บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การคัดแยกแบคทีเรียทนร้อนที่ผลิตไลเปสจากตัวอย่างดินและน้ำ

จากการเก็บตัวอย่างดิน 8 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำ 1 ตัวอย่าง ตามวิธีการทดลองในข้อ 1 คัดแยกแบคทีเรียได้ทั้งสิ้น 20 ไอโซเลท (isolate) (ตารางที่ 7) แต่ละไอโซเลทมีลักษณะโคโลนี, ความสามารถในการเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส และขนาดของวงใสบนอาหารแข็งไตรบูไทรินแตกต่างกันไป (ตารางที่ 8) คัดเลือกแบคทีเรีย JA1, K2, K3 และ K5 ซึ่งมีวงใสกว้างมากกว่า 0.5 เซนติเมตร เพื่อทดสอบแอคติวิตีต่อไป

2. การตรวจแอคติวิตีของไลเปส

นำแบคทีเรีย JA1, K2, K3 และ K5 ซึ่งทั้ง 4 ไอโซเลทเป็นแบคทีเรียชอบร้อน (thermophile) มาเพาะเลี้ยงตามวิธีการทดลองในข้อ 4 และวัดแอคติวิตีตามวิธีการทดลองในข้อ 5 พบว่าที่ 48 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรีย K3 มีแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด (ตารางที่ 9) คือ 0.102 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ 0.084 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 แสดงการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งต่าง ๆ

รหัสตัวอย่าง	แหล่งของแบคทีเรีย	จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้	อุณหภูมิของแหล่งเก็บตัวอย่าง (องศาเซลเซียส)	pH ของแหล่งเก็บตัวอย่าง
B	ดินข้างร้านข้าวแกง จ.สมุทรสาคร	2	-	7.5
C	ดินบ่อน้ำเสีย จ.นครนายก	1	-	8.6
D	ดินบ่อน้ำพุร้อน จ.ตาก	3	-	7.3
H	ดินโรงงานปลากรอบ จ. สมุทรสาคร	2	-	8
Rh56	ดินบ่อน้ำพุร้อน จ.ระนอง	2	56	7.2
Rh60	ดินบ่อน้ำพุร้อน จ.ระนอง	3	60	7.4
JA	ดินบ่อน้ำพุร้อน จ.ตาก	3	-	7.3
JC	น้ำบ่อน้ำพุร้อน จ.ตาก	1	-	7.i
K	ดินโรงงานน้ำมันมะพร้าว จ. ราชบุรี	3	-	6.9
รวม		20		

หมายเหตุ - ไม่ได้วัด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 แสดงลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

รหัสเชื้อ	ลักษณะโคโลนี	ความสามารถในการเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส	ขนาดของวงใสที่การเจริญ 65 องศาเซลเซียส(เซนติเมตร)
B1	สีขาว,รูปร่างกลม,ขอบไม่เรียบ,นูนตรงกลาง,มีเมือกรอบโคโลนี	+	0.45
B2	สีขาว,รูปร่างกลม,ขอบเรียบ,นูนตรงกลาง	-	0.20
C5	สีขาว,รูปร่างรี,ขอบเรียบ,ไม่นูน	-	0.50
D1	สีขาว,รูปร่างกลม,ขอบเรียบสีขาวจาง,นูนตรงกลาง	-	0.20
D3	สีขาว,รูปร่างกลม,ขอบเรียบ,ตรงกลางสีเข้มไม่นูน	+	0.37
D4	สีขาว,รูปร่างไม่แน่นอน,ขอบไม่เรียบ,ไม่นูน	+	0.50
H1	สีขาว,รูปร่างกลม,ขอบไม่เรียบ,ไม่นูน	-	0.44
H3	สีขาว,รูปร่างกลม,ขอบเรียบ,ไม่นูน	-	0.39
Rh56-1	สีขาวขุ่น, รูปร่างกลม, ตรงกลางบุ๋ม	+	0.47
Rh56-2	สีครีม, รูปร่างกลม, ตรงกลางเรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ	+	0.40
Rh60-2	สีครีม, รูปร่างไม่แน่นอน, นูนตรงกลาง	+	0.42
Rh60-5	สีครีม, รูปร่างกลม,ขอบไม่เรียบ, นูนตรงกลาง	+	0.40
Rh60-6	สีครีม, รูปร่างกลม	+	0.48
JA1	สีครีม, รูปร่างกลม,ขอบไม่เรียบ,นูนตรงกลาง	-	1.14
JA2	สีขาว, รูปร่างกลม	-	0.30
JA3	สีครีม, รูปร่างกลม, นูนตรงกลาง	-	0.43
JC2	สีขาว, รูปร่างกลม	+	0.50
K2	สีขาว,รูปร่างกลม,ขอบไม่เรียบ,ไม่นูน	-	1.02
K3	สีเหลืองอ่อน,รูปร่างกลม,ขอบเรียบ,ไม่นูน	-	0.65
K5	สีขาว,รูปร่างกลม,ขอบไม่เรียบ,ไม่นูน,ขนาดใหญ่	-	1.00

หมายเหตุ + เจริญได้

\- ไม่สามารถเจริญได้

ตารางที่ 9 แสดงแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะของไลเปสจากแบคทีเรียที่คัดเลือกบ่มอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

รหัสเชื้อ	แอคติวิตี (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	แอคติวิตีจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน)
JA1	0.070	1.595	0.044
K2	0.066	1.253	0.052
K3	0.102	1.226	0.084
K5	0.100	1.321	0.076

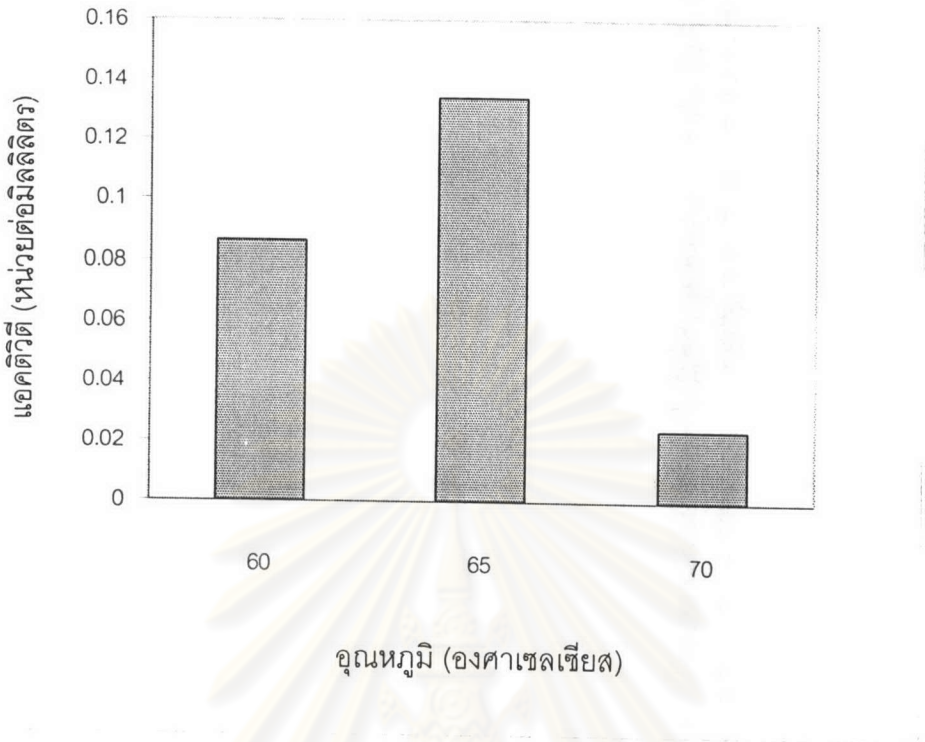
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. **การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปส** (Perry, 1989)

