เอกสารอ้างอิง

กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย วิเชียร กิจปรีชาวนิช ลาวัลย์ ไกลเดช. 2534. *วิธีการที่รวดเร็วสำหรับการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

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

คล้ายอัปสร พงศ์รพีพร และคณะ. 2548. *ชีวเคมี*. คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

จุรีรัตน์ แซ่แต้. 2541. *การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่แยกได้จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

เจริญศรี มังกรณ์การณ์, ชุมนุม ศิริวัฒน์, สมทรง เลขะกุล . 2536. ชีวเคมี. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

ดุษฎี รัตนพระ. 2545. การตรึงไลเปสจาก *Pseudomonas fluorescens* เพื่อผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันพืช. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. 2548. การคัดแยกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่สร้างไลเปส *วารสารวิชาการ ม.อบ.* 7 : 95-114.

พิชญ์นาฏ สุทธิสมณ์. 2546. *การบำบัดน้ำเสียที่มีน้ำมันถั่วเหลืองโดยการเติมแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสในระบบบำบัดแบบแอคติเวตเต็ดสลัดจ์*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร

พงพันธุ์ จันทรานุรักษ์. 2545. *การกำจัดไขมันและน้ำเสียโดยเอนไซม์และจุลินทรีย์*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

ภาวิณี คณาสวัสดิ์ และ คณะ. 2541. *การพัฒนาการผลิตและการใช้ไลเปสจากจุลินทรีย์เทอร์โมไฟล์เพื่อการแปรรูปไขมันและน้ำมัน*. วิทยานิพนธ์ดุษฎีบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.เชียงใหม่.

มนตรี จุฬาวัฒนทล, ยงยุทธ ยุทธวงศ์ และ ชยานนท์ ผลโภค. 2542. *ชีวเคมี*. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพมหานคร.

วิภูมิ แก้วทอง. 2545. *การคัดเลือกและการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากแบคทีเรียชอบด่าง*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

ศศิธร สุวรรณกูชัย. 2535. *การศึกษาสมบัติและการตรึงเอนไซม์ไลเปสชนิดที่มีประสิทธิภาพที่อุณหภูมิสูงซึ่งผลิตจากจุลินทรีย์ในน้ำพุร้อนบริเวณจังหวัดเชียงใหม่*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

เสาวนีย์ ธรรมสถิติ. 2541. *การวิจัยเพื่อการผลิตเอนไซม์ที่ทนอุณหภูมิสูงเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมไขมันและในอาหารสัตว์*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพมหานคร.

สุวรรณา เนียมสนิท, งานนิจ นนทโส ประสาท โพธิ์นิ่มแดง, พลสัณห์ มหาขันธ์, สุรศักดิ์ ศิริพรอดุลศิลป์,

นิยม กำลังดี. 2540. การคัดเลือกจุลินทรีย์จากน้ำทิ้งที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายไขมัน. *วารสารวิจัย มข.* 2 : 27-35

อัจฉรา ลาภจตุรพิธ. 2546. *การโคลนยีนไลเปสจากเชื้อ Bacillus stearothermophilus 329 เข้าสู่เชื้อ Escherichia coli* DH5. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา. กรุงเทพมหานคร.

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 thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil. *Appl Microbial Biotechnol.* 48 : 184-190.

Becker, P., D. Koster, M. N. Popov, S. Markossian, G. Anlianileian, H. Marki, 1999. The biodegradation of olive oil and the treatment of lipid-rich wool scouring wastewater under aerobic thermophilic conditions. *Water Res.* 33: 653-660.

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

Dharmsthiti, S. and S. Luchai. 1998. Production and immobilization of lipase from *Aeromonas sobria* harboring a heterologus gene. *J. Ferment. Bioeng.* 86:335-337.

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

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

Jeganathan, J., A. Bassi, and G. Nakhla. 2006. Pre-treatment og high oil and grease pet food industrial wastewaters using immobilized lipase hydrolyzation. *J. Hazard. Mater.* 137(1): 121-128.

Kambourova, M. and N. Mandeva. 2003. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearoyhermophills* M7. *Molecular catalysis.* 22: 307-313.

Kirschman H.D. and R. Pomeroy, 1949 Determination of oil in oil field wastewater. *Analytical Chemistry.* **21:** 793.

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

Lanciotti, R., A. Gianotti, D. Baldi, R. Angrisani, G. Suzzi, D. Mastrocola, M. E. Guerzoni. 2005. Use of *Yarrowia lipolyticua* strains for the treatment of olive mill wastewater. *Bioresour. Technol.* 96:317-322.

Leal, M. C. M. R., M. C. M. Cammarota, D. M. G. Freire, G. L. Sant'Anna Jr. 2002. Hydrolytic enzymes as coadjuvants in the anaerobic treatment of dairy wastewater. Braz. *J. Chem. Eng.* 19: 175-180.

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.

Markossian, S., P. Becker., H. Markl. and G. Antranikian. 2000. Isolation and characterization of lipid-degrading *Bacillus theroleovorans* IHI-91 from and Icelandic hotspring. *Extreamophies.* 4: 356-371.

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.

Mongkolthanaruk, W. and S. Dharmsthti. 2002. Biodegradation of lipid-rich wastewater by a mixed bacterial consortium. *Inter. Biodeterio. Biodegrad.* 50 : 101-105.

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.

Pencreach, G.and J. C. Baratti, 1997. Properties of free and immobilised lipase from *Burkholderia cepacia* in organic media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53 : 276-280

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.

Rosevear, A., J.F. Kennedy and J.M.S. Cabral. 1987. *Immobilised Enzyme and Cells.* IOP Publishing Ltd. London.

Sharma, R., Y. Chisti. and T. Banerjee. 2002. Production, Purification, Characterization and Application of lipase. *Biotechnol. Adv.* 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.

Vemuri, G., R. Banerjee, B. C. Bhattacharyya. 1998. Immobilization of lipase using egg shell and alginate as carriers: optimization of reaction conditions. *Biopro. Engineer.* 19:111-114.

Wakelin, N. G. and C. F. Forster. 1997. An investigation into microbial removal of fats, oil And greases. *Bioresour. Technol.* 59: 37-43.

Willey, R. 2001. Fats, oils and greases: the minimization and treatment of wastewaters generated from oil refining and margarine production. *Ecotox. Environ. Safe.* 50: 127-133.

Woo, L.D., Y.S. Koh, K.J. Kim, B.C. Kim, H.J. Choi, D.S. Kim, M.T. Suhartono and Y.R. Pyun. 1999. Isolation and chalacterrization of athermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiol. Letts.* 179: 393-400.

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Enrichment medium broth I

Basalt salt solution: 0.1% w/v yeast extract, 1.0% w/v olive oil

การเตรียม Basalt salt solution ปริมาตร 1.0 ลิตร

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. ชั่งส่วนผสมต่างๆตามสูตรข้างต้น ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร (Basalt salt solution)

2. นำไปปรับ pH 7.0

3. แบ่งสารละลายที่ได้มา 200 มิลลิลิตร เตรียม yeast extract 1 กรัม ละลายให้เข้ากัน และ olive oil ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นให้ olive oil กระจายตัว

4. เติม basalt salt solution ให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร นำมาบรรจุในขวดรูปชมพู่ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Enrichment medium broth (ที่ไม่เติม yeast extract)

Basalt salt solution

1.0% w/v olive oil

การเตรียม Basalt salt solution ปริมาตร 1.0 ลิตร

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. ชั่งส่วนผสมต่างๆตามสูตรข้างต้น ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร (Basalt salt solution)

2. นำไปปรับ pH 7.0

3. เติม olive oil ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นให้ olive oil กระจายตัว

4. เติม basalt salt solution ลงไป ปรับให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร นำมาบรรจุในขวดรูปชมพู่ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Olive oil medium

Basalt salt solution

2.0% w/v olive oil

การเตรียม Basalt salt solution ปริมาตร 1.0 ลิตร

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. ชั่งส่วนผสมต่างๆตามสูตรข้างต้น ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร (Basalt salt solution)

2. นำไปปรับ pH 7.0

3. เติม olive oil ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นให้ olive oil กระจายตัว

4. เติม basalt salt solution ลงไป ปรับให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร นำมาบรรจุในขวดรูปชมพู่ แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. The synthetic (lipid-containing) wastewater medium (SLWM)

Peptone	0.6	กรัม
Beef extract	0.4	กรัม
Urea	0.1	กรัม
Na_2HPO_4	0.1	กรัม
NaCl	0.03	กรัม
$CaCl_2$	0.014	กรัม

KCl	0.014	กรัม
$MgSO_4$	0.01	กรัม

วิธีการเตรียม

1. ชั่งส่วนผสมต่างๆตามสูตรข้างต้น ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

2. เติม olive oil ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นให้ olive oil กระจายตัว

3. ตวงตัวอย่าง จำนวน 150 มิลลิลิตร นำมาบรรจุลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์กิจกรรมไลเปส

1. นำสารละลายเอนไซม์มา 4 มิลลิลิตร
2. เติม 10% emultion olive oil in 0.09% povinyl alcohol ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
3. เติม 0.2% M phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
4. บ่มสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
5. หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย acetone: alcohol (1:1) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร
6. หยดฟีนอลทาลีนเพื่อเป็นอินดิเคเตอร์
7. ไตเตรทกับสารละลายมาตรฐาน 0.05 M NaOH

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำมันและไขมัน

1. อบถ้วยระเหยขนาด 90 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำเข้าตู้ดูดความชื้น นาน 12 ชั่วโมง แล้วชั่งน้ำหนักถ้วยระเหยด้วยเครื่องชั่ง

2. เทตัวอย่างที่มีเปลือกไข่ปริมาตร 150 มิลลิลิตร จากขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่กรวยแยก แล้วเติมเฮกเซน 10 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรง 2 นาที ตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีบน Ring support ชั้นเฮกเซนซึ่งมีน้ำมันและไขมันละลายจะอยู่ส่วนบน ส่วนตัวอย่างที่มีเปลือกไข่จะอยู่ส่วนล่าง ไขส่วนล่างใส่ขวดรูปชมพูใบเดิม

3. ถ่ายชั้นของเอกเซนซึ่งมีไขมันและน้ำมันละลายอยู่ผ่านกระดาษกรองลงในถ้วยระเหยที่แห้งและน้ำหนักคงที่และชั่งน้ำหนักไว้แล้ว

4. นำส่วนล่างมาสกัดซ้ำอีก 2 ครั้ง

5. ไขชั้นบนทั้งหมดรวมกันในถ้วยระเหยใบเดิม ในครั้งสุดท้ายใช้เฮกเซนประมาณ 10 – 15 มิลลิลิตร ล้าง แล้วไขรวมกันในถ้วยกระเบื้อง

6. นำถ้วยระเหยที่มีเฮกเซนและไขมันละลายอยู่ไประเหยเอาเฮกเซนออกโดยการอบที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงแล้วใส่ในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก จากนั้นจึงนำมาหาปริมาณน้ำมันและไขมันโดยวิธี Extractive Gravimetric Method จากสูตร

$$\text{(ปริมาณน้ำมันและไขมัน) mg oil and grease/L} = \frac{(B-A) \times 100}{\text{ml sample}}$$

ตัวอย่างการคำนวณ

น้ำหนักถ้วยกระเบื้องการทดลอง = 105.66 g

น้ำหนักถ้วยกระเบื้อง+น้ำมัน = 105.93 g

$$\text{(ปริมาณไขมันและน้ำมัน) mg oil and grease/L} = \frac{(105.93 - 105.66) \times 1000}{150}$$

$$= 1.80 \text{ mg oil and grease/L}$$

ภาคผนวก ค

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

(วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ปีที่ 14 ฉบับที่ 2 เมษายน - มิถุนายน 2555)

แบบแจ้งผลการพิจารณาผลงานทางวิชาการ เพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ใน

วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

Journal of Science & Technology, Ubon Ratchathani University

วันที่ 10 ก.พ. 2555

ตามที่ ผศ.ดร.ปราณี **พัฒนพิพิธไพศาล** ได้ส่งผลงานทางวิชาการ เรื่อง **"การคัดเลือกไลเปสที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงเพื่อการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน"** เพื่อตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี นั้น

