura, M. Production and Properties of Lipase from a Newly Isolated Chromobacterium. Agric. Biol. Chem. 37(1973): 999-1005.

Yamane, T. Enzyme Technology for The Lipids Industry: An Engineering Overview. J.Amer.Oil.Soc. 64 (1987): 1659-1661.

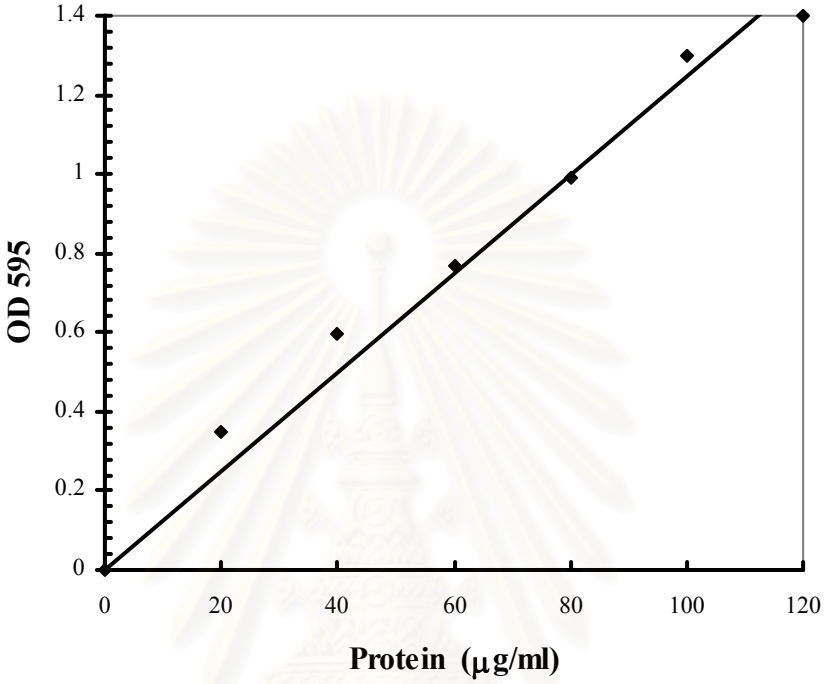
วิทยานิพนธ์

รักชนก ธีรกวินสกุล. การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนและการตรวจสอบลักษณะสมบัติของไลเปสจาก *Pseudomonas aeruginosa*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2539.

วรรณวิมล ทรัพย์ดี.การผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,2540.

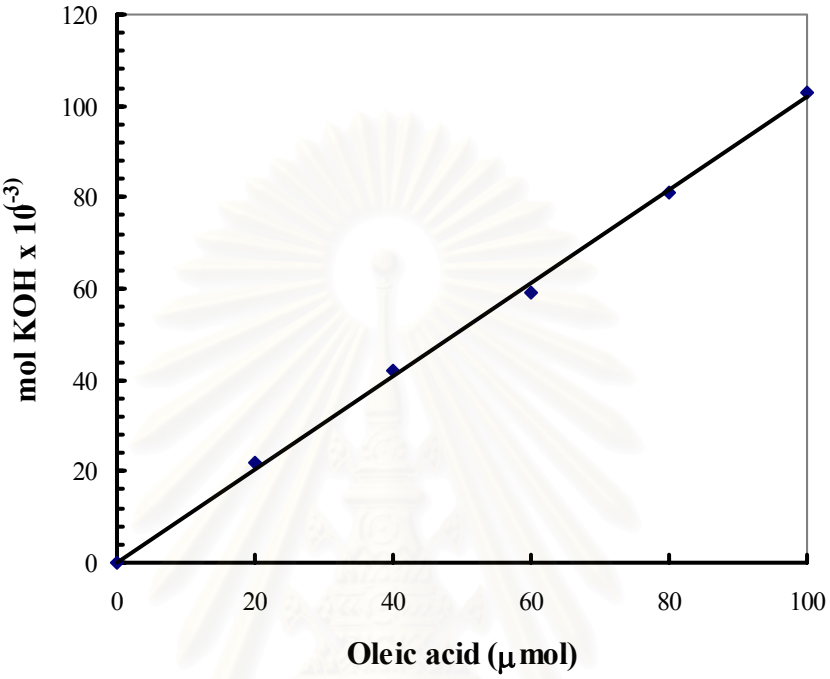
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก



ภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยแบรดฟอร์ด แปรความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐานคือ BSA ในช่วง 0-120 ไมโครกรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานของกรดโอเลอิก แปรผันปริมาณความเข้มข้นตั้งแต่ 0-100 ไมโครโมล ซึ่งเมื่อหาความชันของกราฟได้เท่ากับ 1.02×10^{-3}

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 3 การเตรียมสาร

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1. Luria-Bertani medium (LB)

ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย

Bacto-tryptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
NaCl	10	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำ ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.0 แล้วเติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ภายใต้ความดัน 12 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

1.2. อาหารสูตรปรับต่ำ (Minimum medium)

ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย

$(NH_4)_2SO_4$	1.3	กรัม
K_2HPO_4	0.9	กรัม
KH_2PO_4	0.6	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
Yeast extract	0.1	กรัม
Olive oil	10.0	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำ 1 ลิตร ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 7.0 เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร แล้วเติม Olive oil จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

ในกรณีที่ต้องการเตรียมอาหารแข็ง (Minimum medium agar plate) ให้เติม Bacto-agar 15 กรัมใน minimum medium จำนวน 1 ลิตร

2. <u>การเตรียมสารในการหาแอคติวิตีของไลเปส</u>

2.1 การเตรียมอีมัลชันของสับสเตรท (1.5% olive oil emulsion)

ดัดแปลงจากวิธีของ Sugihara และคณะ (1991) ในสารละลายประกอบด้วย

1% (w/v) gum arabic solution	300 ml
1M NaCl	30 ml
2% (w/v) $CaCl_2$	7 ml

ผสมทั้ง 3 ส่วนให้เข้ากันดีแล้วเติม Olive oil 1.5 มล. ต่อส่วนผสม 100 มล. แล้วปั่นด้วยเครื่องปั่น moulinex ความเร็วสูงสุดนาน 5 นาที

2.2 การเตรียม 0.05 M Acetate buffer, pH 4.5

- 0.05 M Sodium acetate

ละลาย CH_3COONa 4.3545 กรัมในน้ำกลั่น 500 มล.

- 0.05 M Acetic acid

ละลายกรดอะซิติก 1.43 มล. ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 500 มล.

ผสม 0.05 M Acetic acid : 0.05 M CH_3COONa ในอัตราส่วน 50.0 : 86.9

2.3 การเตรียม 0.05 M Potassium phosphate buffer, pH 6.5

- 0.05 M K_2HPO_4

ละลาย K_2HPO_4 4.3545 กรัมในน้ำกลั่น 500 มล.

- 0.05 M KH_2PO_4

ละลาย KH_2PO_4 3.4022 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มล.

ผสม 0.05 M K_2HPO_4 : 0.05 M KH_2PO_4 ในอัตราส่วน 32.43 : 67.57

2.4 การเตรียม 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0

- ละลาย Tris 1.212 กรัม ในน้ำ 100 มล. นำสารละลายนี้มา 50 มล. แล้วปรับ pH ด้วย HCl จนมี pH เท่ากับ 8.0 แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มล.

2.5 การเตรียม 0.05 M Bicarbonate buffer, pH 10.5

- 0.05 M Na_2CO_3

ละลาย Na_2CO_3 5.31 กรัมในน้ำกลั่น 1,000 มล.

- 0.05 M $NaHCO_3$

ละลาย $NaHCO_3$ 4.20 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มล.

ผสม 0.05 M Na_2CO_3 : 0.05 M $NaHCO_3$ ในอัตราส่วน 202.5 : 47.5

3 <u>การเตรียมสารละลายสำหรับวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด (Bradforf, 1976)</u>

3.1 สารละลายโปรตีนรีเอเจนต์

ละลาย Coomassie Brilliant Blue G-250 100 มก. ใน 95% เอทิลแอลกอฮอล์ ปริมาตร 50 มล. เติม 85% กรดฟอสฟอริกปริมาตร 100 มล. เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรครบ 1 ลิตร

3.2 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน

ละลาย Bovine Serum Albumin10 มก.ในน้ำกลั่น 10 มล. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ

ภาคผนวกที่ 4 ผลการเปรียบเทียบการเจริญ (OD 600) ภายใน 72 ชั่วโมงของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณของฟรุกโตสเป็น 1%, 2% และ 3% (w/v) ในสูตรอาหารและภาวะเพื่อผลิตไลเปส

เวลา (ชม.)	OD600		
	1% fructose	2% fructose	3% fructose
0	0	0	0
12	1.294	0.530	0.862
24	2.120	1.241	2.051
36	2.068	1.892	2.370
48	2.083	2.265	2.238
60	2.060	2.340	2.035
72	1.870	2.301	1.970

ภาคผนวกที่ 5 ผลการเปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะที่ชั่วโมงต่างๆ ของการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณของ ฟรุกโตสเป็น 1%, 2% และ 3% (w/v) ในสูตรอาหารและภาวะเพื่อผลิตไลเปส

เวลา (ชม.)	Specific activity (U/mg protein)		
	1% fructose	2% fructose	3% fructose
0	0	0	0
12	0	0	0
24	0	0	0
36	272.95	867.48	251.02
48	421.63	938.39	258.32
60	198.70	293.25	325.18
72	143.33	204.12	208.41

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 6 ผลการเปรียบเทียบการเจริญ (OD600) ของภายใน 72 ชั่วโมง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.05, 0.13%, 0.25% และ 0.50% (w/v) ในสูตรอาหารและภาวะเพื่อผลิตไลเปส

เวลา (ชม.)	OD600			
	0.05% N source	0.13% N source	0.25% N source	0.50% N source
0	0	0	0	0
12	0.744	0.531	0.742	0.56
24	1.320	1.242	1.205	1.953
36	1.904	1.892	1.953	1.955
48	2.040	2.266	1.955	1.913
60	2.160	2.341	1.813	2.220
72	2.059	2.301	2.293	2.286

ภาคผนวกที่ 7 ผลการเปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะที่ชั่วโมงต่างๆ ของการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 0.05, 0.13%, 0.25% และ 0.50% (w/v) ในสูตรอาหารและภาวะเพื่อผลิตไลเปส

เวลา (ชม.)	Specific activity (U/mg protein)			
	0.05% N source	0.13% N source	0.25% N source	0.50% N source
0	0	0	0	0
12	0	0	0	0
24	0	0	0	0
36	411.52	867.48	161.18	355.71
48	403.98	938.39	195.40	275.02
60	276.69	293.25	168.24	153.95
72	220.90	204.12	41.63	150.77

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 8 ผลการเปรียบเทียบการเจริญ (OD600) ภายใน 72 ชั่วโมงของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อตั้งต้นเป็น 0.25%, 0.50% และ 1.0% (v/v) ในสูตรอาหารและภาวะเพื่อผลิตไลเปส

เวลา	OD600		
(ชม.)	1% Inoculum size	0.5% Inoculum size	0.25% Inoculum size
0	0	0	0
12	0.531	0.324	0.301
24	1.242	1.764	0.949
36	1.892	1.917	1.956
48	2.266	2.270	2.268
60	2.341	2.320	2.308
72	2.301	2.245	2.486

ภาคผนวกที่ 9 ผลการเปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อตั้งต้นเป็น 0.25%, 0.50% และ 1.00% (v/v) ในสูตรอาหารและภาวะเพื่อผลิตไลเปส

เวลา	Specific activity (U/mg protein)		
(ชม.)	1% Inoculum size	0.5% Inoculum size	0.25% Inoculum size
0	0	0	0
12	0	0	0
24	0	0	0
36	867.48	536.68	105.07
48	938.39	1,476.50	1124.54
60	293.25	843.74	925.07
72	204.12	251.52	89.96

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 10 ผลการเปรียบเทียบการเจริญ (OD600) ภายใน 72 ชั่วโมงของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอัตราเร็วในการกวนเป็น 200 rpm, 250 rpm และ 300 rpm ในสูตรอาหารและภาวะเพื่อผลิตไลเปส

เวลา (ชม.)	OD600		
	200 rpm	250rpm	300 rpm
0	0	0	0
12	0.356	0.324	0.156
24	1.056	1.764	1.209
36	1.626	1.917	1.990
48	1.829	2.270	2.222
60	2.014	2.320	2.965
72	2.001	2.245	2.875