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย K3 และแปรสภาวะในการเลี้ยงตามวิธีการทดลองในข้อ 7.1 โดยแปรผันอุณหภูมิ ได้แก่ 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส แปรผันความเป็นกรดด่าง ได้แก่ pH 6.0, 7.0 และ 8.0 และแปรผันเวลาในการบ่ม ได้แก่ 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ได้ผลแอคติวิตีของไลเปสจากการเลี้ยงแบคทีเรีย K3 ในสภาวะต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 2, รูปที่ 3 และรูปที่ 4 พบว่าแบคทีเรีย K3 สามารถให้แอคติวิตีของไลเปสสูงที่สุด ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส , pH 7.0 จึงเลือกสภาวะนี้มาใช้ในการทดลองต่อไป ส่วนระยะเวลาในการบ่มได้ทำการทดลองอีกครั้งในการทดลองที่ 7.2 โดยวัดแอคติวิตีทุกๆ 6 ชั่วโมง

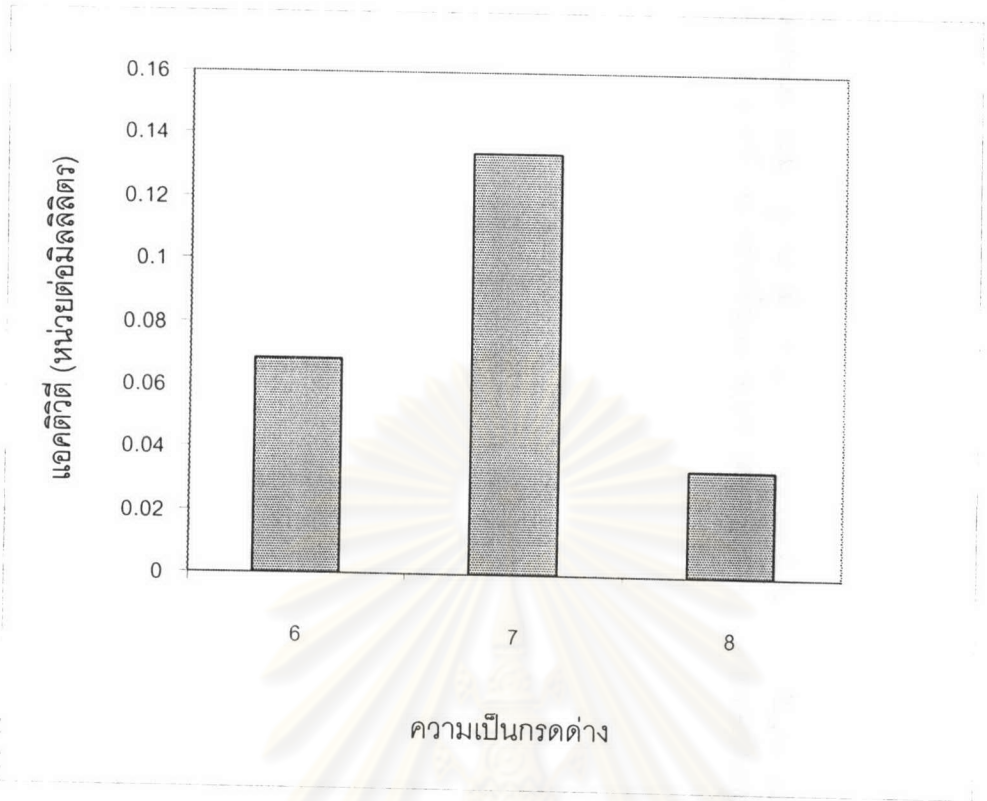
จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย K3 และเตรียมสารละลายเอนไซม์ไลเปส ตามวิธีการทดลองในข้อ 4 โดยเลี้ยงในสภาวะที่สามารถผลิตไลเปสได้ดีที่สุด คือ 65 องศาเซลเซียส, pH 7.0 แล้ววัดการเจริญโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร , วัดค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ และติดตามแอคติวิตีของไลเปสในอาหารเลี้ยงเชื้อทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรีย K3 สามารถผลิตไลเปสได้ดีที่สุดที่ 18 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงปลายการเจริญแบบทวีคูณ (exponential phase) (รูปที่ 5) ส่วนความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มขึ้นในช่วง 0-18 ชั่วโมง จาก 6.89 เป็น 7.47 และค่าความเป็นกรดด่างจะค่อยๆ ลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 18 เหลือ 6.93 ที่ 48 ชั่วโมง (รูปที่ 6)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



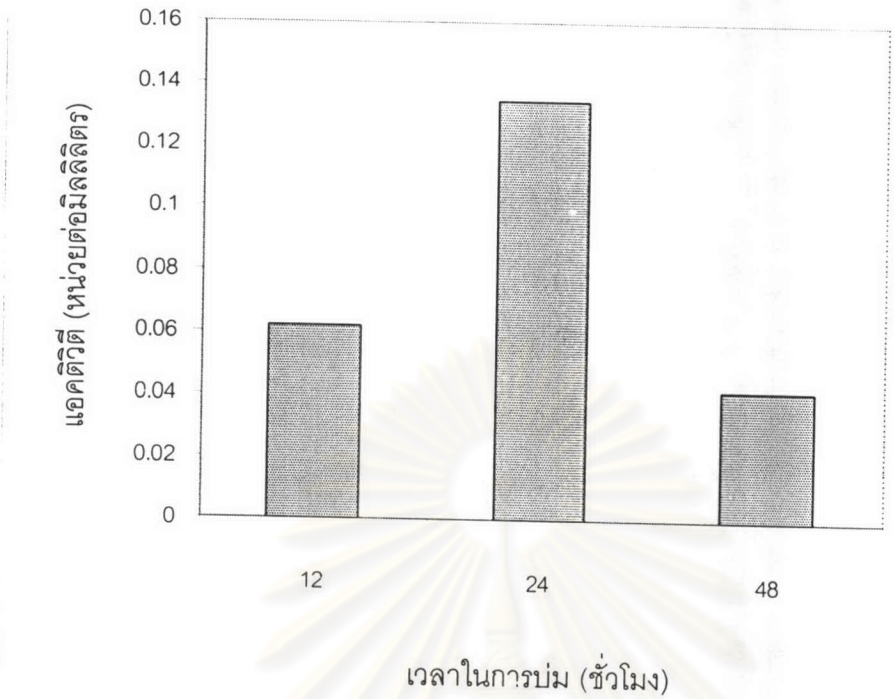
รูปที่ 2 กราฟแสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากแบคทีเรีย K3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



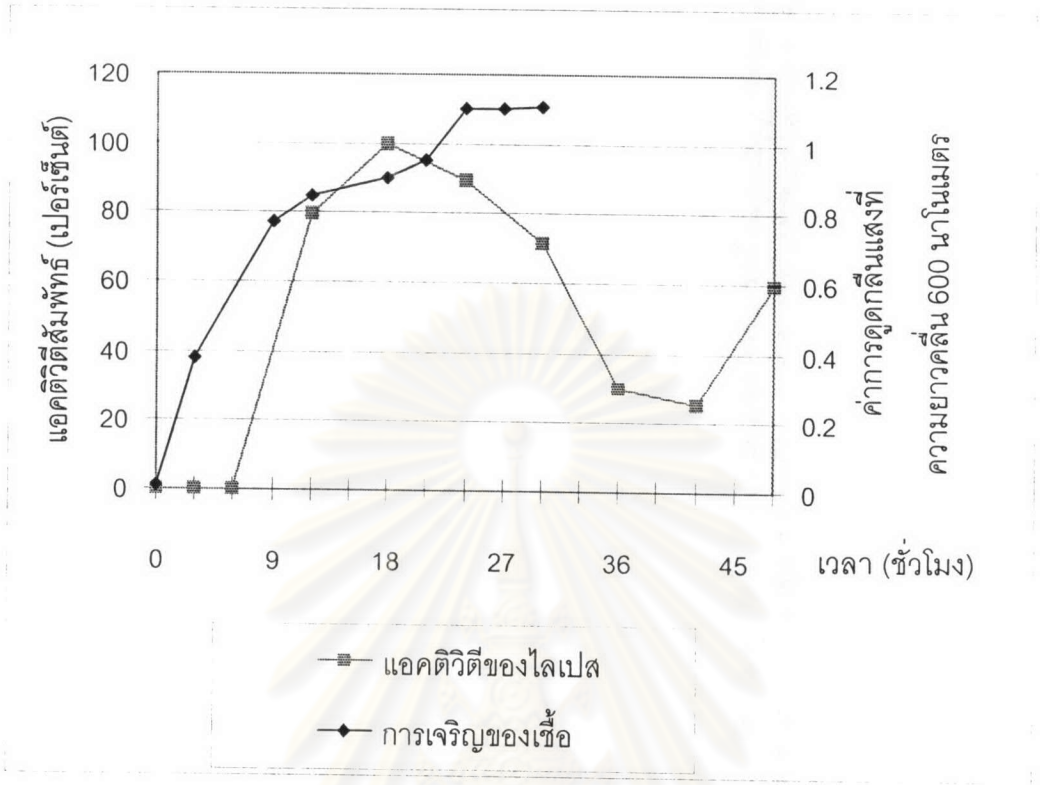
รูปที่ 3 กราฟแสดงความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากแบคทีเรีย K3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



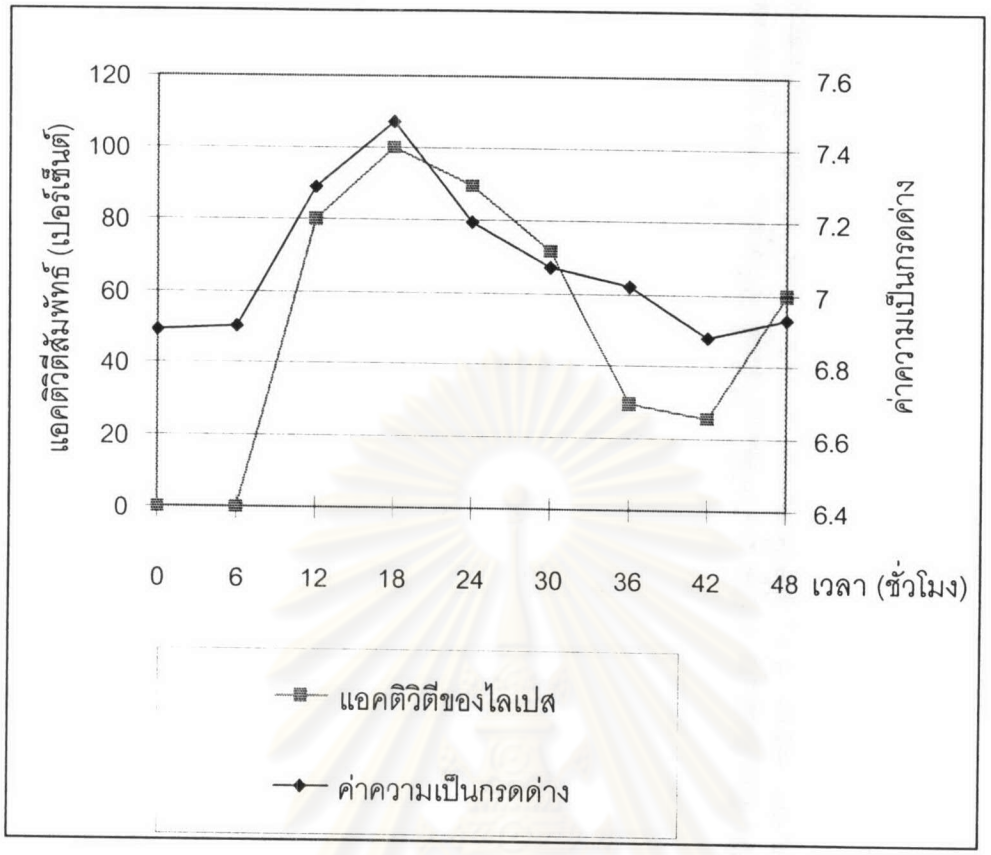
รูปที่ 4 กราฟแสดงเวลาในการบ่มที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากแบคทีเรีย K3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและแอคติวิตีของไลเปสจากแบคทีเรีย K3 บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส ทุก ๆ 6 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อและแอคติวิตีของไลเปสจากแบคทีเรีย K3 บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส ทุก ๆ 6 ชั่วโมง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

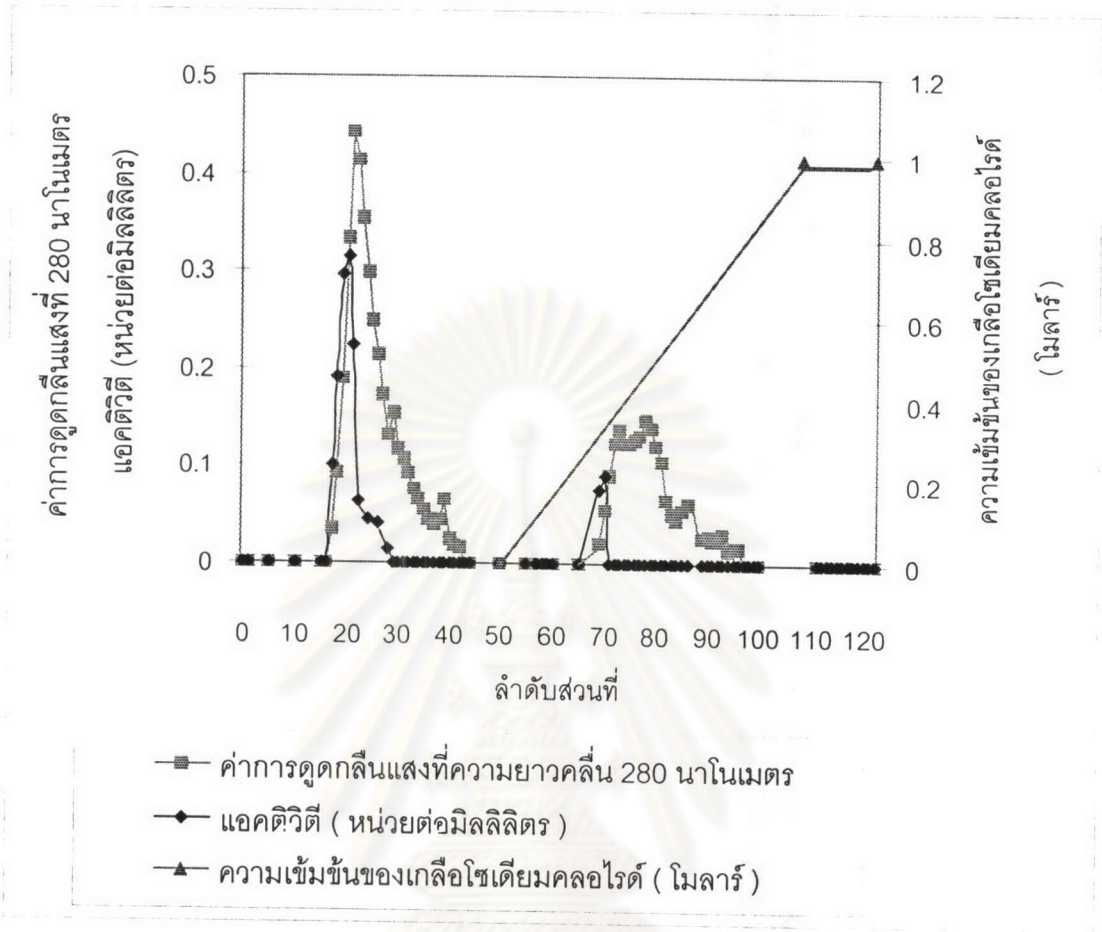
4. การทำไลเปสให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย K3 ตามวิธีการทดลองในข้อ 4 โดยเลี้ยงในสภาวะที่สามารถผลิตไลเปสได้ดีที่สุด คือ 65 องศาเซลเซียส, pH 7.0 และบ่มนาน 18 ชั่วโมง มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีบนดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ ผลการทดลองในรูปที่ 7 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

ขั้นตอนและผลการทำไลเปสจากเชื้อแบคทีเรีย K3 ให้บริสุทธิ์บางส่วนได้สรุปไว้ในตารางที่ 10

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 แสดงการทำไลเปสให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 ขั้นตอนการทำไลเปสให้บริสุทธิ์บางส่วน

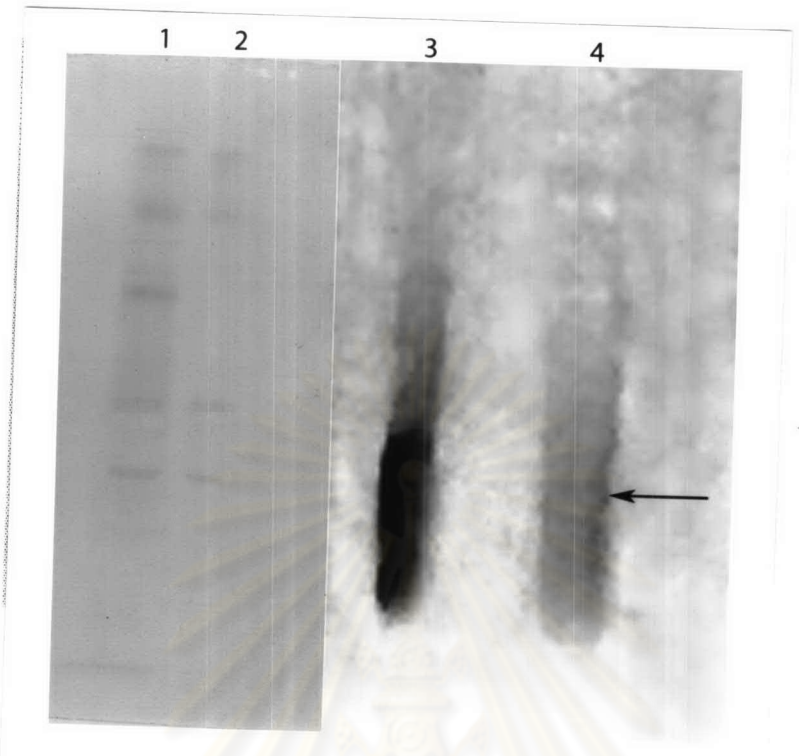
ลำดับขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	แอคติวิตีทั้งหมด (หน่วย)	โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	แอคติวิติจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	แอคติวิตี (เปอร์เซ็นต์)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
สารละลายเอนไซม์ (crude)	30.0	5.13	39.0	0.13	100	1
ไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางของคอลัมน์ดีอีเออีไบโอ-เจล เอ (unbound)	9.6	2.73	5.76	0.47	53.22	3.56
ไลเปสที่เกาะกับตัวกลางของคอลัมน์ดีอีเออีไบโอ-เจล เอ (bound)	4.4	0.374	1.01	0.37	7.29	2.80

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ มาตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส แบ่งเจลเป็น 2 ส่วน ส่วนที่1 นำไปย้อมสีโปรตีน (dye staining) โดยใช้สีคูแมสซี บลู ส่วนที่ 2 นำไปย้อมแอคติวิตี (activity staining) โดยใช้สารละลายย้อมแอคติวิตี ตามวิธีการทดลองในข้อ 9 ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 8 จากการย้อมด้วยสีคูแมสซี บลู พบว่าไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) แถบโปรตีนอาจมีปริมาณโปรตีนต่ำกว่า 1 ไมโครกรัม (Frederick และคณะ, 1999) หรือเจลมีความหนาจนไม่สามารถติดสีคูแมสซี บลูได้ ส่วนไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) สามารถกำจัดโปรตีนอื่นออกไปได้บ้างเมื่อทียบกับสารละลายเอนไซม์ (crude) เพื่อตรวจสอบว่าแถบโปรตีนใดเป็นไลเปส จึงได้นำเจลส่วนที่ย้อมแอคติวิตีมาเปรียบเทียบโดยแถบสีจะแสดงแอคติวิตีของไลเปสที่ย่อยสลายแอลฟา-แนพทิล อะซีเตท ได้เป็นแอลฟา-แนพทอลจับกับฟาสต์บลู บีบี ซอลท์ (fast blue BB salt) (Marianne และคณะ, 1991) ผลการทดลองนี้สามารถระบุได้ว่าแถบโปรตีนที่แสดงแอคติวิตีของไลเปสไม่ใช่แถบโปรตีนหลัก ซึ่งให้แถบสีน้ำเงินเข้ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 การทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิสของเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน

แถวที่ 1-2 ย้อมสีโปรตีนด้วยสีคูแมสซี บลู

แถวที่ 3-4 ย้อมแอคติวิตีของไลเปสด้วยแอลฟา-แนพทิล อะซีเตทและ ฟาสต์บลู บีบี ซอลท์

แถวที่ 1 และ 3 สารละลายเอนไซม์ (crude) ปริมาณโปรตีน 20.8 ไมโครกรัม

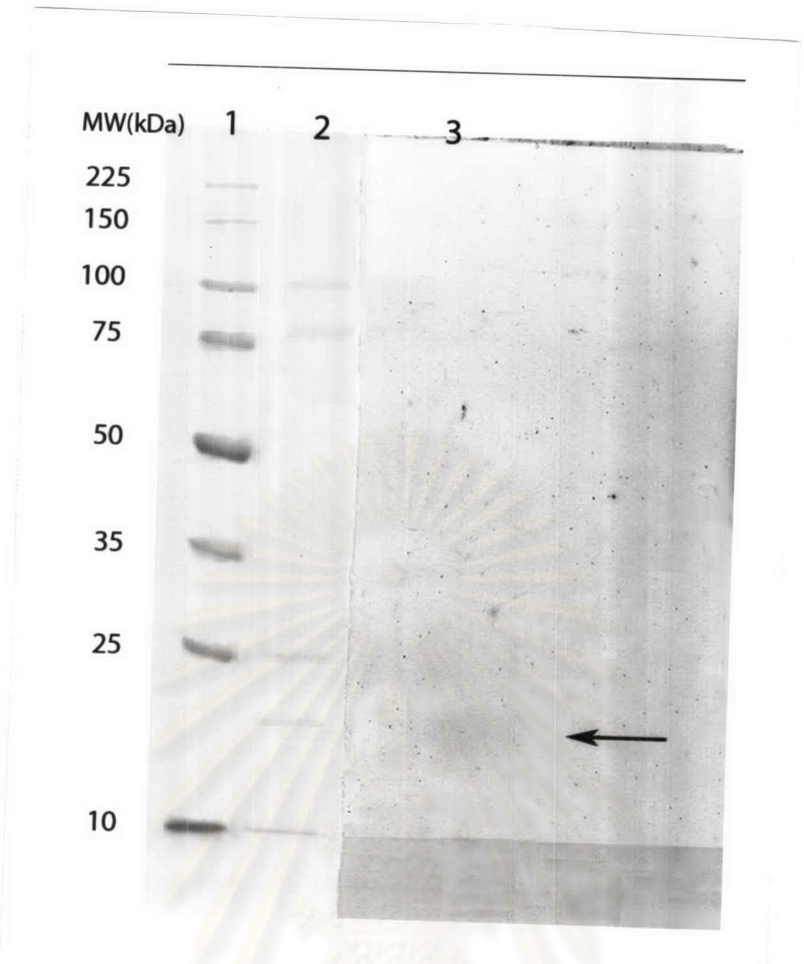
แถวที่ 2 และ 4 ไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) ปริมาณโปรตีน 9.6 ไมโครกรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. **การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล**

จากการนำไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี 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 (Hummel และคณะ, 1996) แล้วนำไปย้อมแอคติวิตี (activity staining) ทำโดยแช่เจลในสารละลายย้อมแอคติวิตี โดยแถบสีจะแสดงแอคติวิตีของไลเปสที่ย่อยสลายแอลฟา-แนพทิล อะซีเตทได้เป็นแอลฟา-แนพทอลจับกับ ฟาสต์บลู บีบี ซอลท์ (Marianne และคณะ, 1991) นำเจลทั้งสองส่วนมาเทียบหาแถบโปรตีนที่แสดงแอคติวิตีของไลเปส แล้วหาน้ำหนักโมเลกุลโดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 9 พบว่าไลเปสคือแถบโปรตีนที่ 4 และจากการวิเคราะห์กราฟมาตรฐานระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานกับระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล แสดงดังรูปที่ 10 พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 22,000 ดาลตัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



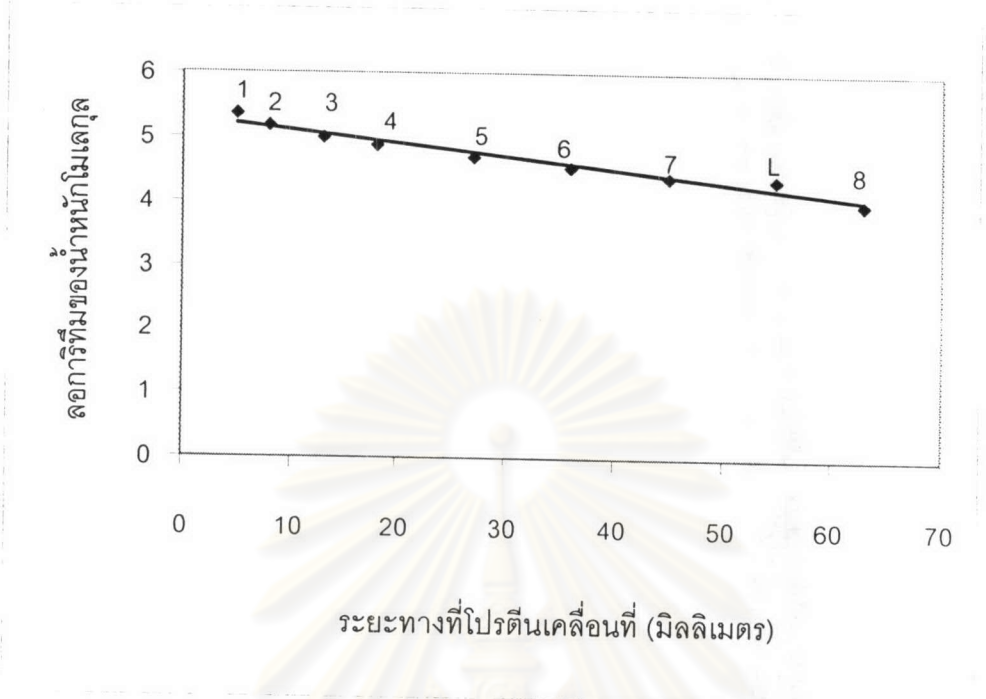
รูปที่ 9 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการทำอีเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจล

แถวที่ 1-2 ย้อมสีโปรตีนด้วยสีคูแมสซี บลู

แถวที่ 3 ย้อมแอคติวิตีของไลเปสด้วยแอลฟา-แนพทิล อะซีเตทและ ฟาสต์บลู บีบี ซอลท์

แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐาน

แถวที่ 2 และ 3 ไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) ปริมาณโปรตีน 9.6 ไมโครกรัม



รูปที่ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลกับระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่บนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส

หมายเลข 1 มีน้ำหนักโมเลกุล 225 กิโลดาลตัน

หมายเลข 2 มีน้ำหนักโมเลกุล 150 กิโลดาลตัน

หมายเลข 3 มีน้ำหนักโมเลกุล 100 กิโลดาลตัน

หมายเลข 4 มีน้ำหนักโมเลกุล 75 กิโลดาลตัน

หมายเลข 5 มีน้ำหนักโมเลกุล 50 กิโลดาลตัน

หมายเลข 6 มีน้ำหนักโมเลกุล 35 กิโลดาลตัน

หมายเลข 7 มีน้ำหนักโมเลกุล 25 กิโลดาลตัน

หมายเลข 8 มีน้ำหนักโมเลกุล 10 กิโลดาลตัน

L คือ ไลเปส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. การศึกษาสมบัติบางประการของไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน

นำเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนแล้วดังกล่าวข้างต้นมาศึกษาสมบัติต่างๆ ดังนี้

7.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปส

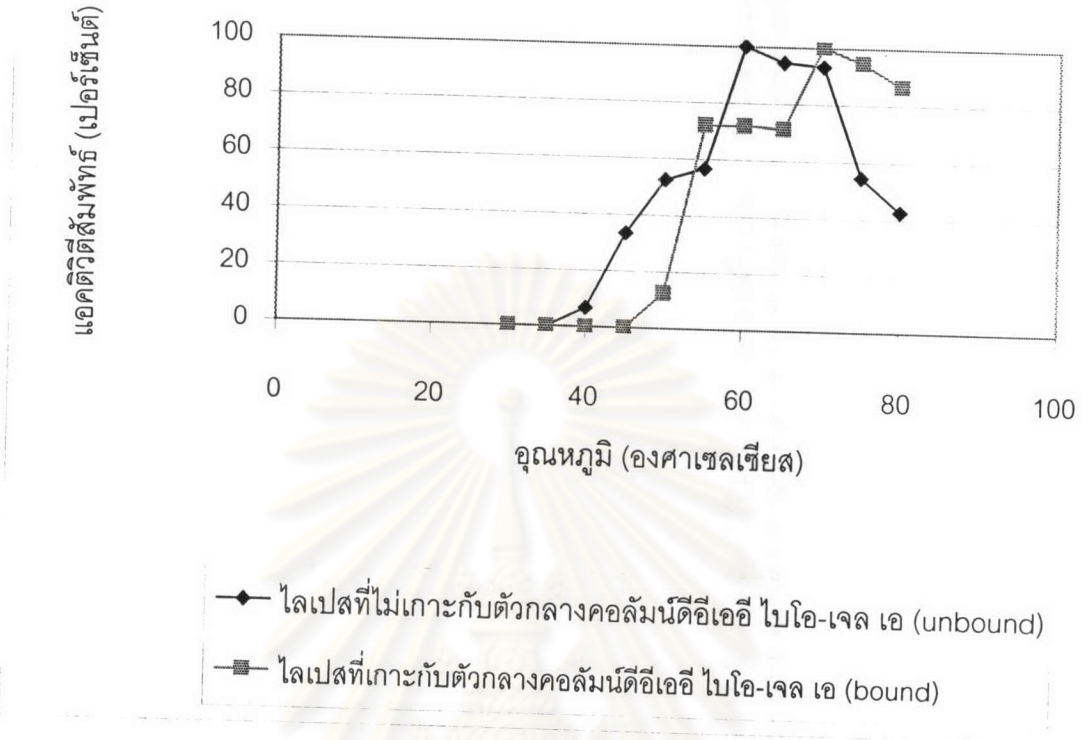
จากการนำไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนในปริมาณเท่าๆกันมาวิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีการทดลองในข้อ 5 โดยแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาตั้งแต่ 30-80 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) คือ 60 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) คือ 70 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมินี้เอนไซม์ให้แอคติวิตีสูงสุด ดังรูปที่ 11

7.2 ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปส

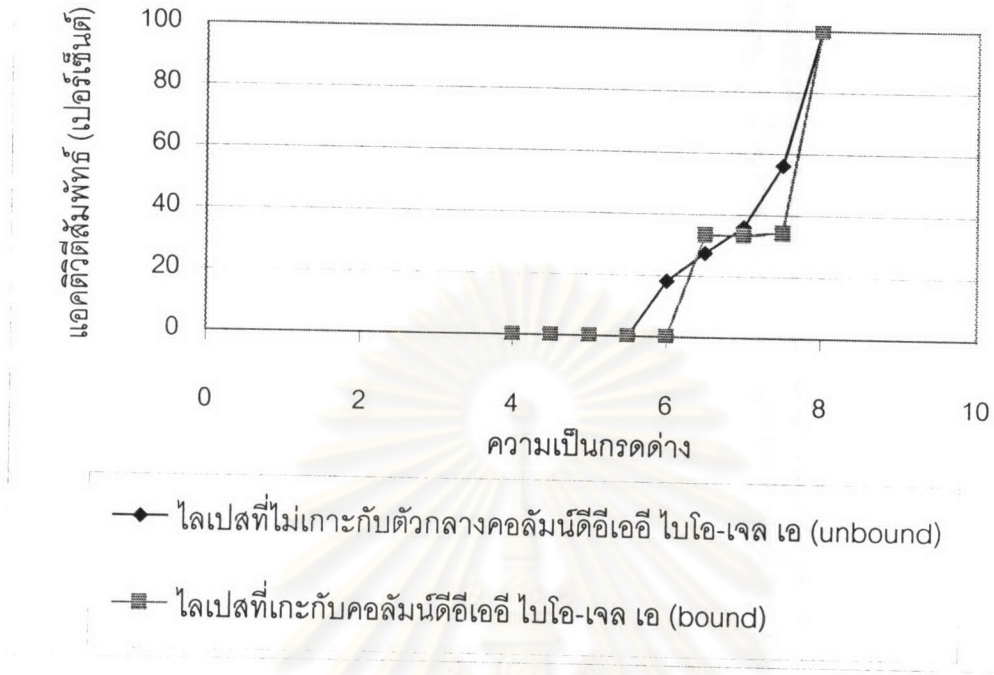
จากการนำไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนในปริมาณเท่าๆ กันมาวิเคราะห์แอคติวิตีตามวิธีการทดลองในข้อ 5 โดยแปรความเป็นกรดด่างที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาในช่วง 4.0-8.0 พบว่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) และความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) ให้ผลการทดลองเหมือนกันคือ 8.0 โดยที่ความเป็นกรดด่างนี้เอนไซม์ให้แอคติวิตีสูงสุด ดังรูปที่ 12

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 กราฟแสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 12 กราฟแสดงความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของไลเปส

โดยบ่มในบัฟเฟอร์ต่างๆ ดังนี้

50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ ในช่วง pH 4.0-5.5

50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ในช่วง pH 6.0-7.0

50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ ในช่วง pH 7.5-8.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7.3 ความเสถียรของไลเปสต่ออุณหภูมิ

นำไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมาบ่มที่อุณหภูมิในช่วง 30-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีแล้ววิเคราะห์แอคติวิตีที่เหลือตามวิธีการทดลองในข้อ 5 โดยเทียบแอคติวิตีของไลเปสที่ไม่ผ่านการบ่มเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 13 พบว่าไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลาง

คอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) จะมีแอคติวิตีสูงขึ้นเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงมากกว่าเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่ม เมื่อบ่มที่ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เอนไซม์จะมีแอคติวิตีสูงถึง 164-160 เปอร์เซ็นต์ และมีความเสถียรต่ออุณหภูมิได้สูงถึงประมาณ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังมีแอคติวิตีได้สูงถึง 85 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ 75 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็วแต่ยังคงมีแอคติวิตีสูงถึง 79 เปอร์เซ็นต์

ส่วนไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) มีความเสถียรต่ออุณหภูมิได้สูงถึงประมาณ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เอนไซม์ยังมีแอคติวิตีสูงถึงประมาณ 84 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ 75 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็ว

7.4 ความเสถียรของไลเปสต่อความเป็นกรดด่าง

เมื่อนำไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมาบ่มในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่มีความเป็นกรดด่างในช่วง 4.0-8.0 เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้ววิเคราะห์แอคติวิตีที่เหลือตามวิธีการทดลองในข้อ 5 โดยเทียบแอคติวิตีของไลเปสที่ไม่ผ่านการบ่มเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 14 พบว่าไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างได้ประมาณ 7.0-7.5 เป็นเวลา 30 นาที เอนไซม์ยังมีแอคติวิตีสูงถึงประมาณ 88 เปอร์เซ็นต์ เมื่อความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 5.5 เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็วและสูญเสียแอคติวิตีอย่างสิ้นเชิงเมื่อความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.5

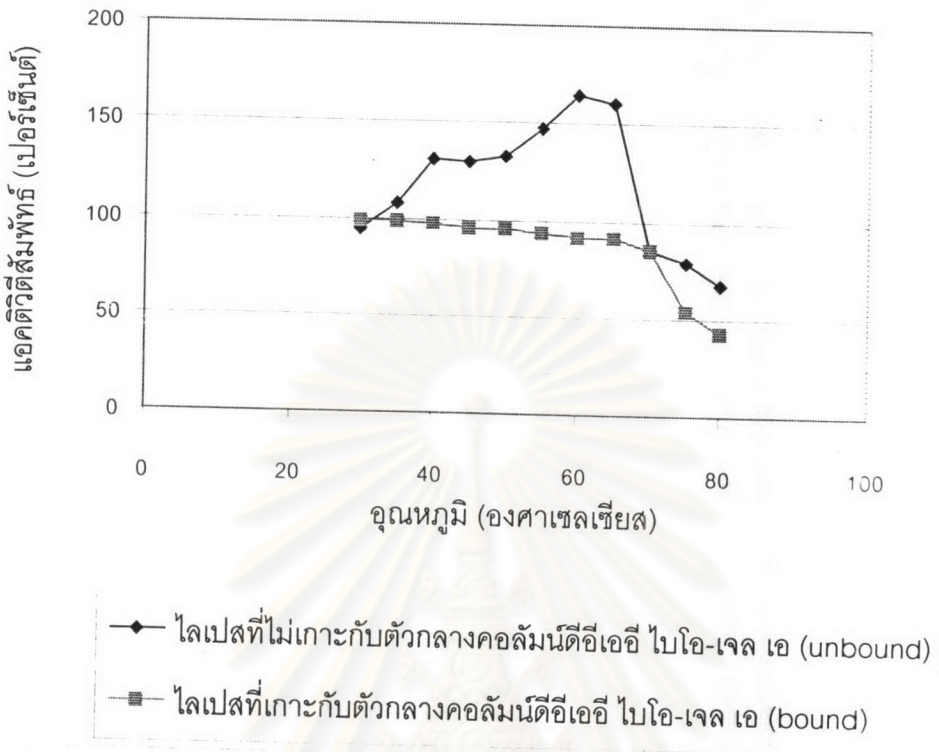
ส่วนไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) มีความเสถียรต่อความเป็นกรดด่างได้ประมาณ 7.0-7.5 เป็นเวลา 30 นาที เอนไซม์ยังมีแอคติวิตีสูงถึงประมาณ 86 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 6.5 เอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างรวดเร็วและสูญเสียแอคติวิตีอย่างสิ้นเชิงเมื่อความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0

7.5 ความเสถียรของไลเปสต่อสภาวะการเก็บ

นำไลเปสที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนเก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียสและเติมกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์, 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 วัน, 7 วันและ 14 วัน แล้ววิเคราะห์แอคติวิตีที่เหลือตามวิธีการทดลองในข้อ 5 โดยเทียบแอคติวิตีของไลเปสที่ไม่ผ่านการเก็บเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 15 พบว่าไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) มีความเสถียรต่อสภาวะการเก็บที่ –20 องศาเซลเซียส, 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 วัน และ 7 วัน แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาการเก็บเป็น 14 วัน เอนไซม์มีความเสถียรต่อสภาวะการเก็บที่ –20 องศาเซลเซียส เท่านั้น โดยยังเหลือแอคติวิตีประมาณ 94 เปอร์เซ็นต์

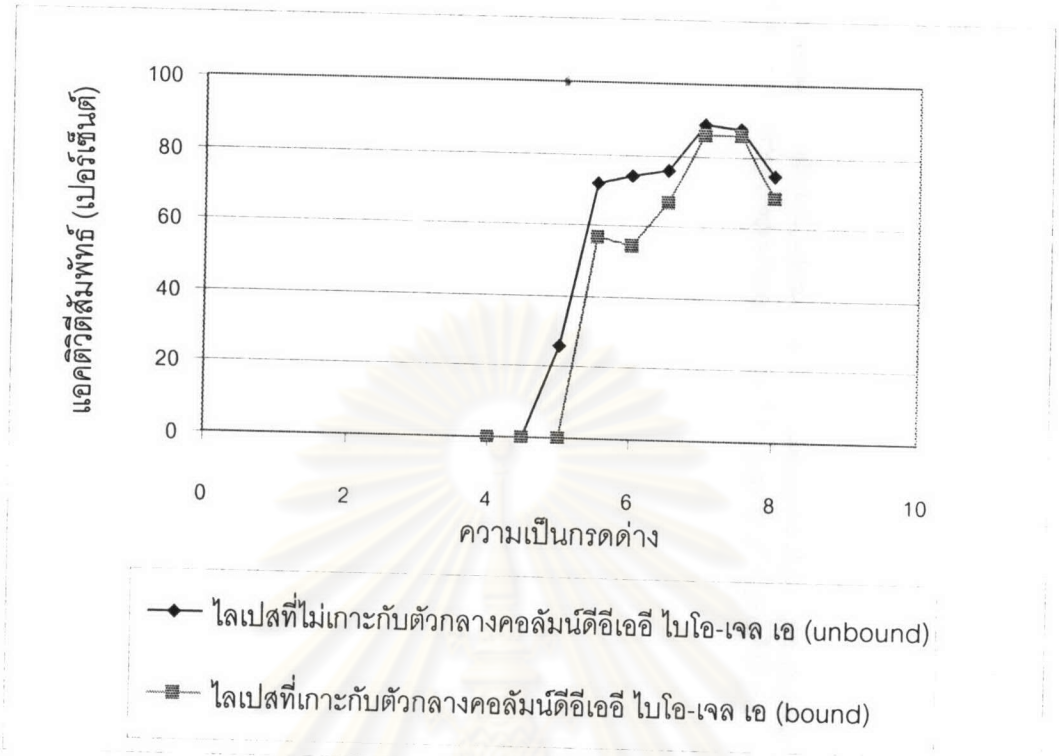
ส่วนไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) พบว่ามีความเสถียรต่อการเก็บที่ –20 องศาเซลเซียส เท่านั้น โดยยังเหลือแอคติวิตีประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บเป็นเวลา 14 วัน ส่วนการเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเก็บเป็นเวลา 1 วันและ 7 วัน และเอนไซม์จะสูญเสียแอคติวิตีอย่างสิ้นเชิงเมื่อเก็บเป็นเวลา 14 วัน ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 16

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 กราฟแสดงความเสถียรของไลเปสต่ออุณหภูมิ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



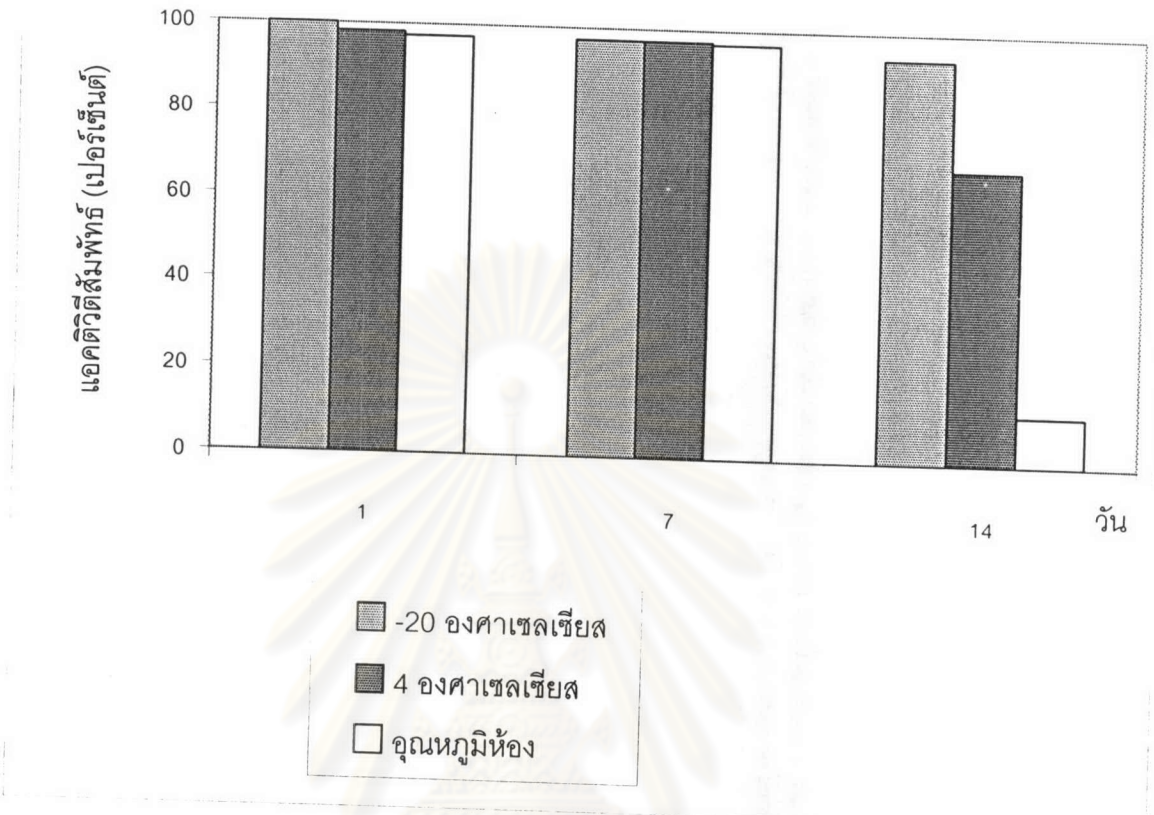
รูปที่ 14 กราฟแสดงความเสถียรของไลเปสต่อความเป็นกรดด่าง

โดยบ่มในบัฟเฟอร์ต่างๆ ดังนี้

50 มิลลิโมลาร์ อะซิเตท บัฟเฟอร์ ในช่วง pH 4.0-5.5

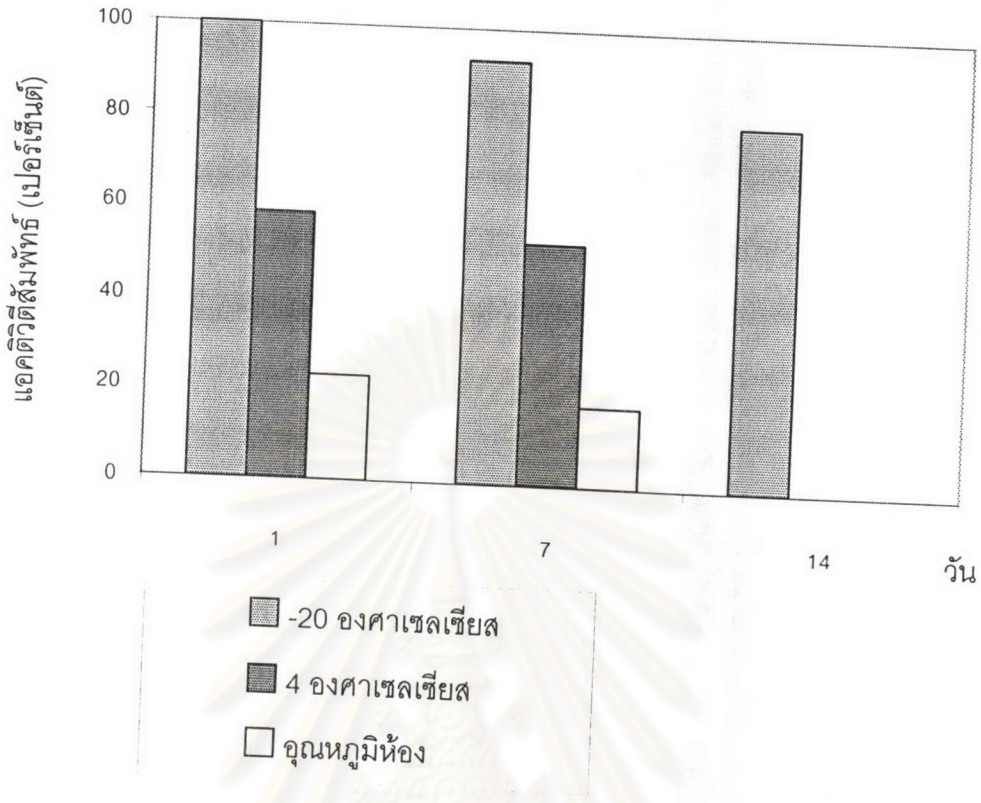
50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ในช่วง pH 6.0-7.0

50 มิลลิโมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ ในช่วง pH 7.5-8.0



รูปที่ 15 กราฟแสดงความเสถียรของไลเปสที่ไม่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (unbound) ต่อสภาวะการเก็บ โดยใช้เอนไซม์ 100 ไมโครลิตร เท่ากันทุกสภาวะการเก็บในการวัดแอคติวิตี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 16 กราฟแสดงความเสถียรของไลเปสที่เกาะกับตัวกลางคอลัมน์ดีอีเออี ไบโอ-เจล เอ (bound) ต่อสภาวะการเก็บ โดยใช้เอนไซม์ 100 ไมโครลิตร เท่ากันทุกสภาวะการเก็บในการวัดแอคติวิตี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. **การศึกษารูปร่างลักษณะและสมบัติของแบคทีเรียที่คัดเลือก**

คัดเลือกแบคทีเรีย K3 ที่มีแอคติวิตีและแอคติวิตีจำเพาะสูงสุด มาตรวจสอบรูปร่าง การติดสีแกรม การติดสีสปอร์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์และลักษณะการเจริญ (รูปที่ 17) ศึกษาลักษณะสมบัติและจำแนกตามวิธีของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.(1994) พบว่าเป็น *Bacillus* sp. ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 11 และน่าจะเป็น *Bacillus stearothermophilus* ตามวิธีของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.(1986) ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 12

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 แสดงรูปร่างลักษณะและสมบัติของแบคทีเรียที่คัดเลือก

จาก Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. (1994) สามารถจำแนกแบคทีเรีย K3 อยู่ใน Genus *Bacillus* โดยอาศัยลักษณะสมบัติดังตาราง

ลักษณะสมบัติ	K3	*Bacillus* sp.
ลักษณะโคโลนี	สีเหลืองอ่อน,รูปร่างกลม, ขอบเรียบ,ไม่นูน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร	D
รูปร่างเซลล์	แท่ง	แท่ง
การติดสีแกรม	แกรมบวก	แกรมบวก
ขนาด > 2.5 ไมครอน	-	-
เอนโดสปอร์	+	+
Ellipsoidal	-	D
Central or paracentral	-	D
Subterminal or terminal	+	D
การเคลื่อนที่	+	+
Strict aerobes	+	D
Facultative anaerobes	-	D
Strict anaerobes	-	-
คะตะเลส	+	+
ออกซิเดส	-	D
การทดสอบไนเตรต	+	D
การผลิตกรดจากกลูโคส	+	+

หมายเหตุ + ให้ผลบวก

- ให้ผลลบ

D ให้ผลแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์

ตารางที่ 12 แสดงลักษณะสมบัติของแบคทีเรียที่คัดเลือก

จาก Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.(1986) แบคทีเรีย K3 น่าจะเป็น *Bacillus stearothermophilus* โดยอาศัยลักษณะสมบัติดังตาราง

ลักษณะสมบัติ	K3	*B. stearothermophilus*
ขนาด >1.0 ไมครอน	-	-
เอนโดสปอร์	+	+
Central or paracentral	-	-
Subterminal or terminal	+	+
Swelling the sporangium	+	+
การเคลื่อนที่	+	+
คะตะเลส	+	d
การเจริญในสภาวะไร้อากาศ	-	-
MR	-	-
VP	-	-
อุณหภูมิการเจริญ (องศาเซลเซียส)		
30	-	-
37	-	-
40	-	+
50	+	+
55	+	+
65	+	+
การเจริญในอาหารที่มี		
pH 5.7	-	-
3% NaCl	-	d
5% NaCl	-	d
การเกิดก๊าซจากการหมักน้ำตาล	-	-
การย่อยแป้ง	+	+

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 (ต่อ)

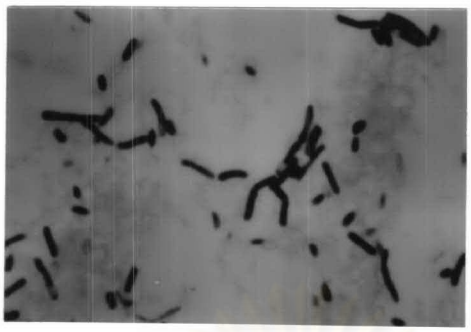
ลักษณะสมบัติ	K3	*B. stearothermophilus*
กรดที่เกิดจากการย่อย		
กลูโคส	+	+
อะราบิโนส	-	d
ไซโลส	-	d
แมนนิทอล	+	d
การใช้ซิเตรต	-	d
การทดสอบไนเตรต	+	d
การผลิตอินโดล	-	-

หมายเหตุ + ให้ผลบวก

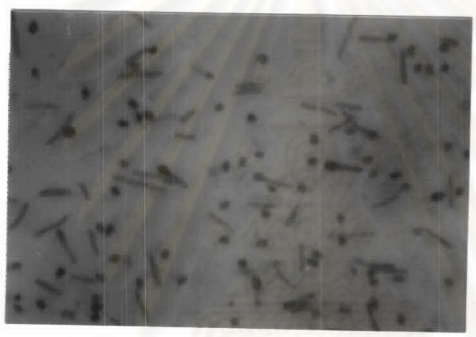
- ให้ผลลบ

d 11-89 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อชนิดนี้ให้ผลบวก

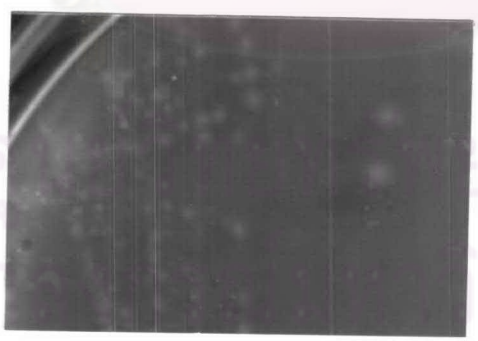
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก. กำลังขยาย 1,000 เท่า



ข. กำลังขยาย 1,000 เท่า



ค.

รูปที่ 17 แสดงลักษณะรูปร่าง การติดสีแกรม (ก), การติดสีสปอร์ (ข) และลักษณะโคโลนี (ค) ของแบคทีเรีย K3