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ได้พิจารณานำผลงานดังกล่าวตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ปีที่ 14 ฉบับที่ 2 เมษายน – มิถุนายน พ.ศ.2555

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สิทธา เจนศิริศักดิ์)

ผู้ช่วยอธิการบดีฝ่ายบริการวิชาการและทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรม

โครงการจัดตั้งกองส่งเสริมการวิจัยฯ สำนักงานอธิการบดี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

โทรศัพท์ 045-353035 โทรสาร 045-288508 Email address: anatcha2010@gmail.com

การคัดเลือกไลเปสจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงเพื่อการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน

Screening of lipase from thermophilic bacteria for lipid wastewater treatment

จิราวรรณ มลาไวย์ สายน้ำผึ้ง ฉายาพัฒน์ และปราณี พัฒนพิพิธไพศาล*

ห้องปฏิบัติการไบโอรีเมดดิเอชัน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี 34190

*corresponding author, E-mail: scpranpa@gmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการย่อยสลายไขมันของไลเปสที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงจำนวน 4 สายพันธุ์ พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปสที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงสายพันธุ์ PTL36, PTL38, PTL41, และ PTL44 คือ 6.5 6.0 5.6 และ 6.0 ตามลำดับ อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 60 60 50 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ มีความคงตัวในช่วงพีเอชเท่ากับ 6.5-7.0 6.5-7.0 7.0 และ 6.0-6.5 ตามลำดับ เมื่อบ่มไลเปสไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมคงเหลือเท่ากับ 69.67 93.12 71.65 และ 55.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการตรวจวินิจฉัยด้วยเทคนิคชีวโมเลกุล สามารถจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่สังเคราะห์ไลเปส สายพันธุ์ PTL38 คือ *Geobacillus stearothermophilus* PTL38 ผลการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำไลเปสที่สังเคราะห์จาก *G. stearothermophilus* PTL38 ซึ่งเป็นไลเปสที่มีกิจกรรมสูงและมีความคงทนต่อช่วงสภาวะที่เป็นกลางและอุณหภูมิสูงมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมต่างๆ รวมทั้งการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมันต่อไป

คำสำคัญ : ไลเปส แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง ไขมัน การบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน

Abstract

Comparison of the optimization conditions for the lipolytic reaction among four thermophilic bacteria was investigated. It was found that the optimal lipase activity of strain PTL36, PTL38, PTL41, and PTL44 were pH 6.5, 6.0, 5.6, and 6.0, respectively, and at 60, 60, 50, and 60°C, respectively. The lipases were stable in the pH range of 6.5-7.0, 6.5-7.0, 7.0, and 6.0-6.5, respectively. The lipases retained 69.67%, 93.12%, 71.65%, and 55.32% of original activity after incubation at 70 °C for 30 minutes. The result showed that thermophilic bacteria isolate PTL38 synthesized lipase containing high activity and stability in acidic condition and at high temperature. From 16S rDNA sequencing analysis showed that thermophilic lipase producing bacteria strain PTL38 was *Geobacillus stearothermophilus* PTL38. The study indicated that lipase from *G. stearothermophilus* PTL38 could be further applied in industries including for lipid-contaminated wastewater treatment.

Keywords: lipase, thermophilic bacteria, lipid, lipid wastewater treatment

1. บทนำ

ปัญหาที่สำคัญของการบำบัดน้ำเสียในโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร โรงงานอุตสากรรมนมและผลิตภัณฑ์นม โรงงานผลิตเนื้อสัตว์ คือการกำจัดไขมันออกจากน้ำทิ้ง ซึ่งทำได้โดยวิธีทางกายภาพและเคมี ภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูง อย่างไรก็ตามน้ำทิ้งที่ได้จากการบำบัดโดยวิธีดังกล่าว อาจมีปริมาณไขมันลดลง แต่ความเป็นกรดเป็นด่างจะมีค่าสูงจนมีผลต่อสภาวะแวดล้อม ดังนั้น การบำบัดโดยชีววิธีโดยใช้เอนไซม์ไลเปสในการย่อยสลายไขมันให้เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล ซึ่งปฏิกิริยาสามารถเกิดขึ้นที่อุณหภูมิต่ำกว่าวิธีทางกายภาพและเคมี จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและไม่มีผลข้างเคียงต่อสิ่งแวดล้อม ทั้งยังช่วยลดการใช้พลังงานความร้อนและลดต้นทุนได้อีกทางหนึ่ง

ไลเปส หรือ triacylglycerol acylhydrolase (EC 3.1.1.3) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของไตรกลีเซอไรด์ให้เปลี่ยนเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน พบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งสัตว์ พืช แบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อรา แต่ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์เป็นแหล่งสำคัญและได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง เพราะจุลินทรีย์สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว วิธีการเพาะเลี้ยงไม่ยุ่งยาก สามารถผลิตได้ในปริมาณมาก กระบวนการผลิตและการเก็บเกี่ยวไม่ซับซ้อน [1-3] โดยเฉพาะอย่างยิ่งไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic microorganisms) เนื่องจากระบบการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน ต้องมีการให้ความร้อนสูง (อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสขึ้นไป) เพื่อให้อัตราการแตกตัวของไขมันเพิ่มขึ้น ความเหนียวหนืดของไขมันลดลง และไขมันจะอยู่ในรูปอิมัลชัน ง่ายต่อการย่อยสลายโดยเอนไซม์และจุลินทรีย์ [4] มีรายงานว่าจุลินทรีย์หลายชนิดสามารถย่อยสลายไขมันได้ จุลินทรีย์เหล่านี้ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* [5], *Pseudomonas* sp. [6], *Candida cyindracea* [7] *Bacillus* sp. [8] และ *Bacillus*

thermaleovorans [9] รวมทั้งแบคทีเรียที่ยังไม่ทราบชนิดคือ สายพันธุ์ PTL36, PTL38, PTL41 และ PTL44 [10] เนื่องจากไลเปสจากแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติในการเข้าทำปฏิกิริยาแตกต่างกัน ดังนั้น ลักษณะและคุณสมบัติของไลเปสจึงเป็นข้อมูลสำคัญสำหรับการนำไปประยุกต์ให้เหมาะสมกับสภาวะแวดล้อม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาคุณสมบัติของไลเปสที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงสายพันธุ์ PTL36 PTL38 PTL41 และ PTL44 เพื่อคัดเลือกไลเปสที่มีกิจกรรมดีในสภาวะอุณหภูมิสูงเพื่อการนำไปประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมันต่อไป

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การเตรียมหัวเชื้อและสารละลายไลเปส

เตรียมหัวเชื้อตั้งต้นโดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium A ซึ่งประกอบด้วย basal salt solution 0.1 % w/v ยีสต์สกัดและ 1 % v/v น้ำมันมะกอก บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเชื้อ (OD_{600}) เท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium A จากนั้นปิเปตหัวเชื้อตั้งต้นที่เจือจางแล้ว (5% v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ enrichment medium B (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) ซึ่งประกอบด้วย basal salt solution 0.5 % w/v ยีสต์สกัดและ 1 % v/v น้ำมันมะกอก โดยปรับพีเอชเท่ากับ 7.0 ด้วย 0.1 M HCl หรือ NaOH นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดแล้วทำการแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 19,000 xg เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสหรือสารละลายไลเปสที่ได้มาทดสอบกิจกรรมและความคงทนของไลเปสที่สภาวะแวดล้อมต่างๆ ต่อไป

2.2 พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปส

นำสารละลายไลเปสมาเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอชระดับต่างๆ คือ 4.0 4.6 5.0 5.6 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.50 และ 9.0 แล้วนำมาหากิจกรรมไลเปส [11] โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำการทดลอง

2.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปส

นำสารละลายไลเปสมาเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 แล้วนำมาหากิจกรรมไลเปสที่อุณหภูมิ 40 45 50 55 60 65 และ 70 องศาเซลเซียส โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำการทดลอง

2.4 ผลของพีเอชต่อความคงทนของไลเปส

นำสารละลายไลเปสมาเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอชระดับต่างๆ คือ 4.0 4.6 5.0 5.6 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0 8.50 และ 9.0 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที แล้วนำมาหากิจกรรมไลเปส โดยบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.3 ทำการทดลอง 3 ซ้ำการทดลอง

2.5 ผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของไลเปส

นำสารละลายไลเปส 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิระดับต่างๆ คือ 30 40 50 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาหากิจกรรมไลเปส โดยใช้พีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 และบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.3 โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำการทดลอง

2.6 การตรวจวินิจฉัยชนิดของแบคทีเรียโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

เตรียมสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วย crude cell lysate, primer pairs pA/pH′, deoxynucleoside triphosphate, *Tag* DNA polymerase และ PCR buffer อุณหภูมิที่ใช้สำหรับปฏิกิริยาคือ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 วินาที 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จำนวนปฏิกิริยาเท่ากับ 35 รอบ นำสารละลาย PCR product มาทำให้บริสุทธิ์ และนำไปวิเคราะห์หาลำดับเบสแล้วนำมาเปรียบเทียบกับ 16S rRNA gene sequence ในฐานข้อมูลของ EMBL database โดยใช้ BLAST search

3. ผลการวิจัย

3.1 สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปสที่สังเคราะห์จากเชื้อแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง สายพันธุ์ PTL36

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปสที่สังเคราะห์จากเชื้อแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง สายพันธุ์ PTL36 ผลการวิจัยพบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอชและอุณหภูมิเท่ากับ 6.5 และ 60 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 29.38 และ 34.69 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 1(ก)-1(ข) เมื่อศึกษาผลของพีเอชต่อความคงทนของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์มีความคงทนสูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 6.5 โดยมีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 32.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าเอนไซม์มีความคงทนต่ออุณหภูมิสูง โดยมีกิจกรรมคงเหลือมากกว่า 69 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 24.17 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 1 (กำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันมะกอกให้ได้กรดไขมันที่อยู่ในรูป oleic acid ปริมาตร 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 20 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด)

3.2 สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปสที่สังเคราะห์จากเชื้อแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง สายพันธุ์ PTL38

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปสที่สังเคราะห์จากเชื้อแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง สายพันธุ์ PTL38 ผลการวิจัยพบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอชและอุณหภูมิเท่ากับ 6.0 และ 60 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 34.75 และ 36.65 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2(ก)-2(ข) เมื่อศึกษาผลของพีเอชต่อความคงทนของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์มีความคงทนสูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 7.0 โดยมีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 39.13 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าเอนไซม์มีความคงทนต่ออุณหภูมิสูง โดยมีกิจกรรม

คงเหลือมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 34.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 1

3.3 สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปสที่สังเคราะห์จากเชื้อแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง สายพันธุ์ PTL41

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปสที่สังเคราะห์จากเชื้อแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง สายพันธุ์ PTL41 ผลการวิจัยพบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอชและอุณหภูมิเท่ากับ 5.6 และ 50 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 27.75 และ 29.07 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3(ก)-3(ข) เมื่อศึกษาผลของพีเอชต่อความคงทนของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์มีความคงทนสูงสูดที่พีเอชเท่ากับ 7.0 โดยมีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 27.51 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าเอนไซม์มีความคงทนต่ออุณหภูมิสูง โดยมีกิจกรรมคงเหลือมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 20.83 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 1

