รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การโคลนและสมบัติของยีนไลเปสจาก *Bacillus* sp. ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสประสิทธิภาพสูง
(Cloning and characterization of lipase-encoding gene from high-efficiency lipase producing *Bacillus* sp.)

หัวหน้าโครงการ

ดร. พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประเภทเงินรายได้ (เงินอุดหนุนรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ 2557

กิตติกรรมประกาศ

งานส่วนแรกของโครงการวิจัยนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปได้ ทั้งนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เป็นอย่างสูง ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2557 และขอขอบพระคุณหน่วยงานต้นสังกัด ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์
หัวหน้าโครงการวิจัย

หัวข้อโครงการวิจัย การโคลนและสมบัติของยีนไลเปสจาก *Bacillus* sp. ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสประสิทธิภาพสูง

หัวหน้าโครงการวิจัย ดร. พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์*

บทคัดย่อ

Bacillus sp. BLCD 003 สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสในอาหาร Production medium ที่มีน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 1.0 ± 0.09 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อศึกษาระดับอณูชีววิทยาถึงยีนสังเคราะห์เอนไซม์ไลเปส สามารถจำแนกยีนไลเปสบางส่วนของ *Bacillus* sp. BLCD003 (308 bp) ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงสูงสุดกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไลเปสจาก *Bacillus pumilus* และมีลำดับกรดอะมิโน (103 residues) คล้ายคลึงสูงสุดกับลำดับกรดอะมิโน ของเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus pumilus* อย่างไรก็ตาม ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหลืออยู่ของทั้งชิ้นยีนไลเปส จึงจะสามารถใช้ในการโคลนนิ่งเพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสต่อไปได้

คำสำคัญ: ยีนไลเปส, เอนไซม์ไลเปส, *Bacillus* sp.

*ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
Email : patcharanan@go.buu.ac.th, patcharanana@gmail.com

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา	3
รายละเอียดเกี่ยวกับ *Bacillus* sp.	3
รายละเอียดเกี่ยวกับเอนไซม์ไลเปส	5
รายละเอียดเกี่ยวกับปาล์มน้ำมัน	14
รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา	15
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง	17
บทที่ 4 ผลการทดลอง	25
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	36
เอกสารอ้างอิง	38
ภาคผนวก	45
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	46
ภาคผนวก ข สารเคมีและบัฟเฟอร์	48
ภาคผนวก ค ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไลเปส	52
ภาคผนวก ง Multiple alignment ของลำดับกรดอะมิโนของไลเปสจาก *Bacillus* spp. ในฐานข้อมูล GenBank	53

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มจำนวนยีนไลเปส.....	26
2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มจำนวนยีนไลเปสที่เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank	27
3	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มจำนวนยีนไลเปสคู่ไพรเมอร์ OXF1-ACR2 และ OXF2-ACR2.....	29
4	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณอนุรักษ์ของยีนไลเปส.....	34
5	ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของไลเปสที่เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank....	35

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus* sp. ไอโซเลต BLCD 003 (จากการศึกษานี้).....	4
2	การทำปฏิกิริยาต่างๆของเอนไซม์ไลเปส.....	9
3	ผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มจำนวนยีนไลเปสบน 1% Agarose gel	26
4	Multiple sequence alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่อ่านจากไพรเมอร์ OXF	30
5	Multiple sequence alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่อ่านจากไพรเมอร์ ACR	32
6	Multiple sequence alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไลเปส.....	34
7	ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนไลเปสจากการศึกษานี้.....	35
8	ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการ Translate ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไลเปส.....	35

บทที่ 1
บทนำ

ไลเปส (Lipase; EC 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่สามารถไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ได้ผลผลิตเป็นโมโนกลีเซอรอล ไดกลีเซอไรด์ และกรดไขมันอิสระ (เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน, 2545) ไลเปสไม่เพียงสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ในสภาวะที่มีน้ำแต่ไลเปสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการสร้างเอสเทอร์ และเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ในสภาวะที่มีการควบคุมปริมาณน้ำในปฏิกิริยา (Mitsuhashi *et al*., 1999) เนื่องจากสับสเตรตของไลเปสมักเป็นโมเลกุลที่ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ หรือตัวกลางที่ประกอบไปด้วยน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ (Agino *et al*., 2000) เอนไซม์ไลเปสถูกนำไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมด้านต่างๆ เช่น อาหาร เภสัชกรรม สิ่งทอ เครื่องสำอาง โพลีเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด และการผลิตไบโอดีเซล (Hasan *et al*., 2006b; Jaeger and Eggert, 2002; Jaeger and Reetz, 1998) ซึ่งไบโอดีเซลนั้นเป็นอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศเป็นอย่างมากในปัจจุบัน

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชเศรษฐกิจที่รัฐบาลได้สนับสนุนและส่งเสริมให้มีการเพาะปลูกเพิ่มมากขึ้นภายในประเทศ เพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไบโอดีเซล เนื่องจากปาล์มน้ำมันมีข้อดีหลายประการ ได้แก่ สามารถให้ผลผลิตน้ำมันได้ในปริมาณมาก มีศัตรูพืชน้อย ช่วยลดปริมาณการปล่อยก๊าซเรือนกระจกได้มากกว่า rapeseed (Thamsiriroj and Murphy, 2009) และสิ้นเปลืองพลังงานสุทธิที่ใช้ในกระบวนการเพาะปลูก การสกัดน้ำมัน การผลิตไบโอดีเซล และการขนส่งน้อยกว่าสบู่ดำและมะพร้าว (Pleanjai and Gheewala, 2009) ดังนั้น น้ำมันปาล์มจึงเป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล

เอนไซม์ไลเปสถูกผลิตได้โดยจุลินทรีย์ทั้งในกลุ่มราและแบคทีเรีย แบคทีเรียมีความได้เปรียบกว่าราตรงที่แบคทีเรียมีอัตราการเจริญเร็วกว่ารา จึงสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในเวลาอันสั้น *Bacillus* sp. เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ แบคทีเรียสกุล *Bacillus* sp. สามารถคัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ แบคทีเรียสกุล *Bacillus* sp. ผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด โดยเอนไซม์ส่วนใหญ่รวมไปถึงเอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่ถูกขับออกนอกเซลล์ (Extracellular enzyme) และระดับเอนไซม์ที่แบคทีเรีย *Bacillus* sp. ผลิตได้นั้นขึ้นอยู่กับสภาวะในการเลี้ยงเชื้อ เช่น ชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่แตกต่างกันด้วย (Hasan et al., 2006a)

เพื่อเป็นการส่งเสริมการใช้น้ำมันปาล์มและการใช้พลังงานทางเลือกอย่างยั่งยืนในประเทศ และสนับสนุนนโยบายของภาครัฐด้านความมั่นคงทางพลังงานที่ส่งเสริมให้มีการผลิตและการใช้ไบโอดีเซลเพิ่มขึ้นภายในประเทศเพื่อลดการนำเข้าน้ำมันจากฟอสซิล งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาการนำเอนไซม์ไลเปสประสิทธิภาพสูงจาก *Bacillus* sp. มาใช้ในการผลิตไบโอดีเซลโดยมีน้ำมันปาล์มเป็นสารตั้งต้น และศึกษาลักษณะของยีนและเอนไซม์ที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. ที่ผ่านการคัดเลือกมาแล้วในห้องปฏิบัติการของผู้วิจัยว่ามีความสามารถในการย่อยสลายลิพิดได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง ผลจากการศึกษานี้อาจจะทำให้ได้รับข้อมูลใหม่ๆเกี่ยวกับลักษณะของยีนและเอนไซม์ไลเปสที่แตกต่างออกไปจากข้อมูลจากงานวิจัยอื่นๆ และข้อมูลในระดับอณูชีววิทยาจะเป็นข้อมูลที่สามารถนำไปใช้ศึกษาต่อยอดในการปรับปรุงสายพันธุ์ *Bacillus* sp. หรือเพิ่มการแสดงออกของยีนไล

เปสเพื่อการผลิตเอนไซม์ ไลเปสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้นหรือผลิตได้ในปริมาณมาก นอกจากนี้ ผลที่ได้จากการศึกษาอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ จะเป็นข้อมูลที่สำคัญสำหรับการนำเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. ไปพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์จริงในกระบวนการทางอุตสาหกรรมต่อไป

ความมุ่งหมายของการศึกษา

เพื่อศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ไลเปสประสิทธิภาพสูงจากเชื้อ *Bacillus* sp. โดยใช้น้ำมันปาล์มเป็นสารตั้งต้น

ความสำคัญของการศึกษา

การศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบถึงข้อมูลเกี่ยวกับยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. ซึ่งอาจมีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะ

สมมติฐานของการศึกษา

Bacillus sp. มียีนไลเปสเนื่องจากเป็นไอโซเลตที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้

ขอบเขตของการศึกษา

Bacillus sp. ถูกนำมาตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหาร Emulsion tributyrin agar และอาหาร Production medium จากนั้นทำการตรวจหายีนไลเปสของ *Bacillus* sp. โดยสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอมาเป็นแม่แบบในการเพิ่มจำนวนยีนไลเปสแล้วนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ตลอดจนการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนเพื่อยืนยันหน้าที่ของยีนไลเปส

สถานที่ทำการทดลอง

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา แบ่งออกเป็น 6 หัวข้อ ดังนี้

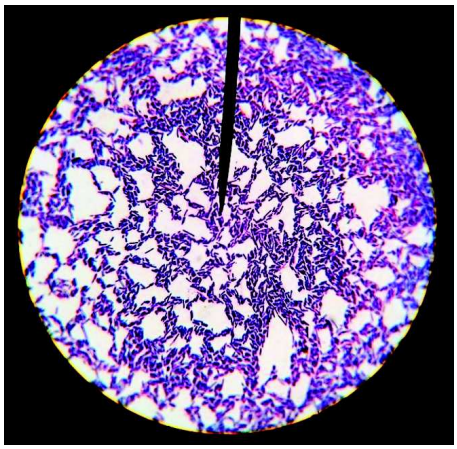
1. รายละเอียดเกี่ยวกับ *Bacillus* sp.
2. รายละเอียดเกี่ยวกับเอนไซม์ไลเปส
3. รายละเอียดเกี่ยวกับปาล์มน้ำมัน
4. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

1. รายละเอียดเกี่ยวกับ *Bacillus* sp.

เชื้อ *Bacillus* จัดอยู่ในวงศ์ Bacillaceae ในปัจจุบันมีมากกว่า 60 สปีชีส์ เป็นแบคทีเรียในกลุ่มแอโรบส์ (Aerobes) หรือแฟคัลเททีฟแอนแอโรบส์ (Facultative anaerobes) มีรูปแท่งติดสีแกรมบวกมีการเรียงตัวเป็นสายยาว (ภาพที่ 1) และสร้างสปอร์ บางครั้งอาจพบว่าเชื้อ *Bacillus* ที่มีอายุนานหลายวันจะมีการติดสีได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ (Gram-variable) เชื้อ *Bacillus* ให้ผลบวกต่อการทดสอบออกซิเดสและคาทาเลส สปอร์ของเชื้อ *Bacillus* จะถูกสร้างขึ้นในสภาวะที่มีออกซิเจน สปอร์จะทำให้เชื้อมีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้ดี เชื้อมีการเจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารครบถ้วน เช่น Blood agar พบเชื้อนี้ได้ทั่วไปตามธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ อากาศ ฝุ่นละออง ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่มีการดำรงชีพอย่างอิสระ (Saprophyte) บางสปีชีส์พบว่าเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ของคนและสัตว์ เชื้อ *Bacillus* ที่มีความสำคัญทางการแพทย์ได้แก่ *B. anthracis* และ *B. cereus* (วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์ และ อิสยา จันทร์วิทยานุชิต, 2553)

การจำแนกสปีชีส์ของ *Bacillus* (Classification of species) (วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์ และ อิสยา จันทร์วิทยานุชิต, 2553)

Bacillus จำแนกออกเป็นสปีชีส์ โดยอาศัยลักษณะของเชื้อหลายประการ ได้แก่ ขนาดของเซลล์ เช่น เซลล์มีขนาดใหญ่หรือเล็ก มีขนาดมากกว่าหรือน้อยกว่า 0.9 ไมโครเมตร รูปร่างของสปอร์ เช่น รูปไข่ (Oval) หรือรูปกลม (Spherical) ตำแหน่งของสปอร์ เช่น อยู่ตรงกลางเซลล์ (Central) ค่อนมาทางปลายเซลล์ (Subterminal) หรือปลายเซลล์ (Terminal) การเคลื่อนที่ การสร้างแคปซูล การทดสอบความไวต่อยาเพนิซิลลิน การสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar การทดสอบความไวต่อแกมมาฟาจ (Gamma phage) การทดสอบความเหมือนกันของลำดับเบสบนเส้นดีเอ็นเอ (DNA homology) และการทดสอบชีวเคมีอื่นๆ เช่น การย่อยสลายแป้ง การสร้างอินโดล การรีดิวซ์ ไนเทรต การสร้างเอนไซม์เลซิทิเนส ทำให้สามารถจำแนกเชื้อ *Bacillus* ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้



ภาพที่ 1 ลักษณะเซลล์ของ *Bacillus* sp. ไอโซเลต BLCD 003 (จากการศึกษานี้)

กลุ่มที่ 1 เซลล์มีขนาดความกว้างมากกว่าหรือเท่ากับ 0.9 ไมโครเมตร สปอร์รูปไข่ขนาดเล็ก ทำให้รูปร่างของเซลล์ไม่มีเปลี่ยนแปลง สปอร์อยู่ตรงกลางเซลล์หรือปลายเซลล์ เชื้อกลุ่มนี้ ได้แก่ *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. mycoides*

กลุ่มที่ 2 เซลล์มีขนาดความกว้างน้อยกว่า 0.9 ไมโครเมตร สปอร์รูปไข่มีขนาดเล็กทำให้เซลล์มีรูปร่างไม่มีเปลี่ยนแปลง สปอร์อยู่ตรงกลางเซลล์หรือปลายเซลล์ เชื้อในกลุ่มนี้ ได้แก่ *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. firmus*

กลุ่มที่ 3 เซลล์มีขนาดความกว้างน้อยกว่า 0.9 ไมโครเมตร สปอร์รูปกลม มีขนาดใหญ่ ทำให้เซลล์โป่งออก สปอร์อยู่ปลายเซลล์ เชื้อในกลุ่มนี้ ได้แก่ *B. sphaericus*, *B. polymyxa*, *Geobacillus stearothermophilus* (*B. stearothermophilus*), *B. circulans*, *B. laterosporus*, *B. brevis*, *B. alvei*

แบคทีเรียชนิดนี้มีความสำคัญต่อเทคโนโลยีชีวภาพค่อนข้างมาก เนื่องจากนับเป็นสายพันธุ์ที่ถูกเลือกเป็นสายพันธุ์ผู้ผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ ของจุลินทรีย์จำนวนมาก ทั้งนี้เพราะ *Bacillus* sp. เป็นแบคทีเรียที่สามารถหลั่งสารประกอบต่างๆ ที่สร้างขึ้นออกสู่ภายนอกเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ แบคทีเรียชนิดนี้มีเพียงไม่กี่สปีชีส์ที่เป็นเชื้อก่อโรค ส่วนใหญ่มีความปลอดภัยต่อการใช้งาน ความน่าสนใจในแบคทีเรียชนิดนี้ในทางเทคโนโลยีชีวภาพอีกอย่างหนึ่ง คือ ความหลากหลายในทางชีวเคมีที่ทำให้สามารถปรับตัวอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่รุนแรง (Extreme conditions) ต่างๆ ได้โดย เฉพาะอย่างยิ่งความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูง และสภาพความเป็นด่างได้ดี มีหลายชนิดที่สามารถเจริญได้แม้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส หรือมีอุณหภูมิต่ำสุดที่ยังเจริญได้ที่ระดับอุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส เป็นต้น คุณสมบัติการทนต่ออุณหภูมิสูงนี้เป็นที่ต้องการอย่างมากในทางเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องจากเอนไซม์ที่สร้างจากแบคทีเรียพวกนี้จะทนทานได้ดีต่ออุณหภูมิสูง ทำให้ทนทานต่อระดับอุณหภูมิสูงในการผลิตทางอุตสาหกรรม และมีอายุการใช้งานที่นาน ทั้งยังทนทานต่อสารที่มักทำลายโปรตีนได้ (อามีเน๊าะ โดยมาตู, 2548)

2. รายละเอียดเกี่ยวกับเอนไซม์ไลเปส

2.1 เอนไซม์ไลเปส

Deseulle and Sarda (1985) รายงานว่า ไลเปสถูกพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1856 โดยนักวิทยาศาสตร์ชื่อ Claude Bernard โดยเอนไซม์นี้พบในสารที่ขับออกจากตับ (Pancreatic juice) ซึ่งขณะนั้นเข้าใจกันว่า “ไลเปส” เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิยาการย่อยสลาย (Hydrolysis) หยดน้ำมันที่ไม่ละลายน้ำให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ละลายน้ำได้ แต่ในปี 1896 Hanriot ได้เรียกเอนไซม์ที่เร่งการย่อยสลายโมโนบิวไทริน (Monobutyrins-Hydrolyzing enzyme) ในเซรุ่ม (Serum) ว่า “ไลเปส” เช่นกัน (ณกัญภัทร จินดา, 2547)

ไลเปส (Triacylglycerol acylhydrolase, EC 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่สามารถไฮโดรไลซ์พันธะเอสเทอร์ (Ester bond) ของโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์ได้ผลผลิตเป็น โมโนกลีเซอไรด์ (Monoglyceride) ไดกลีเซอไรด์ (Diglyceride) และกรดไขมันอิสระ (Free fatty acid) ตรงผิวร่วมระหว่างน้ำและน้ำมัน ไลเปสไม่เพียงสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ในสภาวะที่มีน้ำ แต่ไลเปสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาสังเคราะห์เอสเทอร์และเคลื่อนย้ายหมู่เอสเทอร์ในสภาวะที่มีการควบคุมปริมาณน้ำในปฏิกิริยา เนื่องจากสับสเตรตของไลเปสมักเป็นโมเลกุลที่ไม่ละลายน้ำ แต่สามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ หรือตัวกลางที่ประกอบไปด้วยน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ (เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน, 2545) ด้วยคุณสมบัติของไลเปสจึงเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย ได้แก่ อุตสาหกรรมผลิตสารลดแรงตึงผิว อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมการบำบัดของเสีย และอุตสาหกรรมเครื่องสำอางโดยเฉพาะกลุ่มทำความสะอาด เป็นต้น (ณกัญภัทร จินดา, 2547)

