การคัดเลือกไลเปสจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงเพื่อการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน

Screening of Lipase from Thermophilic Bacteria for Lipid Wastewater Treatment

จิราวรรณ มลาไวย์ สายน้ำผึ้ง ฉายาพัฒน์ และปราณี พัฒนพิพิธไพศาล*

ห้องปฏิบัติการไบโอรีเมตดิเอชัน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อ. วารินชำราบ จ. อุบลราชธานี 34190

*E-mail: scpranpa@gmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการย่อยสลายไขมันของไลเปสที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงจำนวน 4 สายพันธุ์ พบว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมไลเปสที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงสายพันธุ์ 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

This study investigated and compared optimal conditions for the lipolytic reaction of four thermophilic bacteria strains, PTL36, PTL38, PTL41, and PTL44. It was found that the optimal lipase activity of PTL36, PTL38, PTL41, and PTL44 were pH 6.5, 6.0, 5.6, and 6.0 respectively at 60°C, 60°C, 50°C, and 60°C respectively. The lipases were stable in the pH ranges 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% respectively of original activity after incubation at 70°C for 30 minutes. Results showed that PTL38 synthesized lipase contained high activity and stability in acidic conditions and at high temperatures. 16S rDNA sequencing analysis revealed that PTL38 was *Geobacillus stearothermophilus* PTL38. The study indicated that lipase from *G. stearothermophilus* PTL38 could be applied in industrial contexts, such as 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 พบได้ทั่วไปใน

สิ่งมีชีวิตหลายชนิดทั้งสัตว์ พืช แบคทีเรีย ยีสต์และเชื้อรา แต่ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์เป็นแหล่งสำคัญและได้รับความสนใจอย่างกว้างขวาง เพราะจุลินทรีย์สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว วิธีการเพาะเลี้ยงไม่ยุ่งยาก สามารถผลิตได้ในปริมาณมาก กระบวนการผลิตและการเก็บเกี่ยวไม่ซับซ้อน [1], [2] ,[3] โดยเฉพาะอย่างยิ่งไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic microorganisms) เนื่องจากระบบการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมัน ต้องมีการให้ความร้อนสูง (อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ขึ้นไป) 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 ลักษณะและคุณสมบัติของไลเปส จึงเป็นข้อมูลสำคัญสำหรับการนำไปประยุกต์ให้เหมาะสมกับสภาวะแวดล้อม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาคุณสมบัติของไลเปสที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงสายพันธุ์PTL36 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 เมื่อครบกำหนดแล้วแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 19,000 xg เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสหรือสารละลายไลเปสที่ได้มาทดสอบกิจกรรม และความคงทนของไลเปสที่สภาวะแวดล้อมต่างๆ 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 พบว่าเอนไซม์มีความคงทนสูงสูดที่พีเอชเท่ากับ 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 ยูนิตของเอนไซม์หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันมะกอกให้ได้กรดไขมันที่อยู่ในรูป 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 พบว่าเอนไซม์มีความคงทนสูงสูดที่พีเอชเท่ากับ 7.0 โดยมีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 39.13 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าเอนไซม์มีความคงทนต่ออุณหภูมิสูง โดยมีกิจกรรมคงเหลือมากกว่า 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

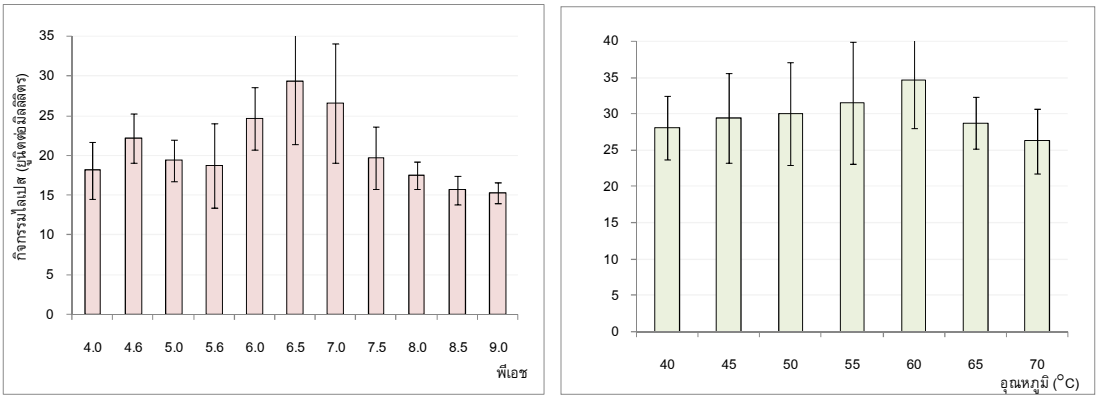
เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าเอนไซม์มีความคงทนต่ออุณหภูมิสูง โดยมีกิจกรรมคงเหลือมากกว่า 55 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 18.88 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 1

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

3.5 การวิเคราะห์หาระดับเบสของ 16 S rDNA

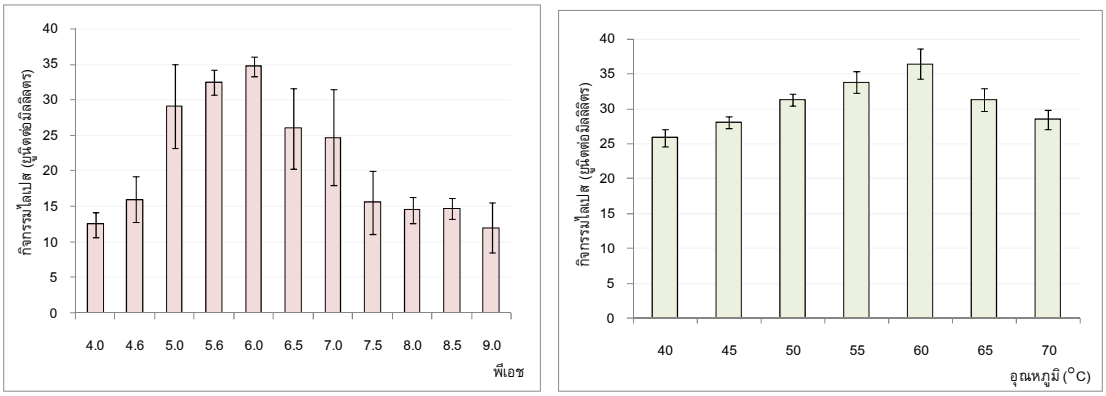
เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูงที่สังเคราะห์ไลเปส สายพันธุ์ PTL38 มาจัดจำแนกระดับสปีชีส์ด้วยเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มจำนวน 16S rDNA fragments โดยใช้ primer

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



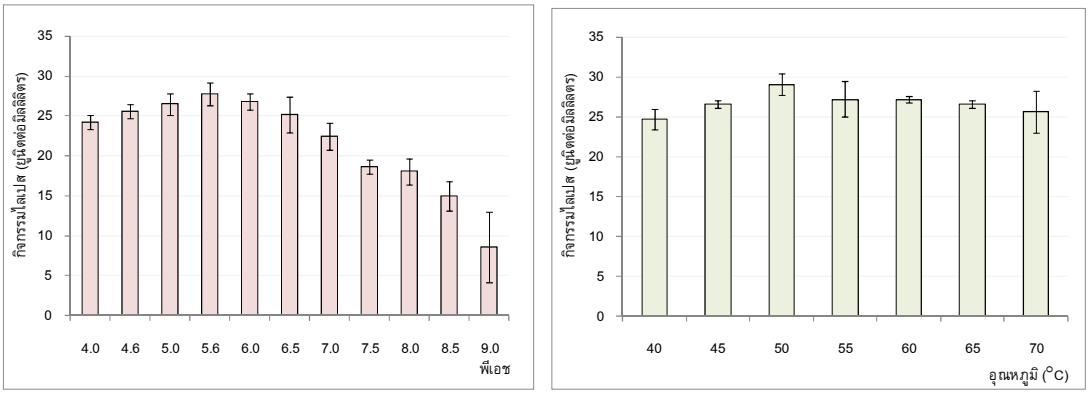
(ก) (ข)

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



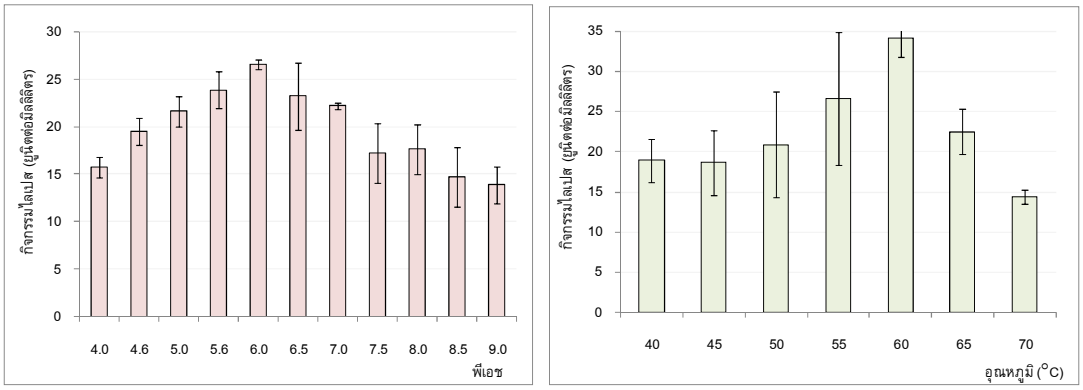
(ก) (ข)

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 4 สายพันธุ์

สายพันธุ์	พีเอชที่เหมาะสม	กิจกรรมเอนไซม์ (U/ml)	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/ml)	พีเอชที่คงทน	กิจกรรมเอนไซม์ (U/ml)	อุณหภูมิที่คงทน (°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 และมีความคงตัวสูงในช่วง พีเอช 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] พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรม ไลเปสที่สังเคราะห์จาก *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) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำกิจกรรม คือ 60 องศาเซลเซียส และยังมีความคงทนต่ออุณหภูมิสูงถึง 70 องศาเซลเซียส ซึ่งช่วงพีเอชและอุณหภูมิดังกล่าวตรงกับลักษณะทางกายภาพของน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมที่มีการปนเปื้อนไขมันสูงคือมีระดับพีเอชต่ำและอุณหภูมิสูง จึงแสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำไลเปสที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียนี้ไปประยุกต์ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมและกระบวนการบำบัดน้ำเสียที่ปนเปื้อนไขมันได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงบประมาณ 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.** วิทยานิพนธ์: 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.