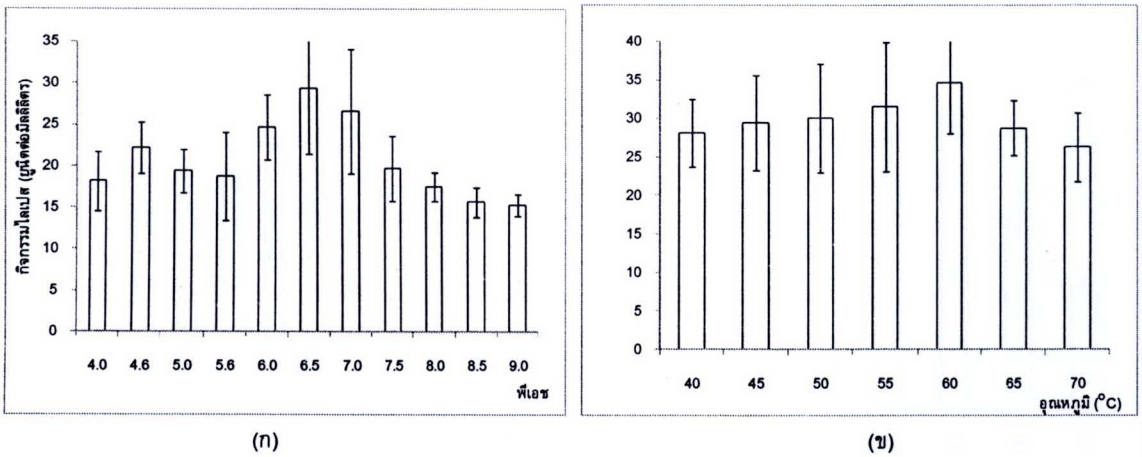
3.4 สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปสที่สังเคราะห์จากเชื้อแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง สายพันธุ์ PTL44

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปสที่สังเคราะห์จากเชื้อแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง สายพันธุ์ PTL44 ผลการวิจัยพบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอชและอุณหภูมิเท่ากับ 6.0 และ 60 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 26.63 และ 34.13 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4(ก)-4(ข) เมื่อศึกษาผลของพีเอชต่อความคงทนของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์มีความคงทนสูงสูดที่พีเอชเท่ากับ 6.0 โดยมีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 33.63 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าเอนไซม์มีความคงทนต่ออุณหภูมิสูง โดยมีกิจกรรมคงเหลือมากกว่า 55 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 18.88 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 1

เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมไลเปสของแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงทั้ง 4 สายพันธุ์ ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PTL38 เป็นแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงสามารถสังเคราะห์ไลเปสมีกิจกรรมไลเปสสูงและมีความคงทนต่ออุณหภูมิสูงกว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ PTL36 PTL41 และ PTL44 ซึ่งมีประโยชน์ในการนำเอนไซม์นี้ไปประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายไขมันในน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีการปนเปื้อนไขมันสูงได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงคัดเลือกแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงสายพันธุ์ PTL38 ในการศึกษาวิจัยต่อไป

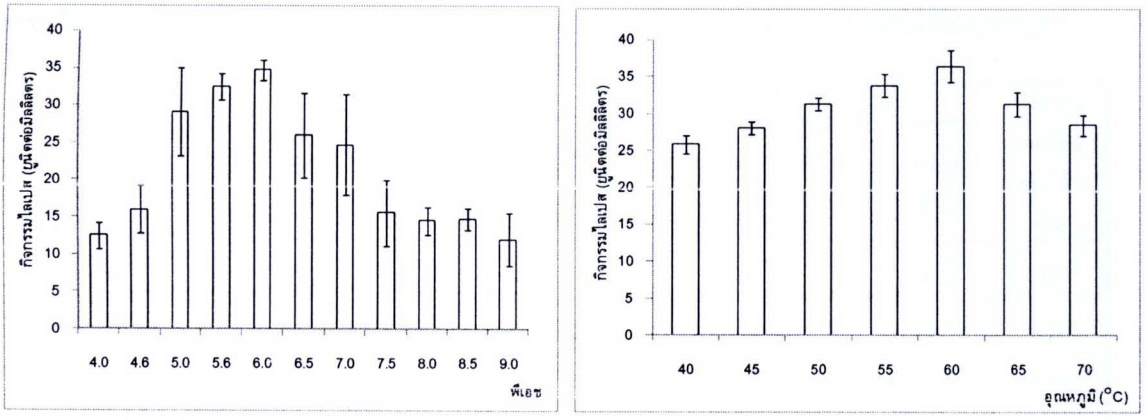
3.5 การวิเคราะห์หาระดับเบสของ 16 S rDNA

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่สังเคราะห์ไลเปสสายพันธุ์ PTL38 มาจัดจำแนกระดับสปีชีส์ด้วยเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มจำนวน 16S rDNA fragments โดยใช้ primer pairs pA/pH′ และนำ PCR product ที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับเบส (direct sequencing) โดยใช้ primer 943 reverse นำลำดับเบสที่ได้มาเปรียบเทียบหาลำดับเบสที่เหมือนกันที่สุดในฐานข้อมูลของ EMBL database โดยใช้ BLAST search ผลการสืบค้นข้อมูลพบว่า ลำดับเบสของเชื้อแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่สังเคราะห์ไลเปส สายพันธุ์ PTL38 สอดคล้อง 96 เปอร์เซ็นต์ กับลำดับเบสของ *Geobacillus stearothermophilus* 16S rRNA gene (Accession no. EU652090.1) ดังนั้นแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่สังเคราะห์ไลเปสสายพันธุ์ PTL38 คือ *Geobacillus stearothermophilus* PTL38



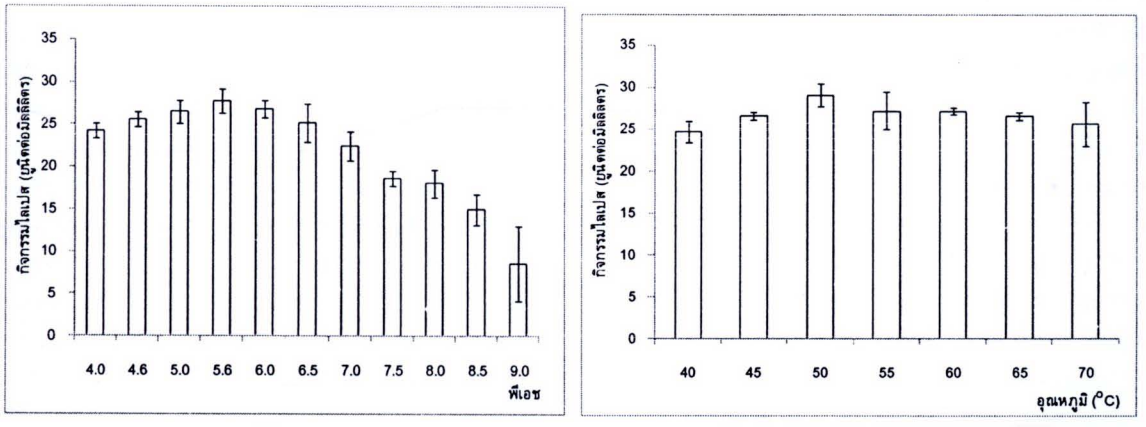
(ก) (ข)

ภาพที่ 1 กิจกรรมไลเปสที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง สายพันธุ์ PTL36 ที่พีเอช (ก) และอุณหภูมิ (ข) ระดับต่างๆ



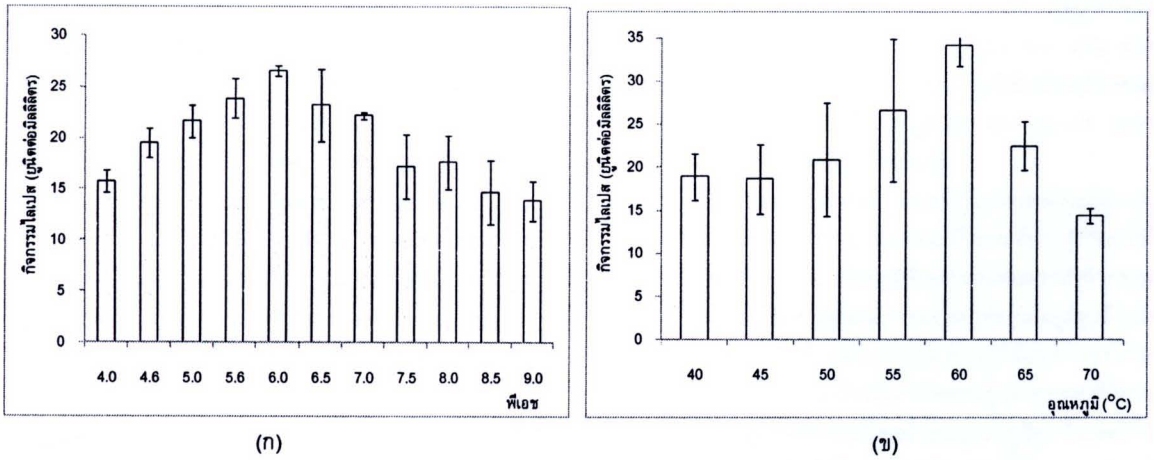
(ก) (ข)

ภาพที่ 2 กิจกรรมไลเปสที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง สายพันธุ์ PTL38 ที่พีเอช (ก) และอุณหภูมิ (ข) ระดับต่างๆ



(ก) (ข)

ภาพที่ 3 กิจกรรมไลเปสที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง สายพันธุ์ PTL41 ที่พีเอช (ก) และอุณหภูมิ (ข) ระดับต่างๆ



(ก) (ข)

ภาพที่ 4 กิจกรรมไลเปสที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง สายพันธุ์ PTL44 ที่พีเอช (ก) และอุณหภูมิ (ข) ระดับต่างๆ

ตารางที่ 1 สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการย่อยสลายไขมันและความคงทนของไลเปสที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงทั้ง 4สายพันธุ์

สายพันธุ์	พีเอชที่เหมาะสม	กิจกรรมเอนไซม์ (U/ml)	อุณหภูมิที่เหมาะสม (^{o}C)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/ml)	พีเอชที่คงทน	กิจกรรมเอนไซม์ (U/ml)	อุณหภูมิที่คงทน (^{o}C)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/ml)	กิจกรรมเอนไซม์คงเหลือ (%)
PTL 36	6.5	29.38	60	34.69	6.5	32.5	70	24.17	69.67
PTL 38	6.0	34.75	60	36.65	7.0	39.13	70	34.13	93.12
PTL 41	5.6	27.75	50	29.07	7.0	27.51	70	20.83	71.65
PTL 44	6.0	26.63	60	34.13	6.0	33.63	70	18.88	55.32

4. อธิบายผลการวิจัย

การศึกษาเปรียบเทียบสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการย่อยสลายไขมันของไลเปสที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ PTL36 PTL38 PTL41 และ PTL44 ผลการวิจัยพบว่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปสที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงทั้ง 4 สายพันธุ์ อยู่ในช่วงพีเอชที่เป็นกรดและอุณหภูมิสูงคือ 5.6-6.5 และ 50-60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ มีความคงตัวในช่วงพีเอช 6.0-7.0 และมีความคงตัวอยู่ในช่วงอุณหภูมิสูงที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมคงเหลือเท่ากับ 55.32-93.12 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงสายพันธุ์ PTL38 เป็นแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงสังเคราะห์ไลเปสที่มีกิจกรรมและความคงทนต่อช่วงสภาวะที่เป็นกลางและคงทนต่ออุณหภูมิสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 4 สายพันธุ์ และเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ไลเปสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปสแตกต่างกันคือ ไลเปสที่สังเคราะห์จากแบคทีเรีย T63 มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส และพีเอช 6.0 เมื่อเก็บไว้ที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้กิจกรรมไลเปสลดลงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ [12] สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปสที่สังเคราะห์จาก *Bacillus* sp. PS15 คือ พีเอชเท่ากับ 9.5 และอุณหภูมิเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวสูงในช่วงพีเอช 9.0-9.5 เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เอนไซม์มีกิจกรรมคงเหลือมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ และกิจกรรมไลเปสจะลดลงเหลือเพียง 31 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที [13] Lee และคณะ [1] รายงานว่าไลเปสที่ชอบร้อนที่สังเคราะห์จากแบคทีเรีย *B. thermoleovorans* ID-1 มีกิจกรรมสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำกิจกรรมมีค่าเท่ากับ 7.5 และยังมีกิจกรรมเหลือถึง 73 และ 50 เปอร์เซ็นต์ หลังการบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และบ่มที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตามลำดับ Kulkarni และ Gradre [14] รายงานว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปสที่สังเคราะห์จาก *Pseudomonas fluorescens* NS2W คือ พีเอช 9.0 และยังคงมีกิจกรรมมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มในช่วงพีเอช 3.0-11.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ไลเปสมีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และทนต่ออุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ได้อย่างน้อย 2 ชั่วโมง สำหรับไลเปสที่สังเคราะห์จาก *Burkholderia cepacia* C737-11 มีกิจกรรมดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส [15] ในขณะที่อุณหภูมิเหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปสที่สังเคราะห์จาก *Burkholderia* sp. HY-10 และ *Burkholderia* sp. C20 มีค่าเท่ากับ 60 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ [16-17] พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปสที่สังเคราะห์จาก *B. cepacia* C737-11 เท่ากับ 8.0 เช่นเดียวกับไลเปสที่สังเคราะห์จาก *Burkholderia* sp. GXU56 [18] พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปสที่สังเคราะห์จาก *Burkholderia* sp. HY-10, *Burkholderia* sp. C20 และ *Burkholderia* sp. 34-5 มีค่าเท่ากับ 8.5, 9.0 และ 9.6 ตามลำดับ [16-17] ไลเปสที่สังเคราะห์จาก *B. cepacia* C737-11 มีความคงทนต่อพีเอชในช่วง 6.0-8.0 และกิจกรรมไลเปสจะลดลงเมื่อบ่มที่พีเอชเท่ากับ 9.0 และ 10.0 [15] และยังคงมีกิจกรรมเท่ากับ 97, 88 และ 63 เปอร์เซ็นต์ของกิจกรรมไลเปสเริ่มต้น หลังการบ่มที่อุณหภูมิ 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 20 นาที

ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง *G. stearothermophilus* PTL38 สังเคราะห์ไลเปสที่ทำปฏิกิริยาดีที่ช่วงพีเอชเป็นกรด (6.0) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำกิจกรรมคือ 60 องศาเซลเซียส และยังมีความคงทนต่ออุณหภูมิสูงถึง 70 องศาเซลเซียส ซึ่งช่วงพีเอชและอุณหภูมิดังกล่าวตรงกับลักษณะทางกายภาพของน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีการปนเปื้อนไขมันสูงคือมีระดับพีเอชต่ำและอุณหภูมิสูง จึงแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำไลเปสที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียนี้ไปประยุกต์ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมและกระบวนการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมันได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ 2551 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสถานที่สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้

6. บรรณานุกรม

[1] Lee D. W., Y. S. Koh, Ki-Jun Kim, B. C. Kim, H. J. Choi, D. S. Kim, M.T. Suhartono and Y. R. Pyun. (1999). Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiol. Lett.* 179: 393-400.

[2] Sharma, R., Y. Chisti. and T. Banerjee. (2001). Production, purification, characterization and application of lipase. *Biotechnol. Adv.* 19: 627-662.

[3] 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.

[4] 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 thermophile *Bacillus* sp. IHI-91 on olive oil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 184-190.

[5] Martinez, A. and S. Cha′ves. (2001). Characterization of the *lipA* gene encoding the major lipase from *Pseudomonas aeruginosa* strain IGB83. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 731-735.

[6] 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.

[7] 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.

[8] Okada S. I. (1991). Treatment of lipid-containing wastewater using bacteria which assimilate lipids. *J Ferment. Bioeng.* 71: 424-429.

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

[10] ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. 2548. การคัดแยกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่สร้างไลเปส *วารสารวิชาการ ม.อบ.* 7: 95-114.

[11] 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.

[12] ภาวิณี คณาสวัสดิ์. (2541). *การพัฒนาการผลิตและการใช้ไลเปสจากจุลินทรีย์เทอร์โมไฟล์เพื่อการแปรรูปไขมันและน้ำมัน*. วิทยานิพนธ์ดุษฎีบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

[13] จุรีรัตน์ แซ่แต้. (2541). *การคัดเลือกและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่แยกได้จากโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.

[14] Kulkarni, N. and R.V. Gadre. (2002). Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. *Indust. Microbiol. Biotechnol.* 28: 344-348.

[15] Ma Q., X. Sun, and S. Gong. (2010). Screening and Identification of a highly lipolytic bacterial strain from barbecue sites in Hainan and characterization of its lipase. *Ann. Microbiol.* 60: 429-437.

[16] Liu, C. H., W. B. Lu and J. S. Chang. (2006). Optimizing lipase production of *Burkholderia* sp. by response surface methodology. *Process Biochem.* 41: 1940-1944.

[17] Park, D. S., H. W. Oh, S. Y. Heo, W. J. Jeong, D. H. Shin, K. S. Bae, and H. Y. Park. (2007). Characterization of an extracellular lipase in *Burkholderia* sp. HY-10 isolated from a longicorn beetle. *J. Microbiol.* 45: 409-417.

[18] Wei,H. N. and B. Wu. (2008). Screening and immobilization *Burkholderia* sp. GXU56 lipase for enantioselective resolution of (R, S)-methylmandelate. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 149: 79-88.

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นางปราณี พัฒนพิพิธไพศาล

(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Pranee Pattanapipitpaisal

2. เพศ หญิง สถานภาพ สมรส

3. วันเดือนปีเกิด 21 สิงหาคม 2505

4. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

5. ที่อยู่ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
อำเภอ วารินชำราบ จังหวัด อุบลราชธานี รหัสไปรษณีย์ 34190
โทรศัพท์: 045-288400 ต่อ 4502 โทรสาร: 045-288380

6. E-mail address: praneesci@gmail.com

7. ประวัติการศึกษา

7.1 ปริญญาตรีสาขาชีววิทยา ปีที่สำเร็จการศึกษา : 2527
สถาบันการศึกษา มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศไทย

7.2 ปริญญาโทสาขา จุลชีววิทยา ปีที่สำเร็จการศึกษา: 2531
สถาบันการศึกษา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย

7.3 ปริญญาเอกสาขา Biological Sciences ปีที่สำเร็จการศึกษา: 2544
สถาบัน: The University of Birmingham ประเทศอังกฤษ
แหล่งทุนที่ได้รับในขณะศึกษาระดับปริญญาเอก ทุนพัฒนาอาจารย์ สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