2.2 แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

ไลเปสเป็นเอนไซม์สำคัญในเมตาบอลิซึมของไขมัน ซึ่งมีความสำคัญต่อการเจริญของสิ่งมีชีวิต จึงพบได้ในทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (ณกัญภัทร จินดา, 2547) แต่ในทางปฏิบัติไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้นในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม โดยตัวอย่างไลเปสจากจุลินทรีย์ที่นำมาใช้มากในทางการค้า ได้แก่ ไลเปสจากรา เช่น ไลเปสที่ผลิตโดย *Aspergillus* และ *Penicillium* ไลเปสจากยีสต์ เช่นไลเปสจาก *Candida cylindracea* (เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน, 2545, อ้างอิงจาก Hatzinikolaou *et al*., 1999; Chen, 1996 อ้างโดย Gulati *et al*., 1999)

2.2.1 เอนไซม์ไลเปสจากสัตว์ (Animal lipase)

เอนไซม์ไลเปสจากตับ (Pancreatic lipase) เป็นชนิดแรกที่พบ ทำหน้าที่เร่งการย่อยสลายโมเลกุลไขมันในระบบย่อยอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เอนไซม์ประเภทเอนไซม์เนื้อเยื่อ (Tissue lipases) นี้มีบทบาทและความสำคัญต่อการนำไปใช้ในการรักษาโรคและในทางการแพทย์ จึงมีความพยายามเสาะหาแหล่งเอนไซม์ประเภทนี้จากแหล่งใหม่ๆ อยู่ตลอดเวลา (ณกัญภัทร จินดา, 2545 อ้างอิงจาก Steiner and Williams, 2002) พบว่า ไลเปสจากตับอ่อนของสัตว์ตระกูล *Canine* เป็นแหล่งไลเปสที่น่าสนใจ ทั้งนี้มีลำดับกรดอะมิโน (Amino acid sequence) คล้ายกับเอนไซม์ไลเปสจากตับอ่อนของสัตว์สายพันธุ์อื่นๆ ได้แก่ *Sus scrofa* (หมู), *Bos taurus* (ม้า) และโดยเฉพาะใน *Homo sapiens* (มนุษย์) ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจไลเปสจากสัตว์ตระกูล *Canine* (สุนัข) มากขึ้นเนื่องจากสามารถใช้เป็นสารทดแทนไลเปสจากตับอ่อนของมนุษย์ได้

แมลงเป็นแหล่งของไลเปสอีกแหล่งหนึ่ง โดยเฉพาะ *Cephaloleia presignis* ซึ่งผลิตไลเปสชนิดใหม่ที่ทำงานได้ดีในพีเอชเป็นกลาง (Neutral lipase) ซึ่งได้รับความสนใจในการนำมาใช้เป็นสารทดแทนของ Pregastric lipase ที่ถูกใช้เป็นยารักษาภาวะน้ำหนักเกิน (Obesity) และการทำงานผิดปกติของกระบวนการย่อยและสังเคราะห์สารต่างๆ (Metabolic disorder) ในมนุษย์ (ณกัญภัทร จินดา, 2545, อ้างอิงจาก Roberto *et al*., 2000)

2.2.2 เอนไซม์ไลเปสจากพืช (Plant lipases)

ไลเปสจากพืชมีความจำเพาะต่อสับสเตรตสูงและมีสมบัติเฉพาะ ซึ่งจะไม่พบในไลเปสจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมและจุลินทรีย์ (ณกัญภัทร จินดา, 2545, อ้างอิงจาก Huang *et al*., 1988) ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์จึงเริ่มให้ความสนใจเพื่อนำไลเปสจากแหล่งนี้ไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม

ผลปาล์มน้ำมัน เมล็ดข้าวโพด เมล็ดถั่วเหลือง เมล็ดทานตะวัน มะกอก ข้าวสาลี และข้าวเจ้า เป็นแหล่งสำคัญของไลเปส Huang (1984) อ้างอิงโดย ณกัญภัทร จินดา (2545) รายงานว่าโดยธรรมชาติเมล็ดพืช (Seed) สะสมไขมันไว้ใน Lipid-bodies และ Glyoxysomes อันเป็นเนื้อเยื่อที่สามารถพบไลเปสด้วย ขณะที่ไลเปสของเมล็ดธัญพืช (Grain lipase) พบได้ในรำ (Bran) เช่น รำข้าวสาลี และรำข้าวเจ้า *Carica papaya latex* (CPL) หรือยางมะละกอ ซึ่งทราบกันว่าเป็นแหล่งของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (Proteases) ได้แก่ Papain และ Thiol protease อื่นๆ อย่างไรก็ตาม Magos *et al*. (1999) อ้างอิงโดย ณกัญภัทร จินดา (2545) พบไลเปสในยางมะละกอด้วย นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสในพืชตระกูลหญ้า (*Gramineaea*) ที่มีราคาไม่แพง ซึ่ง Mohamed *et al*. (2000) อ้างอิงโดย ณกัญภัทร จินดา (2545) รายงานว่าพบเอนไซม์ในข้าวโอ๊ต *Avena fatua* สูงถึง 93.9 ยูนิตต่อกรัม

2.2.3 ไลเปสจากจุลินทรีย์ (Microbial lipases)

ไลเปสจากจุลินทรีย์มีข้อดีเหนือกว่าไลเปสที่ได้จากพืช และจากสัตว์ เนื่องจากจุลินทรีย์เจริญได้รวดเร็ว และเลี้ยงง่ายกว่า พืช และสัตว์ การเพาะเลี้ยงไม่ขึ้นกับสภาพภูมิอากาศ มีความคงทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ ไม่ต้องการ Cofactors ในการทำงาน มีความจำเพาะต่อสับสเตรตหลายชนิด ประหยัดพื้นที่ในการผลิต ไม่สิ้นเปลืองแรงงานในการเพาะเลี้ยง และการเก็บเกี่ยว มี Enantio- selectivity สูง อีกทั้งความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ได้ก็สูงกว่า และไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกันก็จะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันด้วย เช่น *Bacillus thermocatenulatus* จะผลิตไลเปส 2 ชนิด ได้แก่ ไลเปส BTL-1 จะมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานที่ 7.0-8.0 และไลเปส BTL-2 จะมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานที่ 8.0-9.0 (เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน, 2545, อ้างอิงจาก Schmidt-Dannert *et al*., 1996) *Humicola lanuginosa* ผลิตไลเปสที่ทนความร้อน (เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน, 2545, อ้างอิงจาก Liu *et al*., 1973) และจากการที่จุลินทรีย์สามารถผลิตไลเปสได้ต่างชนิดกันจึงทำให้สามารถเลือกไลเปสมาใช้ประโยชน์ให้เหมาะสมกับอุตสาหกรรมต่างๆ (กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย, 2532) สำหรับขนาดโมเลกุลของไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์จะมีขนาดต่างๆ กัน เช่น ไลเปสจาก *B. thermocatenulatus* จะมีขนาดโมเลกุลประมาณ 16 กิโลดาลตัน (เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน, 2545, อ้างอิงจาก Schmidt-Dannert *et al*., 1994) ไลเปสจาก *Aspergillus nidulans* มีขนาดโมเลกุลประมาณ 29 กิโลดาลตัน (เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน , 2545, อ้างอิงจาก Mayordomo *et al*., 2000) และไลเปสจาก *Bacillus* sp. THL027 ซึ่งจะมีขนาดโมเลกุลประมาณ 69 กิโลดาลตัน (เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน, 2545, อ้างอิงจาก Dharmsthiti and Luchai, 1999) เป็นต้น

จุลินทรีย์ที่ผลิตไลเปสพบได้ในแหล่งต่างๆทางธรรมชาติ เช่น ในน้ำเสียหรือดินที่ปนเปื้อนน้ำมันหรือไขมัน เมล็ดพืชน้ำมันหรืออาหารที่เน่าเสีย กองปุ๋ยคอก แม้กระทั่งน้ำพุร้อน ปัจจุบันมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ถูกใช้ในทางการค้า 129 สายพันธุ์ โดยเป็นเชื้อรา 53 สายพันธุ์ ยีสต์ 23 สายพันธุ์ และแบคทีเรีย 53 สายพันธุ์

2.2.3.1 เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อราและยีสต์

ไลเปสที่ใช้กันแพร่หลายในทางการค้าส่วนใหญ่ได้จากเชื้อรา ได้แก่ *Mucor javanicus*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus* sp., *Geotrichum* sp. และ *Aspergillus* sp. และยีสต์ได้แก่ *Candida lipolytica*, *C. antarctica*, *C. rugosa* และ *C. cylindracea* เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากแหล่งนี้มักนิยมใช้ในการ Resolution ของ Secondary alcohol esters (ณกัญภัทร จินดา, 2547)

ไลเปสที่ได้จากเชื้อราและยีสต์มักมีหลายฟอร์ม เช่น ไลเปส I และ II (Lipase I and II) จาก *Rhizopus niveus* เอนไซม์สองชนิดนี้มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกันแม้ว่าจะได้จากเชื้อราสายพันธุ์เดียวกัน ซึ่งเอนไซม์ I สามารถเปลี่ยนเป็นเอนไซม์ II ได้โดย Limited proteolysis (ณกัญภัทร จินดา, 2547, อ้างอิงจาก Kohno *et al*., 1994) นอกจากนี้ *Geotrichum candidum* ATCC 34614 ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ 4 ชนิดที่มีสมบัติต่างกัน แต่ไลเปส I เป็นชนิดที่ถูกพบเป็นส่วนใหญ่ เอนไซม์ชนิดนี้ไม่จำเพาะต่อตำแหน่งของกรดไขมันที่จับกับโมเลกุลของกลีเซอรอล ขณะที่เอนไซม์ไลเปส IV จำเพาะต่อตำแหน่งกรดไขมัน (ณกัญภัทร จินดา, 2547, อ้างอิงจาก Sugihara *et al*., 1994) สำหรับ *Candida antarctica* ผลิตเอนไซม์ไลเปส 2 ชนิดคือ Lipase A และ Lipase B โดย Lipase B มี Stereoselective ต่อ R-isomer ของ Ketoprofen ใน Chiral solvent เช่น Isopentyl methyl ketone (ณกัญภัทร จินดา, 2547, อ้างอิงจาก Arroyo and Sinisterra, 1995)

2.2.3.2 เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย

ไลเปสจากแบคทีเรียมีความสำคัญที่สุดในตลาดเอนไซม์และการวิจัยทางด้านเอนไซม์ เนื่องจากไม่เพียงสามารถผลิตได้ในปริมาณมากๆ แต่ยังมีความคงทนต่อความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิสูง และตัวทำละลายอินทรีย์และยังคงมีสมบัติ Regioselectivity และ Chiral selectivity ที่เด่นชัดด้วย (ณกัญภัทร จินดา, 2547, อ้างอิงจาก Kim and Oh, 2002) เอนไซม์จากแหล่งนี้มี 4 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

กลุ่มที่ 1 มี 2 ชนิด ชนิดแรกเป็นเอนไซม์ที่ได้จาก *Pseudomonas aeruginosa* และ *Pseudomonas alcaligenes* เอนไซม์ชนิดแรกนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 285 โมเลกุล ส่วนชนิดที่สองเป็นเอนไซม์ที่ได้จาก *Pseudomonas glumae* และ *Pseudomonas cepacia* ซึ่งเอนไซม์ชนิดที่สองนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 320 โมเลกุล

กลุ่มที่ 2 ได้แก่เอนไซม์ที่ได้จาก *Pseudomonas fluorescens* และ *enterobacterium*, *Serratia marcescens* เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีโมเลกุลขนาดใหญ่กว่ากลุ่มแรกและมีขนาดและลำดับกรดอะมิโนที่มีความคล้ายคลึง (Sequence homology) เล็กน้อย ยกเว้น ส่วนที่เป็น N-terminal และลำดับกรดอะมิโนที่อยู่ใกล้กับบริเวณเร่งซีรีน (Active site serine)

กลุ่มที่ 3 และ 4 ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสที่ได้จาก *Bacillus* sp. และ *Staphylococcus* เอนไซม์ในกลุ่มที่ 3 นี้มีกรดอะมิโน Alanine (Ala) เป็นกรดอะมิโนตัวแรกใน

Consensus pentapeptide sequence (Gly-X-Ser-X-Gly) แทนที่จะเป็น Glycine (Gly) แบบเอนไซม์ ไลเปสจากแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นๆ (ณกัญภัทร จินดา, 2547, อ้างอิงจาก Lee *et al*., 2001)

2.3 ความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปส

จากการที่ Macrae (1983) ได้แบ่งความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสออกเป็น 3 กลุ่ม และจาก Yamane (1987) ได้แบ่งไลเปสตามความจำเพาะเป็น 2 กลุ่ม ต่อมาในปี 1997 ได้มีการแบ่งไลเปสจากสิ่งมีชีวิตออกเป็น 5 กลุ่ม (ณกัญภัทร จินดา, 2547)

2.3.1 ไลเปสที่มีความจำเพาะกับสารตั้งต้น (Substrate specific lipase)

ไลเปสในกลุ่มนี้สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์ตรงพันธะเอสเทอร์ของสารตั้งต้นที่เป็นทั้งไตรเอซิลกลีเซอรอล ไดเอซิลกลีเซอรอล โมโนเอซิลกลีเซอรอล และแม้แต่ฟอสโฟลิปิด โดยไลเปสในกลุ่มนี้พบได้ทั้งในสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ ซึ่งไลเปสโดยทั่วไปที่ได้จากสัตว์จะสามารถไฮโดรไลซ์ไตรเอซิลกลีเซอรอลได้สูงสุด แต่จะไฮโดรไลซ์โมโนเอซิลกลีเซอรอลได้ต่ำสุด ส่วนไลเปสจากพืชและจุลินทรีย์สามารถไฮโดรไลซ์ไตรเอซิลกลีเซอรอลได้สูงกว่าสับสเตรตชนิดอื่น แต่มีจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ที่ผลิตไลเปสที่มีความจำเพาะกับโมโนเอซิลกลีเซอรอลและไดเอซิลกลีเซอรอลมากกว่าไตรเอซิลกลีเซอรอล เช่น ไลเปสจาก *Penicillium camembertii* (เอกรัตน์ เซี่ยงฉิน, 2545, อ้างอิงจาก Macrae, 1983) เป็นต้น

2.3.2 ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง (Positional or Regiospecific)

ไลเปสในกลุ่มนี้จะมีความจำเพาะต่อพันธะเอสเทอร์ที่ตำแหน่งภายนอกและตำแหน่งภายในของแกนกลางไตรเอซิลกลีเซอรอล เช่น ไลเปสชนิด 1,3-Regioselective จะไฮโดรไลซ์เอสเทอร์ที่ตำแหน่ง sn-1 และ sn-3 ได้ผลผลิตได้เป็นโมโนเอซิลกลีเซอรอล ซึ่งไลเปสที่จัดเป็นชนิด 1,3-Regioselective นั้นได้แก่ ไลเปสจากตับอ่อนหมู ไลเปสจาก *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus* และ *Candida antarctica*

2.3.3 ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะ (Non specific lipase)

ไลเปสเหล่านี้มีอยู่มากมาย โดยไลเปสกลุ่มนี้จะสามารถไฮโดรไลซ์เอสเทอร์ทั้งหมดในไตรเอซิลกลีเซอรอล

2.3.4 ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อกรดไขมัน (Fatty acid or Acyl selective)

ไลเปสกลุ่มนี้จะมีความจำเพาะต่อกรดไขมัน โดยจะไฮโดรไลซ์กรดไขมันเหล่านั้น โดยไม่คำนึงถึงตำแหน่งของเอสเทอร์บนไตรเอซิลกลีเซอรอล ตัวอย่างของไลเปสชนิดนี้ ได้แก่ ไลเปสจาก *Geotrichum candidum* จำเพาะต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิด Cis-9-Unsaturated fatty acid และไลเปสจาก *Botrytis cinerea* จำเพาะต่อกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว

2.3.5 ไลเปสที่มีความจำเพาะ (Stereospecific)

ไลเปสชนิดนี้สามารถเลือกทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสระหว่างตำแหน่ง sn-1 หรือ sn-3 ของไตรเอซิลกลีเซอรอลโดยไลเปสจาก *Humicola lanuginosa* และ *Pseudomonas fluorescens* จะจำเพาะสำหรับ sn-1 ส่วนไลเปสจากกระเพาะกระต่าย และ *Fusarium solani* จะจำเพาะสำหรับ sn-3

การทำงานของเอนไซม์ไลเปส

Gandhi (1997) อ้างอิงโดย เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน (2545) ได้แบ่งการทำงานของไลเปสเป็น 2 กลุ่ม คือ การย่อยสลายเอสเทอร์ และการสังเคราะห์เอสเทอร์ ซึ่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์สามารถแบ่งออกเป็น 4 ชนิด ได้แก่ Esterification, Acidolysis, Interesterification และ Alcoholysis โดยสามปฏิกิริยาหลังนี้ได้มีการจัดไว้ในกลุ่มที่ชื่อว่า Transesterification แต่ Yamane (1987) อ้างอิงโดย เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน (2545) ได้จัดให้ปฏิกิริยา Aminolysis อยู่ในกลุ่ม Transesterification ด้วย (ภาพที่ 2)

- Hydrolysis	$R_1COOR_2 + H_2O \longrightarrow R_1COOH + R_2OH$
-Ester Synthesis	$R_1COOH + R_2OH \longrightarrow R_1COOR_2 + H_2O$
-Acidolysis	$R_1COOR_2 + R_3COOH \longrightarrow R_3COOR_2 + R_1COOH$
-Interesterification	$R_1COOR_2 + R_3COOR_4 \longrightarrow R_3COOR_2 + R_1COOR_4$
-Alcoholysis	$R_1COOR_2 + R_3OH \longrightarrow R_1COOR_3 + R_2OH$
-Aminolysis	$R_1COOR_2 + R_3NH_2 \longrightarrow R_1CONHR_3 + R_2OH$

ภาพที่ 2 การทำปฏิกิริยาต่างๆของเอนไซม์ไลเปส
(ที่มา : เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน, 2545, อ้างอิงจาก Yamane, 1987)

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวและกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

ลักษณะการทำงาน และความคงตัวของเอนไซม์ไลเปสมีผลมาจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อมต่างๆ ดังต่อไปนี้

