บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

1. คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตไลเปสโดยดูจากวงใสบนอาหารไตรบูไทรินจากแหล่งต่างๆ ได้ 20 ไอโซเลท (isolate) เป็นแบคทีเรียชอบร้อน (thermophile) 11 ไอโซเลท และแบคทีเรียทนร้อน (thermotolerant) 9 ไอโซเลท มีเชื้อแบคทีเรียที่สร้างวงใสกว้างกว่า 0.5 เซนติเมตร 4 ไอโซเลท ซึ่งเป็นแบคทีเรียชอบร้อน (thermophile) ได้แก่ JA1, K2, K3 และ K5 จึงคัดเลือกไว้เพื่อตรวจสอบแอคติวิตีของไลเปส

2. เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ได้แก่ JA1, K2, K3 และ K5 มาตรวจสอบแอคติวิตีของไลเปสพบว่า แบคทีเรีย K3 มีแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะสูงที่สุด ดังนั้นจึงคัดเลือกมาศึกษารูปร่างลักษณะสมบัติ และผลิตไลเปสเพื่อทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้น

3. เมื่อศึกษาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสของแบคทีเรีย K3 พบว่าสามารถผลิตไลเปสได้สูงสุดเมื่อบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส ในอาหาร pH 7.0 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงปลายการเจริญแบบทวีคูณ (exponential phase) จึงเลือกใช้สภาวะนี้ในการผลิตไลเปสที่จะนำไปทำบริสุทธิ์ต่อไป

4. ในขั้นตอนการทำไลเปสให้บริสุทธิ์โดยวิธีคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ พบว่ามีแอคติวิตีของไลเปส 2 ชนิด ได้แก่ ไลเปสที่เกาะและไม่เกาะกับตัวกลางนี้ ไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) จะถูกชะออกมาในลำดับส่วนที่ 17-21 เมื่อรวมส่วนที่มีแอคติวิตีเข้าด้วยกันและทำให้เข้มข้นแล้ว วัดปริมาตรรวมได้ 9.6 มิลลิลิตร มีแอคติวิตีทั้งหมดเท่ากับ 2.73 หน่วย มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 5.76 มิลลิกรัม แอคติวิตีจำเพาะ 0.47 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.56 เท่า และยังมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 53.22 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) จะถูกชะออกมาในลำดับส่วนที่ 69-70 ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.31-0.33 โมลาร์ เมื่อรวมส่วนที่มีแอคติวิตีเข้าด้วยกันและทำให้เข้มข้นแล้ว วัดปริมาตรรวมได้ 4.4 มิลลิลิตร มีแอคติวิตีทั้งหมดเท่ากับ 0.374 หน่วย มีปริมาณโปรตีนทั้งหมดเท่ากับ 1.01 มิลลิกรัม แอคติวิตีจำเพาะ 0.37 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.80 เท่า และยังมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 7.29 เปอร์เซ็นต์

5. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไลเปสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส พบว่าไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) ไม่สามารถติดสีคูแมสซี บลูได้ ส่วนไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) สามารถกำจัดโปรตีนอื่นออกไปได้บ้างเมื่อทียบกับสารละลายเอนไซม์ (crude) แถบโปรตีนที่แสดงแอคติวิตีของไลเปสไม่ใช่แถบโปรตีนหลัก ซึ่งให้แถบสีน้ำเงินเข้ม

6. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) โดยการทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล พบว่าไลเปสคือแถบโปรตีนที่ 4 และจากการวิเคราะห์กราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 22,000 ดาลตัน

7. จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลาง (unbound) และไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) คือ 60 และ 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

8. จากการศึกษาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลาง(unbound) และไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) คือ 8.0

9. ไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) จะมีแอคติวิตีสูงขึ้นเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงมากกว่าเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่ม เมื่อบ่มที่ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เอนไซม์จะมีแอคติวิตีสูงถึง 164-160 เปอร์เซ็นต์ ไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลาง (unbound) และไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) มีความเสถียรต่ออุณหภูมิได้สูงถึงประมาณ 70 องศาเซลเซียส

10. ไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างได้ประมาณ 7.0-7.5 เมื่อบ่มเป็นเวลา 30 นาที เมื่อความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 5.5 เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็วและสูญเสียแอคติวิตีอย่างสิ้นเชิงเมื่อความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5 ส่วนไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างได้ประมาณ 7.0-7.5 แต่ที่ความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 6.5 เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็วและสูญเสียแอคติวิตีอย่างสิ้นเชิงเมื่อความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0

11. ไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลาง (unbound) และไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) มีความเสถียรต่อสภาวะการเก็บที่ –20 องศาเซลเซียส ได้ดีที่สุด ยังคงมีแอคติวิตีประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บเป็นเวลา 14 วัน

12. จากการศึกษารูปร่างลักษณะและสมบัติของแบคทีเรีย K3 พบว่าเป็น *Bacillus sp.* ตามวิธีของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.(1994) และน่าจะเป็น *Bacillus stearothermophilus* ตามวิธีของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.(1986)

ตารางที่ 13 ได้สรุปสมบัติบางประการของไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากแบคทีเรีย K3

ตารางที่ 13 สรุปสมบัติบางประการของไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากเชื้อแบคทีเรีย K3

สมบัติของไลเปส	ผลการวิจัย	
	ไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound)	ไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound)
น้ำหนักโมเลกุล	22,000 ดาลตัน	-
อุณหภูมิที่เหมาะสม	60 องศาเซลเซียส	70 องศาเซลเซียส
ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	8.0	8.0
ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	70 องศาเซลเซียส 30 นาที	70 องศาเซลเซียส 30นาที
ความเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง	7.0-7.5 30 นาที	7.0-7.5 30 นาที
ความเสถียรต่อสภาวะการเก็บ	-20 องศาเซลเซียส	-20 องศาเซลเซียส

อภิปรายผลการวิจัย

ในการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดิน 8 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำ 1 ตัวอย่าง จากแหล่งต่างๆ ได้ทั้งสิ้น 20 ไอโซเลท (isolate) เชื้อที่สร้างไลเปสดูได้จากวงใสบนอาหารไตรบูไทริน เนื่องจากไลเปสจะย่อยไตรบูไทรินกลายเป็นกลีเซอรอลและกรดบูไทริค (Masanobu และคณะ,1995) เชื้อที่แยกได้เป็นแบคทีเรียชอบร้อน (thermophile) 11 ไอโซเลท เนื่องจากไม่สามารถเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส แต่สามารถเจริญที่ 65 องศาเซลเซียส และเป็นแบคทีเรียทนร้อน (thermotolerant) 9 ไอโซเลท เนื่องจากสามารถเจริญได้ทั้งที่ 37 องศาเซลเซียส และ 65 องศาเซลเซียส คัดเลือกแบคทีเรีย 4 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างวงใสบนอาหารไตรบูไทริน ได้มากกว่า 0.5 เซนติเมตร ซึ่งแสดงว่ามีแอคติวิตีสูง มาตรวจสอบแอคติวิตีของไลเปส ได้แก่ JA1, K2 K3 และK5 ทั้ง 4 ไอโซเลทเป็นแบคทีเรียชอบร้อน (thermophile) ซึ่ง JA1 คัดแยกจากดินบ่อน้ำพุร้อนจังหวัดตาก K2, K3 และ K5 คัดแยกจากดินโรงงานน้ำมันมะพร้าวจังหวัดราชบุรี แสดงว่าดินที่มีน้ำมันปนเปื้อนปริมาณมาก สามารถแยกเชื้อที่มีแอคติวิตีของไลเปสสูงได้ดี เหมาะที่จะใช้เป็นแหล่งในการคัดแยกเชื้อที่ผลิตไลเปสมากกว่าแหล่งอื่น

เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ทั้ง 4 ไอโซเลท มาตรวจสอบแอคติวิตีของไลเปส โดยไลเปสจะย่อยพารา-ไนโตรฟีนิล อะซีเตท (*p*-nitrophenyl acetate) แล้วให้พารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitrophenol) ซึ่งมีสีเหลืองและสามารถตรวจวัดที่ค่าการดูดกลืนแสง 460 นาโนเมตร พบว่าเชื้อแบคทีเรีย K3 มีแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสสูงสุด จึงคัดเลือกมาศึกษารูปร่างลักษณะสมบัติ สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสและทำไลเปสให้บริสุทธิ์บางส่วน

เมื่อศึกษาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสของแบคทีเรีย K3 ตามวิธีของ Perry (1989) ซึ่งเลี้ยงเชื้อในสภาวะ 65 องศาเซลเซียส, pH 7.0 และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เป็นจุดศูนย์กลาง (center point) แปรผันอุณหภูมิ ความเป็นกรดด่างและเวลาในการบ่ม เพิ่มขึ้นและลดลงจากจุดศูนย์กลาง แปรผันอุณหภูมิ ได้แก่ 70, 65 และ 60 องศาเซลเซียส แปรผันความเป็นกรดด่าง ได้แก่ 8.0, 7.0 และ 6.0 แปรผันเวลาในการบ่ม ได้แก่ 48, 24 และ 12 ชั่วโมง เมื่อคำนวณแอคติวิตีเฉลี่ยที่ได้ในแต่ละจุด พบว่าอุณหภูมิ ความเป็นกรดด่างและเวลาในการบ่มที่ให้แอคติวิตีของไลเปสสูงสุดคือ 65 องศาเซลเซียส, pH 7.0 และบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เนื่องจากจุดของเวลาในการบ่มค่อนข้างห่างกันมาก จึงนำมาทดลองซ้ำอีกครั้งโดยวัดแอคติวิตีในการบ่มให้ถี่ขึ้นเป็นทุกๆ 6 ชั่วโมง และเลี้ยงในสภาวะ 65 องศาเซลเซียส, pH 7.0 พร้อมทั้งวัดการเจริญและความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าแบคทีเรีย K3 สามารถผลิตไลเปส

ได้ดีที่สุดที่ 18 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงปลายการเจริญแบบทวีคูณ (exponential phase) เชื้อส่วนใหญ่จะสร้างไลเปสได้สูงสุดในช่วงนี้ (Suzuki และคณะ, 1988) และไลเปสเป็นผลิตภัณฑ์แบบปฐมภูมิ (primary metabolite) เนื่องจากสร้างไปพร้อมๆกับการเจริญของเชื้อ ส่วนค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มขึ้นในช่วง 0-18 ชั่วโมง จาก 6.89 เป็น 7.47 และค่าความเป็นกรดด่างจะค่อยๆ ลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 18 เหลือ 6.93 ที่ 48 ชั่วโมง ในช่วงการบ่มช่วงแรกเชื้อจะใช้สารอาหารพวกโปรตีนในการเจริญเติบโตพร้อมกับการสร้างไลเปสเพื่อย่อยน้ำมันให้กลายเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน ใช้เป็นแหล่งพลังงาน จึงเกิดแอมโมเนียในอาหารพร้อมกับกรดไขมันถูกเซลล์นำไปใช้ ทำให้สารละลายอาหารเป็นด่างมากขึ้น หลัง 18 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงปลายการเจริญแบบทวีคูณ ปริมาณเซลล์เกิดขึ้นมาก จึงมีการปล่อยเอนไซม์ไลเปสออกมามากในช่วงนี้ เมื่อมีกรดไขมันในอาหารมากขึ้นจึงทำให้ความเป็นกรดด่างลดลง อีกทั้งแหล่งพลังงานในอาหารเริ่มขาดแคลน จึงผลิตไลเปสออกมามากเพื่อย่อยน้ำมันให้กลายเป็นเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน ใช้เป็นแหล่งพลังงานต่อไป (Suzuki และคณะ, 1988)

เลี้ยงแบคทีเรีย K3 ในสภาวะที่ทำให้ผลิตไลเปสได้สูงสุดคือ 65 องศาเซลเซียส, pH 7.0 และบ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปปั่นแยกเซลล์และกรองน้ำมันออก ทำให้เข้มข้นด้วยวิธี concentrating centrifugation ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ด้วย concentrator tube ที่มีเมมเบรนการคัดขนาดโมเลกุล (molecular weight cut-off) 10,000 ดาลตัน จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนอิออนลบ พบว่ามีแอคติวิตีของไลเปส 2 ชนิด ได้แก่ ไลเปสที่เกาะและไม่เกาะกับตัวกลางนี้ ไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) จะถูกชะออกมาในลำดับส่วนที่ 17-21 ส่วนไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) จะถูกชะออกมาในลำดับส่วนที่ 69-70 ซึ่งมีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.31-0.33 โมลาร์ ไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) มีแอคติวิตี แอคติวิตีจำเพาะและความบริสุทธิ์มากกว่าส่วนไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) ทั้งๆที่ส่วนที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) น่าจะมีโปรตีนอื่นปนเปื้อนมากกว่า ซึ่งอาจเป็นเพราะไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) มีแอคติวิตีสูงกว่าไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) มาก การมีแอคติวิตีของไลเปส 2 ชนิดคล้ายกับงานวิจัย

ไบโอ-เจล เอ (unbound) น่าจะมีโปรตีนอื่นปนเปื้อนมากกว่า ซึ่งอาจเป็นเพราะไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) มีแอคติวิตีสูงกว่าไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) มาก การมีแอคติวิตีของไลเปส 2 ชนิดคล้ายกับงานวิจัยของ Emmanuelle และ Alasdair (1992) ที่ทำบริสุทธิ์ไลเปส 2 ชนิดจาก *Geotrichum candidum* ได้แก่ ไลเปส A และ ไลเปส B

นำไลเปสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส แบ่งเจลเป็น 2 ส่วน ส่วนที่1 นำไปย้อมสีโปรตีน (dye staining) โดยใช้สีคูแมสซี บลู ส่วนที่ 2 นำไปย้อมแอคติวิตี (activity staining) โดยใช้สารละลายย้อมแอคติวิตี จากการย้อมด้วยสีคูแมสซี บลู พบว่าไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) แถบโปรตีนอาจมีปริมาณโปรตีนต่ำกว่า 1 ไมโครกรัม (Frederick และคณะ, 1999) หรือเจลมีความหนาจนไม่สามารถติดสีคูแมสซี บลูได้ ส่วนไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) สามารถกำจัดโปรตีนอื่นออกไปได้บ้างเมื่อเทียบกับสารละลายเอนไซม์ (crude) เพื่อตรวจสอบว่าแถบโปรตีนใดเป็นไลเปส จึงได้นำเจลส่วนที่ย้อมแอคติวิตีมาเปรียบเทียบ โดยแถบสีจะแสดงแอคติวิตีของไลเปสที่ย่อยสลายแอลฟา-แนทิล อะซีเตท ได้เป็นแอลฟา-แนพทอลจับกับฟาสต์บลู บีบี ซอลท์ (fast blue BB salt) (Marianne และคณะ, 1991) ผลการทดลองพบว่าแถบสีเกิดเป็นบริเวณกว้าง อาจเนื่องมาจากมีปริมาณเอนไซม์มากเกินไปหรือบ่มปฏิกิริยานานเกินไป แถบโปรตีนที่แสดงแอคติวิตีของไลเปสไม่ใช่แถบโปรตีนหลัก ซึ่งให้แถบสีน้ำเงินเข้ม แสดงว่าไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) ยังคงมีโปรตีนหลายชนิดปนเปื้อนอยู่ เพื่อให้ได้ไลเปสที่มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น จึงควรนำไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) ไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านโครมาโทรกราฟีบน gel filtration ต่อไป

เนื่องจากไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) มีปริมาณโปรตีนน้อยมากจนไม่สามารถติดสีคูแมสซี บลูได้ อีกทั้งยังมีแอคติวิตี แอคติวิตีจำเพาะและความบริสุทธิ์น้อยกว่าไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) ดังนั้นไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) จึงเหมาะที่จะนำไปวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเปส

การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเปสโดยนำไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) มาทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล จากนั้นตัดเจลเป็น 2 ส่วน ส่วนที่1 นำไปย้อมสีโปรตีน (dye staining) โดยใช้สีคูแมสซี บลู ส่วนที่ 2 นำไปแช่ใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ Triton-X 100 ใน 0.1 โมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.0 เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเพื่อดึง SDS ออก ซึ่งดัดแปลงจากงานวิจัยของ Hummel และคณะ (1996) ได้รายงานว่าสามารถตรวจความบริสุทธิ์และหาน้ำหนักโมเลกุลได้พร้อมกัน โดยทำ SDS-PAGE และกำจัด SDS และให้โปรตีนพับโมเลกุลกลับสู่สภาพเดิม แล้วนำไปย้อมแอคติวิตี (activity staining) โดยใช้สารละลายย้อมแอคติวิตี แถบสีจะแสดงแอคติวิตีของไลเปสที่ย่อยสลายแอลฟา-แนพทิล อะซีเตท ได้เป็นแอลฟา-แนพทอลจับกับฟาสต์บลู บีบี ซอลท์ (fast blue BB salt) (Marianne และคณะ, 1991) นำเจลทั้งสองส่วนมาเทียบหาแถบโปรตีนที่แสดงแอคติวิตีของไลเปส แล้วหาน้ำหนักโมเลกุลโดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน จากการวิเคราะห์กราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 22,000 ดาลตัน ไลเปสจากแบคทีเรีย K3 มีขนาดค่อนข้างเล็กเท่ากับไลเปสจาก *Bacillus sp.*(Sugihara และคณะ, 1991) แต่ไม่สามารถระบุจำนวนหน่วยย่อยได้เนื่องจากขาดข้อมูลการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยผ่านคอลัมน์โครมาโทรกราฟีบน gel filtration จากการค้นคว้างานวิจัยพบว่าไลเปสส่วนใหญ่มีขนาด 30,000-34,000 ดาลตัน และมีเพียง1 หน่วยย่อย ได้แก่ ไลเปสจาก *Pseudomonas sp.* (Fumio และคณะ, 1991), ไลเปสจาก *Aspergillus terreus* (Raman และคณะ, 1998), ไลเปสจาก *Pseudomonas sp* KWI-56 (Taro และคณะ,1990), ไลเปสจาก *Bacillus thermoleovolans* ID-1 (Dong และคณะ, 1999), ไลเปสจาก *Fusarium heterosporum* (Yugi และคณะ, 1993) และไลเปสจาก *Bacillus sp.* strain 398 (Hyung และคณะ, 1994) เป็นต้น

การศึกษาสมบัติบางประการของไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน พบว่าไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลาง (unbound) และไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) มีสมบัติต่างกัน น่าจะเป็นเอนไซม์ต่างชนิดกัน จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) คือ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งเท่ากันกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสจาก *Bacillus sp.*(Sugihara และคณะ, 1991), ไลเปสจาก *Bacillus sp.*(Wang และคณะ, 1995) และไลเปสจาก *Pseudomonas sp* KWI-56

(Taro และคณะ,1990) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) คือ 70 องศาเซลเซียส ซึ่งเท่ากันกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสจาก *Bacillus sp.* THL027 (Saovanee และ Sudaporn, 1999)

การศึกษาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนพบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลาง(unbound) และไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) คือ 8.0 ซึ่งเท่ากับความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสจาก *Bacillus thermocatenulatus* (Claudia และคณะ, 1994) และไลเปสจาก *Pseudomonas sp* LP7315 (Takaharu และคณะ, 2001) การทดลองนี้มีข้อจำกัดคือไม่สามารถแปรค่าความเป็นกรดด่างให้มากกว่า 8.0 ได้เพราะพารา-ไนโตรฟีนิล อะซีเตท ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการวัดแอคติวิตีของไลเปสจะไม่เสถียรเมื่อความเป็นกรดด่างมากกว่า 8.0 (Marianne และคณะ, 1991)

การศึกษาความเสถียรของไลเปสต่ออุณหภูมิ พบว่าไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลาง (unbound) และไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) มีความเสถียรต่ออุณหภูมิได้สูงถึงประมาณ 70 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเป็นเวลา 30 นาที ยังคงมีแอคติวิตีมากกว่า 83 เปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกับไลเปสจาก *Pseudomonas sp* LP7315 (Takaharu และคณะ, 2001) และไลเปสจาก *Bacillus sp.* THL027 (Saovanee และ Sudaporn, 1999) ซึ่งมีความเสถียรต่ออุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เอนไซม์ทั้งสองชนิดมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงได้ดี โดยเฉพาะไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) จะมีแอคติวิตีสูงขึ้นเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงมากกว่าเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่ม เมื่อบ่มที่ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เอนไซม์จะมีแอคติวิตีสูงถึง 164-160 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยที่ผ่านมา น่าจะเกิดความคาดเคลื่อนของผลการทดลอง เนื่องจากไม่ได้บ่มเอนไซม์ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที หลังจากบ่มทดสอบความเสถียรที่อุณหภูมิต่างๆแล้ว เพื่อให้เอนไซม์มีอุณหภูมิเท่ากันก่อนวัดแอคติวิตีของไลเปส

การศึกษาความเสถียรของไลเปสต่อความเป็นกรดด่าง พบว่าทั้งไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลาง (unbound) และไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) ไม่ค่อยเสถียรต่อความเป็นกรดด่าง มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างในช่วง 7.0-7.5 เมื่อบ่มเป็นเวลา 30 นาที ใกล้เคียงกับไลเปสจาก *Bacillus sp.* THL027 (Saovanee และ Sudaporn, 1999)

อาจเพราะเป็นเอนไซม์จากแบคทีเรียที่คัดแยกจากแหล่งที่มีความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วงเป็นกลาง คือ 6.9-7.3 และเลี้ยงแบคทีเรีย K3 ในอาหารที่มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 มาตลอด ทำให้เอนไซม์ที่ผลิตออกมามีความเสถียรในช่วง 7.0-7.5 เท่านั้น จากผลการทดลองที่ได้อาจมีความคาดเคลื่อน เนื่องจากขั้นตอนการบ่มเอนไซม์ที่ความเป็นกรดด่างต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที ไม่ได้วัดความเป็นกรดด่างของสารละลายผสมระหว่างบัฟเฟอร์และเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน

การศึกษาความเสถียรของไลเปสต่อสภาวะการเก็บ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 100 ไมโครลิตร เท่ากันทุกสภาวะการเก็บในการวัดแอคติวิตีของไลเปสที่เหลืออยู่ พบว่าไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ (unbound) และไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) มีความเสถียรต่อสภาวะการเก็บที่ –20 องศาเซลเซียสและเติมกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ได้ดีที่สุด ยังคงมีแอคติวิตีมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บเป็นเวลา 14 วัน อาจเนื่องมาจากกลีเซอรอลป้องกันการแข็งตัวของเอนไซม์จึงเสียแอคติวิตีน้อย ส่วนการเก็บเอนไซม์ที่ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้องให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกันและไม่สามารถเก็บเอนไซม์มากกว่า 7 วัน ดังนั้นการเก็บเอนไซม์มากกว่า 7 วัน ควรเก็บที่ –20 องศาเซลเซียสและเติมกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ จากงานวิจัยของ Raman และคณะ (1998) พบว่าไลเปสจาก *Aspergillus terreus* มีความเสถียรต่อสภาวะการเก็บมาก เมื่อผ่านกระบวนการ freeze-dry แล้วสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นานกว่า 6 เดือน งานวิจัยของ Dharmsthiti และคณะ (1998) พบว่าไลเปสจาก *Acinetobacter calcoaceticus* LP009 การเก็บเอนไซม์ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ต้องเติมสารลดแรงตึงผิว (surfactant) เช่น 0.1 เปอร์เซ็นต์ Triton X-100, 0.1 เปอร์เซ็นต์ ทวีน 20 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ทวีน 40 ทำให้เอนไซม์ไม่เสียแอคติวิตี

การศึกษารูปร่างลักษณะสมบัติของแบคทีเรีย K3 พบว่าเป็น *Bacillus sp.* ตามวิธีของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.(1994) โดยมีลักษณะสมบัติดังนี้ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง ขนาดเซลล์เล็กกว่า 2.5 ไมครอน สร้างสปอร์บริเวณปลายเซลล์ สามารถเคลื่อนที่ได้ ต้องการออกซิเจนในการหายใจ สามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้ มีเอนไซม์คะตะเลส (catalase) สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ และไม่มีเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) ตามวิธีการทดลองของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.(1986) น่าจะเป็น *Bacillus stearothermophilus* โดยมีลักษณะสมบัติเพิ่มเติมดังนี้ มีกรดเกิดขึ้นจากการใช้น้ำตาลกลูโคสและไซโลส ไม่สามารถใช้น้ำตาลอะราบิโนสและแมนนิทอล ไม่เกิดก๊าซจากการหมักน้ำตาล สามารถ

ย่อยแป้งได้ ให้ผลลบกับอาหาร MR-VP ไม่สามารถเจริญในอาหาร pH 5.7 และอาหารที่มี NaCl ได้ ไม่สามารถใช้ซิเตรต (citrate) และไม่สามารถสร้างอินโดลได้ เจริญที่อุณหภูมิมากกว่า 40 องศาเซลเซียส และเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองจึงควรหาลำดับยีน 16 SrRNA ของแบคทีเรีย K3 เทียบกับ *Bacillus stearothermophilus* เพิ่มเติมต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ควรหาลำดับยีน 16 SrRNA ของเชื้อแบคทีเรีย K3 เทียบกับลำดับยีน 16 SrRNA ของ *Bacillus stearothermophilus* เพื่อยืนยันผลการทดลอง

2. ควรนำไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) ไปวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยผ่านคอลัมน์โครมาโทรกราฟีบน gel filtration และเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์โดยทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล จะทำให้ทราบจำนวนหน่วยย่อยของไลเปส

3. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไลเปสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส ขั้นตอนการบ่มในสารละลายย้อมแอคติวิตี ควรใช้ปริมาณเอนไซม์น้อยลงและเวลาบ่มให้สั้นลง เพื่อแก้ปัญหาแถบสีที่เกิดเป็นบริเวณกว้าง

4. การศึกษาความเสถียรของไลเปสต่ออุณหภูมิ ควรบ่มเอนไซม์ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 10 นาที หลังจากบ่มทดสอบความเสถียรที่อุณหภูมิต่างๆแล้ว เพื่อให้เอนไซม์มีอุณหภูมิเท่ากันก่อนวัดแอคติวิตีของไลเปส

5. การศึกษาความเสถียรของไลเปสต่อความเป็นกรดด่าง ควรวัดความเป็นกรดด่างของสารละลายผสมระหว่างบัฟเฟอร์และเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนว่าได้ความเป็นกรดด่างเท่ากับที่ต้องการทดสอบความเสถียรหรือไม่

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย