รายงานการวิจัย

เรื่อง
การคัดเลือกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่สร้างเอนไซม์ไลเปส
(Screening of lipase-producing thermophilic bacteria)

โดย
ดร. ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล
ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โดยได้รับทุนอุดหนุนจากเงินรายได้ของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ประจำปีงบประมาณเงินรายได้ พ. ศ. 2546

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. พิชิต โตสุโขวงศ์ และผศ. วรรณวไล อธิวาสน์พงศ์ ที่กรุณาให้แนวคิดและให้คำปรึกษาเกี่ยวกับโครงการวิจัย ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้ทุนสนับสนุนเพื่อการวิจัย ขอขอบคุณนางสาวทิพย์มณฑา ฤกษ์ใหญ่ และนายชาตรี โสสว่าง ที่ให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์ข้อมูล และขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่สำหรับทำงานวิจัยในครั้งนี้

บทคัดย่อ

การคัดเลือกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่สร้างเอนไซม์ไลเปส โดยเก็บตัวอย่างดินและน้ำในเขตจังหวัดอุบลราชธานี และเขตจังหวัดสมุทรปราการ จำนวนทั้งสิ้น 12 ตัวอย่าง แยกได้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่เจริญบนอาหาร olive oil agar บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จำนวน 82 ไอโซเลท ทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปสของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยวิธี tributyrin agar diffussion assay ได้เชื้อแบคทีเรียที่ให้รัศมีของบริเวณใสมากกว่า 5.1 เซนติเมตร จำนวน 6 isolates เมื่อนำมาหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยวิธีการไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้น้ำมันมะกอกเป็นสารตั้งต้นในการทดสอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบเชื้อที่มีกิจกรรมเอนไซม์มากกว่า 75 unit/ml จำนวน 4 isolates คือ isolate PTL36, PTL38, PTL41 และ PTL44 สารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ของ isolate PTL36 และ PTL44 คือ น้ำมันมะกอก (87.71 และ 78.86 unit/ml ตามลำดับ) สารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ของ isolate PTL38 และ PTL41 คือ น้ำมันถั่วเหลือง (100.28 และ 96.57 unit/ml ตามลำดับ) นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสจาก isolate PTL38 มีประสิทธิภาพในการไฮโดรไรด์น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันข้าวโพด น้ำมันรำข้าว น้ำมันปาล์มโอรีนได้สูงกว่าเอนไซม์ที่สร้างโดย isolate PTL36, PTL41 และ PTL44

คำสำคัญ : ไลเปส, แบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่สร้างเอนไซม์ไลเปส

Abstract

A lipase-producing thermophilic bacteria were isolated from twelve soil and water samples in Ubon Ratchathani and Samoulprakarn Province. Eighty-two isolates are able to grow on olive agar under 55 °C. Lipase production by colonies on agar medium was detected by the tributyrin agar diffussion assay, only six isolates showed more than 5.1 centimeter clear zone in radius. Lipase activity in culture supernatants was examined by titrating free fatty acids liberated from olive oil with NaOH and isolate PTL36 showed maximum activity at 55 °C. The highest lipolytic activity of isolate PTL36 and PTL44 was found towards olive oil (87.71 and 78.86 unit/ml, respectively). The best substrate for lipase from isolate PTL38 and PTL41 was soybean oil (100.28 และ 96.57 unit/ml, respectively). Nevertheless lipase from thermophillic bacterium isolate PTL38 showed higher hydrolytic activity on soybean oil, maize oil, rice bran oil, palm oil than from isolate PTL36, PTL41 and PTL44

Key words : lipase, lipase-producing thermophilic bacteria

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 บทบาทของเอนไซม์ไลเปสในทางอุตสาหกรรม และการนำไปใช้ 9

ตารางที่ 2 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส 10

ตารางที่ 3 ชนิดของตัวอย่างและลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้ 19

ตารางที่ 4 ขนาดของ clear zone ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 23
เมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหาร tributyrin agar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 5 กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรียจำนวน 6 isolates 27
เมื่อใช้น้ำมันมะกอกเป็นสารตั้งต้น

ตารางที่ 6 กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรีย isolate PTL36, PTL38, 28
PTL41 และ PTL44 เมื่อใช้น้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันข้าวโพด
น้ำมันรำข้าว และน้ำมันปาล์มโอรีนเป็นสารตั้งต้น

บทนำ

ไขมัน เป็นสารอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีการปนเปื้อนในน้ำทิ้งจากแหล่งชุมชนและโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น โรงงานทำกระดาษ โรงงานทอผ้า โรงงานทำสบู่ โรงงานผลิตและแปรรูปอาหารและโรงงานผลิตเครื่องหนัง น้ำทิ้งจากโรงงานเหล่านี้นอกจากจะมีน้ำมัน ไขมัน กรดไขมันและซัลเฟตในปริมาณสูงแล้ว ยังมีค่าความเป็นกรดเป็นด่างต่ำและอุณหภูมิของน้ำทิ้งค่อนข้างสูงอีกด้วย (Markossian *et al.*, 2000)

วิธีการบำบัดน้ำทิ้งที่มีการปนเปื้อนของไขมัน กระทำได้โดยวิธีทางกายภาพเช่น การใช้หลุมซึม ซึ่งไขมันจะไปอุดตันช่องว่างในดิน ทำให้น้ำซึมได้ยาก หรือการใช้บ่อดักไขมัน โดยภายในบ่อจะมีแผ่นคอนกรีตหรือไม้กั้นขวางให้น้ำไหลลอดแผ่นกั้นนี้ ส่วนไขมันจะถูกดักไว้และต้องตักออกไปทำลาย การบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมันโดยวิธีนี้ก่อให้เกิดสภาพที่ไม่น่าดู เสียค่าใช้จ่ายสูง ทั้งยังก่อให้เกิดปัญหาในการบำบัดตะกอนไขมันที่เหลือต่อไปอีก อีกวิธีหนึ่งเป็นวิธีทางชีววิทยาโดยใช้จุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ที่เจริญได้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงมาใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งที่มีการปนเปื้อนของไขมัน เนื่องจากในสภาวะที่มีการกวนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสขึ้นไป ไขมันจะอยู่ในรูปอีมัลชั่น ง่ายต่อการย่อยสลายโดยเอนไซม์และจุลินทรีย์ ความสามารถในการแพร่และการขนส่งสารจะเพิ่มมากขึ้น มีผลให้จุลินทรีย์สามารถใช้สารตั้งต้นได้มากขึ้น นอกจากนี้ของเสียจะเกิดสภาพปลอดเชื้อโรคเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส (Becker *et al.*, 1997) จุลินทรีย์หลายชนิดเจริญและมีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง จุลินทรีย์เหล่านี้ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* (Martinez and Soberon′-Cha′ves, 2001), *Pseudomonas* sp. (Rashid *et al.*, 2001), *Candida cyindracea* (Sokolovska *et al.*, 1998) *Bacillus* sp. (Okada Shin-Ichi, 1991, Becker *et al.*, 1997) และ *Bacillus thermaleovorans* (Markossian *et al.*, 2000) ดังนั้นการศึกษาเพื่อนำจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายไขมันได้ดีและเจริญที่อุณหภูมิสูง มาประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน จึงเป็นแนวทางหนึ่งสำหรับนำไปพัฒนาระบบบำบัดน้ำเสียให้บรรลุเป้าหมายได้ดียิ่งขึ้นต่อไป สำหรับงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่สร้างเอนไซม์ไลเปสและศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายไขมันชนิดต่าง ๆ

การตรวจเอกสาร

1. ไขมัน (Lipid)

ไขมันหรือลิปิด (Lipid) เป็นชีวโมเลกุลที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตประเภทโพลีแซคคาไรด์ โครงสร้างทางเคมีของลิปิดค่อนข้างหลากหลาย มีส่วนโครงสร้างที่เป็นไฮโดรคาร์บอนที่ไม่มีขั้ว (non-polar) ซึ่งจะแสดงคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ทำให้ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) ลิปิดบางชนิดอาจประกอบด้วยส่วนที่มีขั้ว (polar) ที่มีประจุหรือไม่มีประจุอยู่ในโครงสร้างด้วย ทำให้มีคุณสมบัติชอบน้ำ (hydrophilicity) ลิปิดที่คุณสมบัติสองอย่างนี้อยู่ด้วยกันจะเป็น amphipathic molecule หรือ แอมฟิไฟล์ (amphiphiles) ลิปิดกลุ่มนี้สามารถทำหน้าที่เป็นตัวกลาง ทำให้ลิปิดที่ไม่ชอบน้ำสามารถกระจายตัวอยู่ในน้ำได้ ลิปิดบางชนิดอาจมีส่วนของโมเลกุลที่ไม่มีขั้วเป็นสายตรง เช่น พวกกลีเซอไรด์ เทอร์ปีนอยด์ ลิปิดเหล่านี้จะมีคุณสมบัติเป็นกลาง (neutral lipids) มีความไม่ชอบน้ำสูงและมักจะรวมตัวกันเอง ลิปิดมีหน้าที่หลากหลายในสิ่งมีชีวิต เช่น สะสมพลังงาน เป็นโครงสร้างของเยื่อเซลล์ และทำหน้าที่เฉพาะอื่น ๆ ที่จำเป็นต่อสิ่งมีชีวิต (มนตรี และคณะ, 2542)

2. การจำแนกประเภทของไขมัน ตามลักษณะโครงสร้าง

ลิปิดที่พบในธรรมชาติส่วนใหญ่ แบ่งตามโครงสร้างได้ดังนี้

2.1 เอสเทอร์ของกลีเซอรอล (Glycerol ester) ได้แก่ ลิปิดที่เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน (fatty acid) และกลีเซอรอล (glycerol) ตัวอย่างเช่น กลีเซอไรด์ (glyceride) หรือเอซิลกลีเซอไรด์ (acyl glyceride) และฟอสโฟกลีเซอไรด์ (phosphoglyceride)