2.5.1 พีเอช

ไลเปสจากจุลินทรีย์นั้นมีทั้งที่สามารถทำงานได้ดีในสภาวะต่างๆ กัน เช่น ไลเปสที่ได้จาก *Bacillus subtilis* 168 (เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน, 2545, อ้างอิงจาก Lessuisse *et al*., 1993) และ *Pseudomonas aeruginosa* EF2 (เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน, 2545, อ้างอิงจาก Gilbert *et al*., 1991) ทำงาน ได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง ส่วนใหญ่ไลเปสที่ได้จากแบคทีเรียทนร้อนมักจะเป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลาง และค่อนไปทางด่าง (เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน, 2545, อ้างอิงจาก Sugihara *et al*., 1991) ส่วนความคงตัวต่อพีเอชของไลเปสจากจุลินทรีย์นั้นพบว่า ส่วนใหญ่จะมีความคงตัวในช่วง พีเอชที่กว้าง เช่น ไลเปสจาก *Bacillus* sp. 398 มีความคงตัวในช่วงพีเอช 4.0-11.0 (เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน, 2545, อ้างอิงจาก Kim *et al*., 1994)

2.5.2 อุณหภูมิ

ไลเปสที่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน จะมีคุณสมบัติในการทำงาน และความคงตัวต่ออุณหภูมิที่แตกต่างกัน เช่น ไลเปสจาก *Pseudomonas putida* 3SK จะทำงานได้ดี ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวมากกว่าร้อยละ 70 หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน, 2545, อ้างอิงจาก Lee & Rhee, 1993)

2.5.3 ตัวทำละลายอินทรีย์ (เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน, 2545)

นอกจากไลเปสจะสามารถทำปฏิกิริยาการย่อยสลายโมเลกุลของไขมัน และน้ำมันในสภาวะที่มีน้ำ แต่ไลเปสยังสามารถทำปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ และการย้ายหมู่เอสเทอร์ในสภาวะที่มีการควบคุมปริมาณน้ำในปฏิกิริยา ซึ่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์เอสเทอร์ และการย้ายหมู่เอสเทอร์เป็นปฏิกิริยาที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในอุตสาหกรรมต่างๆ เพราะจะสามารถสังเคราะห์โมเลกุลชีวรูปที่มีคุณสมบัติทางเคมี และทางกายภาพตามที่ต้องการได้ โดยการทำปฏิกิริยาในสภาวะที่มีการควบคุมปริมาณน้ำนั้นจะมีการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์มาเกี่ยวข้องในการทำปฏิกิริยา ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาถึงผลของตัวทำละลายอินทรีย์ต่อการทำงาน และความคงตัวของเอนไซม์ ส่วนใหญ่ตัวทำละลายอินทรีย์มักจะลดความยืดหยุ่นในโมเลกุลของเอนไซม์ และจะทำให้โมเลกุลของเอนไซม์สูญเสียสภาพธรรมชาติ นอกจากตัวทำละลายอินทรีย์จะทำให้ไลเปสมีความคงตัวลดลง แต่ตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิดก็สามารถเพิ่มความคงตัวของไลเปสได้

2.5.4 ไอออนของโลหะ และสารเคมี (เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน, 2545)

ไอออนของโลหะบางชนิดอาจมีผลต่อการทำงานของไลเปสจากแบคทีเรีย เช่น Ca^{2+}, Na^{+}, Ba^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+} และ Sr^{2+} จัดเป็นไอออนที่เร่งปฏิกิริยาการทำงานของไลเปสส่วนใหญ่ Ca^{2+} มักจะเป็นไอออนที่เร่งปฏิกิริยาการทำงานของไลเปสจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยไอออนของแคลเซียมจะช่วยในการเปลี่ยนรูปร่างของเอนไซม์ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้นโดยเพิ่มการดูดซึมของไลเปสที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมัน (Oil-water interface) และยังช่วยขจัดกรดไขมันออกจากผิวสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมัน (เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน, 2545, อ้างอิงจาก Wang *et al*., 1988) และนอกจากไอออนของโลหะแล้วสารเคมีบางชนิดก็มีผลยับยั้งการทำงานของไลเปสด้วย เช่น Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

2.5.5 การปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรีย (เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน, 2545)

ปัจจุบันการปรับปรุงสายพันธุ์สิ่งมีชีวิตเป็นที่สนใจ เพราะสามารถเพิ่มผลผลิตทางด้านทรัพยากรธรรมชาติให้เพียงพอต่อประชากรมนุษย์ที่เพิ่มสูงขึ้นทั่วโลก ซึ่งข้อดีของการปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรีย คือ ได้สายพันธุ์ใหม่ที่ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงสั้นกว่าวิธีดั้งเดิม ได้ผลผลิตที่ถูกต้องตรงตามที่ต้องการ ซึ่งการปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียนั้นทำได้หลายวิธี

2.6 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ (Enzyme Purification) (เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน, 2545)

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ประกอบไปด้วยหลายขั้นตอน โดยในการทำให้บริสุทธิ์เป็นการแยกเอาสารที่ไม่ใช่เอนไซม์ออกไป โดยวิธีการทำบริสุทธิ์สามารถทำได้หลายวิธี เช่น

2.6.1 การตกตะกอนโปรตีน (Protein Precipitation)

การตกตะกอนเป็นการแยกเอาโปรตีนที่ไม่ต้องการออกโดยอาศัยคุณสมบัติในการละลายของโปรตีน โดยสารที่จะใช้ในการตกตะกอนโปรตีนได้แก่

- ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น เอทานอล (Ethanol) เมทานอล (Methanol) โพรพานอล (Propanol) ไอโซโพรพานอล (Iso-propanol) อีเทอร์ (Ether) อะซีโตน (Acetone) และเฮกเซน (Hexane) เป็นต้น
- เกลือบางชนิด เช่น เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate) เกลือโซเดียมฟอสเฟต (Sodium phosphate) เป็นต้น

• สารอื่นๆ เช่น Polyethylene glycol (PEG), เคซีน (Casein) และ Diatomaceous earth เป็นต้น

โดยในการตกตะกอนโปรตีนอาจใช้วิธีใดวิธีหนึ่งหรืออาจใช้หลายๆ วิธีร่วมกันก็ได้ แต่โดยทั่วไปสารที่นิยมใช้ในการตกตะกอนโปรตีนคือ เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เนื่องจากเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตมีคุณสมบัติที่ดีหลายประการ ได้แก่ มีความสามารถในการละลายที่สูง (4 โมลาร์) ใช้อุณหภูมิในการละลายต่ำช่วยเพิ่มการไม่ละลายระหว่างโปรตีนกับโปรตีน และทำให้สารละลายที่ได้มีความหนืด และความหนาแน่นต่ำ ทำให้สามารถแยกสารที่ต้องการได้ง่าย (เอกรัตน์ เซี่ยงฉิน, 2545)

การตกตะกอนโปรตีนโดยใช้เกลือที่มีความเข้มข้นสูง เรียกวิธีการนี้ว่า Salting out เป็นการเติมเกลือลงไปในสารละลายโปรตีนผสม เพื่อเพิ่มความแรงไอออน (Ionic strength) ของสารละลายให้สูงขึ้น จนกระทั่งไอออนของเกลือไปแย่งโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีนออกมาล้อมรอบโมเลกุลของเกลือเอง อาจกล่าวได้ว่าเป็นการแข่งขันระหว่างโมเลกุลของโปรตีนและโมเลกุลของเกลือในการเกิดแรงกริยาทางไฟฟ้ากับโมเลกุลของน้ำนั่นเอง เมื่อใดก็ตามที่แรงกระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับน้ำมีค่าเหลือน้อยกว่าแรงกระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับโปรตีน โปรตีนก็จะจับตัวกันตกตะกอนลงมา การรวมตัวกันของโปรตีนเกิดจากส่วนที่ไม่ชอบน้ำบนโมเลกุลของโปรตีนแต่ละตัว เคลื่อนที่เข้ามาอยู่ใกล้กันโดยแรงดึงดูดระหว่างส่วนที่ไม่ชอบน้ำด้วยกันเอง เกิดเป็นกลุ่มก้อนโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ขึ้น เมื่อน้ำหนักสะสมเพิ่มขึ้นก็เกิดการตกกะกอนลงมาเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า Salting out effect (ชรินทร์ เตชะพันธุ์, 2542)

ในกรณีที่มีโปรตีนผสมหลายๆ ชนิดรวมอยู่ด้วยกัน สามารถแยกตกตะกอนโปรตีนออกเป็นกลุ่มย่อยๆได้ โดยการทำ Salting out ที่ความเข้มข้นของเกลือต่างๆ กัน เรียกวิธีนี้ว่า Salt fractionation โดยเลือกตกตะกอนโปรตีนเป็นช่วงๆ ความเข้มข้นสำหรับการตกตะกอนเอนไซม์หรือโปรตีนใดๆ ที่ต้องการโดยที่ยังไม่ทราบช่วงความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมในการตกตะกอนสามารถทำการทดลองขั้นพื้นฐาน (Preliminary test) หรือทำการทดลองสุ่ม (Trial fractionation) ในช่วงความเข้มข้นกว้างๆ ก่อนแล้วตรวจวัดค่ากิจกรรม (Activity) ของเอนไซม์ที่ตกตะกอนลงมา ช่วงความเข้มข้นของเกลือในช่วงใดที่ให้ร้อยละของเอนไซม์ตกตะกอนลงมามาก และมีค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่สูง (Purification factor) ก็ให้เลือกช่วงดังกล่าวเป็นความเข้มข้นมาตรฐานในการตกตะกอนจริง (ชรินทร์ เตชะพันธุ์, 2542)

2.7 การผลิตเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์สามารถผลิตได้ทั้งอาหารเหลว (Submerge culture) และบนอาหารแข็ง (Solid state) Pandey *et al*. (1999), อ้างอิงโดย ณกัญภัทร จินดา (2547) โดยรายงานว่า การผลิตไลเปสบนอาหารแข็งมีข้อดีกว่าการผลิตในอาหารเหลวหลายประการ ได้แก่ จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ง่าย เอนไซม์ที่ได้มีปริมาณ (Yield) และความเข้มข้นสูงกว่าการผลิตในอาหารเหลว นอกจากนี้ยังสามารถใช้เทคนิคในกระบวนการแยกและเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้ง่ายกว่า และทำให้เกิดของเสียที่เป็นของเหลวในปริมาณต่ำ อย่างไรก็ตามปัจจุบันการผลิตไลเปสส่วนใหญ่เป็นการผลิตในอาหารเหลวไม่ว่าจะเป็นการผลิตจากการผลิตเชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย ทั้งนี้เป็นเพราะสามารถปรับสภาพการเลี้ยง สารอาหาร และปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไลเปสในอาหารเหลวทำได้ง่ายกว่า ปัจจัยที่อิทธิพลต่อการผลิตไลเปสของจุลินทรีย์ ได้แก่ ชนิด และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และ

ไนโตรเจน สภาพความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการทำงานของเอนไซม์ และความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการผลิต (ณกัญภัทร จินดา, 2547, อ้างอิงจาก Elibol and Ozer, 2001)

2.8 การนำเอนไซม์ไลเปสไปใช้ประโยชน์

2.8.1 การใช้เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ในระดับอุตสาหกรรม

การใช้เอนไซม์ไลเปสเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีบทบาทอย่างมากในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับเทคโนโลยีชีวภาพโดยเฉพาะอุตสาหกรรมอาหาร วิทยาศาสตร์การแพทย์ อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเคมี และแหล่งเชื้อเพลิงชีวภาพ (ณกัญภัทร จินดา, 2547, อ้างอิงจาก Stehr *et al*., 2003; Steiner and Williams, 2002; Pandey *et al*., 1999) ข้อดีที่สำคัญของเอนไซม์ ไลเปส คือ มีความคงทนในตัวทำละลายอินทรีย์ จึงสามารถเร่งปฏิกิริยา Transesterification ได้ทั้งในระบบที่มีตัวทำละลายอินทรีย์และปราศจากตัวทำละลายอินทรีย์ (ณกัญภัทร จินดา, 2547, อ้างอิงจาก Sharma *et al*., 2001) และยังสามารถทำงานได้ในสภาพที่ปราศจาก Cofactors นอกจากนี้ยังมีความจำเพาะต่อสับสเตรต และมี Enantioselectivity สูงด้วย

ความสนใจเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วสะท้อนให้เห็นจากรายงานการวิจัยด้านการคัดเลือก (Screening) การทำบริสุทธิ์ (Purification) อณูชีววิทยา (Molecular biology) สมบัติทางชีวเคมี (Biochemical properties) และการใช้ประโยชน์ทางเทคโนโลยีชีวภาพของไลเปสที่มีมากมาย เช่น

2.8.1.1 เอนไซม์ไลเปสในยาฆ่าแมลง

ด้านเทคโนโลยีชีวภาพของยาฆ่าแมลง เอนไซม์ไลเปสถูกนำมาใช้เป็น Enantioselective biocatalyst ในตัวทำละลายอินทรีย์ ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่ถูกตรึงเพื่อลดต้นทุนและป้องกันการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมภายนอก โดยทั่วไปยาฆ่าแมลงผลิตได้จากการทำ Resolution ของ Racemic mixtures ของ Alcohol หรือ Carboxylic esters ในปฏิกิริยา Stereospecific synthesis reaction (ณกัญภัทร จินดา, 2547, อ้างอิงจาก Pandey *et al*., 1999)

2.8.1.2 เอนไซม์ไลเปสในสารซักล้าง

ในการผลิตสารซักล้างไลเปสที่ใช้มีความจำเพาะต่อสับสเตรตต่ำ แต่มีความคงทนต่อสภาพที่เป็นด่างทนต่อสารลดแรงตึงผิว (Surfactants) และอุณหภูมิสูง เอนไซม์ที่มีลักษณะตามที่ต้องการนี้เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม “Surfactant lipase” นอกจากนี้ยังสามารถทำงานร่วมกับเอนไซม์ Amylase, Cellulase และ Protease ได้ด้วย (ณกัญภัทร จินดา, 2547, อ้างอิงจาก Jaeger and Reetz, 1998; Pandey *et al*., 1999; Rathi *et al*., 2001) ดังนั้นเอนไซม์ที่ใช้ในสารซักล้างจึงต้องทนต่อด่างและความร้อน เช่น เอนไซม์ไลเปสจาก *Pseudomonas alkaligenes* ทำงานได้ดีที่ พีเอช 7-11 อุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส มีความคงทนต่อสารลดแรงตึงผิวที่เป็นทั้ง Anionic และ Nonionic ในสภาพการซักล้าง (ณกัญภัทร จินดา, 2547, อ้างอิงจาก Pandey *et al*., 1999)

2.8.1.3 เอนไซม์ไลเปสในการผลิตเชื้อเพลิง

เป็นที่ทราบว่าสิ่งที่ได้รับควบคู่กับการเผาไหม้เชื้อเพลิงจากฟอสซิล (Fossil fuel) คือก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ คาร์บอนมอนอกไซด์และซัลเฟอร์ อันเป็นผลทำให้สิ่งแวดล้อมเต็มไป

ด้วยมลพิษ ภาวะเช่นนี้ทำให้เริ่มมีความสนใจที่จะนำเชื้อเพลิงเหลว (Liquid fuel) ที่ได้จากการนำวัตถุดิบทางชีวภาพ (Biomass) กลับมาใช้ใหม่และมีการพัฒนาแหล่งพลังงานนี้อย่างต่อเนื่อง เพื่อเป็นทางเลือกใหม่ของการผลิตเชื้อเพลิงในอนาคต

Fatty acid methyl esters (Biodiesel fuel) จากน้ำมันพืช ไขมันสัตว์ และน้ำมันปรุงอาหารที่ใช้แล้วถูกนำกลับมาใช้เป็นพลังงานอีกครั้งตั้งแต่ทศวรรษที่ผ่านมา แหล่งพลังงานประเภทนี้ไม่ก่อให้เกิดมลพิษต่อสภาพแวดล้อมเนื่องจากสามารถถูกย่อยสลายได้ และไม่เป็นพิษ ซึ่งมีการทดลองใช้เชื้อเพลิงไบโอดีเซลจากอุตสาหกรรมน้ำมันพืชเพื่อนำมาใช้ทดแทนเชื้อเพลิงจากฟอสซิล ในทวีปอเมริกาเหนือและยุโรป (ณกัญภัทร จินดา, 2547, อ้างอิงจาก Krawczyk, 1996; Cvengros and Cvengrosova, 1994)

ไบโอดีเซลสามารถผลิตได้จากน้ำมันจากเมล็ด Rapeseed, Canola, ทานตะวัน, ดอกคำฝอยและถั่วเหลือง ด้วยปฏิกิริยา Transesterification ซึ่งต้องใช้ไลเปสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (ณกัญภัทร จินดา, 2547, อ้างอิงจาก Clark *et al*., 1984)

Watanabe *et al*. (2000) อ้างอิงโดย ณกัญภัทร จินดา (2547) ใช้ไลเปสจาก *Candida antarctica* เร่งปฏิกิริยา Transesterification ระหว่าง Methyl esters ของ Fatty acids และ Sterols เพื่อผลิต Steroid esters ที่ใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง และยา

2.8.1.4 การย่อยสลายไขมัน

ไลเปสจะสามารถย่อยสลายไขมัน หรือ น้ำมันให้ได้เป็นกรดไขมัน และกลีเซอรอล ซึ่งเป็นตัวสำคัญในการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม เช่น การนำกรดไขมันมาใช้ในการผลิตสบู่ โดยไลเปสที่ใช้สำหรับวัตถุประสงค์นี้ได้มาจาก *Candida rugosa* (เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน, 2545, อ้างอิงจาก Hoq *et al*., 1985) และในปัจจุบันได้มีการสนใจในการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตกรดไขมันและกลีเซอรอลในทางอุตสาหกรรมมากขึ้นโดยได้มีการใช้เอนไซม์ไลเปสที่สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงในการย่อยสลายไขมันจากสัตว์ซึ่งมีจุดหลอมเหลวสูง (เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน, 2545 อ้างอิงจาก Garcia, Yang and Parkin, 1995)

2.8.1.5 อุตสาหกรรมเครื่องหนัง

ในกระบวนการผลิตเครื่องหนังจะมีขั้นตอนการเอาไขมันส่วนที่เหลือ และโปรตีน ที่เสียรูปที่ติดอยู่บริเวณหนัง และขนออก ซึ่งการกำจัดไขมัน และโปรตีนออกจาก หนังสัตว์โดยวิธีการทางเคมีจะมีประสิทธิภาพต่ำ (เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน, 2545, อ้างอิงจาก Seitz, 1974) แต่ปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ผสมระหว่างไลเปสกับเอนไซม์โปรติเอส มาใช้ในการกำจัดไขมันและโปรตีนออกไปจากหนังสัตว์ (เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน, 2545, อ้างอิงจาก Christner, Pfeiderer, and Taeger, 1991; Figurin, Shestakova, Mironova, Shtein, and Arends, 1990; Gandhi, 1997; Posorskl, 1984)

2.8.1.6 การบำบัดของเสีย

ได้มีการนำไลเปสมาใช้ประโยชน์ในการบำบัดของเสียในขบวนการบำบัดแบบให้อากาศ ซึ่งในกระบวนการบำบัดของเสียแบบให้อากาศจะเกิดแผ่นคราบไขมันบริเวณผิวสัมผัสของของเสียกับอากาศทำให้การถ่ายเทอากาศเป็นไปได้ไม่ดี ซึ่งในอดีตได้ทำการแก้ไขปัญหานี้โดยการตักเอาคราบของไขมันออก แต่พบว่าการใช้ไลเปสนั้นจะให้ผลที่ดีกว่าโดยไลเปสที่ใช้ในการ

บำบัดของเสียนี้ได้จาก *Candida rugosa* ซึ่งต่อมาได้มีการผลิตไลเปสจากเชื้อตัวนี้ในระดับอุตสาหกรรม โดยมีชื่อทางการค้าว่า Lipase-MY และได้ถูกนำไปใช้ในประเทศสหรัฐอเมริกา (เอกรัตน์ เซี่ยงฉิน, 2545, อ้างอิงจาก Gandhi, 1997; Seitz, 1974) นอกจากนี้ยังอาจนำไลเปสมาใช้ในการควบคุมการย่อยสลายของเสียในขบวนการไร้อากาศได้ (เอกรัตน์ เซี่ยงฉิน, 2545, อ้างอิงจาก Godfrey and Reichelt, 1983)

2.8.1.7 การสร้างกลิ่นรสในอุตสาหกรรมนม และผลิตภัณฑ์จากนม

ได้มีการใช้ไลเปสเพื่อปรับปรุงกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์จากนมต่างๆ เช่น เนยแข็ง เนยเหลว มาการีน และนอกจากนี้ยังใช้ในการปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของนมซึ่งเป็นผลมาจากไขมัน โปรตีน และน้ำตาลแล็กโตสที่มีอยู่ในน้ำนม และนอกจากนี้แล้วยังได้นำไลเปสมาใช้ร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสในการตกตะกอนนม และปรับปรุงกลิ่นรสของนมและยังได้มีการนำไลเปสมาใช้ในขบวน การผลิตครีมเทียมให้มีกลิ่นรสที่ดีขึ้นและให้ความหวานต่ำ (เอกรัตน์ เซี่ยงฉิน, 2545, อ้างอิงจาก Colburn, 1969; Gandhi, 1997) และยังนำไลเปสมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตของหวาน เช่น ช็อคโกแล็ต โดยให้ไลเปสมาทำให้เกิดกลิ่นรสในนมช็อคโกแล็ต คาราเมล และท๊อฟฟี่ และนอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ อีก เช่น อุตสาหกรรมขนมอบ อุตสาหกรรมผลิตน้ำสลัด อุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันข้าวโพด อุตสาหกรรมการผลิตไส้กรอก อุตสาหกรรมขนม ขบเคี้ยว และอุตสาหกรรมสบู่

2.8.1.8 อุตสาหกรรมอาหาร และอาหารสัตว์

มีการนำไลเปสมาใช้ในการบ่มเนื้อให้มีความนิ่มเพื่อลดระยะเวลาในการเกิดการเกร็งตัวของเนื้อสัตว์ใช้ในอุตสาหกรรมผักดอง อุตสาหกรรมการผลิตน้ำนมถั่วเหลือง และยังได้มีการนำไลเปสมาทำการผลิตอาหารสุนัขที่มีปริมาณไขมันต่ำ นอกจากนี้ได้มีการนำไลเปสที่ได้จากตับอ่อนมาใช้ร่วมกับเอนไซม์โปรติเอสในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสัตว์ต่างๆ (เอกรัตน์ เซี่ยงฉิน, 2545, อ้างอิงจาก Gandhi, 1997)

2.8.1.9 อุตสาหกรรมเภสัชกรรม

เนื่องจากคาร์โบไฮเดรต และโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลักของวัสดุชีวภาพซึ่งนอกจากนี้ยังรวมไปถึงไขมันต่างๆ ด้วย ซึ่งทั้งสามองค์ประกอบนี้จะมีผลต่อการนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของร่างกาย การย่อยสลาย และการดูดซึมต่างๆ ซึ่งได้มีการพยายามในการหาสารซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกาย ซึ่งได้มีการใช้คุณสมบัติในการเกิด Selective esterification ของไลเปสมาใช้ในการทำบริสุทธิ์กรดไขมันไม่อิ่มตัว Polyunsaturated fatty acid (PUFA) ได้แก่ การทำบริสุทธิ์ Docosahecaenoic acid (DHA) และ Ecosapentaenoic acid (EPA) จากน้ำมันปลาทูน่า ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาการของสมอง และระบบประสาทสำหรับการมองเห็นของทารกในครรภ์มารดา (เอกรัตน์ เซี่ยงฉิน, 2545, อ้างอิงจาก Lawson and Hughes, 1988)

3. รายละเอียดเกี่ยวกับปาล์มน้ำมัน

ผลของปาล์มนั้นสามารถนำมาใช้ในการผลิตน้ำมันได้ 2 ประเภท คือ น้ำมันปาล์มดิบ (Crude palm oil หรือ CPO) จากเปลือกหุ้มภายนอก และน้ำมันปาล์มจากเนื้อในของเมล็ด (Palm kernel oil หรือ PKO) ซึ่งสามารถนำน้ำมันทั้ง 2 ชนิด ไปผ่านกรรมวิธีแล้วได้เป็น น้ำมันปาล์มโอเลอิน กับน้ำมันปาล์มสเตียริน น้ำมันปาล์มมีกรดไขมันและไตรเอซิลกลีเซอรอลที่เป็นเอกลักษณ์ไม่เหมือนน้ำมัน

ที่สามารถบริโภคได้ชนิดอื่นๆ เนื่องจากมีองค์ประกอบของกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวใกล้เคียงกัน เกือบร้อยละ 50 ต่อ 50 (Mba, Dumont, & Ngadi, 2015) โดยในน้ำมันปาล์มดิบมีกรดไขมันอิ่มตัวที่พบมากคือ กรดปาล์มิติก (C:16) ประมาณร้อยละ 42 และมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่พบมาก คือ กรดโอเลอิก (C18:1) ประมาณร้อยละ 39.37 (Zambiazi *et al.*, 2007) ส่วนน้ำมันปาล์มโอเลอินผ่านกรรมวิธีมีกรดไขมันอิ่มตัวที่พบมากคือ กรดปาล์มิติก (C:16) ประมาณร้อยละ 37 (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์, ม.ป.ป.) และมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่พบมาก คือ กรดโอเลอิก (C18:1) ประมาณร้อยละ 46 ร้อยละ 37.3 ถึง 40.8 (Mba *et al*., 2015)

การผลิตปาล์มน้ำมันของไทยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยในปี พ.ศ. 2550 (ค.ศ. 2007) มีเนื้อที่ให้ผล 2.66 ล้านไร่ ผลผลิต 6.39 ล้านตัน คิดเป็นผลผลิตต่อไร่ที่ 2,399 กิโลกรัม ส่วนในปี พ.ศ. 2554 (ค.ศ. 2011) มีเนื้อที่ให้ผล 3.75 ล้านไร่ ผลผลิต 9.88 ล้านตัน คิดเป็นผลผลิตต่อไร่ที่ 2,631 กิโลกรัม ทั้งนี้ผลผลิตต่อไร่ของไทยนับว่าค่อนข้างต่ำ เนื่องจากความแปรปรวนของสภาพภูมิอากาศ โดยเฉพาะภาวะฝนทิ้งช่วงปลายปี พ.ศ. 2552 (ค.ศ. 2009) ต่อเนื่องถึงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2553 (ค.ศ. 2010) และภาวะน้ำท่วมช่วงปลายปี พ.ศ. 2553 (ค.ศ. 2010) และ พ.ศ. 2554
(ค.ศ. 2011) (ไบรอัน เคฟ (ประเทศไทย), 2555)

4. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

มีรายงานการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเอนไซม์ไลเปสใน *Bacillus* spp. หลายสปีชีส์ เช่น

ยีน *lip* จาก *B. subtilis* 168 ซึ่งสร้างเอนไซม์ไลเปสที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ catalytic site เป็น Ala-X-Ser-X-Gly (Dartois *et al*., 1992)

ยีนไลเปสจาก *B. stearothermophilus* L1 มีขนาดประมาณ 1.2 กิโลเบส ซึ่งสร้างเอนไซม์ไลเปสที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงและในสภาวะที่เป็นด่าง และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ catalytic site เป็น Ala-X-Ser-X-Gly (Kim *et al*., 1998)

ยีนไลเปสจาก *B. thermocatenulatus* สร้างเอนไซม์ไลเปสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิสูงและในสภาวะที่เป็นด่างไม่ต่ำกว่า pH 8.0 (Schmidt-Dannert *et al*., 1996)

ยีนไลเปสจาก *B. sphaericus* 205y สร้างเอนไซม์ไลเปสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และในสภาวะที่มีค่า pH 7.0 ถึง 8.0 (Sulong *et al*., 2006)

ยีนไลเปสจาก *B. thermoleovorans* ID-1 สร้างเอนไซม์ไลเปสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส (Cho *et al*., 2000)

ยีนไลเปสจาก *B. stearothermophilus* P1 สร้างเอนไซม์ไลเปสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และในสภาวะที่มีค่า pH 8.5 (Sinchaikul *et al*., 2001)

ยีนไลเปสจาก *B. pumilus* B26 สร้างเอนไซม์ไลเปสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และในสภาวะที่มีค่า pH 8.5 (Kim *et al*., 2002)

ยีนไลเปสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* PS35 ที่แสดงออกใน *Escherichia coli* DH5α มีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 8.0 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ มีครึ่งชีวิต

เท่ากับ 2, 1 และ 0.5 ที่อุณหภูมิ 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และ K^{+} และ Fe^{3+} ช่วยส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ (Kanmani, Kumaresan & Aravind, 2015)

ยีนไลเปสจาก *Bacillus* sp. L2 มีขนาด 1251 คู่เบส และถอดรหัสไปเป็นโปรตีนที่มี 417 amino acid residues เมื่อศึกษา Recombinant lipase พบว่ามีกิจกรรมเพิ่มขึ้น 178 เท่าเมื่อเทียบกับ Crude native lipase และ recombinant lipase มีขนาด 43.2 กิโลดาลตัน เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์มีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 9.0 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสถูกยับยั้งได้โดย EDTA, PMSF, pepstatin-A, 2-mercaptoethanol และ dithiothreitol (Shariff *et al*., 2011)

ยีนไลเปสจาก *Bacillus Subtilis* Strain I4 มีลำดับกรดอะมิโนที่เป็น Signal sequence ขนาด 31 residues และมีส่วนที่เป็น Mature protein ขนาด 181 residues เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้มีขนาด 19.33 กิโลดาลตัน จัดอยู่ใน lipase family1.4 และมีค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 7.0 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Xie *et al*., 2013)

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. สายพันธุ์แบคทีเรีย

แบคทีเรีย *Bacillus* sp. BLCD 003 (Amornrattanapan and Ruangrit, 2012)

2. เครื่องมือ

2.1 เครื่องเขย่า (Shaker) (Green SSeriker II, PNP)
2.2 เครื่อง Centrifuge (Sartorius, ประเทศเยอรมนี)
2.3 เครื่อง Spin down (Fotodyne incorporation)
2.4 เครื่อง Thermal cycler (T Gradient, Biometra®, ประเทศเยอรมนี)
2.5 Gel electrophotoresis apparatus (Minisub™ DNA cell, Bio rad, ประเทศอิตาลี)
2.6 เครื่อง Vortex (vortex genie-2, Scientific industries, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
2.7 เครื่อง Microplate reader (Spectro star nano, BMG labtech, ประเทศเยอรมนี)
2.8 Power supplies (Enduro™ Labnet international lnc.)

3. วัสดุอุปกรณ์

3.1 หลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3.2 หลอด PCR ขนาด 0.2 มิลลิลิตร
3.3 Petri dish
3.4 Autopipett ขนาด P10, P20, P200, P1000
3.5 ขวด Duran ขนาด 100 มิลลิลิตร, 250 มิลลิลิตร, 500 มิลลิลิตร, 1000 มิลลิลิตร
3.6 Pipett ขนาด 1 มิลลิลิตร, 5 มิลลิลิตร, 10 มิลลิลิตร
3.7 Glass bead ขนาด 425-600 ไมโครเมตร (Sigma, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
3.8 Quartz cuvette

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1 Trypticase soy agar (TSA)
4.2 Trypticase soy broth (TSB)
4.3 Emulsion tributyrin agar
4.4 Production medium

5. สารเคมี

5.1 Triton X-100 (Sigma-Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
5.2 Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Ajax finechem Pty Ltd, ประเทศออสเตรเลีย)

5.3 Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) (Amresco®, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
5.4 Tris base (Vivantis, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
5.5 Agarose (Amresco®, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
5.6 Hydrochloric acid (HCl) (QRëC™, ประเทศนิวซีแลนด์)
5.7 Sodium chloride (NaCl) (Loba chemie PVT, ประเทศอินเดีย)
5.8 Sodium hydroxide (NaOH) (VWR prolabo®)
5.9 Glacial acetic acid (QRëC™, ประเทศนิวซีแลนด์)
5.10 Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol (25:24:1) (Research organic, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

6. ชุด kits สำเร็จรูป

6.1 PCR clean-up kit (Vivantis, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
6.2 Rapid™ Yeast Plus System (Remel, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
6.3 PCR clean-up kit (Vivantis, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
6.4 PureLink™ Quick Gel Extraction kit (Invitrogen, ประเทศเยอรมนี)

7. สารอื่นๆ ที่ใช้ในการทดลอง

7.1 Ethidium bromide
7.2 6x Gel loading buffer (QRëC™, ประเทศนิวซีแลนด์)
7.3 TE buffer pH 8.0
7.4 1x TAE buffer
7.5 VC 100bp plus DNA ladder (Vivantis, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
7.6 Lysis buffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, 1mM EDTA)

8. ไพรเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR (Bell *et al.*, 2002)

ไพรเมอร์	ลำดับนิวคลีโอไทด์
OXF1	5´- CCY GTK GTS YTN GTN CAY GG - 3´ (20 bp)
OXF2	5´- CCR ATM RTW YTN GTN CAY GG - 3´ (20 bp)
OXF3	5´- CCK YTW GTK YTN ATH CAY GG - 3´ (20 bp)
ACR1	5´- AGG CCN CCC AKN GAR TGN SC - 3´ (20 bp)
ACR2	5´ - AGR CCN CCC AKR CTR TGN SC - 3´ (20 bp)
ACR3	5´ - AGG CCR CCN TGN GAR TGN SC - 3´ (20 bp)
ACR4	5´ - AGG CCN CCN TGR CTR TGN SC - 3´ (20 bp)

วิธีการทดลอง

1. การตรวจสอบการย่อยไตรบิวทิริน (Amornrattanapan and Ruangrit, 2012)

1.1 นำเชื้อ *Bacillus* spp. ที่เตรียมดังแสดงในข้อ 1 มาทำ Point inoculation โดยใช้ Micropipette ดูดเซลล์มา 0.3 ไมโครลิตร หยดลงตรงกลางของอาหาร Emulsion tributyrin agar (พีเอช 7.5) (ไอโซเลตละ 3 ซ้ำ)

1.2 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 96 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone ที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีทุกๆ 18, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยของสัดส่วน ขนาดวงใส / ขนาดโคโลนี

2. การตรวจสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปสในอาหารเหลว (พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์, 2557)

2.1 นำโคโลนีเดี่ยวของ Stock เชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มาขีดแยกเชื้อลงบนอาหาร Trypticase soy agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.2 นำเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งที่ได้มาแขวนลอยใน 100 มิลลิโมลาร์ Potassium phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และปรับความขุ่นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0

2.3 นำหัวเชื้อที่เตรียมดังแสดงในข้อ 3.2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร Production medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.4 บ่มบนเครื่องเขย่า (Incubator shaker) ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2.5 ปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บส่วนใสไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ดังแสดงในข้อ 3

3. การวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ดัดแปลงจาก Winkler & Stuckmann, 1979)

3.1 การวัดกิจกรรมเอนไซม์

3.1.1 นำ Solution A (16.5 มิลลิโมลาร์4-nitrophenyl palmitate ที่ละลายใน 2-propanol 10 มิลลิลิตร) ผสมกับ Sterile solution B (50 มิลลิโมลาร์ phosphate buffer pH 7 ที่เติม Triton X-100 ร้อยละ 0.4 และ Gum Arabic ร้อยละ 0.1) อัตราส่วน 1:9 ในหลอดเซนตริฟิวจ์สเตอไรล์

3.1.2 ปิเปต Solution A+B ที่ได้มาปริมาตร 180 ไมโครลิตร ลงในหลุมของ 96-well plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.1.3 เติม Crude enzyme ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate ที่มี Solution A+B บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3.1.4 หยุดการทำงานของเอนไซม์โดยวาง 96-well plate ไว้บนน้ำแข็ง 10 นาที

3.1.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร โดยใช้ Blank เป็น Solution B และใช้ Solution B ผสมกับ Crude enzyme (Solution B 180 ไมโครลิตร : Crude enzyme 20 ไมโครลิตร) เป็นชุดควบคุม

3.2 การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

1 ยูนิตของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ปล่อย 4-nitrophenol 1.0 ไมโครโมล จาก 4-nitrophenyl palmitateในเวลา 1 นาที

กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

$$= \frac{\text{(ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดลอง-ชุดควบคุม÷ค่าความชันจากกราฟมาตรฐาน4-nitrophenol) (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) x ปริมาตรทั้งหมดของสารละลาย(มิลลิลิตร)}}{\text{เวลา (นาที) xปริมาตรของเอนไซม์ (มิลลิลิตร) x มวลโมเลกุลของ 4-nitrophenol (139.11 กรัมต่อโมล)}}$$

4. การเลี้ยงแบคทีเรียและการสกัดดีเอ็นเอ

4.1 เลี้ยงแบคทีเรีย BLCD 003 ในอาหารเหลว TSB ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20-24 ชั่วโมง

4.2 นำหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์จากข้อ 4.1 ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบสูงสุด นาน10 นาที

4.3 กำจัดส่วนใส เก็บเฉพาะตะกอนเซลล์มาแขวนลอยใน TE buffer (pH 8.0) 475 ไมโครลิตร โดยใช้ไมโครปิเปต แล้วผสมให้เข้ากัน (vortex) จนไม่เห็นตะกอนที่ก้นหลอด

4.4 ปิเปต 10% SDS ปริมาตร 25 ไมโครลิตร และ Phenol/Chloroform (1:1) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงไปในเซลล์แขวนลอย ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบสูงสุดนาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

4.5 ใช้ไมโครปิเปตค่อยๆดูดส่วน aqueous phase ชั้นบนที่มีลักษณะใส มาใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดใหม่

4.6 ทำเช่นเดียวกับข้อ 1.3-1.4 ซ้ำอีกครั้ง แต่ไม่ต้องเติม 10% SDS

4.7 ปิเปต 3M Sodium acetate 0.2 volume และ Absolute ethanol 2 volume ลงไปผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000 ×g นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.8 เทส่วนใสทิ้งแล้วล้างตะกอนดีเอ็นเอโดยปิเปต 70% Ethanol ที่แช่เย็น 500 ไมโครลิตร ค่อยๆปล่อยผ่านตะกอนอย่างเบาๆ โดยไม่ต้องทำให้แขวนลอย จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1000 ×g นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วเทเอทานอลทิ้งให้เหลือแต่ตะกอนดีเอ็นเอ

4.9 ทำข้อ 4.7 ซ้ำอีก 1 รอบ

4.10 เปิดฝาหลอดแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เอทานอลที่ค้างอยู่ในหลอดระเหยออกไป

4.11 นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาแขวนลอยใน TE buffer (pH 8.0) 40 ไมโครลิตร และเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

5. การเพิ่มปริมาณยีนไลเปสโดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) และวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

5.1 เตรียมส่วนผสมสำหรับปฏิกิริยา PCR โดยมีจีโนมิกดีเอ็นเอเป็นแม่แบบและเตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา ดังต่อไปนี้

Component	Volume (µl)	Final concentration
Sterilized dH_2O	32.5	-
10xPCR buffer+ $MgCl_2$ (50 mM)	5	1x
dNTPmix (10 mM each)	1	2.0 mM
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	1.5	2.5 mM
Forward-Primer (10 µM)	2.5	0.5 mM
Reverse-Primer (10 µM)	2.5	0.5 mM
ปริมาตรรวม	45	

5.2 เติมจีโนมิกดีเอ็นเอ หลอดละ 5 ไมโครลิตร ลงในส่วนผสมในข้อ 5.1

5.3 เตรียม Negative controls 2 หลอด โดยหลอดแรกเป็นหลอดที่ผสมทุกอย่าง ยกเว้น จีโนมิกดีเอ็นเอและหลอดที่ 2 เป็นหลอดที่มีส่วนผสมทุกอย่าง ยกเว้น คู่ primers

5.4 ใส่ PCR tubes ในเครื่อง Thermocycler และดำเนินปฏิกิริยา PCR ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

Steps	อุณหภูมิ	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Initial denaturation	94	3 min	1
Denaturation	95	1 min	35
Annealing	50	1 min	
Extention	72	1 min	
Final Extention	72	7 min	1

5.5 ตรวจสอบขนาดที่ถูกต้องของผลิตภัณฑ์ PCR บน Agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 1x TAE buffer โดยเปรียบเทียบกับขนาดของ VC 100bp plus DNA ladder (DNA marker) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ไปทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR clean-up kit (Vivantis,ประเทศสหรัฐอเมริกา) วิเคราะห์ความเข้มข้นวิธี Spectrophotometry และนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

6. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยวิธี Agarose gel electrophoresis (Sambrook & Russell, 2001)

6.1 เท Agarose ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่หลอมละลายแล้วใส่ถาด เสียบหวีแล้วตั้งทิ้งนานอย่างน้อย 30 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว

6.2 ใส่ถาดที่มี Agarose gel ลงใน Gel electrophotoresis apparatus เท 1x TAE buffer ให้ท่วม Agarose gel

6.3 ปิเปตดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาผสมกับ 6x Gel loading buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วปิเปตทั้งหมดลงในหลุมของเจล และปิเปต VC 100 bp plus DNA ladder ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในหลุมเจลหลุมแรก

6.4 ให้กระแสไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที

6.5 ตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอใต้แสงยูวีและถ่ายภาพ

7. การทำผลิตภัณฑ์ PCR ให้บริสุทธิ์ด้วย PCR clean-up kit (Vivantis, ประเทศสหรัฐอเมริกา)

7.1 ปรับปริมาตรของสารละลายดีเอ็นเอที่ได้จากข้อ 5 หรือ 6 ให้เป็น 100 ไมโครลิตร ด้วยน้ำ Deionized ปราศจากเชื้อ

7.2 เติม Buffer PCR ปริมาตร 5 volume แล้วผสมให้เข้ากันด้วย Vortex

8.3 ใส่สารละลายดีเอ็นเอที่มีสีเหลืองลงใน Column (หากสารละลายมีสี ส้ม/ชมพู/แดง ให้เติม 3M Sodium acetate (pH 5.2) และผสมให้กลับมาเป็นสีเหลือง)

7.3 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งส่วนของสารละลายที่ไหลลงมาอยู่ในหลอดเก็บ แล้วล้าง Column ด้วย Wash buffer ปริมาตร 650 ไมโครลิตร

7.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งสารละลายที่ไหลลงมาอยู่ในหลอดเก็บ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อกำจัดเอทานอลที่เหลือ

7.5 ย้าย Column ไปวางบน Microcentrifuge tube ที่ปราศจากเชื้อ เติม Elution buffer ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ลงตรงกลาง Column membrane และตั้งทิ้งไว้ 2 นาที

7.6 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งในส่วนของ Column และนำส่วนของดีเอ็นเอที่ไหลลงมาในหลอดเก็บด้านล่าง ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

8. การแยกดีเอ็นเอออกจาก Agarose gel ด้วย PureLink™ Quick Gel Extraction kit (Invitrogen, ประเทศเยอรมนี)

8.1 ตั้งอุณหภูมิของ Waterbath ให้อยู่ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

8.2 ใช้ใบมีดตัด Agarose gel บริเวณที่มีแถบดีเอ็นเอที่ต้องการและนำชิ้นเจลที่ได้ใส่ในหลอด Microcentrifuge ที่ปลอดเชื้อและนำไปชั่งน้ำหนัก

8.3 ใส่บัฟเฟอร์ L3 ในอัตราส่วน 3:1 ของน้ำหนักชิ้นเจลที่ตัดได้ นำไปแช่ใน Waterbath ที่มีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยต้องพลิกหลอดกลับไปมาทุก 3 นาที หลังจากครบ 10 นาที ให้บ่มต่ออีก เป็นเวลา 5 นาที ให้ชิ้นส่วนเจลละลายเป็นเนื้อเดียวกันกับบัฟเฟอร์ให้หมด

8.4 ใช้ปิเปตดูดสารละลายเจลที่ได้ใส่ลงใน Column และนำไปปั่นเหวี่ยงที่มากกว่า 12,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้องและทิ้งสารละลายที่ไหลลงมาในหลอดเก็บ

8.5 ล้าง Column ด้วย Wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้แรงมากกว่า 12,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และทิ้งสารละลายที่ไหลลงมาในหลอดเก็บ

8.6 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 1 -2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นทิ้งหลอดเก็บและย้าย Column ไปใส่ใน Recovery tube และปิเปต Elution buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงไปตรงกลาง Filter ที่อยู่ใน Column ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที

8.7 นำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้แรงมากกว่า 12,000 xg เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งส่วนของ Column และนำส่วนของดีเอ็นเอที่ไหลผ่าน Column ลงมา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศา-เซลเซียส

9. การวิเคราะห์ความเข้มข้นของดีเอ็นเอและตรวจสอบความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ (Sambrook & Russell, 2001)

9.1 เจือจางดีเอ็นเอ 200 เท่า โดยปิเปตดีเอ็นเอปริมาตร 5 ไมโครลิตรและเติมน้ำ DI ปราศจากเชื้อปริมาตร 995 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Microcentrifuge ที่ปราศจากเชื้อ (เก็บดีเอ็นเอที่เหลือที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส)

9.2 ปิเปตดีเอ็นเอ 1 มิลลิลิตรลงใน Quartz cuvett แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) และ 280 นาโนเมตร (A_{280}) ด้วยเครื่อง Microplate reader

9.3 คำนวณหาความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอจากสมการ โดยนำค่าที่คำนวณได้มาแปลผลดังแสดงในตาราง

$$\text{ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ } A_{260} \text{ นาโนเมตร}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ } A_{280} \text{ นาโนเมตร}}$$

A_{260} / A_{280}	**ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ**
1.65-1.85	ดีเอ็นเอบริสุทธิ์
น้อยกว่า 1.65	ปนเปื้อนโปรตีน
มากกว่า 1.85	ปนเปื้อนอาร์เอ็นเอ

9.4 คำนวณความเข้มข้นปริมาณดีเอ็นเอ

$$\text{ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ } A_{260} \text{ นาโนเมตร} \times 50 \times \text{Dilution factor}$$

10. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

10.1 นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ทำบริสุทธิ์แล้วไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

10.2 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์ความน่าเชื่อถือโดยดูจากค่า QV ที่ปรากฏ โดยใช้โปรแกรม Sequence scanner 1.0 และแก้ไขความถูกต้องของลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม

Bioedit ตามด้วยการใช้ BLASTn เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลที่มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต้องการศึกษา

11. การเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 3 sequences ขึ้นไปไปวิเคราะห์ Multiple sequence alignment ด้วยโปรแกรม CLUSTAL omega

12. การวิเคราะห์ข้อมูลโปรตีน

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไลเปสไป Translate ให้เป็นลำดับกรดอะมิโนโดยใช้โปรแกรม EMBOSS Transeq โดยใช้ bacterial codon table จากนั้นนำลำดับกรดอะมิโนที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วย BLASTp

บทที่ 4
ผลการทดลอง

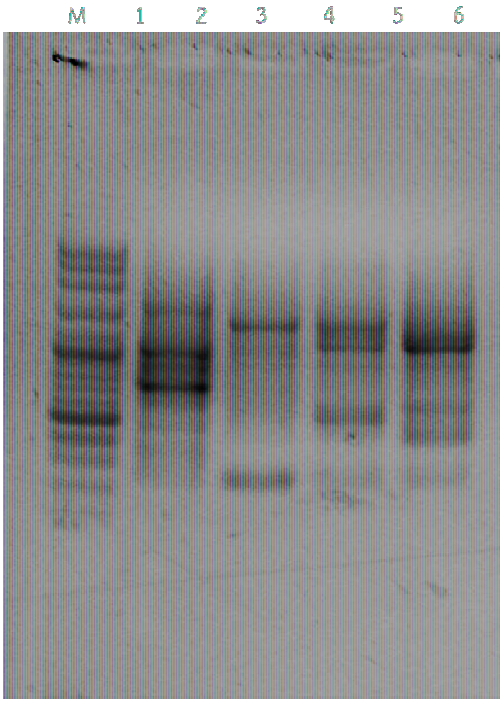
1. การผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย

จากการศึกษากิจกรรมการย่อยสลายลิพิดจากเชื้อ *Bacillus* sp. BLCD003 โดยเลี้ยงบนอาหาร Emulsion tributyrin agar (pH 7.5) ทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Clear zone ที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีที่เวลาแตกต่างกันแล้วนำมาคำนวณค่าเฉลี่ยของสัดส่วน ขนาดวงใส / ขนาดโคโลนี พบว่ามีค่าเฉลี่ยของสัดส่วน ขนาดวงใส / ขนาดโคโลนี สูงที่สุดเท่ากับ 2.40 ± 0.020 ที่ชั่วโมงที่ 72

จากการนำเชื้อ *Bacillus* sp. BLCD003 มาเลี้ยงในอาหาร Production medium ที่เติมน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้เชื้อผลิตเอนไซม์ไลเปส หลังจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นำ Crude enzyme ที่ได้ไปวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส โดยใช้ 4-nitrophenyl palmitate เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในช่วง 0.78 **±** 0.12 – 1.0 **±** 0.09 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

2. การตรวจหายีนไลเปส

จากการนำจีโนมิกดีเอ็นเอของ *Bacillus* sp. BLCD003 มาใช้เป็นแม่แบบในการทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีนไลเปส โดยใช้คู่ไพรเมอร์ OXF-ACR จำนวน 12 คู่ และนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มาตรวจสอบด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1x TAE buffer และใช้กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที พบผลิตภัณฑ์ PCR จากการใช้คู่ไพรเมอร์ OXF1-ACR1, OXF1 -ACR2, OXF2-ACR2 และ OXF 3-ACR2 (ภาพที่ 3) ในขณะที่ไม่พบผลิตภัณฑ์ PCR จากคู่ไพรเมอร์อื่นๆ อย่างไรก็ตาม พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ปรากฏจากการใช้แต่ละคู่ไพรเมอร์มีจำนวนมากกว่า 1 ชิ้น (ตารางที่ 1) จึงได้ดำเนินการแยกแถบดีเอ็นเอแต่ละแถบออกจากกันเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป



ภาพที่ 3 ผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มจำนวนยีนไลเปสบน 1% Agarose gel โดย**เลน M** คือ VC 100 bp Plus DNA Ladder**; เลนที่ 1 ถึง 4** คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการใช้คู่ไพรเมอร์ OXF1-ACR1; OXF1 -ACR2; OXF2-ACR2 และ OXF3-ACR2 ตามลำดับ **เลนที่ 5** คือ Negative control ที่ไม่มี Template; **เลนที่ 6** คือ Negative control ที่ไม่มีไพรเมอร์

ตารางที่ 1 ขนาดของผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มจำนวนยีนไลเปส

OXF-ACR	จำนวนชิ้นดีเอ็นเอ	ขนาด (bp)
1-1	2	700 และ 1100
1-2	2	250 และ 1400
2-2	3	250, 500 และ 1400
3-2	2	250 และ 300

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ทั้ง 9 ชิ้น โดยการ BLAST พบว่า ผลิตภัณฑ์ PCR จากการใช้คู่ไพรเมอร์ OXF1 -ACR2 และ OXF2-ACR2 มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายคลึงสูงสุดที่ 99% กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไลเปสของ *Bacillus pumilus* strain Nwsic-2 ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ PCR จากคู่ไพรเมอร์ OXF1 –ACR1 และ OXF3-ACR2 ไม่สามารถใช้ระบุยีนไลเปสได้ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มจำนวนยีนไลเปสที่เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank

คู่ที่	คู่ไพรเมอร์		bp	Description	% Query coverage	% Identity
1	OXF	1	512	*Bacillus pumilus* SAFR-032, complete genome	96	96
				Bacillus pumilus strain MTCC B6033, complete genome	96	95
	ACR	1	307	*Bacillus pumilus* strain MTCC B6033, complete genome	69	90
				Bacillus pumilus SAFR-032, complete genome	74	87
2	OXF	1	401	*Bacillus pumilus* strain MTCC B6033, complete genome	95	89
	ACR	2	399	*Bacillus pumilus* strain MTCC B6033, complete genome	88	90
				Bacillus pumilus SAFR-032, complete genome	73	83
3	OXF	1	205	*Bacillus pumilus* strain Nwsic-2 lipase gene, complete cds	81	99
				Bacillus pumilus strain L21 lipase gene, complete cds	86	93
				Bacillus pumilus strain SG2 lipase gene, partial cds	81	95
				Bacillus pumilus strain XJU-13 lipase gene, partial cds	81	95
				Bacillus sp. B26 lipase gene, complete cds	81	95
				Bacillus sp. XZ18 lipase gene, partial cds	81	95
				Bacillus pumilus strain SW41 lipase gene, complete cds	81	95
				Bacillus pumilus strain MTCC B6033, complete genome	81	95
				Bacillus sp. enrichment culture clone S6 lipase gene, complete cds	81	95
				Bacillus licheniformis strain RSP-09 lipase gene, partial cds	81	95
				Bacillus pumilus strain F3 lipase precursor, gene, complete cds	81	89
	ACR	2	200	-	-	-
4	OXF	1	-	-	-	-
	ACR	2	319	*Bacillus pumilus* strain Nwsic-2 lipase gene, complete cds	97	98
				Bacillus sp. B26 lipase gene, complete cds	80	90
				Bacillus pumilus strain SG2 lipase gene, partial cds	80	89
				Bacillus pumilus strain XJU-13 lipase gene, partial cds	80	89
				Bacillus pumilus strain SW41 lipase gene, complete cds	80	88
				Bacillus pumilus strain MTCC B6033, complete genome	80	88
				Bacillus pumilus strain L21 lipase gene, complete cds	80	88
				Bacillus sp. enrichment culture clone S6 lipase gene, complete cds	80	88
				Bacillus licheniformis strain RSP-09 lipase gene, partial cds	69	86
				Bacillus sp. XZ18 lipase gene, partial cds	59	88
8	OXF	2	429	-	-	-

	ACR	2	453	-	-	-
9	OXF	2	210	*Bacillus pumilus* strain Nwsic-2 lipase gene, complete cds	83	98
				Bacillus pumilus strain L21 lipase gene, complete cds	85	93
				Bacillus pumilus strain SG2 lipase gene, partial cds	83	94
				Bacillus pumilus strain XJU-13 lipase gene, partial cds	83	94
				Bacillus sp. B26 lipase gene, complete cds	83	94
				Bacillus sp. XZ18 lipase gene, partial cds	83	93
				Bacillus pumilus strain SW41 lipase gene, complete cds	83	93
				Bacillus pumilus strain MTCC B6033, complete genome	83	93
				Bacillus sp. enrichment culture clone S6 lipase gene, complete cds	83	93
				Bacillus licheniformis strain RSP-09 lipase gene, partial cds	83	93
				Bacillus pumilus strain F3 lipase precursor, gene, complete cds	75	90
	ACR	2	389	*Bacillus pumilus* strain Nwsic-2 lipase gene, complete cds	73	95
				Bacillus sp. B26 lipase gene, complete cds	88	90
				Bacillus pumilus strain MTCC B6033, complete genome	88	89
				Bacillus pumilus strain SG2 lipase gene, partial cds	73	91
				Bacillus pumilus strain XJU-13 lipase gene, partial cds	73	91
				Bacillus pumilus strain SW41 lipase gene, complete cds	73	91
				Bacillus sp. enrichment culture clone S6 lipase gene, complete cds	73	91
				Bacillus pumilus strain L21 lipase gene, complete cds	76	87
				Bacillus licheniformis strain RSP-09 lipase gene, partial cds	49	90
				Bacillus sp. XZ18 lipase gene, partial cds	41	93
11	OXF	3	170	*Bacillus pumilus* strain MTCC B6033, complete genome	66	85
	ACR	2	192	*Bacillus pumilus* strain MTCC B6033, complete genome	52	98
12	OXF	3	249	*Bacillus pumilus* strain MTCC B6033, complete genome	27	96
				Bacillus pumilus SAFR-032, complete genome	26	97
	ACR	2	314	-	-	-