ภาคผนวกที่ 11 ผลการเปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอัตราการกวนเป็น 200 rpm, 250 rpm และ 300 rpm ในสูตรอาหารและภาวะเพื่อผลิตไลเปส

เวลา (ชม.)	Specific activity (U/mg protein)		
	200 rpm	250rpm	300 rpm
	0	0	0
12	0	0	0
24	0	0	0
36	102.56	536.68	198.64
48	161.79	1,476.50	489.95
60	95.04	843.74	315.85
72	0	251.52	88.29

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 12 ผลการเปรียบเทียบการเจริญ (OD600) ภายใน 72 ชั่วโมงของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 vvm, 1.0 vvm และ 1.5 vvm ในสูตรอาหารและภาวะเพื่อผลิตไลเปส

เวลา (ชม.)	OD600		
	0.5 vvm	1.0 vvm	1.5 vvm
0	0	0	0
12	0.251	0.324	0.509
24	1.643	1.764	1.958
36	2.074	1.917	2.043
48	2.351	2.270	2.250
60	2.355	2.320	2.325
72	2.324	2.245	2.422

ภาคผนวกที่ 13 ผลการเปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 vvm, 1.0 vvm และ 1.5 vvm ในสูตรอาหารและภาวะเพื่อผลิตไลเปส

เวลา (ชม.)	Specific activity (U/mg protein)		
	0.5 vvm	1.0 vvm	1.5 vvm
0	0	0	0
12	0	0	0
24	0	0	0
36	218.36	536.68	321.98
48	259.35	1,476.50	1,037.42
60	213.22	843.74	240.66
72	137.90	251.52	33.10

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 14 ผลการเปรียบเทียบการเจริญ (OD600) ภายใน 72 ชั่วโมงของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเป็น 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ในสูตรอาหารและภาวะเพื่อผลิตไลเปส

เวลา (ชม.)	OD600		
	30°C	37°C	40°C
0	0	0	0
12	0.251	0.324	0.330
24	1.459	1.764	1.177
36	1.920	1.917	1.766
48	2.010	2.270	1.999
60	1.897	2.320	1.988
72	1.854	2.245	2.087

ภาคผนวกที่ 15 ผลการเปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเป็น 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ในสูตรอาหารและภาวะเพื่อผลิตไลเปส

เวลา (ชม.)	Specific activity (U/mg protein)		
	30°C	37°C	40°C
0	0	0	0
12	0	0	0
24	0	0	0
36	338.34	536.68	36.84
48	363.83	1,476.50	141.84
60	227.53	843.74	52.58
72	39.19	251.52	15.76

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 16 ผลการเปรียบเทียบการเจริญ (OD600) ภายใน 72 ชั่วโมงของ *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผัน pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเป็น 6, 7 และ 8ในสูตรอาหารและภาวะเพื่อผลิตไลเปส

เวลา (ชม.)	OD600		
	6	7	8
0	0	0	0
12	0.291	0.324	0.222
24	1.424	1.764	0.946
36	2.064	1.917	1.381
48	2.344	2.270	1.563
60	2.243	2.320	1.689
72	2.349	2.245	1.844

ภาคผนวกที่ 17 ผลการเปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสที่ได้จากการเลี้ยง *Pseudomonas aeruginosa* เมื่อแปรผัน pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเป็น 6, 7 และ 8 ในสูตรอาหารและภาวะเพื่อการผลิตไลเปสที่กล่าวมาข้างต้น

เวลา (ชม.)	Specific activity (U/mg protein)		
	6	7	8
0	0	0	0
12	0	0	0
24	0	0	0
36	107.36	536.68	0
48	176.88	1,476.50	0
60	126.65	843.74	0
72	30.35	251.52	0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย อังคาร ตั้นพันธ์ เกิดเมื่อวันที่ 3 ตุลาคม 2521 สำเร็จการศึกษาระดับประถมศึกษาจากโรงเรียนกรุงเทพคริสเตียนวิทยาลัย ระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนบดินทรเดชา (สิงห์ สิงหเสนี) และสำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตจาก ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ด้วยคะแนนสะสมเฉลี่ย 2.59 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิตที่สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี 2542

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย