บทคัดย่อ

222445

คัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสจากดินป่าไม้จำนวน 64 ตัวอย่าง ที่เก็บรวบรวมจากอุทยานแห่งชาติทุ่งแสลงหลวง อุทยานแห่งชาติน้ำหนาว อุทยานแห่งชาติภูหินร่องกล้า และเขตห้ามล่าสัตว์ป่าเขาค้อ โดยการคัดแยกด้วยอาหารที่มีน้ำมันมะกอก 1 เปอร์เซ็นต์ และ cycloheximide 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นองค์ประกอบ จากการทดลองสามารถคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสจำนวน 326 ไอโซเลท โดยแยกเป็นแบคทีเรียแกรมลบ 306 ไอโซเลท และแบคทีเรียแกรมบวก 20 ไอโซเลท จากนั้นคัดเลือกขั้นต้นด้วยอาหารที่มี tributyrin เป็นองค์ประกอบ พบว่าแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปสมีค่าดัชนีเอนไซม์ตั้งแต่ 2 ขึ้นไป ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง จำนวน 46 ไอโซเลท และเมื่อนำมาคัดเลือกในขั้นยืนยันด้วยอาหารเหลวที่มีน้ำมันมะกอกเป็นองค์ประกอบ พบว่า แบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปส จำนวน 11 ไอโซเลท เปลี่ยนสีของ bromocresol purple จากสีม่วงแดงเป็นเหลือง ภายใน 24 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี pH stat พบแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปส 3 ไอโซเลท คือ TC16, KS11 และ TC44 ให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด เท่ากับ 55.06 , 54.46 และ 51.58 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ จากการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท พบว่า ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียดังกล่าว คือ การเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 9 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง โดย ไอโซเลท KS11 และ TC16 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ที่ 48 ชั่วโมง ต่างจากไอโซเลท TC44 ที่มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ที่ 36 ชั่วโมง และแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท ผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของไอโซเลท KS11 และ TC44 คือ น้ำมันมะกอกเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างจากไอโซเลท TC16 ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำมันถั่วเหลืองเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สำหรับชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของไอโซเลท KS11 และ TC44 คือ แอมโมเนียมซัลเฟต เข้มข้น 0.25 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างจากไอโซเลท TC16 ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงสุดในอาหารที่มียีสต์เอ็กแทรกซ์ 0.35 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน และเมื่อจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ small subunit ribosomal DNA (SSU rDNA) ของแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ไลเปส 3 ไอโซเลทที่คัดแยกได้ พบว่าเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกัน คือ *Burkholderia metallica*

A total of 326 lipase-producing bacteria were isolated from 64 forest soil samples collected in 3 national parks, such as Nam Nao, Thung Salaeng Luang and Phuhin Rongkla, and Khao Kho Non-Hunting Area, by agar plate technique with medium containing (10 ml/L) olive oil and (50 mg/L) cycloheximide. They were divided into 306 isolates gram-negative bacteria, and 20 isolates of gram-positive bacteria on the basis of gram-staining. Based on ratios of diameter of clear zone and bacterial colony (Enzyme Index $\geq$ 2) on the tributyrin agar, 46 bacterial isolates were primarily screened. On the basis of fatty acid production and lipase activity in olive oil liquid medium, 7 isolates could change indicator color of bromocresol purple from purple to yellow within 24 hours. However, only three isolates, including TC16, KS11 and TC44, showed the highest specific activity of lipases indicated by 55.06, 54.46 and 51.58 U/mg protein, respectively. To optimize the condition for producing bacterial lipase, some factors, such as types and initial concentration of carbon and nitrogen sources, initial pH of media and cultivation temperatures were determined. The results indicated that all bacterial isolates grew well in the medium adjusted initial pH to 9.0 and incubated on incubator shaker at 200 rpm and at 30 °C. KS11 and TC16 had the maximum specific growth rate at 48 h in contrast to TC44 showed the maximum specific growth rate at 36 h. All 3 isolates had the maximum lipase producing at 48 h. To consider about types and initial concentrations of carbon and nitrogen sources, the results showed that KS11 could grow and produce lipase well in medium containing 1% of olive oil and 0.25% of ammonium sulfate. Similarly, TC44 could grow and produce lipase well in medium containing 1% of olive oil and 0.20 % of ammonium sulfate. However, TC16 had the maximum specific growth rate and highest lipase activity in the medium supplemented with 1% of soy bean oil and 0.35% of yeast extract. Finally, The phylogenic analysis based on 16s rRNA sequence showed that all of 3 isolates were *Burkholderia metallica*.