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR (ตารางที่ 3) ไปทำ Multiple sequence alignment เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไลเปสจาก *Bacillus pumilus* strain Nwsic-2 (ภาคผนวก ค) พบว่าสามารถจำแนกบริเวณอนุรักษ์ของยีนไลเปสซึ่งมีขนาด 161 และ 217 bp ได้ดังแสดงในภาพที่ 4, 5 และตารางที่ 4 และเมื่อเชื่อมต่อข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองส่วน (ภาพที่ 6) พบว่าส่วนของยีนไลเปสที่วิเคราะห์มีขนาด 308 bp และมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังแสดงในภาพที่ 7

เมื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน (103 aa) (ภาพที่ 8) ใน BLASTp พบว่ามี Conserved domain ตรงกับเอนไซม์ในตระกูล Alpha/beta hydrolases (abhydrolases superfamily) และมีความคล้ายคลึงสูงสุดที่ 96% กับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไลเปสของ *Bacillus pumilus* (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR จากการเพิ่มจำนวนยีนไลเปสคู่ไพรเมอร์ OXF1-ACR2 และ OXF2-ACR2

OXF-ACR	ลำดับนิวคลีโอไทด์	ขนาด (bp)
1674051_CD3_F03_OXF1	NNNANNNGNNNNTGTANCTTTGCTTNNTCANCGATACTTGGTATCACAGG GCTGGGATCAAAACCAGCTTTTTGCACTGGATTTCATAGACAAAACCGGT AATAACCTGNCAATGGCCCGCGTCTCTCGAGATTCGACAAAGATGTACTA TCCAAAACGGGCGCCAAAAAAGTAGATATTGTGGCCCATATTACGGGGGG GCCTANTG	208
1674054_CD3_R04_ACR2	TAATTTTTTTAAAGAAAAGAACATTTCAAATTATAGATTTAGCTTTCATT ACTGGTTGGATCAATTGCCTTCATCCAGCCGAAAGAAGCCAAAGCGGCTG CGCATAATCCGGTTGTAATGGTACCCGGCATGGGCGGTGCGTTTTATAAC TTTGCTTTGATCAAATCGATACTTGGTATCAACAGGGATGGGATCAAAAC CACGCTTTTTGCAATCGATTTCATAGACAAAACCCGGTAATAACCTGAAC AATGGCCCGCGTCTCTCGAGATCGTCAAAGATGTATAGCCAAAACCGCGC AAAAATGATAGGTCTTGTT	319
1674064_CD3_R09_ACR2	TAGAGGGCGAAAAGAAAAATTATGGCATATTTTTCTTGTTTAAAATAGAG ACGTATTCGAAAATTAAGGGGGAATGAACATGGTCGTTTTAAAGAAAAGG AGTTTGCAAATTTTGATTGCGCTTGCATTAGTGGTTGGATCAATGGCCTT CATCCAGCCGAAAGAAGCCAAAGCGGCTGCGCATAATCCGGTTGTAATGG TACCCGGCATGGGCGGTGCGTTTTATAACTTTGCTTCGATCAAACGATAC TTGGTATCACAGGGATGGGATCAAAACCAGCTTTTTGCAATCGATTTCAT AGACAAAACAGGTAATAACCTGAACAATGGCCCGCGTCTCTCGAGATCGT CAAAGATGTACAGCCAAACGCTCTAAAAAGTTGTTCTGC	389
1695094_CD3_F04_OXF1	NNNNNNNGNGNNNNNNNNTNTGCTTCGATCAACGATACTTGGTATCACAG GGATGGGATCAAAACCAGCTTTTTGCAATCGATTTCATAGACAAAACAGG TAATAACCTGAACAATGGCCCGCGTCTCTCGAGATTCGTCAAAGATGTAC TAGCCAAAACGGGCGCCAAAAAAGTAGATATTGTGGCCCACAGCTGGGGG GGCCA	205
1695106_CD3_F10_OXF2	GNNGGGGGGGGGGGGTTTTTTTTGGTTCGATCAGCGATACTTGGTATCAC AGGGATGGGATCAAAACCAGCTTTTTGCAATCGATTTCATAGACAAAACA GGTAATAACCTGAACAATGGCCCGCGTCTCTCGAGATTCGTCAAAGATGT ACTAGCCAAAACGGGCGCCAAAAAAGTAGATATTGTGGCCCATAGCTGGG GGGGCTAAAN	210

```
                5'            10         20         30         40         50
                         ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
gi|544191646             ATGAAAGTGA TTCGATTTAA GAAAAGGAGT TTGCAAATTC TGATTGCGCT  50
1674051_CD3_F03_OXF1     ---------- ---------- ---------- ---------- ----------   1
1695094_CD3_F04_OXF1     ---------- ---------- ---------- ---------- ----------   1
1695106_CD3_F10_OXF2     ---------- ---------- ---------- ---------- ----------   1
Clustal Consensus                                                                1

                                60         70         80         90        100
                         ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
gi|544191646             TGCATTAGTG GTTGGATCAA TGGCTTTCGT CCAGCCGAAA GAGGCCAAAG  100
1674051_CD3_F03_OXF1     ---------- ---------- ---------- ---------- ----------   1
1695094_CD3_F04_OXF1     ---------- ---------- ---------- ---------- ----------   1
1695106_CD3_F10_OXF2     ---------- ---------- ---------- ---------- ----------   1
Clustal Consensus                                                                1

                       110        120        130        140        150
                         ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
gi|544191646             CGGCTGAGCA TAATCCGGTA GTGATGGTAC ACGGCATGGG CGGTGCGTCT  150
1674051_CD3_F03_OXF1     ---------- ---------- ---------- -----NNNAN NNGNNNNTGT   15
1695094_CD3_F04_OXF1     ---------- ---------- ---------- -----NNNNN NNGNGNNNNN   15
1695106_CD3_F10_OXF2     ---------- ---------- ---------- --GNNGGGGG GGGGGGGTTT   18
Clustal Consensus                                                      *         1

                         160        170        180        190        200
                         ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
gi|544191646             TATAACTTTG CTTCGATCAA ACGATACTTG GTATCACAGG GATGGGATCA  200
1674051_CD3_F03_OXF1     AN---CTTTG CTTNNATCAA ACGATACTTG GTATCACAGG GATGGGATCA   62
1695094_CD3_F04_OXF1     NN---NTNTG CTTCGATCAA ACGATACTTG GTATCACAGG GATGGGATCA   62
1695106_CD3_F10_OXF2     T----TTTTG GTTCGATCAA ACGATACTTG GTATCACAGG GATGGGATCA   64
Clustal Consensus            * **  **  ***** ********** ********** **********  41

                         210        220        230        240        250
                         ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
gi|544191646             AAACCAGCTT TTTGCAATCG ATTTCATAGA CAAAACAGGT AATAACCTGA  250
1674051_CD3_F03_OXF1     AAACCAGCTT TTTGCAATCG ATTTCATAGA CAAAACAGGT AATAACCTGA  112
1695094_CD3_F04_OXF1     AAACCAGCTT TTTGCAATCG ATTTCATAGA CAAAACAGGT AATAACCTGA  112
1695106_CD3_F10_OXF2     AAACCAGCTT TTTGCAATCG ATTTCATAGA CAAAACAGGT AATAACCTGA  114
Clustal Consensus        ********** ********** ********** ********** **********  91

                         260        270        280        290        300
                         ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
gi|544191646             ACAATGGCCC GCGTCTCTCG AGATTCGTCA AAGATGTACT AGCCAAAACG  300
1674051_CD3_F03_OXF1     ACAATGGCCC GCGTCTCTCG AGATTCGTCA AAGATGTACT AGCCAAAACG  162
1695094_CD3_F04_OXF1     ACAATGGCCC GCGTCTCTCG AGATTCGTCA AAGATGTACT AGCCAAAACG  162
1695106_CD3_F10_OXF2     ACAATGGCCC GCGTCTCTCG AGATTCGTCA AAGATGTACT AGCCAAAACG  164
Clustal Consensus        ********** ********** ********** ********** **********  141

                         310        320        330        340        350
                         ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
gi|544191646             GGCGCCAAAA AAGTAGATAT TGTGGCTCAT AGTATGGGTG GTGCGAACAC  350
1674051_CD3_F03_OXF1     GGCGCCAAAA AAGTAGATAT TGTGGCCCAT ATTACGGGGG GGCCTANTG-  211
1695094_CD3_F04_OXF1     GGCGCCAAAA AAGTAGATAT TGTGGCCCAC AGC-TGGGGG GGCCA-----  206
1695106_CD3_F10_OXF2     GGCGCCAAAA AAGTAGATAT TGTGGCCCAT AGC-TGGGGG GGCTAAAN--  211
Clustal Consensus        ********** ********** ****** **  *    *** * *        175

                         360        370        380        390        400
                         ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
gi|544191646             GTTATACTAT ATTAAAAACC TAGACGGCGG AGATAAAATT GAAAACGTCG  400
1674051_CD3_F03_OXF1     ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  211
1695094_CD3_F04_OXF1     ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  206
1695106_CD3_F10_OXF2     ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  211
Clustal Consensus                                                               175

                         410        420        430        440        450
                         ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
gi|544191646             TCACACTTGG TGGAGCGAAC GGGCTCGTTT CACTCAGAGC ATTACCAGGC  450
1674051_CD3_F03_OXF1     ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  211
1695094_CD3_F04_OXF1     ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  206
1695106_CD3_F10_OXF2     ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  211
Clustal Consensus                                                               175
```

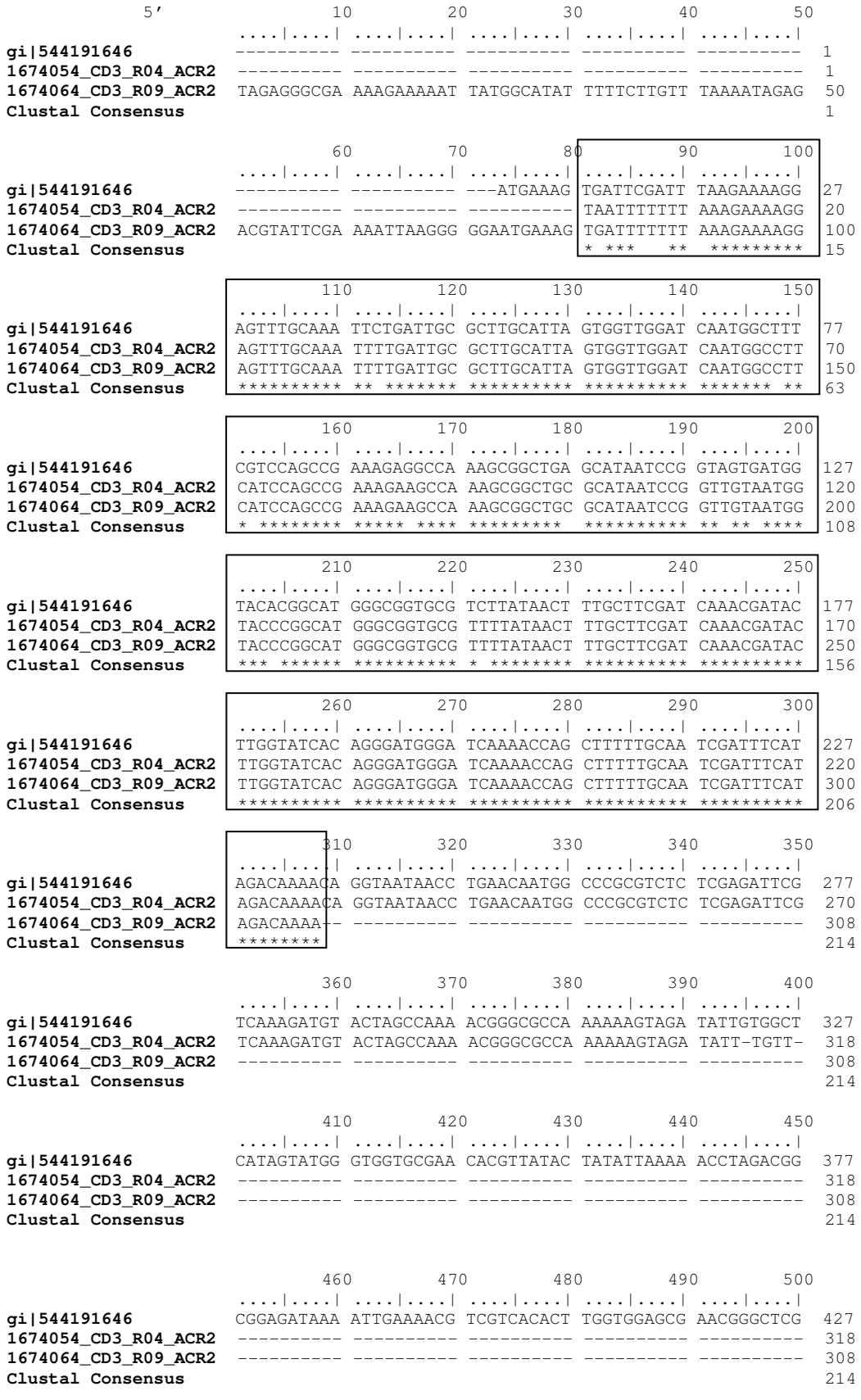
```
                          460        470        480        490        500
                     ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
gi|544191646         ACCGATCCAA ATCAAAAAAT TCTTTACACA TCTGTCTATA GCTCAGCCGA  500
1674051_CD3_F03_OXF1 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  211
1695094_CD3_F04_OXF1 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  206
1695106_CD3_F10_OXF2 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  211
Clustal Consensus                                                           175

                          510        520        530        540        550
                     ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
gi|544191646         TCTCATTGTC GTCAACAGCC TCTCACGCTT AATTGGCGCG AGAAACGTCC  550
1674051_CD3_F03_OXF1 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  211
1695094_CD3_F04_OXF1 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  206
1695106_CD3_F10_OXF2 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  211
Clustal Consensus                                                           175

                          560        570        580        590        600
                     ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
gi|544191646         TCATCCACGG CGTTGGACAT ATCGGTCTAT TAACCTCAAG CCAAGTCAAA  600
1674051_CD3_F03_OXF1 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  211
1695094_CD3_F04_OXF1 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  206
1695106_CD3_F10_OXF2 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  211
Clustal Consensus                                                           175

                          610        620        630        640
                     ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|...
gi|544191646         GGCTATGTGA AAGAAGGATT GAATGGCGGA GGACAGAATA CGAATTAA 648
1674051_CD3_F03_OXF1 ---------- ---------- ---------- ---------- -------- 211
1695094_CD3_F04_OXF1 ---------- ---------- ---------- ---------- -------- 206
1695106_CD3_F10_OXF2 ---------- ---------- ---------- ---------- -------- 211
Clustal Consensus                                                       175
```

ภาพที่ 4 Multiple sequence alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่อ่านจากไพรเมอร์ OXF


5′
gi|544191646
1674054_CD3_R04_ACR2
1674064_CD3_R09_ACR2
Clustal Consensus
TAGAGGGCGA AAAGAAAAAT TATGGCATAT TTTTCTTGTT TAAAATAGAG
---ATGAAAG TGATTCGATT TAAGAAAAGG
TAATTTTTTT AAAGAAAAGG
ACGTATTCGA AAATTAAGGG GGAATGAAAG TGATTTTTTT AAAGAAAAGG
AGTTTGCAAA TTCTGATTGC GCTTGCATTA GTGGTTGGAT CAATGGCTTT
AGTTTGCAAA TTTTGATTGC GCTTGCATTA GTGGTTGGAT CAATGGCCTT
AGTTTGCAAA TTTTGATTGC GCTTGCATTA GTGGTTGGAT CAATGGCCTT
CGTCCAGCCG AAAGAGGCCA AAGCGGCTGA GCATAATCCG GTAGTGATGG
CATCCAGCCG AAAGAAGCCA AAGCGGCTGC GCATAATCCG GTTGTAATGG
CATCCAGCCG AAAGAAGCCA AAGCGGCTGC GCATAATCCG GTTGTAATGG
TACACGGCAT GGGCGGTGCG TCTTATAACT TTGCTTCGAT CAAACGATAC
TACCCGGCAT GGGCGGTGCG TTTTATAACT TTGCTTCGAT CAAACGATAC
TACCCGGCAT GGGCGGTGCG TTTTATAACT TTGCTTCGAT CAAACGATAC
TTGGTATCAC AGGGATGGGA TCAAAACCAG CTTTTTGCAA TCGATTTCAT
TTGGTATCAC AGGGATGGGA TCAAAACCAG CTTTTTGCAA TCGATTTCAT
TTGGTATCAC AGGGATGGGA TCAAAACCAG CTTTTTGCAA TCGATTTCAT
AGACAAAACA GGTAATAACC TGAACAATGG CCCGCGTCTC TCGAGATTCG
AGACAAAACA GGTAATAACC TGAACAATGG CCCGCGTCTC TCGAGATTCG
AGACAAAA
TCAAAGATGT ACTAGCCAAA ACGGGCGCCA AAAAAGTAGA TATTGTGGCT
TCAAAGATGT ACTAGCCAAA ACGGGCGCCA AAAAAGTAGA TATT-TGTT-
CATAGTATGG GTGGTGCGAA CACGTTATAC TATATTAAAA ACCTAGACGG
CGGAGATAAA ATTGAAAACG TCGTCACACT TGGTGGAGCG AACGGGCTCG

```
                          510        520        530        540        550
                     ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
gi|544191646         TTTCACTCAG AGCATTACCA GGCACCGATC CAAATCAAAA AATTCTTTAC  477
1674054_CD3_R04_ACR2 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  318
1674064_CD3_R09_ACR2 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  308
Clustal Consensus                                                           214

                          560        570        580        590        600
                     ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
gi|544191646         ACATCTGTCT ATAGCTCAGC CGATCTCATT GTCGTCAACA GCCTCTCACG  527
1674054_CD3_R04_ACR2 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  318
1674064_CD3_R09_ACR2 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  308
Clustal Consensus                                                           214

                          610        620        630        640        650
                     ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
gi|544191646         CTTAATTGGC GCGAGAAACG TCCTCATCCA CGGCGTTGGA CATATCGGTC  577
1674054_CD3_R04_ACR2 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  318
1674064_CD3_R09_ACR2 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  308
Clustal Consensus                                                           214

                          660        670        680        690        700
                     ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
gi|544191646         TATTAACCTC AAGCCAAGTC AAAGGCTATG TGAAAGAAGG ATTGAATGGC  627
1674054_CD3_R04_ACR2 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  318
1674064_CD3_R09_ACR2 ---------- ---------- ---------- ---------- ----------  308
Clustal Consensus                                                           214

                          710        720
                     ....|....| ....|....| .
gi|544191646         GGAGGACAGA ATACGAATTA A 648
1674054_CD3_R04_ACR2 ---------- ---------- - 318
1674064_CD3_R09_ACR2 ---------- ---------- - 308
Clustal Consensus                          214
```

ภาพที่ 5 Multiple sequence alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่อ่านจากไพรเมอร์ ACR

ตารางที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณอนุรักษ์ของยีนไลเปส

Primer	Seq. 5'-3'	bp
OXF	ATCAAACGATACTTGGTATCACAGGGATGGGATCAAAACCAGCTTTTTGCAATCGATTTCATAGACAAAACAGGTAATAACCTGAACAATGGCCCGCGTCTCTCGAGATTCGTCAAAGATGTACTAGCCAAAACGGGCGCCAAAAAAGTAGATATTGTGGC	161
ACR	AAGAAAAGGAGTTTGCAAATTTTGATTGCGCTTGCATTAGTGGTTGGATCAATGGCCTTCATCCAGCCGAAAGAAGCCAAAGCGGCTGCGCATAATCCGGTTGTAATGGTACCCGGCATGGGCGGTGCGTTTTATAACTTTGCTTCGATCAAACGATACTTGGTATCACAGGGATGGGATCAAAACCAGCTTTTTGCAATCGATTTCATAGACAAAA	217

```
CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment


ACR             ------------------AAGAAAAGGAGTTTGCAAATTTTGATTGCGCTTGCATTAGTG
gi|544191646    ATGAAAGTGATTCGATTTAAGAAAAGGAGTTTGCAAATTCTGATTGCGCTTGCATTAGTG
OXF             ------------------------------------------------------------

ACR             GTTGGATCAATGGCCTTCATCCAGCCGAAAGAAGCCAAAGCGGCTGCGCATAATCCGGTT
gi|544191646    GTTGGATCAATGGCTTTCGTCCAGCCGAAAGAGGCCAAAGCGGCTGAGCATAATCCGGTA
OXF             ------------------------------------------------------------

ACR             GTAATGGTACCCGGCATGGGCGGTGCGTTTTATAACTTTGCTTCGATCAAACGATACTTG
gi|544191646    GTGATGGTACACGGCATGGGCGGTGCGTCTTATAACTTTGCTTCGATCAAACGATACTTG
OXF             ----------------------------------------------ATCAAACGATACTTG
                                                               ***************
ACR             GTATCACAGGGATGGGATCAAAACCAGCTTTTTGCAATCGATTTCATAGACAAAA-----
gi|544191646    GTATCACAGGGATGGGATCAAAACCAGCTTTTTGCAATCGATTTCATAGACAAAACAGGT
OXF             GTATCACAGGGATGGGATCAAAACCAGCTTTTTGCAATCGATTTCATAGACAAAACAGGT
                ************************************************************
ACR             ------------------------------------------------------------
gi|544191646    AATAACCTGAACAATGGCCCGCGTCTCTCGAGATTCGTCAAAGATGTACTAGCCAAAACG
OXF             AATAACCTGAACAATGGCCCGCGTCTCTCGAGATTCGTCAAAGATGTACTAGCCAAAACG

ACR             ------------------------------------------------------------
gi|544191646    GGCGCCAAAAAAGTAGATATTGTGGCTCATAGTATGGGTGGTGCGAACACGTTATACTAT
OXF             GGCGCCAAAAAAGTAGATATTGTGGC----------------------------------

ACR             ------------------------------------------------------------
gi|544191646    ATTAAAAACCTAGACGGCGGAGATAAAATTGAAAACGTCGTCACACTTGGTGGAGCGAAC
OXF             ------------------------------------------------------------

ACR             ------------------------------------------------------------
gi|544191646    GGGCTCGTTTCACTCAGAGCATTACCAGGCACCGATCCAAATCAAAAAATTCTTTACACA
OXF             ------------------------------------------------------------

ACR             ------------------------------------------------------------
gi|544191646    TCTGTCTATAGCTCAGCCGATCTCATTGTCGTCAACAGCCTCTCACGCTTAATTGGCGCG
OXF             ------------------------------------------------------------

ACR             ------------------------------------------------------------
gi|544191646    AGAAACGTCCTCATCCACGGCGTTGGACATATCGGTCTATTAACCTCAAGCCAAGTCAAA
OXF             ------------------------------------------------------------

ACR             --------------------------------------------------
gi|544191646    GGCTATGTGAAAGAAGGATTGAATGGCGGAGGACAGAATACGAATTAA
OXF             --------------------------------------------------
```

ภาพที่ 6 Multiple sequence alignment ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไลเปส

AAGAAAAGGAGTTTGCAAATTTTGATTGCGCTTGCATTAGTGGTTGGATCAATGGCCTTCATC
CAGCCGAAAGAAGCCAAAGCGGCTGCGCATAATCCGGTTGTAATGGTACCCGGCATGGGCGGT
GCGTTTTATAACTTTGCTTCGATCAAACGATACTTGGTATCACAGGGATGGGATCAAAACCAG
CTTTTTGCAATCGATTTCATAGACAAAACAGGTAATAACCTGAACAATGGCCCGCGTCTCTCG
AGATTCGTCAAAGATGTACTAGCCAAAACGGGCGCCAAAAAAGTAGATATTGTGGC

ภาพที่ 7 ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนไลเปสจากการศึกษานี้

KKRSLQILIALALVVGSMAFIQPKEAKAAAHNPVVMVPGMGGAFYNFASIKRYLVSQGWD
QNQLFAIDFIDKTGNNLNNGPRLSRFVKDVLAKTGAKKVDIVA

ภาพที่ 8 ลำดับกรดอะมิโนที่ได้จากการ Translate ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไลเปส

ตารางที่ 5 ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของไลเปส ที่เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank

Description	Accession	%Coverage	%Similarity
lipase [*Bacillus pumilus*]	AGW07449.1	100	96
lipase [*Bacillus pumilus*]	ADD29798.1	100	94
lipase [*Bacillus pumilus*]	ADK63095.1	100	94
lipase [*Bacillus stratosphericus*]	AJW76889.1	100	94
lipase [*Bacillus pumilus*]	ABO32303.1	100	94
lipase (Triacylglycerol lipase) [*Bacillus* sp. M 2-6]	EIL86006.1	100	94

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

Bacillus sp. BLCD003 จากการศึกษานี้ สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 1.0 ± 0.09 ยูนิตต่อมิลลิลิตรในอาหาร Production medium ที่มีน้ำมันปาล์ม 1 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาระดับอณูชีววิทยาถึงยีนสังเคราะห์เอนไซม์ไลเปส สามารถจำแนกยีนไลเปสบางส่วนของ *Bacillus* sp. BLCD003 ซึ่งมีลำดับนิวคลีโอไทด์ (308 bp) คล้ายคลึงสูงสุดกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไลเปสจาก *Bacillus pumilus* และมีลำดับกรดอะมิโน (103 residues) คล้ายคลึงสูงสุดกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus pumilus* จากฐานข้อมูล GenBank ซึ่งมีบริเวณอนุรักษ์แบบ Ala-X-Ser-X-Gly

อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษากิจกรรมการย่อยสลายลิพิดจากเชื้อ *Bacillus* sp. BLCD003 บนอาหาร Emulsion tributyrin agar ที่ pH 7.5 พบว่าเชื้อ *Bacillus* sp. BLCD003 สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสออกมานอกเซลล์เพื่อย่อย Tributyrin แล้วทำให้เห็นเป็น clear zone รอบโคโลนี Tributyrin oil ที่ถูกนำมาใช้เป็นสับสเตรทสำหรับเอนไซม์ไลเปสในการศึกษานี้เป็นไขมันชนิดไตรกลีเซอไรด์ ซึ่งเมื่อถูกย่อยจะได้กลีเซอรอลและกรดไขมัน และ Tributyrin oil จะทำให้เกิดความขุ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ หากจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อย tributyrin ได้ อาหารรอบๆโคโลนีจะใส (Patil *et al*., 2011)

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเตรียมเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus* sp. BLCD003 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันปาล์มเป็นสารเหนี่ยวนำ (Inducer) เพื่อช่วยให้มีการสังเคราะห์เอนไซม์ไลเปส ซึ่งสารเหนี่ยวนำนี้อาจเป็นสารชนิดเดียวหรือต่างชนิดกับสารที่เป็นแหล่งคาร์บอนก็ได้ (ณกัญภัทร จินดาและทรัพย์ทวี ฝุ่นละทอง, 2549)

เอนไซม์ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์รวมทั้งปฏิกิริยาการย่อยสลายและการสังเคราะห์ Fatty/Carboxylic acid Esters ที่ละลายน้ำหรือไม่ละลายน้ำและเอไมด์ วิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสามารถทำได้โดยใช้ Chromogenic *p*-nitrophenyl palmitate (*p*NPP) เป็นสับสเตรท แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของ *p*-nitrophenol ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งวิธีนี้เป็นหนึ่งในเทคนิคการวัดสีที่ง่ายสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส *p*NPP เป็นเอสเทอร์ที่มีสายโซ่คาร์บอนยาว มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำและเป็นสับสเตรตที่นิยมใช้กันมากที่สุด สำหรับการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยวิธีการวัดความเข้มของสี แต่ข้อจำกัดที่สำคัญของการวิเคราะห์ *p*-nitrophenyl ester คือจะต้องทำการวิเคราะห์โดยใช้สภาวะที่มีค่าพีเอชเป็นกลางหรือด่างอ่อนๆ จึงจะสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้อย่างแม่นยำ เนื่องจากถ้าหากพีเอชเป็นกรด (4.5-6.0) *p*-nitrophenol จะดูดกลืนแสงได้ต่ำ และถ้าหากพีเอชเป็นด่างสูง (10-12) ก็จะทำให้ *p*-nitrophenol เกิดการเสื่อมสลายหรือเกิดสีจากเกลือที่มีอยู่ในสารละลาย แทนที่จะเป็นสีที่เกิดจาก *p*-nitrophenol ทำให้วัดค่าดูดกลืนแสงคลาดเคลื่อนได้ (Kanwar *et al*., 2005)

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไลเปสที่ได้จากศึกษาในครั้งนี้เป็นข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วน ซึ่งมีขนาด 308 bp โดยขนาดของยีนไลเปสทั้งชิ้นยีน (Full length) ที่มีรายงานก่อนหน้านี้ใน *B. stearothermophilus* L1 พบว่ามีขนาดประมาณ 1200 bp (Kim *et al*., 1998) ซึ่งใกล้เคียงกับขนาดของยีนไลเปสใน *Bacillus* sp. L2 ซึ่งมีขนาด 1251 bp (Shariff *et al*., 2011)

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนไลเปส (308 bp) ไป Translate เป็นลำดับกรดอะมิโนพบว่ามีขนาด 103 residues และเป็นบริเวณส่วนต้นของโมเลกุลเปปไทด์ที่ยังไม่ถึงบริเวณที่เป็น Conserved motif ของเอนไซม์ไลเปส อย่างไรก็ตาม จากข้อมูลผลการวิเคราะห์ BLASTp ของเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus pumilus* ในฐานข้อมูล GenBank มีบริเวณ Conserved motif เป็น Ala-X-Ser-X-Gly (ภาคผนวก ง) เช่นเดียวกับที่มีรายงานใน *Bacillus subtilis* มาก่อน (Shi *et al*., 2010) ข้อมูลดังกล่าวทำให้ผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่าลำดับกรดอะมิโนในส่วนที่เหลืออยู่ของไลเปสจาก *Bacillus* sp. BLCD003 น่าจะมีบริเวณ conserved motif ที่เป็น Ala-X-Ser-X-Gly เช่นกัน ดังนั้นการศึกษาในลำดับถัดไปจึงจะต้องทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไลเปสทั้งยีนเพื่อใช้ในการโคลนนิ่งและศึกษาคุณสมบัติของไลเปสต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย. (2532). *การคัดเลือกแบคทีเรียจากดินเพื่อผลิตไลเปสและศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิต*. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยา, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชรินทร์ เตชะพันธุ์. (2542). *การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์*. วันที่สืบค้นข้อมูล 15 มีนาคม 2557, เข้าถึงได้จาก http://www.agro.cmu.ac.th/e_books/protein/protein.html

ณกัญภัทร จินดา. (2547). เอนไซม์ไลเปส 1 แหล่งประโยชน์ระดับอุตสาหกรรม. *วารสารมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย*, 24(3), 114-131.

ณกัญภัทร จินดา และทรัพย์ทวี ฝุ่นทอง. (2549). เอนไซม์ไลเปส: การผลิต และคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ. *วารสารมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย*, 26(2), 20-34.

นภัสพร พันธุ์ทอง. (2551). การสลายไขมันจากกระบวนการผลิตปลาส้มโดยแบคทีเรียที่สลายลิพิดและการประยุกต์เพื่อการบำบัดน้ำเสีย. วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาชีววิทยา, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ไบรอัน เคฟ (ประเทศไทย). (2555). *โครงการพัฒนาและปรับปรุงข้อมูลด้านเศรษฐกิจ การค้า การลงทุน.* วันที่ค้นข้อมูล 26 มิถุนายน 2558, เข้าถึงได้จาก htpp://tpso.moc.go.th/img/news/1022-img.pdf

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์ (ม.ป.ป.). *น้ำมันปาล์ม*. วันที่ค้นข้อมูล 7 เมษายน 2558, เข้าถึงได้จาก http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1300/palm-oil-น้ำมันปาล์ม

พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์. (2557). การพัฒนาการตรึงเอนไซม์ไลเปสประสิทธิภาพสูงจากแบคทีเรียบนวัสดุราคาประหยัดเพื่อใช้ในการผลิตไบโอดีเซล. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยบูรพา.

วัชรินทร์ รังษีภาณุรัตน์ และอิสยา จันทร์วิทยานุชิต. (2553). แบซิลลัส. (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุดาพร ปุกแก้ว. (2550). การ*เตรียมสารเคมีและสารละลายที่ใช้ในการเตรียมไวรัสบริสุทธิ์*. ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

เอกรัตน์ เชี่ยงฉิน. (2545). *การโคลนยีน การทำบริสุทธิ์ และคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียชอบอุณหภูมิสูง Bacillus* sp. UN16a. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อามีเน๊าะ โดยมาตู. (2548). *การผลิตเอนไซม์ของ Bacillus* sp. สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์ (จุลชีววิทยา), คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.

Agino, H., Akagi, R., Doukyu, N., Gemba, Y., Hiroshima, SH., Ishikawa, H., Ishimi, K., Katou, Y., Mimitsuka, T., & Yasuda, M. (2000). Purification and characterization of organic solvent-stable lipase from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *Extremophiles*, 11, 809-817.

Amornrattanapan, P., and Ruangrit, A. (2012). Study of *Bacillus* spp. capable of lipase

production from different oils. Paper presented at: Burapha University International Conference (Jomtien Palm Beach Hotel & Resort, Pattaya, Thailand)

Arroyo, S., & Sinisterra, J.V. (1995). Influence of chiral corvones on selectivity of pure lipase-B from *Candida antarctica*. *Biotechnology Letter*, 17, 525-530.

Bell P.J., Sunna A., Gibbs M.D., Curach N.C., Nevalainen H., & Bergquist P.L. (2002). Prospecting for novel lipase genes using PCR. *Microbiology*, 148 (Pt 8), 2283-2291.

Cho, A.R., Yoo, S.-K., and Kim, E.-J. (2000). Cloning, sequencing and expression in *Escherichia coli* of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. *FEMS Microbiology Letters*, 186, 235-238.

Christner, J., Pfeiderer, E., & Taeger, T. (1991). Enzyme-Aided Soaking Process for Skins and Hides. United Kingdom Patent 2233665.

Clark, S.J., Wangner, L., Schrock, M. D., & Pienaar, P. G. (1984). Methyl and ethyl soybean esters as renewable fuels for diesel engines. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 61, 1632-1638.

Colburn, J. T. (1969). Lipase-treated milk fats in production of butter/margarine flavors. United States Patent 3477857.

Cvengros, J., & Cvengrosova, Z. (1994). Quality control of rapeseed oil methyl eaters by determination of acyl conversion. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71, 1349-1352.

Dartois, V., Baulard, A., Schanck, K., and Colson, C. (1992). Cloning, nucleotide sequence and expression in Escherichia coli of a lipase gene from *Bacillus subtilis* 168. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1131, 253-260.

Desuell, P., & L. Sarda. (1985). Action de la lipase pancreatique sur les esters en emulsion. *Biochimistry Biophysical Acta*, 30, 513-521.

Dharmsthiti, S., & Luchai, S. (1999). Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027. *Federation of European Microbiological Societies Microbiol letters*, 179, 241-246.

Elibol, M., & Ozer, D. (2001). Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochemistry*, 36, 325-329.

Figurin, Y. V., Shestakova, I. S., Mironova, T. F., Shtein, I. V., & Arends, I. M. (1990). Method of processing hides and skins. Union of the Soviet Socialists Republic Patent 1567634.

Gandhi, N. N. (1997). Applications of lipase. *Journal of the American Oil Chemists'*

Society, 74, 621-634.

Garcia, H. S., Yang, B., & Parkin, K. L. (1995). Contineous reactor for enzymatic glycerolysis of butter oil in the absence of solvent. *Food Research International*, 28, 605-609.

Gilbert, E. J., Cornish, A., & Jones, C. W. (1991). Purification and properties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2. *Journal of General Microbiology*, 137, 2223-2229.

Godfrey, T., & Reichelt, J. (1983). Industrial enzymology. *The Application of Enzyme in Industry*. Retrieved May 7, 2013, from Macmillan Publishers Ltd: England.

Gulati, R., Saxena, R. K., Gupta, R., Yadav, R. P., & Davidson, W. S. (1999). Parametric optimization of *Aspergillus terreus* lipase production and its potential in ester synthesis. *Process Biochemistry*, 35, 459-464.

Hasan, F., Shah, A., and Hameed, A. (2006a). Influence of culture conditions on lipase production by *Bacillus* sp. FH5. *Annals of Microbiology*, 56, 247-252.

Hasan, F., Shah, A.A., and Hameed, A. (2006b). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 235-251.

Hatzinikolaou, D. G., Kourentzi, E., Stamatis, H., Christakopoulos, P., Kolisis, F. N., Kekos, D., & Macris, B. J. (1999). A novel lipolytic activity of *Rhodotorula glutinis* cell : production, partial characterization and application in the synthesis of esters. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 88(1), 53-56.

Huang, A.H.C., & Brockman, B. H. L. (1984). Plant lipases. *Elsevier Science Publishers, Amsterdam*, 65, 897-899.

Huang, A. H. C., Lin Y. H., & Wang, S. (1988). Characteristics and biosynthesis of seed lipases in maize and other plant species. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65, 897-899.

Jaeger, K.-E., and Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 390-397.

Jaeger, K.-E., and Reetz, M.T. (1998). Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 16, 396-403.

Kanmani, P., Kumaresan, K., & Aravind, J. (2015). Gene cloning, expression, and characterization of the *Bacillus amyloliquefaciens* PS35 lipase. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(4), 1235-1243.

Kanwar, S. S., Kaushal, R. K., Jawed, A. & Chimni, S. S. (2005). Evaluation of methods to inhibit lipase in colorimetric assay employing p-nitrophenyl palmitate. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 42, 233–237.

Kim, H.K., Choi, H.J., Kim, M.H., Sohn, C.B., and Oh, T.K. (2002). Expression and

characterization of Ca2+-independent lipase from *Bacillus pumilus* B26. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1583, 205-212.

Kim, H.-K., Park, S.-Y., Jung-Kee, L., and Oh, T.-K. (1998). Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* L1 *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62, 66-71.

Kim, H. K., Sung, M. H., Kim, H. M., & Oh, T. K. (1994). Occurrence of thermostable lipase in thermophilic *Bacillus* sp. Strain 398. *Bioscience*, *Biotechnology and Biochemistry*, 58, 961-962.

Kim, I., & Oh, T. K. (2002). Characterization of an alkaline lipase from *Proteus valgaris* K80 and the DNA sequence of the encoding gene. *Biotechnology*, 346-349.

Kohno, M., Kugimiya, W., Hashimoto, Y., & Morita, Y. (1994). Purification, characterization and crystallization of two types of lipases from *Rhizopus niveus*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 58, 1007-1012.

Krawczyk, T. (1996). Biodiesel: Alternative fuel makes inroads but hurdles remain. *American Oil Chemists Society*, 8, 801-815.

Lawson, L. D., & Hughes, B. G. (1988). Human absorption of fish oil fatty acids as triacylglycerols, free acid or ethyl esters. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 152, 328-335.

Lee, S. Y., & Rhee, J. S. (1993). Production and partial purification of a lipase from *Pseudomonas putida* 3SK. *Enzyme and Microbial Technology*, 15, 617-623.

Lesuisse, E., Schanck, K., & Colson, C. (1993). Purification and preliminary Characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168 and extremely basic pH-tolerant enzyme. *European Journal of Biochemistry*, 216, 155-160.

Liu, W. H., Beppu, T., & Arima, K. (1973). Purification and general properties of the lipase of thermophilic fungus *Humicola lanuginosa* S-38. *Agricultural and Biological Chemistry*, 37(1), 157-163.

Macrae, A. R. (1983). Lipase-catalyzed interesterification of oils and fat. *Biodiesel: Alternative fuel makes inroads but hurdles remain*, 61, 1067-1071.

Magos, T.J., Jones, K.C., & Foglia, T.A. (1999). Lipase-catalyzed synthesis of structured low-calorie triacylglycerols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76, 1127-1132.

Mayordomo, I., Randez-Gil, F., & Prieto, J. A. (2000). Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 105-109.

Mba, O. I., Dumont, M. J., & Ngadi, M. (2015).Palm oil: Processing, characterization and utilization in the food industry–A review. *Food Science*, 10, 26-41.

Mitsuhashi, K., Yamashita, M., Hwan Y.S., Ihara, F., Nihira, T., & Yamada, Y. (1999). Purification and characterization of a novel extracellular lipase catalyzing hydrolysis of oleyl benzoate from *Acenitobacter* nov. sp. Strain KM109. *Bioscience*, *Biotechnology and Biochemistry*, 63, 1959-1964.

Mohamed, M. A., Mohamed, T. M., Mohamed S. A., & Fahmy, A. S. (2000). Distribution of lipases in the Gramineae. Partial purification and characterization of esterase from *Avena fatua*. *Bioresorch Thechnology*, 11, 227-234.

Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P. Krieger, N., & Soccol, V. T. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29, 119-131.

Patil, J. K., Chopda, Z., and Mahajan, T. R. (2011). Lipase biodiversity. *Indian Journal of Science and Technology*, 4(8), 971-982.

Pleanjai, S., and Gheewala, S.H. (2009). Full chain energy analysis of biodiesel production from palm oil in Thailand. Applied Energy 86*, Supplement* 1, S209-S214.

Posorske, L. H. (1984). Industrial-scale application of enzymes to the fats and oils industry. *Ibid*, 61, 1758-1760.

Rhathi, P., Saxina R.K., & Gupta R. (2001). A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochemistry*, 37, 187-192.

Roberto, A., Arreguin, B., & Gonzalez, C. (2000). Purification and properties of a lipase from *Cephaloleia presignis* (Coleoptera, chrysomelidae). *Biotechnology Applied Biochemistry*, 31, 239-244.

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning. (3rd ed.). USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schmidt-Dannert, C., Sztajer, H., Stocklein, W., Menge, U., & Schmid, R. D. (1994). Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*. *Biochimica et Biophysical Acta*, 1214, 43-53.

Schmidt-Dannert, C., Rua, M. L., Atomi, H., & Schmid, R. D. (1996). Thermoalkaliphilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1301, 105-114.

Seitz, E. W. (1974). Industrial applications of microbial lipase-a review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 51, 12-16.

Shariff, F. M., Rahman, R. N. Z. R. A., Basri, M., & Salleh, A. B. (2011). A newly isolated thermostable lipase from *Bacillus* sp. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 2917-2934.

Sharma, R., Chisti, Y., & Banergy, U.C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*, 19, 627-662.

Shi, B., Wu, W., Wen, J., Shi, Q., & Wu S. (2010). Cloning and expression of a lipase gene from *Bacillus subtilis* FS1403 in *Escherichia coli*. Annals of Microbiology, 60(3), 399–404.

Sinchaikul, S., Sookkheo, B., Phutrakul, S., Pan, F.-M., and Chen, S.-T. (2001). Optimization of a Thermostable Lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1: Overexpression, Purification, and Characterization. *Protein Expression and Purification*, 22, 388-398.

Steiner, J.M., & Williams, D.A. (2002). Purification of classical pancreatic lipase from dog pancreas. *Biochimistry*, 84, 1243-1251.

Stehr, M.K., Kroger, C., Hube, B., & Schafer, W. (2003) Microbial lipases as virulence factors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22, 347-355.

Sugihara, A., Tani, T., Tominaga, Y. (1991). Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp.. *Journal of Biochemistry*, 109(2), 211-216.

Sugihara, A., Shimada, Y., Nakamura, M., Nagao, T., & Tominaga Y. (1994). Positional and fatty acid specificities of *Geotrichum* lipases. *Protein engineering*, 7, 585-588.

Sulong, M.R., Zaliha Raja Abd. Rahman, R.N., Salleh, A.B., and Basri, M. (2006). A novel organic solvent tolerant lipase from *Bacillus sphaericus* 205y: Extracellular expression of a novel OST-lipase gene. *Protein Expression and Purification*, 49, 190-195.

Thamsiriroj, T., and Murphy, J.D. (2009). Is it better to import palm oil from Thailand to produce biodiesel in Ireland than to produce biodiesel from indigenous Irish rape seed? *Applied Energy*, 86, 595-604.

Wang, Y. J., Sheu, J. Y., Wang, F. F., & Shaw, J. F. (1988). Lipase-catalyzed oil hydrolysis in the absence of added emulsifier. *Biotechnology and Bioengineering*, 31, 628-633.

Winkler, U. K., & Stuckmann, M. (1979). Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 138(3), 663-670.

Xie, Z. R., Zhang, X. L., Ding, J. M., Li, J. J., Yang, Y. J., & Huang, Z. X. (2013). Cloning, expression and characterization of a lipase from *Bacillus Subtilis*Strain I_4 with

potential application in biodiesel production. *Applied Mechanics and Materials*, 291-294, 243-248.

Yamane, T. (1987). Enzyme technology for the lipid industry: An engineering overview. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 64, 1657-1662.

Zambiazi, R. C., Przybylski, R., Zambiazi, M. W., & Mendonca, C. B. (2007). Fatty acid composition of vegetable oils and fats. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 1 (6), 111-120.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Tryptic Soy Broth (TSB)

Tryptone (Pancreatic Digest of Casein)	17.0	กรัม
Soytone (Peptic Digest of Soybean Meal)	3.0	กรัม
Glucose (Dextrose)	2.5	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม
Dipotassium Hydrogen Phosphate	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ชั่งส่วนผสมทั้งหมดลงในบีกเกอร์ และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในฟลาสก์ ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. Tryptic Soy Agar (TSA)

Trytone (Pancreatic Digest of Casein)	15.0	กรัม
Soytone (Peptic Digest of Soybean Meal)	5.0	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	กรัม

ชั่งส่วนผสมทั้งหมดใส่ในขวด Duran และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ต้มจนวุ้นหลอมละลาย ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำไปใส่ในอ่างน้ำร้อน (Water bath) อุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส จึงเทลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ

3. Emulsion tributyrin agar (นภัสพร พันธุ์ทอง, 2551)

Tributyrin	10	มิลลิลิตร
Peptone	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
พีเอช 7.5		

ชั่งส่วนผสมทั้งหมดใส่ในขวด Duran และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ต้มจนวุ้นหลอมละลาย ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำไปใส่ในอ่างน้ำร้อน (Water bath) อุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส จึงเทลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ

4. Production medium (พัชรนันท์ อมรรัตนพันธ์, 2557)

Glucose	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	5.0	กรัม
Sodium Chloride	1.25	กรัม
ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$)	0.5	มิลลิโมลาร์
น้ำกลั่น	990	มิลลิลิตร
น้ำมันปาล์ม	1	เปอร์เซ็นต์
pH	6.0	

ชั่งส่วนประกอบข้างต้น (ยกเว้น น้ำมันปาล์ม) ใส่ลงในบีกเกอร์ จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้าย 990 มิลลิลิตร คนให้ละลาย ปรับ pH เป็น 6.0 แบ่งส่วนผสมใส่ในขวดรูปชมพู่ ขวดละ 19.5 มิลลิลิตร จากนั้นปิเปตน้ำมันปาล์มลงในขวดรูปชมพู่ขวดละ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
สารเคมีและบัฟเฟอร์

1. การเตรียม Potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (ดัดแปลงจาก สุดาพร ปุกแก้ว, 2550)

เตรียมสารละลาย K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 โดยเตรียมสารละลายแต่ละชนิดแยกกันก่อน

1.1.1 การเตรียมสารละลาย K_2HPO_4

เตรียม Stock K_2HPO_4 ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ (100 มิลลิลิตร)

K_2HPO_4	8.709 กรัม
น้ำกลั่น	100.0 มิลลิลิตร

1.1.2 เตรียมสารละลาย KH_2PO_4

เตรียม Stock KH_2PO_4 ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ (100 มิลลิลิตร)

KH_2PO_4	6.805 กรัม
น้ำกลั่น	100.0 มิลลิลิตร

1.1.3 นำ Stock K_2HPO_4 ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ มา 50 มิลลิลิตร นำไปปรับพีเอช โดยค่อยๆ เท Stock KH_2PO_4 ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ลงไปจนกว่าจะได้พีเอช 7.0 จะได้ Stock Potassium phosphate buffer พีเอช 7.0 ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.1.4 เจือจางให้ได้ Phosphate buffer พีเอช 7.0 ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยนำ Stock Potassium phosphate buffer พีเอช 7.0 ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์มา 20 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร จะได้ Potassium phosphate buffer พีเอช 7.0 ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. **การเตรียม Potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์**

2.1.1 การเตรียมสารละลาย K_2HPO_4

เตรียม Stock K_2HPO_4 ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ (100 มิลลิลิตร)

K_2HPO_4	8.709 กรัม
น้ำกลั่น	100.0 มิลลิลิตร

2.1.2 เตรียมสารละลาย KH_2PO_4

เตรียม Stock KH_2PO_4 ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ (100 มิลลิลิตร)

KH_2PO_4	6.805 กรัม
น้ำกลั่น	100.0 มิลลิลิตร

2.1.3 นำ Stock K_2HPO_4 ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ มา 50 มิลลิลิตร นำไปปรับพีเอช โดยค่อยๆ เท Stock KH_2PO_4 ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ลงไปจนกว่าจะได้พีเอช 7.0 จะได้

Stock Potassium phosphate buffer พีเอช 7.0 ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1.4 เจือจางให้ได้ Phosphate buffer พีเอช 7.0 ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยนำ Stock Potassium phosphate buffer พีเอช 7.0 ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์มา 50 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร จะได้ Potassium phosphate buffer พีเอช 7.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. วิธีการเตรียมสารละลายสำหรับวัดกิจกรรมเอนไซม์ (ดัดแปลงจาก Winkler and Stuckmann, 1979)

3.1 การเตรียม Solution A (*p*-nitrophenyl pamitate ความเข้มข้น 16.5 มิลลิโมลาร์ (*p*NPP M.W. 377.52) ที่ละลายใน 2-propanol 10 มิลลิลิตร

p-nitrophenyl pamitate ความเข้มข้น	0.0623	กรัม
2-propanol	10.0	มิลลิลิตร

3.2 การเตรียม Solution B (Potassium phosphate buffer ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช7.0 เติม Triton X-100 ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 และ Gum Arabic ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

Potassium phosphate buffer ความเข้มข้น	50.0	มิลลิโมลาร์
Triton X-100	0.4	มิลลิลิตร
Gum Arabic	0.1	กรัม

นำสารละลาย Triton X-100, Gum Arabic และ Potassium phosphate buffer ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไป autoclave 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. 50x Tris-Acetate (TAE) buffer (Sambrook & Russell, 2001)

ส่วนผสม

Tris base	242	กรัม
Glacial acetic acid	57.1	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย Tris base และ 0.5 M EDTA ในน้ำกลั่น จากนั้นเติม Glacial acetic acid (ทำใน Fume hood) ผสมให้เข้ากัน และปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5. Ethidium bromide (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ส่วนผสม

Ethidium bromide	1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย Ethidium bromide 1 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิตร โดยใช้ Magnetic stirrer จนละลายดี เก็บสารละลายโดยใช้หุ้มด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์หรือถ่ายใส่ขวดสีชา แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. Agarose gels 1 เปอร์เซ็นต์

ชั่งผง Agarose 1 กรัม เติม 1xTAE buffer ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หลอม Agarose โดยใช้ไมโครเวฟ เขย่าเป็นครั้งคราวให้ Agarose ละลายจนหมด

7. Tris-Cl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (pH 8.0) (Sambrook & Russell, 2001)

ส่วนผสม

Tris base	121.1	กรัม
HCl ใช้ปริมาตรตามค่า pH ที่ต้องการ		

pH	HCl (Concentrated)	
7.4	70	มิลลิลิตร
7.6	60	มิลลิลิตร
8.0	42	มิลลิลิตร

ละลาย Tris base ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8.0โดยเติม HCl ปริมาตร 42 มิลลิลิตร ควรปล่อยให้สารละลายเย็นจนถึงอุณหภูมิห้องก่อนทำการปรับ pH ครั้งสุดท้าย และปรับปริมาตรโดยเติมน้ำกลั่นให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

8. Sodium dodecyl sulfate (SDS) 10 เปอร์เซ็นต์ (Sambrook & Russell, 2001)

ส่วนผสม

SDS	100	กรัม
HCl (Concentrarted)		
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย SDS 100 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 68 องศาเซลเซียสจนละลาย ปรับ pH ให้เป็น 7.2 โดยการหยดกรด HCl เพียงเล็กน้อย และปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

9. Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) ความเข้นข้น 0.5 โมลาร์ (pH 8.0) (Sambrook & Russell, 2001)

ส่วนผสม

Disodium ethylene diamine tetra-accetate • 2H2O	186.1	กรัม
NaOH	~20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย Disodium ethylene diamine tetra-accetate • 2H2O 186.1 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร โดยใช้ magnetic stirrer แล้วปรับ pH ให้เป็น 8.0 โดยค่อยๆเติม NaOH จนละลายเข้ากันแล้ววัด pH ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1,000 มิลลิลิตรแล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

10. โซเดียมคลอไรด์ 5 โมลาร์ (Sambrook & Russell, 2001)

ส่วนผสม

NaCl	292.2	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	กรัม

ละลาย NaCl 292.2 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที

11. 6X Gel loading buffer

ส่วนผสม

0.25 เปอร์เซ็นต์ Bromophenol blue

0.25 เปอร์เซ็นต์ Xylene cyanol FF

30 เปอร์เซ็นต์ Glycerol in water

ผสมสารเคมีดังกล่าว แบ่งใส่หลอด microfuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

12. TE buffer, pH 8.0 (Sambrook & Russell, 2001)

ปิเปต Tris-Cl (pH 8.0) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 300 ไมโครลิตรผสมกับ EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 60 ไมโครลิตร เข้าด้วยกัน แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 30 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 15 นาที เก็บที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งจะทำให้ได้ Tris-Cl (pH 8.0) ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 มิลลิโมลาร์ EDTA ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิโมลาร์

ภาคผนวก ค
ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไลเปส

Bacillus pumilus strain Nwsic-2 lipase gene, complete cds (648 bp)

>gi|544191646

ATGAAAGTGATTCGATTTAAGAAAAGGAGTTTGCAAATTCTGATTGCGCTTGCATTAGTG
GTTGGATCAATGGCTTTCGTCCAGCCGAAAGAGGCCAAAGCGGCTGAGCATAATCCGGTA
GTGATGGTACACGGCATGGGCGGTGCGTCTTATAACTTTGCTTCGATCAAACGATACTTG
GTATCACAGGGATGGGATCAAAACCAGCTTTTTGCAATCGATTTCATAGACAAAACAGGT
AATAACCTGAACAATGGCCCGCGTCTCTCGAGATTCGTCAAAGATGTACTAGCCAAAACG
GGCGCCAAAAAAGTAGATATTGTGGCTCATAGTATGGGTGGTGCGAACACGTTATACTAT
ATTAAAAACCTAGACGGCGGAGATAAAATTGAAAACGTCGTCACACTTGGTGGAGCGAAC
GGGCTCGTTTCACTCAGAGCATTACCAGGCACCGATCCAAATCAAAAAATTCTTTACACA
TCTGTCTATAGCTCAGCCGATCTCATTGTCGTCAACAGCCTCTCACGCTTAATTGGCGCG
AGAAACGTCCTCATCCACGGCGTTGGACATATCGGTCTATTAACCTCAAGCCAAGTCAAA
GGCTATGTGAAAGAAGGATTGAATGGCGGAGGACAGAATACGAATTAA

ภาคผนวก ง

Multiple alignment ของลำดับกรดอะมิโนของไลเปสจาก *Bacillus* spp. ในฐานข้อมูล GenBank