2.2 เอสเตอร์ของแอลกอฮอล์อื่น ๆ ลิปิดประเภทนี้เป็นเอสเตอร์ของกรดไขมัน และแอลกอฮอล์อื่น ๆ ที่นอกเหนือจากกลีเซอรอล ตัวอย่างเช่น ขี้ผึ้ง (wax) ไขมันที่เคลือบผิวใบไม้และผลไม้ เป็นต้น

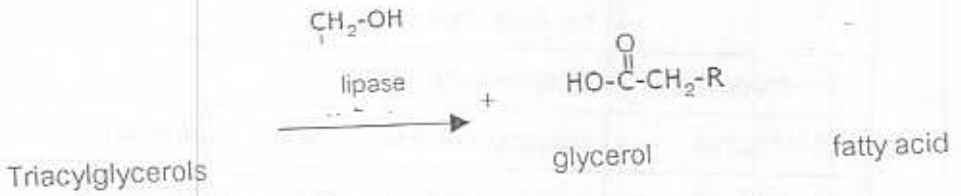
2.3 สฟิงโกลิปิด (sphingolipid) ได้แก่ลิปิดที่เป็นอนุพันธ์ของสฟิงโกซีน (sphingosine) แบ่งเป็นสามชนิดคือ สฟิงโกไมลิน (sphingomyelin) เซเรโบรไซด์ (cerebroside) และแกงกลีโอไซด์ (ganglioside)

2.4 อนุพันธ์ของสเตอรอล (sterol derivative) ได้แก่ ลิปิดที่มีวงแหวน perhydrocyclo pentanophenanthrene ตัวอย่างเช่น โคเลสเตอรอล (cholesterol) กรดน้ำดี (bile acid) ฮอร์โมนสเตรอยด์ (steroid hormone) เป็นต้น

2.5 อนุพันธ์ของเทอร์ปีน (terpene derivative) ได้แก่ ลิปิดที่มีหน่วยของเทอร์ปีน อยู่ในสูตรโครงสร้างอย่างเช่น วิตามินเอ อี และ เค บีตา-แคโรทีน (β-carotene) (มนตรี และคณะ, 2542)

3. เอนไซม์ไลเปส (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3)

เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไรด์ไตร- ได- และโมโนกลีเซอไรด์ เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล และมีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาesterification และ interesterification reaction ซึ่งประกอบด้วย acidolysis, alcoholysis, ester exchange, และ aminolysis (กิตติเดช และคณะ 2534) เอนไซม์ชนิดนี้พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดทั้งสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ แต่เอนไซม์จากจุลินทรีย์มีบทบาทและคุณค่าทางอุตสาหกรรมมากกว่าเนื่องจากมีคุณสมบัติทนต่อความร้อนได้ดี (Iizumi *et al.*, 1990) มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น (Che Omar *et al.*, 1987) และยังคงมีกิจกรรมในสารละลายอินทรีย์ (Nishio *et al.*, 1987) จึงเป็นเอนไซม์สำคัญที่ใช้มากในทางการแพทย์ อุตสาหกรรมการผลิตยาและเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมการผลิตสารปรุงกลิ่นอาหาร อุตสาหกรรมการผลิตสารซักฟอก อุตสาหกรรมการทำความสะอาด อุตสาหกรรมการผลิตสารทางคลีนิค รวมทั้งทางด้านการบำบัดน้ำเสียและสิ่งแวดล้อม



ตารางที่ 1 บทบาทของเอนไซม์ไลเปสในทางอุตสาหกรรม และการนำไปใช้ (R. Shama *et al*, 2001)

ประเภทอุตสาหกรรม	ปฏิกิริยา	ผลิตภัณฑ์ หรือ การประยุกต์ใช้
ผงซักฟอก	ไฮโดรไลซ์ไขมัน	จัดคราบไขมันตามเนื้อผ้า
ผลิตภัณฑ์นม	ไฮโดรไลซ์ไขมันในนม, เนย	ปรับปรุงกลิ่นในนม, เนย
ขนมปัง	ปรับแต่งกลิ่น	ยืดอายุการเก็บรักษา
เครื่องดื่ม	ปรับแต่งกลิ่น	เครื่องดื่มต่าง ๆ
อาหารเพื่อสุขภาพ	ย้ายหมู่เอสเทอร์	อาหารเพื่อสุขภาพ
เนื้อ และ ปลา	ปรับแต่งกลิ่นให้ดีขึ้น	การย้ายหมู่ไขมัน
ไขมันและน้ำมัน	ไฮโดรไลซีส	กลีเซอรอล,โมโน-ไดกลีเซอไรด์
สารเคมี	สังเคราะห์สาร	สารเคมีต่าง ๆ
เครื่องสำอาง	สังเคราะห์สาร	เพิ่มความชุ่มชื้น
กระดาษ	ไฮโดรไลซีส	ปรับปรุงคุณภาพกระดาษ
การทำความสะอาด	ไฮโดรไลซีส	ขจัดไขมัน

ตารางที่ 2 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส (R. Shama *et al*, 2001)

Source	Genus	Species
Bacteria (Gram-positive)	*Bacillus*	*B. megaterium, B. cereus, B. stearothermophilus, B. subtilis, B. brevis, B. thermocatenulatus, Bacillus* sp.IHI-91, *Bacillus* strain WAI 28A5, *Bacillus* sp., *B. coagulans, B. acidocaldarius, Bacillus* sp. RS-1, 2, *B. thermoleovorans* ID-1, *Bacillus sp.* J 33
	Staphylococcus	*S. canosus, S. aureus, S. hyicus, S. epidermis, S. warneri*
	Lactobacillus	*Lactobacillus delbruckii* sub sp.*bulgaricus, Lactobacillus* sp.
	Streptococcus	*Streptococcus lactis*
	Micrococcus	*Micrococcus freudenreichii, M. luteus*
	Propionibacterium	*Propionibacterium acne, Pr. granulosum*
	Burkholderia	*Berkholderia* sp., *Bu. glumae*
Bacteria (Gram-negative)	*Pseudomonas*	*P. aeruginosa, P. fragi, P. mendocina, P. putida 3SK, P. glumae, P. cepacia, P. fluorescens, P. aeruginosa* KKA-5,*Pseudomonas* sp., *P. pseudoalcaligenes* F-111, *P. fluorescens* MF0, *Pseudomonase* sp. KWI56
	Chromobacterium	*Ch. Viscosum*
	Acinetobacter	*Aci. pseudoalcaligenases, Aci. radioresistens*
	Aeromonase	*Ae. hydrophila, Ae. sorbia* LP004
Fungi	*Rhizopus*	*R. delemar, R. oryzae, R. arrhizus,R. nigricans, R. nodosus, R. microsporous, R. chinensis, R. japonicus, R. niveus*
	Aspergillus	*A. flavus, A. niger, A. japonicus, A. awamori, A. fumigatus, A. oryzae, A. carneus. A. repens. A. nidulans*
	Penicillium	*P. cyclopium, P. citrinum, P. roqueforti, P. fumiculosum, Penicillium* sp., *P. camambertii,*

Source	Genus	Species
		P. wortmanii
	Mucor	*Mu. miehei, Mu. javanicus, Mu. circinelloides, Mu. hiemalis, Mu. racemosus*
	Ashbya	*Ashbya gossy*
	Geotrichum	*G. candidum, Geotrichum* sp.
	Beauveria	*B. bassiana*
	Humicola	*H. lanuginose*
	Rhizomucor	*R. miehei*
	Fusarium	*Fusarium oxysporum, F. heterosporum*
	Acremonium	*Ac. Srictum*
	Alternaria	*Alternaria brassicicola*
	Eurotrium	*Eu. herbanorium*
	Ophiostoma	*O. piliferum*
Yeasts	*Candida*	*C. rugosa, C. tropicalis, C. Antarctica, C. cylindracea C. parapsilosis, C. deformans, C. curvata, C. valida*
	Yarrowia	*Y. lipolytica*
	Rhodotorula	*Rho. glutinis, Rho. Pilimornae*
	Pichia	*Pi. bispora, Pi. maxicana, Pi. sivicola, Pi. xylosa, Pi. burtonii*
	Saccharomyces	*Sa. lipolytica, Sa. crataegenesis*
	Torulospora	*Torulospora globora*
	Trichosporon	*Trichosporon asteriodes*
Actinomycetes	*Streptomyces*	*Streptomyces fradiae* NCIB8233, *Streptomyces* sp. PCB 27, *Streptomyces* sp. CCM 33, *Str. coelicolor, Str. cinnamomeus*

4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กิตติเดช และคณะ (2534) ศึกษาหาวิธีการที่รวดเร็วสำหรับการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง โดยอาศัยการเปลี่ยนสีของ bromocresol purple (BCP) ซึ่งเติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบกับการใช้ clear zone ของ emultion tributyrin agar จากเชื้อ 191 isolates พบว่าวิธีการวัดการเปลี่ยนสีของ BCP เป็นวิธีที่รวดเร็วกว่า แม้จะมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับกับวิธีการวัดบริเวณใสบน emultion tributyrin agar พบว่าแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนสี BCP ได้รวดเร็ว เป็นสายพันธุ์ที่มีแนวโน้มว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง แบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนสี BCP ได้ภายในเวลา 8 ชั่วโมง มีจำนวน 6 isolates และ 5 ใน 6 isolates สามารถผลิตเอ็นไซม์ไลเปสได้สูง เมื่อนำมาวัดปริมาณเอนไซม์ด้วยกิจกรรมของเอ็นไซม์ ดังนั้นการวัดการเปลี่ยนสีของ BCP จึงเป็นวิธีการที่รวดเร็วที่นำมาใช้คัดเลือกในขั้นต้นสำหรับแบคทีเรียที่ผลิตเอ็นไซม์ไลเปสได้สูง

เกศสุคนธ์ (2538) คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยไขมัน พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Geotrichum candidum* มีประสิทธิภาพในการย่อยไขมันสูงสุดภายในเวลา 36 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30°C และสามารถลดค่า BOD ในน้ำเสียสังเคราะห์ได้ 64.82 % และมีไขมันเหลืออยู่ 43.3 %

สุวรรณา และคณะ (2540) ศึกษาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายไขมันจากน้ำทิ้ง โดยทำการแยกเชื้อด้วยวิธี double layer technique พบว่า 33 isolates มีการเปลี่ยนสีของ bromocresol purple อย่างรวดเร็วภายใน 6 ชั่วโมง เมื่อนำมาหากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าสายพันธุ์ $1A_{42}$ และ $2C_6$ มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยเชื้อสายพันธุ์ $1A_{42}$ ให้กิจกรรมไลเปสสูงสุดเมื่อเลี้ยงใน 2% sucrose, 0.15% yeast extract, 0.09% K_2HPO_4, 0.06% KH_2PO_4, 0.02% $MgSO_4.7H_2O$, 0.5% $CaCO_3$, pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนสายพันธุ์ $2C_6$ จะให้เอนไซม์สูงสุดเมื่อเลี้ยงใน 2% dextrose, 0.15% beef extract, 0.09% K_2HPO_4, 0.06% KH_2PO_4, 0.02% $MgSO_4.7H_2O$, 0.5% $CaCO_3$, pH 7.0 อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ในปี 1991 Okuda Shin-Ichi และคณะได้คัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากโรงงานผลิตเนื้อสัตว์ประเทศญี่ปุ่น พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยไขมันวัว น้ำมันหมู น้ำมันมะกอก และน้ำมันลลัดที่ใช้แล้วคือแบคทีเรีย *Bacillus* sp. และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียนี้มาทดสอบการบำบัดน้ำเสียระบบ water circular system พบว่าไขมันถูกกำจัดได้เกือบสมบูรณ์ โดยไม่ต้องผ่านการบำบัดทางกายภาพ (Okada Shin-Ichi, 1991)

Emanuilova และคณะ (1993) ทำการคัดแยก lipase-producing thermophilic bacteria จากบ่อน้ำพุร้อน ประเทศบัลกาเรีย โดยการเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่คัดแยกได้ มีกิจกรรมของ

เอนไซม์ไลเปสประมาณ 0.5 U/ml เมื่อเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว มีเพียงสามสายพันธุ์ (Gram-positive sporeforming rods) ที่มีกิจกรรมระหว่าง 1.0-3.0 U/ml และ *Bacillus* sp. MC7 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด 2.0-3.0 U/ml เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี Tween-80 เป็นองค์ประกอบ

Lee Dong-Woo และคณะ (1994) ศึกษาคุณสมบัติเอนไซม์ thermophilic lipase จาก *Bacillus thermoleovorans* ID-1 ซึ่งแยกจากน้ำพุร้อน ประเทศอินโดนีเซีย พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำมันมะกอกเป็น sole carbon เชื้อให้อัตราการเจริญสูงสุดที่ 65 องศาเซลเซียส และให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในช่วง exponential phase เท่ากับ 520 U/l เชื้อสามารถเจริญในอาหารที่มี olive oil, soy bean oil , mineral oil, triglycerides (striolein, tributyrin) และ emulsifier (Tween 20, 80) เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์มี optimal activity ที่ 70-75 องศาเซลเซียส pH 7.5 และยังมีกิจกรรมเหลือถึง 50% หลังการบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และบ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

Markossian และคณะ (2000) ศึกษาคุณสมบัติของการย่อยสลายไขมันของ *Bacillus thermoleovorans* IHI-91 ที่แยกจาก icelandic hot spring พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส pH 6.0 และให้กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดเท่ากับ 300 U/l เชื้อสามารถเจริญในอาหารที่มี palmitic acid, stearic acid, lanolin, olive oil, sunflower seed oil, soya oil และ fish oil เป็น sole carbon และ energy source โดยไม่ต้องการเติม growth factor ลงในอาหาร

Haba และคณะ (2000) คัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ไลเปสโดยใช้ flying oil เป็นสารตั้งต้น พบว่าเมื่อใช้ olive และ sunflower flying oils เป็นสารตั้งต้น สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียและยีสต์ได้ 47 สายพันธุ์ได้แก่ *Pseudomonas, Bacillus, Candida, Rhodococcus* และ *Straphylococcus* เชื้อที่เจริญใน waste oil และให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้อัตราส่วนของ substrate sunflower: olive oil เท่ากับ 1:1 คือ *Pseudomonase* sp. 3AT (2748 U/l) และ *Pseudomonase aeruginisa* ATCC 111 (1703.8 U/l)

Kambourova และคณะ (2003) รายงานคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์จากเชื้อทนอุณหภูมิสูง *Bacillus stearothermophilus* MC7 จากการศึกษาด้วย sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่ามวลโมเลกุลของเอนไซม์มีขนาดเท่ากับ 62,500 Da เอนไซม์บริสุทธิ์มีกิจกรรมสูงสุดที่ 75-80 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 7.5-9.0 มีกิจกรรมเหลือ 50% หลังการบ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ค่า K_m และ V_{max} เท่ากับ 0.33 mM และ 188 μM/min/mg ตามลำดับ เมื่อใช้ *p*-nitrophenyl palmitate เป็นสารตั้งต้น กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งโดย divalent ions ของโลหะหนัก thiol และ serine inhibitors ในขณะที่ calcium ion กระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์

Dharmsthiti และ Kuhasuntisuk (1998) รายงานคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* LP 602 ซึ่งแยกจากตัวอย่างน้ำทิ้ง พบว่าเชื้อมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูง

สุดที่ pH 8 และยังคงมีกิจกรรมมากกว่า 90% หลังการบ่มที่ pH 8 เป็นเวลา 5 ชั่วโมง *P. aeruginosa* lipase มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แต่กิจกรรมจะลดลงเหลือ 50% ภายใน 2 ชั่วโมง เอนไซม์สามารถไฮโดรไลซ์ไขมันและน้ำมันได้หลายชนิด

Kulkarni และ Gradre (2002) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* NS2W ในขวดรูปชมพู่และถังหมักขนาด 1 ลิตร พบว่าเชื้อให้กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดเท่ากับ 69.7 และ 68.7 U/ml ตามลำดับ เอนไซม์ไลเปสมีกิจกรรมสูงสุดที่ pH 9.0 และเชื้อยังคงมีกิจกรรมมากกว่า 70% ในเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อบ่มในช่วง pH 3-11 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่ 55 องศาเซลเซียสและทนต่ออุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมมากกว่า 70 % ได้อย่างน้อย 2 ชั่วโมง เมื่อศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิต เอนไซม์ไลเปส พบว่าเชื้อสามารถใช้ vegetable oil ได้ดีกว่า hexose, pentose และใช้ disaccharides, polysaccharides ได้น้อยที่สุด

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างดินและน้ำจากแหล่งตัวอย่างต่าง ๆ จำนวนทั้งสิ้น 12 ตัวอย่าง คือ

1.1 ดินบริเวณบ่อดักไขมันข้างโรงอาหารกลาง มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

1.2 ดินจากฟาร์มเลี้ยงสัตว์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

1.3 ดินจากร้านอาหารสมคิด หน้ามหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

1.4 ดินจากร้านอาหารยูเทอร์น บ้านศรีไค อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี

1.5 ดินจากฟาร์มเลี้ยงหมู บ้านศรีไค อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี

1.6 น้ำทิ้งจากโรงอาหารกลาง มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

1.7 น้ำทิ้งร้านอาหารสมคิด หน้ามหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

1.8 ดินจากบ่อเลี้ยงปลา บริษัทผลิตอาหารสัตว์ S.W.T. จ. สมุทรปราการ

1.9 ดินจากรางน้ำฝน บริษัทผลิตอาหารสัตว์ S.W.T. จ. สมุทรปราการ

1.10 ดินบริเวณสนามฟุตบอล บริษัทผลิตอาหารสัตว์ S.W.T. จ. สมุทรปราการ

1.11 น้ำทิ้งจากร้านอาหารพรเพชรงาม อ. เมือง จ. อุบลราชธานี

1.12 ดินจากฟาร์มไก่ บริษัทก้าวหน้าไก่สด จ. อุบลราชธานี

นำตัวอย่างใส่ในขวดเก็บตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว บรรจุลงในกระติกน้ำแข็ง และนำตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์ที่ห้องปฏิบัติการ CBL 1308 ชั้น 3 อาคารปฏิบัติการชีวภาพ 1 ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

2. การคัดแยกแบคทีเรีย

นำตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ในอัตราส่วน 1:5 จากนั้นปิเปตสารละลายตัวอย่าง (1:10) ลงในขวดรูปชมพู่ที่บรรจุอาหาร enrichment medium broth ที่มีน้ำมันมะกอกเป็นองค์ประกอบ นำไปบ่มใน incubator shaker ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างที่ได้มาทำการคัดเลือกด้วยวิธี double layer technique ในอาหาร enrichment medium agar นำไปบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย โดยเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน มาทำการแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคการ streak plate technique ลงบนอาหาร enrichment medium agar ทำการถ่ายเชื้อที่บริสุทธิ์ลงใน enrichment medium agar slant ที่ไม่มีน้ำมันมะกอกเป็นส่วนประกอบ เมื่อเชื้อเจริญเต็มผิวหน้า เททับด้วยฟาราฟินเหลวที่ปราศจากเชื้อ เก็บเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อการศึกษาต่อไป

ห้องสมุด สำนักวิทยบริการ มหาวิทยาลัยสุราษฎร์ธานี

3. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

3.1 การคัดเลือกขั้นปฐมภูมิ

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้น (starter) โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่แยกได้ในอาหาร enrichment medium broth ปริมาตร 9 มล. จากนั้นนำไปบ่มใน incubator shaker ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการถ่ายเชื้อ (5% v/v) ลงใน อาหาร enrichment medium broth (ที่ไม่เติม yeast extract) บ่มใน incubator shaker ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ด้วย ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง MIKRO 20 (Hettich Centrifugation) ที่ความเร็วรอบ 6,500 rpm. เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตส่วนใสที่ได้ลงในหลุมมาตรฐาน ขนาดเส้นผ่าศูนย์ กลาง 8.0 มม. ที่อยู่ในอาหาร tributyrin agar นำจานเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดความกว้างบริเวณใสที่เกิดขึ้น คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้ เกิดบริเวณใสได้กว้างที่สุด เพื่อการศึกษาขั้นต่อไป

ข้อมูลท้องถิ่น

3.2 การคัดเลือกขั้นทุติยภูมิ

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้น (starter) โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่แยกได้ในอาหาร enrichment medium broth ปริมาตร 9 มล. จากนั้นนำไปบ่มใน incubator shaker ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการถ่ายเชื้อ (5% v/v) ลงใน อาหาร enrichment medium broth (ที่ไม่เติม yeast extract) บ่มใน incubator shaker ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง MIKRO 20 (Hettich Centrifugation) ที่ความเร็วรอบ 6,500 rpm. เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตส่วนใสที่ได้ไป วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

ใช้เฉพาะใน ศูนย์ข้อมูลท้องถิ่นเท่านั้น

3.3 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (Odera *et al.*, 1986)

การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส อาศัยหลักการวัดปริมาณกรดไขมันที่ได้จากการย่อยสลายสารตั้งต้น (น้ำมันมะกอก) โดยการไตเตรทกับสารละลายด่าง สารละลายผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วยสาร ตั้งต้น (10% emulsion olive oil in 0.09% polyvinyl alcohol) ปริมาตร 2 มล., 0.2 M phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 2 มล., และสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 4 มล. บ่มสารละลายผสมของปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย acetone : alcohol (1 : 1) ปริมาตร 20 มล. แล้วไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน 0.05 M NaOH โดยมีฟีนอลทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ กำหนดให้ 1 unit of enzyme หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันมะกอกให้ได้กรดไขมัน ที่อยู่ในรูป oleic acid 1 μM ภายใน 20 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

4. ศึกษาสารตั้งต้นที่เหมาะสม

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 มาทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส โดยการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้น (starter) โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร enrichment medium broth ปริมาตร 9 มล. จากนั้นนำไปบ่มใน incubator shaker ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการถ่ายเชื้อ (5% v/v) ลงในอาหาร enrichment medium broth (ที่ไม่เติม yeast extract) บ่มใน incubator shaker ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง MIKRO 20 (Hettich Centrifugation) ที่ความเร็วรอบ 6,500 rpm. เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยใช้น้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันข้าวโพด น้ำมันรำข้าว และน้ำมันปาล์มโอรีนเป็นสารตั้งต้น

ผลการทดลอง

1.การแยกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่ย่อยสลายไขมัน

จากการแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินและน้ำที่มีการปนเปื้อนของไขมัน ที่เก็บจากอำเภอวารินชำราบและอำเภอเมือง จังหวัดอุบลราชธานี รวมทั้งสิ้น 12 ตัวอย่าง หลังจากทำการแยกเชื้อโดยวิธี double layer technique และทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคการ streak plate สามารถแยกเชื้อได้ 82 isolates ดังแสดงในตารางที่ 3

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไลเปสขั้นปฐมภูมิ

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 1 โดยเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นอายุ 18 ชั่วโมงของแบคทีเรียจำนวน 82 isolates ในอาหาร enrichment

medium broth ทำการถ่ายหัวเชื้อลงในอาหาร enrichment medium broth (ที่ไม่เติม yeast extract) บ่ม ใน incubator shaker ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วทำการปั่น เหวี่ยงแยกเซลล์ นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี tributyrin agar diffussion assay (Lowrance *et al.*, 1967) โดยวัดความกว้างของบริเวณใสที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยง เชื้อดังกล่าว จากการทดลองพบว่า

เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดบริเวณใสมากที่สุด ++++ (รัศมีของบริเวณใสมี ความกว้างตั้งแต่ 5.1 มม. ขึ้นไป) จำนวน 6 isolates คือ isolate PTL30, PTL31, PTL36, PTL38, PTL41 และ PTL44

เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดบริเวณ ใสได้มาก +++ (รัศมีของบริเวณใสมีความกว้างตั้งแต่ 4.1 – 5.0 มม.) จำนวน 6 isolates คือ isolate SCA1, SFA1, SRS5, PTL34, PTL35 และ PTL37

เชื้อแบคทีเรีย ที่ทำให้เกิดบริเวณใสได้ ++ (รัศมีของบริเวณใสมีความกว้างตั้งแต่ 3.1 – 4.0 มม.) จำนวน 3 isolates คือ isolate SRS1, SFU1 และ SFU3

เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดบริเวณใสได้ + (รัศมีของบริเวณใสมีความกว้าง น้อยกว่าหรือเท่ากับ 3.00 มม.) จำนวน 1 isolate คือ isolate PTL29

ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่ไม่ทำให้เกิดบริเวณใสบน tributyrin agar จำนวน 66 isolates คือ isolate WCA1, WCA2, WCA3, WCA4, SRE1, SRE2, SRE3, SRE4, SCA2, SFA2, SFA3, SFR1, SFR2, SFR3, WRE1, SRS2, SRS3, SRS4, SFU2, SFU4, SFRAM1, SFRAM2, SFRAM4, SCAN6, PTL1- PTL28, PTL32-33, PTL40, PTL42-43, PTL45-52 ดังแสดงในตารางที่ 4

คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดบริเวณใสมากที่สุดไปทดสอบประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์ ต่อไป

3. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไลเปสขั้นทุติยภูมิ

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ จากข้อ 2 โดยเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นอายุ 18 ชั่วโมงของเชื้อแบคทีเรียจำนวน 6 isolates ในอาหาร enrichment medium broth ทำการถ่ายหัวเชื้อลงในอาหาร enrichment medium broth (ที่ไม่เติม yeast extract) บ่มใน incubator shaker ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้ว ทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (Odera *et al.*, 1986) จาก การวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรียจำนวน 6 isolates พบว่า isolate ที่มีกิจกรรม เอนไซม์สูงสุด (เมื่อใช้น้ำมันมะกอกเป็นสารตั้งต้น) คือ isolate PTL36 ซึ่งให้กิจกรรมเอนไซม์ เท่ากับ 81.07 unit/ml สำหรับ isolate ที่มีกิจกรรมเอนไซม์รองลงมาได้แก่ PTL41, PTL44, PTL38, PTL31 และ PTL30 ซึ่งให้กิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 80.02, 79.29, 74.64, 69.28 และ 68.57 unit/ml ตามลำดับ ดังแสดงใน ตารางที่ 5 และภาพที่ 1

4. ศึกษาสารตั้งต้นที่เหมาะสม

การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรียเมื่อใช้สารตั้งต้นชนิดต่าง ๆ โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย isolate PTL36, PTL38, PTL41 และ PTL44 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในอาหาร enrichment medium broth ที่มีน้ำมันมะกอกเป็นองค์ประกอบ ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ โดยใช้น้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันข้าวโพด น้ำมันรำข้าวและน้ำมันปาล์มโอรีน (commercial grade oil) เป็นสารตั้งต้น บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นวิเคราะห์หากรดไขมัน oleic acid ที่เกิดขึ้นโดยการไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน 0.05 M NaOH โดยมีฟีนอลทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ จากการทดลองพบว่า

Crude enzyme ของแบคทีเรีย isolate PTL36 มีกิจกรรมในการไฮโดรไรด์น้ำมันมะกอกได้ดีที่สุด (87.71 units/ml) รองลงมาคือ น้ำมันถั่วเหลือง (82.29 units/ml) น้ำมันข้าวโพด (64.57 units/ml) น้ำมันรำข้าว (53.71 units/ml) และน้ำมันปาล์มโอรีน (42.86 units/ml) ตามลำดับ

Crude enzyme ของแบคทีเรีย isolate PTL38 มีกิจกรรมในการไฮโดรไรด์น้ำมันถั่วเหลืองได้ดีที่สุด (100.28 units/ml) รองลงมาคือ น้ำมันข้าวโพด (87.71 units/ml), น้ำมันรำข้าว (80.57 units/ml) น้ำมันปาล์มโอรีน (76.86 units/ml) และน้ำมันมะกอก (74.29 units/ml) ตามลำดับ

Crude enzyme ของแบคทีเรีย isolate PTL41 มีกิจกรรมในการไฮโดรไรด์น้ำมันถั่วเหลืองได้ดีที่สุด (96.57 units/ml) รองลงมาคือ น้ำมันมะกอก (80.86 units/ml) น้ำมันรำข้าว (68.00 units/ml) น้ำมันข้าวโพด (48.29 units/ml) น้ำมันน้ำมันปาล์มโอรีน (46.57 units/ml) ตามลำดับ

Crude enzyme ของแบคทีเรีย isolate PTL44 มีกิจกรรมในการไฮโดรไรด์น้ำมันมะกอกได้ดีที่สุด (78.86 units/ml) รองลงมาคือ น้ำมันรำข้าว (55.43 units/ml) น้ำมันข้าวโพด (46.57 units/ml) น้ำมันปาล์มโอรีน (43.14 units/ml) น้ำมันถั่วเหลือง (26.86 units/ml) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6 ภาพที่ 2

ตารางที่ 3 ชนิดของตัวอย่างและลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้

ชนิดของตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี
1. น้ำทิ้งจากโรงอาหารกลาง ม.อุบลราชธานี	WCA1	โคโลนีสีเหลือง ทึบแสง ขอบหยักเป็นคลื่น
	WCA2	โคโลนีสีขาว โปร่งแสง ขอบหยักเป็นคลื่น
	WCA3	โคโลนีสีขาวขุ่น ทึบแสง ขอบหยักเป็นคลื่น
	WCA4	โคโลนีกลมสีขาว โปร่งแสง ขอบเรียบ
2. ดินจากบ่อดักไขมัน โรงอาหารกลาง ม.อุบลราชธานี	SCA1	โคโลนีสีขาว โปร่งแสง ขอบหยักเป็นลอน
	SCA2	โคโลนีสีขาวขุ่น ทึบแสง ขอบหยักเป็นลอน
	SCA6	โคโลนีสีขาว ทึบแสง ขอบหยักเป็นลอน
3. ดินจากฟาร์มเลี้ยงสัตว์ ม.อุบลราชธานี	SFU1	โคโลนีสีขาวขุ่น ทึบแสง ขอบหยักเป็นคลื่น
	SFU2	โคโลนีสีเหลือง ทึบแสง ขอบหยักเป็นคลื่น
	SFU3	โคโลนีสีขาว ทึบแสง ขอบหยักเป็นคลื่น
	SFU4	โคโลนีกลมสีขาว ทึบแสง ขอบเรียบ
	SFARM1	โคโลนีสีเหลือง ทึบแสง ขอบหยักเป็นลอน
	SFARM2	โคโลนีกลมสีขาวขุ่น ทึบแสง ขอบเรียบ
	SFARM4	โคโลนีสีขาว ทึบแสง ขอบหยักเป็นลอน
4. น้ำทิ้งร้านอาหารสมคิด	WRE1	โคโลนีกลมสีขาวขุ่น ทึบแสง ขอบเรียบ
5. ดินจากร้านอาหารสมคิด	SRE 1	โคโลนีสีขาวขุ่น ทึบแสง ขอบหยักเป็นลอน
	SRE 2	โคโลนีสีขาวขุ่น ทึบแสง ขอบหยักเป็นคลื่น
	SRE 3	โคโลนีสีขาวขุ่น ทึบแสง ขอบหยักเป็นคลื่น
	SRE 4	โคโลนีสีขาว ทึบแสง ขอบหยักเป็นคลื่น
6. ดินจากฟาร์มเลี้ยงหมู บ้านศรีใค	SFA1	โคโลนีกลมสีขาว โปร่งแสง ขอบเรียบ
	SFA2	โคโลนีกลมสีครีม ทึบแสง ขอบเรียบ
	SFA3	โคโลนีกลมสีขาวขุ่น ทึบแสง ขอบเรียบ
	SFR1	โคโลนีสีขาวขุ่น ทึบแสง ขอบหยักเป็นลอน
	SFR2	โคโลนีกลมสีครีม ทึบแสง ขอบเรียบ
	SFR3	โคโลนีสีขาว โปร่งแสง ขอบหยักเป็นคลื่น
7. ดินจากร้านอาหารยูเทอร์น	SRS1	โคโลนีสีขาวขุ่น ทึบแสง ขอบหยักเป็นลอน
	SRS2	โคโลนีกลมสีเหลืองอ่อน ทึบแสง ขอบเรียบ
	SRS3	โคโลนีกลมสีขาวขุ่น ทึบแสง ขอบเรียบ

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชนิดของตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี
	SRS4	โคโลนีกลมสีเหลืองอ่อน ทึบแสง ขอบเรียบ
	SRS5	โคโลนีสีขาวขุ่น ทึบแสง ขอบหยักเป็นคลื่น
8. ดินจากบ่อเลี้ยงปลา บริษัท S.W.T. จ. สมุทรปราการ	PTL1	โคโลนีเป็นจุดเล็ก ๆ สีขาวขุ่น ทึบแสง ขอบเรียบ
	PTL2	โคโลนีสีขาวอมชมพู ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
	PTL3	โคโลนีสีเหลือง ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
	PTL4	โคโลนลีขาวอมชมพู ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
	PTL5	โคโลนีกลม สีขาวอมเหลือง ทึบแสง ขอบเรียบ
	PTL6	โคโลนีสีเหลือง ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
	PTL7	โคโลนีสีขาวขุ่นอมเหลือง ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
	PTL8	โคโลนีสีเหลืองเข้ม ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
	PTL9	โคโลนีสีเหลืองอ่อน ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
	PTL10	โคโลนีสีเหลืองครีม ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
	PTL11	โคโลนีสีขาวขุ่น ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
9. ดินจากรางน้ำฝน บริษัท S.W.T. จ. สมุทรปราการ	PTL12	โคโลนีสีขาวขุ่น ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
	PTL13	โคโลนีสีขาว ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
	PTL14	โคโลนีสีขาวขุ่น ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
	PTL15	โคโลนีสีขาวขุ่น ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
	PTL16	โคโลนีสีขาวครีม ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
	PTL17	โคโลนีสีขาวขุ่น ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชนิดของตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี
	PTL18	โคโลนีสีขาวขุ่น ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
10. ดินบริเวณสนามฟุตบอล บริษัท S.W.T. จ. สมุทรปราการ	PTL19	โคโลนีกลม สีขาว โปร่งแสง ขอบเรียบ
	PTL20	โคโลนีกลม สีขาวอมเหลือง ทึบแสง ขอบเรียบ
	PTL21	โคโลนีขนาดเล็ก สีขาวขุ่น ทึบแสง
	PTL22	โคโลนีสีขาวขุ่น ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
	PTL23	โคโลนีสีขาวขุ่น ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบ หยัก
	PTL24	โคโลนีสีขาวขุ่น ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบ หยัก
	PTL25	โคโลนีกลม สีขาวขุ่น ทึบแสง ขอบเรียบ
	PTL26	โคโลนีกลม สีขาวขุ่น ทึบแสง ขอบเรียบ
	PTL27	โคโลนีสีขาวขุ่น ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบ หยัก
11. น้ำทิ้งจากร้านอาหาร พรเพชรงาม จ.อุบลราชธานี	PTL28	โคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาว สองวง โปร่ง แสง
	PTL29	โคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาวขุ่น ขนาดเล็ก ทึบ แสง
	PTL30	โคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาวอมเหลือง ทึบ แสง
	PTL31	โคโลนีกลม ขอบเรียบ สีขาวอมเหลือง ทึบ แสง
	PTL32	โคโลนีสีขาวอมเหลือง ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
	PTL33	โคโลนีสีขาวอมเหลือง ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
	PTL34	โคโลนีสีขาวอมเหลือง ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
	PTL35	โคโลนีสีขาวอมเหลืองเข้มทึบแสง ขอบหยัก

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชนิดของตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี
	PTL36	โคโลนีสีขาวอมเหลือง โปร่งแสง ขอบหยัก
	PTL37	โคโลนีสีขาวอมเหลือง ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
	PTL38	โคโลนีสีขาวขุ่น โปร่งแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
	PTL39	โคโลนีสีขาวขุ่น ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
	PTL40	โคโลนีสีขาวขุ่น โปร่งแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
	PTL41	โคโลนีกลม สีขาวขุ่น ทึบแสง ขอบเรียบ
	PTL42	โคโลนีกลม สีขาวขุ่น โปร่งแสง ขอบเรียบ
	PTL43	โคโลนีสีขาวอมเหลือง ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
	PTL44	โคโลนีกลม สีขาวอมเหลือง โปร่งแสง ขอบเรียบ
	PTL45	โคโลนีสีขาวอมเหลือง ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
12. ดินจากฟาร์มไก่ บริษัทก้าวหน้าไก่สด จ. อุบลราชธานี	PTL46	โคโลนีสีขาวอมเหลือง โปร่งแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก เป็นคลื่น
	PTL47	โคโลนีสีครีม ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
	PTL48	โคโลนีสีขาวขุ่นโปร่งแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก เป็นคลื่น
	PTL49	โคโลนีสีขาวขุ่น ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
	PTL50	โคโลนีสีขาวครีม ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
	PTL51	โคโลนีสีขาวครีม ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
	PTL52	โคโลนีสีขาวขุ่น ทึบแสง นูนเล็กน้อย ขอบหยัก
รวม 12 ตัวอย่าง	82 isolates	

ตารางที่ 4 ขนาดของ clear zone ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้เมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหาร tributyrin agar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

รหัสเชื้อ	ขนาดรัศมีของ clear zone (มม.)		ค่าเฉลี่ย (มม.)
	การทดลองซ้ำที่ 1	การทดลองซ้ำที่ 2	
WCA1	-	-	-
WCA2	-	-	-
WCA3	-	-	-
WCA4	-	-	-
SRE1	-	-	-
SRE2	-	-	-
SRE3	-	-	-
SRE4	-	-	-
SCA1	+++ (4.5)	+++ (4.5)	+++ (4.5)
SCA2	+++ (4.5)	+++ (4.0)	+++ (4.25)
SFA1	-	-	-
SFA2	-	-	-
SFA3	-	-	-
SFR1	-	-	-
SFR2	-	-	-
SFR3	-	-	-
WRE1	-	-	-
SRS1	++ (3.0)	++ (3.5)	++ (3.25)
SRS2	-	-	-
SRS3	-	-	-
SRS4	-	-	-
SRS5	+++ (4.5)	+++ (4.5)	+++ (4.5)
SFU1	+++ (4.5)	++ (3.0)	++ (3.5)
SFU2	-	-	-
SFU3	++ (3.5)	+++ (4.0)	++ (3.25)
SFU4	-	-	-

ตารางที่ 4 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ขนาดรัศมีของ clear zone (มม.)		ค่าเฉลี่ย (มม.)
	การทดลองซ้ำที่ 1	การทดลองซ้ำที่ 2	
SFARM1	-	-	-
SFARM2	-	-	-
SFARM4	-	-	-
SCAN6	-	-	-
PTL1	-	-	-
PTL2	-	-	-
PTL3	-	-	-
PTL4	-	-	-
PTL5	-	-	-
PTL6	-	-	-
PTL7	-	-	-
PTL8	-	-	-
PTL9	-	-	-
PTL10	-	-	-
PTL11	-	-	-
PTL13	-	-	-
PTL14	-	-	-
PTL15	-	-	-
PTL16	-	-	-
PTL18	-	-	-
PTL19	-	-	-
PTL20	-	-	-
PTL21	-	-	-
PTL22	-	-	-
PTL23	-	-	-
PTL24	-	-	-
PTL25	-	-	-

ตารางที่ 4 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	ขนาดรัศมีของ clear zone (มม.)		ค่าเฉลี่ย (มม.)
	การทดลองซ้ำที่ 1	การทดลองซ้ำที่ 2	
PTL26	-	-	-
PTL27	-	-	-
PTL28	-	-	
PTL29	+ (2.56)	+ (2.50)	+ (2.53)
PTL30	++++ (5.62)	++++ (5.81)	++++ (5.71)
PTL31	++++ (6.00)	++++ (6.13)	++++ (6.07)
PTL32	-	-	-
PTL33	-	-	-
PTL34	+++ (4.44)	+++ (4.69)	+++ (4.57)
PTL35	+++ (4.38)	+++(4.50)	+++(4.44)
PTL36	++++ (6.00)	++++ (6.13)	++++ (6.07)
PTL37	+++ (4.25)	+++ (4.81)	+++ (4.53)
PTL38	++++ (5.88)	+++ (4.62)	++++ (5.25)
PTL40	-	-	-
PTL41	++++ (5.00)	++++ (5.12)	++++ (5.06)
PTL42	-	-	-
PTL43	-	-	-
PTL44	++++ (5.99)	++++ (5.94)	++++ (5.97)
PTL45	-	-	-
PTL46	-	-	-
PTL47	-	-	-
PTL48	-	-	-
PTL49	-	-	-
PTL50	-	-	-
PTL51	-	-	-
PTL52	-	-	-

หมายเหตุ (ตารางที่ 4)

ให้ ++++ เมื่อรัศมีของบริเวณใส มีความกว้างตั้งแต่ 5.1 มม. ขึ้นไป

ให้ +++ เมื่อรัศมีของบริเวณใส มีความกว้างตั้งแต่ 4.1 – 5.0 มม.