8. ผลงานวิจัย

8.1 ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่

1. ปราณี มุ่งสันติ. 2527. ผลของแอลดิลและกรัมม็อกโซนต่อการเจริญของ *Aeromonas hydrophila* (Effect of Adrin and Gromxon on the growth of *Aeromonas hydrophila*. สารนิพนธ์ระดับปริญญาตรี. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน ชลบุรี.
2. ปราณี มุ่งสันติ. 2531. การศึกษาเอนไซม์ย่อยแป้งที่ผลิตจากเชื้อราเจริญที่อุณหภูมิสูง (A Study on Starch Saccharifying Enzyme from Thermotolerant Fungi) วิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพมหานคร.
3. ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. 2545. การลดความเป็นพิษของโครเมียมโดยแบคทีเรีย *วารสารวิชาการ ม.อบ.* 2: 30-35.
4. ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. 2547. การคัดแยกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่มีประสิทธิภาพในการรีดิวส์โครเมต *วารสารวิชาการ ม.อบ.* 6 : 53-63.
5. ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. 2548. การคัดแยกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่สร้างไลเปส *วารสารวิชาการ*

ม.อบ. 7 : 95-114.

6. ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. 2549. การลดปริมาณโครเมตที่มีความเป็นพิษโดยเซลล์และสารสกัดจากเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยโพลีไวนีลแอลกอฮอล์. *วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง.* 15: 1-11.
7. ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. 2549. การลดความเป็นพิษของโครเมตโดยเซลล์แบคทีเรีย *Bacillus fusiformis* NTR9 และเม็ดบีทตรึงเซลล์. การประชุมวิชาการ ม. อบ. ครั้งที่ 1. 28-29 กรกฎาคม 2549 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. อุบลราชธานี.
8. ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. 2551. การปนเปื้อนสารหนูในน้ำใต้ดินเขตลุ่มแม่น้ำโขงตอนล่าง. *วารสารวิชาการ ม.อบ.* 10: 27-39.
9. ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล เอมอร คำเพราะ และรัชฎาพร นวะพิฒ. 2552. การคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการ เจริญของเชื้อราสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ. วารสารวิชาการ ม.อบ. 11: 9-17.
10. 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. *Biotechnology Letters*. 22: 829-836.
11. De Mot R., I. Nagy, A. De Schrijer, **P. Pattanapipitpaisal**, G. Schoofs and J.
12. Vanderleyden. 1997. Structural analysis of the 6-kb crytic plasmid pFAJ2600 from *Rhodococcus erythopolis* N186/21 and construction of *Escherichia coli-Rhodococcus* shuttle vectors. *Journal of Microbiology*. 143: 3137-3147.
13. **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. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57: 257-261.
14. **Pattanapipitpaisal P.**, N.L. Brown and L. E. Macaskie. 2001. Chromate reduction by *Microbacterium liquefaciens* immobilized in polyvinyl alcohol. *Biotechnology Letters.* 23: 61-65.
15. **Pattanapipitpaisal P.**, A. N. Mabbett, J. A. Finlay, A. J. Beswick, M. Paterson-Beedle, A.
16. Essa, J. Wright, M. R. Tolly, U. Badar, N. Ahmed, J. L. Hobman, N. L. Brown and L. E. Macaskie. 2001. Reduction of Cr(VI) and bioaccumulation of chromium by Gram-positive and Gram-negative microorganisms not previously exposed to Cr-stress. *Environmental Teachnology*. 23:731-745.
17. **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.

18. Nuratsa, I and **P. Pattanapipitpaisal**. 2004. Chromate removal by polyvinyl alcohol-immobilized bacterium. 30th C

19. ongress on Science and Technology of Thailand 19-21 October 2004. Impact Exhibition and Convention Center, Muang Thong Thani, Bangkok.

9. โครงการวิจัยที่ได้รับทุนสนับสนุน :

1). โครงการวิจัยเรื่องการใช้กล้าเชื้อแอคติโนมัยสีทปฏิปักษ์ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อสาเหตุโรคเพื่อการผลิตพริกและแตงกวาอินทรีย์ ทุนสนับสนุนจากฝ่ายวิชาการ สำนักงานกองทุนสนับสนุนวิจัย ปีงบประมาณ 2549-2552 (28 ก.ค. 49 – 27 ก.ค. 52) สถานภาพการวิจัย: หัวหน้าโครงการ (ดำเนินการเรียบร้อย)

2). โครงการวิจัยเรื่องการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศด้วยกล้าเชื้อเอนโดฟัยติคแอคติโนมัยสีท เงินงบประมาณเพื่อการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2550- 2551 (1 ต.ค. 49 – 30 ก.ย. 51) สถานภาพการวิจัย: หัวหน้าโครงการ (ดำเนินการเรียบร้อย)

3). โครงการวิจัยเรื่อง การรีดิวส์โครเมตโดยเซลล์และเอนไซม์โครเมตรีดัสเตสที่ถูกตรึง เงินงบประมาณเพื่อการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2548-2549 (1 ต.ค. 47 – 30 ก.ย. 49) สถานภาพการวิจัย: หัวหน้าโครงการ (ดำเนินการเรียบร้อย)

4). โครงการวิจัยเรื่อง การตรวจวินิจฉัยและเก็บรวบรวมแอคติโนมัยสีทที่แยกจากดินในเขตพื้นที่มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี เงินงบประมาณเพื่อการวิจัยโครงการทำนุบำรุงศิลปวัฒนธรรม ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2547 (1 ต.ค. 46 – 30 ก.ย. 47) สถานภาพการวิจัย: หัวหน้าโครงการ (ดำเนินการเรียบร้อย)

5). โครงการวิจัยเรื่อง การรีดิวส์โครเมตโดยแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูง เงินงบประมาณเพื่อการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2547 (1 ต.ค. 46 – 30 ก.ย. 47) สถานภาพการวิจัย: หัวหน้าโครงการ (ดำเนินการเรียบร้อย)

6). โครงการวิจัยเรื่อง การคัดเลือกแบคทีเรียทนอุณหภูมิสูงที่สร้างเอนไซม์ไลเปส ทุนสนับสนุนการทำวิจัยเงินรายได้มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2546 สถานภาพการวิจัย: หัวหน้าโครงการ (ดำเนินการเรียบร้อย)