ให้ ++ เมื่อรัศมีของบริเวณใส มีความกว้างตั้งแต่ 3.1 – 4.0 มม.

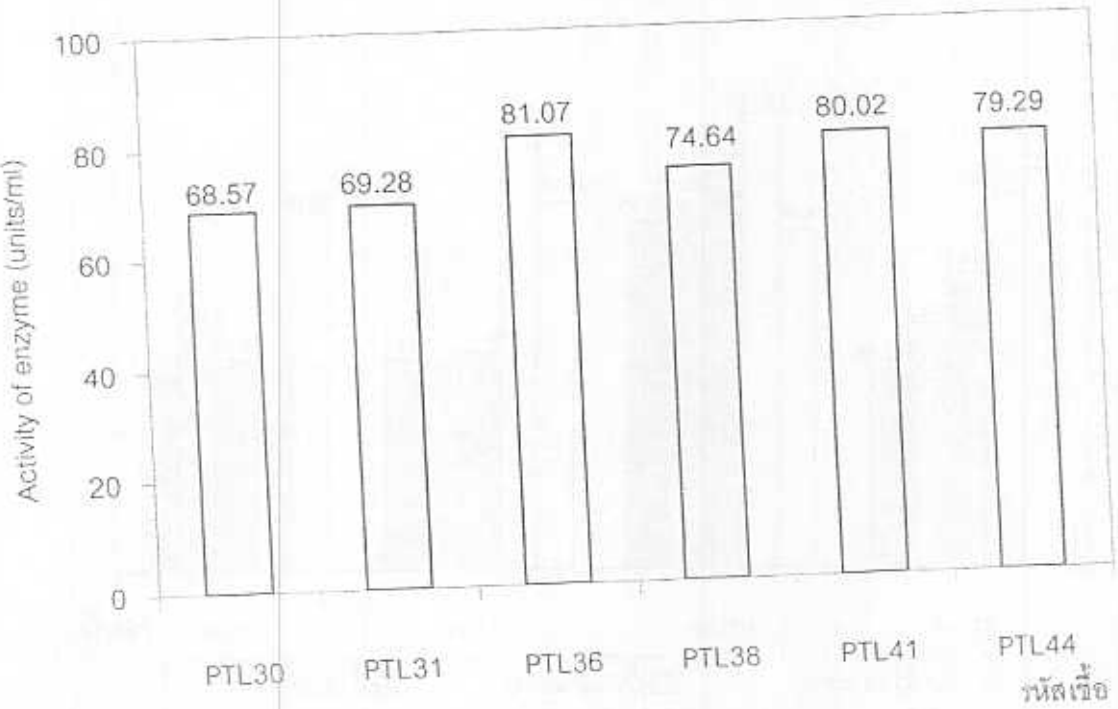
ให้ + เมื่อรัศมีของบริเวณใส มีความกว้างน้อยกว่าหรือเท่ากับ 3.00 มม.

ให้ - เมื่อไม่เกิดบริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tributyrin agar

ตารางที่ 5 กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรียจำนวน 6 isolates เมื่อใช้น้ำมันมะกอกเป็นสารตั้งต้น

รหัสเชื้อ	Activity of enzyme (unit/ml)
PTL30	68.57
PTL31	69.28
PTL36	81.07
PTL38	74.64
PTL41	80.02
PTL44	79.29

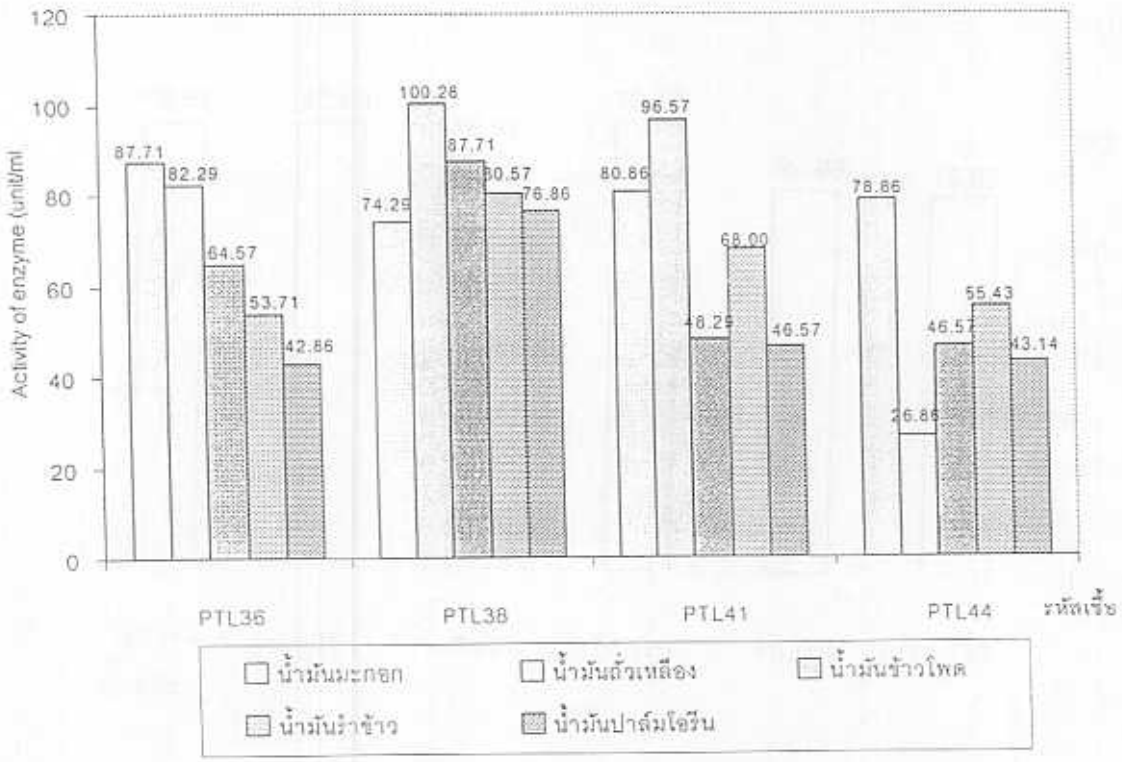
One unit of enzyme หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำมันมะกอกให้ได้กรดไขมันที่อยู่ในรูปของกรดโอลิอีค 1 ไมโครโมล ในเวลา 20 นาที



ภาพที่ 1 กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงจำนวน 6 isolates เมื่อใช้น้ำมันมะกอกเป็นสารตั้งต้นในการทดลอบ

ตารางที่ 6 กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรีย isolate PTL36, PTL38, PTL41 และ PTL44 เมื่อใช้น้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันข้าวโพด น้ำมันรำข้าว และน้ำมันปาล์มโอรีนเป็นสารตั้งต้น

ชนิดของน้ำมัน	Activity of enzyme (unit/ml)			
	PTL36	PTL38	PTL41	PTL44
น้ำมันมะกอก	87.71	74.29	80.86	78.86
น้ำมันถั่วเหลือง	82.29	100.28	96.57	26.86
น้ำมันข้าวโพด	64.57	87.71	48.29	46.57
น้ำมันรำข้าว	53.71	80.57	68.00	55.43
น้ำมันปาล์มโอรีน	42.86	76.86	46.57	43.14



ภาพที่ 2 กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงจำนวน 4 isolates (PTL36, PTL38, PTL41 และ PTL44 เมื่อใช้น้ำมันมะกอก น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันข้าวโพด น้ำมันรำข้าวและน้ำมันปาล์มโอรีน เป็นสารตั้งต้นในการทดสอบ

วิจารณ์ผลการทดลอง

ในช่วงหลายสิบปีที่ผ่านมามีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับ low-temperature lipase จาก psychrotrophic bacteria (Rashid *et al.*,2001), mesothermophilic lipase จาก mesophillic bacteria (กิตติเดช และคณะ, 2534; สุวรรณาและคณะ, 2540; Dharmsthiti and Kuhasuntisuk, 1998; Sarkar *et al.*,1998) และ thermophilic- and thermostable lipase จาก thermophilic bacteria (Kambourva *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 1999; Kulkami and Gadre, 2002) อย่างไรก็ตามนักวิจัยให้ความสนใจทำการค้นคว้าเกี่ยวกับเอนไซม์ที่ทนความร้อนสูงเพราะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท และช่วยลดต้นทุนการผลิต (Fischer *et al.*, 1993) สำหรับงานวิจัยนี้ได้ทำการแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินและน้ำจากแหล่งต่าง ๆ ในจังหวัดอุบลราชธานีและสมุทรปราการ จำนวนทั้งสิ้น 12 ตัวอย่าง ได้เชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญในอาหารที่มีน้ำมันมะกอกเป็นองค์ประกอบและเจริญที่อุณหภูมิสูง 55 องศาเซลเซียสได้ จำนวน 82 isolates เมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยไขมัน โดยตรวจดูจากความกว้างของบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tributyrin agar ได้เชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยไขมันในระดับดีมากจำนวน 6 isolates คือ isolate PTL30, PTL31, PTL36, PTL38, PTL41 และ PTL44 ซึ่งเชื้อเหล่านี้เป็นเชื้อที่คัดแยกได้จากน้ำทิ้งจากบ่อดักไขมันของร้านอาหารพรเพชรงาม อ. เมือง จ. อุบลราชธานี ซึ่งเป็นร้านอาหาร ระดับภัตราคารอาหารจีน จึงมีการใช้น้ำมันในการปรุงแต่งอาหารค่อนข้างมาก แบคทีเรียที่เจริญได้ในบ่อดักไขมันนี้ จึงเป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยสลายไขมันได้

นำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 isolates มาศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไลเปส โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิเดียวกัน พบเชื้อที่มีกิจกรรมเอนไซม์มากกว่า 75 unit/ml จำนวน 4 isolates คือ isolate PTL36, PTL38, PTL41 และ PTL44 จึงอาจกล่าวได้ว่าแบคทีเรียทั้งสี่ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์และเอนไซม์ยังมีกิจกรรมที่อุณหภูมิสูงถึง 55 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถบอกได้ว่าระดับอุณหภูมินี้เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์และกิจกรรมของเอนไซม์หรือไม่ (อยู่ระหว่างดำเนินการทดลอง) จากรายงานของสุวรรณาและคณะ (2540) กล่าวว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ $1A_{42}$ คือ 30 องศาเซลเซียส ในขณะที่เชื้อ $2C_3$ คืออุณหภูมิห้อง (26 องศาเซลเซียส) สำหรับวลีและคณะ (2537) ศึกษาพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อ *Pseudomonas* sp.J7 คือ 27 องศาเซลเซียส จากรายงานของ Dharmsthiti and Kuhasunitsuk (1998) กล่าวว่าเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* LP602 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้เอนไซม์ที่มีกิจกรรมสูงสุดที่ 55 องศาเซลเซียส แต่จะลดลง 50 % ภายในเวลา 2 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม Markossian และคณะวิจัยจากประเทศเยอรมัน พบว่าเชื้อ *Bacillus thermoleovorans* ที่ได้แยกจากบ่อน้ำพุร้อนสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสและเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาหาสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ โดยใช้น้ำมันชนิดต่าง ๆ (commercial grade oils) พบว่าน้ำมันมะกอกเป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อ isolate PTL36 และ PTL44 มากที่สุด น้ำมันถั่วเหลืองเป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อ isolate PTL38 และ PTL41 มากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก isolate PTL38 มีประสิทธิภาพในการไฮโดรไรด์น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันข้าวโพด น้ำมันรำข้าว น้ำมันปาล์มโอรีนได้สูงกว่าเอนไซม์ที่สร้างโดย isolate PTL36, PTL41 และ PTL44 Dharmsthiti and Kuhasunitsuk (1998) รายงานว่าเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* LP602 มีประสิทธิภาพในการไฮโดรไรด์ไขมันเนยได้ดีที่สุด รองลงมาคือน้ำมันละหุ่ง, น้ำมันมะพร้าว, น้ำมันมะกอก, น้ำมันถั่วเหลือง, น้ำมันสกัดจากปลาทูนา, น้ำมันปาล์มและน้ำมันรำข้าว ตามลำดับ ส่วนเอนไซม์ของ *Bacillus stearothermophilus* MC มีกิจกรรมสูงเมื่อใช้ tributyrin เป็นสารตั้งต้น (Kambourova *et al.*,2003)

สรุป

แบคเรีย isolate PTL38 ที่คัดเลือกได้เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่อุณหภูมิสูง และยังสามารถไฮโดรไรด์สารตั้งต้นได้หลายชนิด จึงเป็นแบคทีเรียที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ กระบวนการบำบัดน้ำทิ้งและอุตสาหกรรมต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับไขมันและน้ำมันได้เป็นอย่างดี

บรรณานุกรม

กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย, วิเชียร กิจปรีชาวนิช, ลาวัณย์ ไกรเดช และเลอลักษณ์ จิตดอน. 2534. วิธีการที่รวดเร็วสำหรับการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง.ว.เกษตรศาสตร์. 25 : 162-168

เกศสุคนธ์ มณีวรรณ. 2538. การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ในการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมัน. รายงานการวิจัย. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

เกรียงศักดิ์ อุดมสินโรจน์. 2543. การจัดการเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพฯ. 35 น

มนตรี จุฬาวัฒนทล, ยงยุทธ ยุทธวงศ์ และคณะ. 2542. ชีวเคมี. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ

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

สุวรรณา เนียมสนิท, งานนิจ นนทโล ประสาท โพธิ์นิ่มแดง, พลสัณห์ มหาขันธ์, สุรศักดิ์ ศิริพรอดุลศิลป์, นิยม กำลังดี. 2540. การคัดเลือกจุลินทรีย์จากน้ำทิ้งที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายไขมัน. วารสารวิจัย มข. 2(1) : ม.ค.-มี.ย.

ศิราพร ศิรเวช. 2542. การสุขาภิบาลโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร. โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรม

จากการศึกษาหาสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ โดยใช้น้ำมันชนิดต่าง ๆ (commercial grade oils) พบว่าน้ำมันมะกอกเป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อ isolate PTL36 และ PTL44 มากที่สุด น้ำมันถั่วเหลืองเป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อ isolate PTL38 และ PTL41 มากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก isolate PTL38 มีประสิทธิภาพในการไฮโดรไรด์น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันข้าวโพด น้ำมันรำข้าว น้ำมันปาล์มโอรีนได้สูงกว่าเอนไซม์ที่สร้างโดย isolate PTL36, PTL41 และ PTL44 Dharmsthiti and Kuhasunitsuk (1998) รายงานว่าเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* LP602 มีประสิทธิภาพในการไฮโดรไรด์ไขมันเนยได้ดีที่สุด รองลงมาคือน้ำมันละหุ่ง, น้ำมันมะพร้าว, น้ำมันมะกอก, น้ำมันถั่วเหลือง, น้ำมันสกัดจากปลาทูนา, น้ำมันปาล์มและน้ำมันรำข้าว ตามลำดับ ส่วนเอนไซม์ของ *Bacillus stearothermophilus* MC มีกิจกรรมสูงเมื่อใช้ tributyrin เป็นสารตั้งต้น (Kambourova *et al.*,2003)

สรุป

แบคเรีย isolate PTL38 ที่คัดเลือกได้เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่อุณหภูมิสูง และยังสามารถไฮโดรไรด์สารตั้งต้นได้หลายชนิด จึงเป็นแบคทีเรียที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ กระบวนการบำบัดน้ำทิ้งและอุตสาหกรรมต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับไขมันและน้ำมันได้เป็นอย่างดี

บรรณานุกรม

กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย, วิเชียร กิจปรีชาวนิช, ลาวัณย์ ไกรเดช และเลอลักษณ์ จิตดอน. 2534. วิธีการที่รวดเร็วสำหรับการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง.ว.เกษตรศาสตร์. 25 : 162-168

เกศสุคนธ์ มณีวรรณ. 2538. การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ในการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมัน. รายงานการวิจัย. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

เกรียงศักดิ์ อุดมสินโรจน์. 2543. การจัดการเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพฯ. 35 น

มนตรี จุฬาวัฒนทล, ยงยุทธ ยุทธวงศ์ และคณะ. 2542. ชีวเคมี. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ

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

สุวรรณา เนียมสนิท, งานนิจ นนทโล ประสาท โพธิ์นิ่มแดง, พลสัณห์ มหาขันธ์, สุรศักดิ์ ศิริพรอดุลศิลป์, นิยม กำลังดี. 2540. การคัดเลือกจุลินทรีย์จากน้ำทิ้งที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายไขมัน. วารสารวิจัย มข. 2(1) : ม.ค.-มิ.ย.

ศิวาพร ศิรมาย. 2542. การสุขาภิบาลโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร. โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรม...

จากการศึกษาหาสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ โดยใช้น้ำมันชนิดต่าง ๆ (commercial grade oils) พบว่าน้ำมันมะกอกเป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อ isolate PTL36 และ PTL44 มากที่สุด น้ำมันถั่วเหลืองเป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อ isolate PTL38 และ PTL41 มากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ไลเปสจาก isolate PTL38 มีประสิทธิภาพในการไฮโดรไรด์น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันข้าวโพด น้ำมันรำข้าว น้ำมันปาล์มโอรีนได้สูงกว่าเอนไซม์ที่สร้างโดย isolate PTL36, PTL41 และ PTL44 Dharmsthiti and Kuhasunitsuk (1998) รายงานว่าเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* LP602 มีประสิทธิภาพในการไฮโดรไรด์ไขมันเนยได้ดีที่สุด รองลงมาคือน้ำมันละหุ่ง, น้ำมันมะพร้าว, น้ำมันมะกอก, น้ำมันถั่วเหลือง, น้ำมันสกัดจากปลาทูนา, น้ำมันปาล์มและน้ำมันรำข้าว ตามลำดับ ส่วนเอนไซม์ของ *Bacillus stearothermophilus* MC มีกิจกรรมสูงเมื่อใช้ tributyrin เป็นสารตั้งต้น (Kambourova *et al.*,2003)

สรุป

แบคเรีย isolate PTL38 ที่คัดเลือกได้เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่อุณหภูมิสูง และยังสามารถไฮโดรไรด์สารตั้งต้นได้หลายชนิด จึงเป็นแบคทีเรียที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ กระบวนการบำบัดน้ำทิ้งและอุตสาหกรรมต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับไขมันและน้ำมันได้เป็นอย่างดี

บรรณานุกรม

กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย, วิเชียร กิจปรีชาวนิช, ลาวัณย์ ไกรเดช และเลอลักษณ์ จิตดอน. 2534. วิธีการที่รวดเร็วสำหรับการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง.ว.เกษตรศาสตร์. 25 : 162-168

เกศสุคนธ์ มณีวรรณ. 2538. การคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ในการบำบัดน้ำเสียที่มีไขมัน. รายงานการวิจัย. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

เกรียงศักดิ์ อุดมสินโรจน์. 2543. การจัดการเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพฯ. 35 น

มนตรี จุฬาวัฒนทล, ยงยุทธ ยุทธวงศ์ และคณะ. 2542. ชีวเคมี. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ

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

สุวรรณา เนียมสนิท, งานนิจ นนทโล ประสาท โพธิ์นิ่มแดง, พลสัณห์ มหาขันธ์, สุรศักดิ์ ศิริพรอดุลศิลป์, นิยม กำลังดี. 2540. การคัดเลือกจุลินทรีย์จากน้ำทิ้งที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายไขมัน. วารสารวิจัย มข. 2(1) : ม.ค.-มิ.ย.

ศิวาพร ศิวนาถ. 2542. การสุขาภิบาลโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร. โรงพิมพ์ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรม

เกษตรแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

Becker, P., I. Abu-Reesh, S. Markossian, G. Antranikian and H.Märkl. 1997. Determination of the kinetic parameters during continuous cultivation of the lipase-producing theermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil. *Appl Microbial Biotechnol.* 48 : 184-190.

Che Omar, L., M. Hayashi and S. Nagai. 1987. Purification and some properties of a thermostable lipase from *Humicola lanuginosa* No.3. *Agrie. Biol. Chem.* 51: 37-45.

Dharmsthiti, S. and B. Kuhasuntisuk. 1998. Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602 : biochemical properties and application for wastewater treatment. *Biotechnology*. 21 : 75-80

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

Fischer, K., L. Puchinger, K. Schloffer, W. Kreiner, K. Messner. 1993. Enzymatic pitch control of sulfite pulp on pilot scale. *J. Biotechnol.* 27: 341.

Haba, E., O. Bresco, C. Ferrer, A. Marques, M. Busquets and A. manresa. 2000. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used flying oil as selective substrate. *Enzyme and Microbial. Technology*. 26 : 40-44.

Iizumi, T., K. Nakamura and T. Fukase. 1990. Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. *Agrie. Biol. Chem.* 54: 1253-1258.

Kambourova, M., N. Kirilova, R. Mandeva and A. Derekova. 2003. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC7. *Molecular Catalysis B : Enzymatic* 22 : 307-313.

Kulkarni, N. and R.V. Gadre. 2002. Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. *Industrial Microbiology and Biotechnology* 28 : 344-348.

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

Lowrance, K. C., T. F. Fryer and B. Reiter. 1967. Rapid method for the quantitative estimation of microbial lipase. *Nature*. 25: 1264-1265.

Markossian, S., P. becker, H. Markl and G. Antranikian. 2000. Isolation and characterization of lipid-degrading *Bacillus thermoleovorans* IHI-91 from and Icelandic hotspring. *Extreamophies* 4 :365-371

Markossian S., P. Becker, H. Markl and Antranikian. 2000. Isolation and characterisation of lipid-degradating *Bacillus thermoleovorans* IHI-91 from an icelandic hot spring. *Extrophiles.* 4: 365-371.

Martinez, A. and Soberon′-Cha′ves. 2001. Charactrisation of the *lipA* gene encoding the major lipase from *Pseudomonas aeruginosa* strain IGB83. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 731-735.

Nishio, T., T. Chikano and M. Kaminura. 1987. Purification and some properties of lipase by *Pseudomonas fragi* 2239B. *Agrie.Biol.Chem.* 51: 181-186.

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

Okada Shin-Ichi. 1991. Treatment of lipid-containing wastewater using bacteria which assimilate lipids. *J Ferment Bioeng.* 71: 424-429.

Rashid, N., Y. Shimada, S. Ezaki, H. Atomi and T. Imanaka. 2001. Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4064-4069.

Sharma, R., Y. Chisti and U. C. Banerjee. 2001. Production, Purification, Characterization and Application of lipase. *Biotechnology Advances* 19 : 627-662

Sokolovska, I., C. Albasi, Jean-Pierre Riba, V. Bales. 1998. Production of extracellular lipase by *Candida cylindraea* CBS 6330. *Bio. Bioeng.* 19 : 179-186.

Sarkar, S., B. Sreekanth, S. Kant, R. Banerjee and B. C. Bhattacharyya.1998. Production and optimization of microbial lipase *Bio. Bioeng.* 19 : 29-32.

ภาคผนวก

สูตรอาหาร

1. Enrichment medium broth ประกอบด้วย Basal salt solution, 0.1 % (w/v) yeast extract และ 1.0% (v/v) olive oil

Basal salt solution (1.0 ลิตร) ประกอบด้วย

K_2HPO_4	0.8	กรัม
KH_2PO_4	0.6	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	1.0	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.05	กรัม
NaCl	3.0	กรัม
$FeCl_3$	0.001	กรัม

วิธีการเตรียม

1. เตรียมสารละลาย basal salt solution โดยชั่งส่วนผสมต่าง ๆ ตามสูตรข้างต้น ละลายในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร

2. นำไปปรับ pH 7.0

3. ละลาย yeast extract 1 กรัม ใน olive oil 10 มิลลิลิตร แล้วนำสารละลายมาปั่นด้วยเครื่องปั่นให้ olive oil กระจายตัว จากนั้นผสมกับ basalt salt solution

4. ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร

5. นำมาบรรจุในขวด แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{o}C ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Enrichment medium agar

เตรียมอาหารเช่นเดียวกับ enrichment medium broth แต่ใช้ 0.5 %olive oil และเติม 1.5 % w/v agar

3. Tributyrin agar (ต่อ 1.0 ลิตร)

Peptone	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Tributyrin	10	มล.
Agar	12	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มล.

วิธีการเตรียม

1. ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ปรับ pH เท่ากับ 7.5
2. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 $^{\circ}$C ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
3. ทิ้งไว้ให้อุ่น จากนั้นเทลงในจานเลี้ยงเชื้อ ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อ จานละ 20 มล.

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ : นางปราณี พัฒนพิพิธไพศาล

   Mrs. Pranee Pattanapipitpaisal

2. ตำแหน่งปัจจุบัน : อาจารย์

3. หน่วยงานที่ติดต่อได้ : ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
   อำเภอ วารินชำราบ จังหวัด อุบลราชธานี รหัสไปรษณีย์ 34190
   โทรศัพท์: 045-288400 ต่อ 4030 โทรสาร: 045-288380

4. ประวัติการศึกษาระดับอุดมศึกษา

   ปริญญาตรี: ชีววิทยา สถาบัน: มหาวิทยาลัยบูรพา
   ปีที่สำเร็จการศึกษา: 2527 คะแนนเฉลี่ยสะสม: 2.86
   หัวข้อสารนิพนธ์: ผลของอัลตรินและกรัมม็อกโซนต่อการเจริญของเชื้อ *Aeromonas hydrophila*
   ปริญญาโท: จุลชีววิทยา สถาบัน: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
   ปีที่สำเร็จการศึกษา: 2531 คะแนนเฉลี่ยสะสม: 3.78
   หัวข้อวิทยานิพนธ์: การศึกษาส่วนของเอนไซม์ย่อยแป้งจากเชื้อราที่ทนอุณหภูมิสูง
   ปริญญาเอก: Biological Sciences สถาบัน: The University of Birmingham
   ปีที่สำเร็จการศึกษา: 2544 คะแนนเฉลี่ยสะสม: (research)
   หัวข้อวิทยานิพนธ์: Bioreduction of chromate and detection of chromate resistance genes in Gram-positive and Gram-negative bacteria

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ : พันธุศาสตร์แบคทีเรีย เอนไซม์เทคโนโลยี จุลชีววิทยาสิ่งแวดล้อม

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องการบริหารงานวิจัย

   6.1 ผู้ร่วมวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย Characterisation of transposable elements of the actinomycete *Rhodococcus*. โดยทำงานวิจัยที่ F.A. Janssens Laboratory of Genetics, Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences, Katholieke University Leuven. ประเทศเบลเยี่ยม เมื่อ พ.ค.- ส.ค. 3539

   6.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว:

   Badar, U., N. Ahmed, A. J. Beswick, P. Pattanapipitpaisal and L. E. Macaskie. 2000. Reduction of chromate by microorganisms isolated from metal contaminated sites of Karachi, Pakistan. *Biotechnol. Lett.* 22: 829-836. (สถานภาพในการทำวิจัย: ผู้ร่วมวิจัย)

   De Mot R., I. Nagy, A. De Schrijer, P. Pattanapipitpaisal, G. Schoofs and J. Vanderleyden. 1997. Structural analysis of the 6-kb crytic plasmid pFAJ2600 from *Rhodococcus*

erythipolis N186/21 and construction of *Eschericia coli-Rhodococcus* shuttle vectors. *Microbiol.* 143: 3137-3147. (สถานภาพในการทำวิจัย: ผู้ร่วมวิจัย)

Pattanapipitpaisal, P., N. L. Brown and L. E. Macaskie. 2001. Chromate reduction and 16S rRNA identification of bacteria isolated from a Cr(VI) contaminated site. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 57: 257-261. (สถานภาพในการทำวิจัย: ผู้วิจัย)

Pattanapipitpaisal, P., N. L. Brown and L. E. Macaskie. 2001. Chromate reduction by *Microbacterium liquefaciens* immobilised in polyvinyl alcohol. *Biotechnol. Lett.* 23: 61- 65. (สถานภาพในการทำวิจัย: ผู้วิจัย)

6.3 Proceeding :

ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล 2545. การลดความเป็นพิษของโครเมียมโดยแบคทีเรีย *วารสารวิชาการ ม. อบ.* 2: 30-35.

Pattanapipitpaisal, P., J. L. Hobman, N. L. Brown and L. E. Macaskie. 2001. Bioreduction Of Cr(VI) by *Microbacterium* sp. isolated from tannery waste and used of immobilised cells for continuous removal of Cr(VI). Proceeding of the International Biohydrometallurgy Symposium, Brazil, September.

6.4 งานวิจัยที่กำลังทำ :

1). โครงการวิจัยเรื่อง การคัดเลือกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่สร้างเอนไซม์ไลเปส ทุนสนับสนุนการทำวิจัย เงินรายได้มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2546 (1 พ.ค. 46 – 30 เม.ย. 47)

สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

2) โครงการวิจัยเรื่อง การรีดิวส์โครเมตโดยแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง เงินงบประมาณเพื่อการวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2547 (1 ต.ค. 46 – 30 ก.ย. 47) สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย