# การคัดเลือกและจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรม

**ประดินันท์ รัศมีพงศ์[1*]**

**บทคัดย่อ**

การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันสามารถคัดเลือกเชื้อได้ทั้งสิ้น 22 ไอโซเลตจากการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมน้ำมันมะกอกหรือน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน และเมื่อทำการคัดกรองเชื้อแบคทีเรียทั้ง 22 ไอโซเลตในอาหารเลี้ยงเชื้อ tributyrin พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียเพียง 7 ไอโซเลตที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ไลเปสชนิดหลั่งออกนอกเซลล์ โดยพบการสร้างวงใสรอบโคโลนี โดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต E2I1 มีการสร้างวงใสรอบโคโลนีได้ขนาดใหญ่ที่สุด ตามด้วยไอโซเลต B1I1, E2I2, K2I2, E2I3, E2I4 และ E2I5 ตามลำดับ จากการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสชนิดหลั่งออกนอกเซลล์โดยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16S rDNA รวมทั้งการเปรียบเทียบลำดับวิวัฒนาการพบว่า ไอโซเลต B1I1 และ K2I2 มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas fluorescens* และ *Pseudomonas* sp. ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต E2I1, E2I2, E2I3, E2I4 และ E2I5 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Burkholderia cenocepacia*, *Acinetobacter junii*, *Rhizobium miluonense*, *Pseudoxanthomonas* sp. และ *Staphylococcus* sp. ตามลำดับ

**คำสำคัญ** : เอนไซม์ไลเปสชนิดหลั่งออกนอกเซลล์, น้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรม, การคัดเลือก

*[1]สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา จ. พระนครศรีอยุธยา ประเทศไทย 13000*

** ผู้นิพนธ์หลัก e-mail: pradinunt_eiamsaard@yahoo.com*

# SCREENING AND ISOLATION OF EXTRACELLULAR LIPASE PRODUCING BACTERIA FROM INDUSTRIAL WASTEWATER

**Pradinunt Rassamee-pong**[1*]

**Abstract**

A total 22 bacterial isolates were screened for lipase production from the oil contaminated industrial wastewater using the enrichment medium supplemented with either olive or palm oil as a sole carbon source. The seven of twenty-two isolates were exhibited the clear zone after cultured on the tributyrin agar medium, indicating the relatively extracellular lipase production. The result confirmed, especially the isolate E2I1 proposed the greatest clear zone, followed by the isolate B1I1, E2I2, K2I2, E2I3, E2I4 and E2I5. Furthermore, the extracellular lipase producing bacteria were then identified according to the 16S rDNA determination and phylogenetic analysis. The molecular identification demonstrated the isolate B1I1 and K2I2 were shared the highest homology in order to *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas* sp. Moreover, the isolate E2I1, E2I2, E2I3, E2I4 and E2I5 were closely related to *Burkholderia cenocepacia*, *Acinetobacter junii*, *Rhizobium miluonense*, *Pseudoxanthomonas* sp. and *Staphylococcus* sp., respectively.

**Keywords :** Extracellular lipase, Industrial wastewater, Screening

[1]*Environmental Science, Faculty of Science and Technology, Phranakorn si Ayutthaya Rajabhat University, Phranakorn si Ayutthaya, Thailand 13000*

**Corresponding author,e-mail: pradinunt_eiamsaard@yahoo.com*

**บทนำ**

เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ชนิดกลีเซอรอลเอสเทอร์ไฮโดรเลส (glycerol ester hydrolase) หรือไตรเอซิลกลีเซอรอล ไฮโดรเลส (triacylglycerol hydrolase) (E.C. 3.1.1.3) จัดเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มไฮโดรเลสมีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมัน (Sharma *et al*., 2001) โดยทั่วไปเอนไซม์ไลเปสสามารถสังเคราะห์ได้โดยสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ ซึ่งในปัจจุบันการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากโดยเฉพาะการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีความคงตัวและจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้น ทั้งยังสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมากเนื่องจากจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ควบคุมการผลิตได้ง่ายและคุณภาพสม่ำเสมอ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตต่อหน่วยได้โดยวิธีการปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์ (Treichel *et al*., 2010) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตเอนไซม์ไลเปสชนิดหลั่งออกนอกเซลล์ (extracellular lipase) ได้รับความสนใจทางอุตสาหกรรมหลายด้าน เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมผงซักฟอก และการแพทย์ ทั้งยังมีการนำไปใช้ประโยชน์ในการสังเคราะห์สารอินทรีย์และการย่อยสลายไขมันหรือน้ำมัน (Saxena *et al*., 2003; Houde *et al*., 2004) ในปัจจุบันมีการนำเอนไซม์ไลเปสไปใช้ในการผลิตน้ำมันไบโอดีเซลทดแทนการใช้ปฏิกิริยาทางเคมี เนื่องจากการใช้เอนไซม์ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์น้ำมันไบโอดีเซลนั้นมีข้อดีในด้านการเกิดปฏิกิริยาไม่รุนแรง (mild condition) และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Tan *et al*., 2010)

จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสสามารถพบได้ในหลายพื้นที่ เช่น น้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมประเภทโรงงานผลิตน้ำมันพืช อุตสาหกรรมเกี่ยวกับนมและผลิตภัณฑ์จากนม รวมทั้งดินบริเวณที่พบการปนเปื้อนน้ำมัน (Veerapagu *et al*., 2013; Lee *et al*., 2014) เนื่องจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมเป็นแหล่งที่มีการปนเปื้อนของสารอินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมที่เกี่ยวกับน้ำมันหรือไขมัน ส่งผลให้ของเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตเป็นแหล่งที่น่าสนใจในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ (Ertugrul *et al*., 2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยที่ศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อให้เกิดการผลิตเอนไซม์ไลเปส พบว่าองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อและการควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงทางกายภาพมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรีย Gupta *et al*., 2007; Sirisha *et al*., 2010)

ในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสนั้นส่วนใหญ่มีการเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของกรดไขมันและน้ำมันบางชนิดซึ่งจะช่วยกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ไลเปสในแบคทีเรีย โดยเฉพาะการใช้น้ำมันมะกอกเป็นสารตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นได้รับความสนใจอย่างมาก เช่น การศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* (Borkar *et al*., 2009), *Geobacillus* และ *Aneurinibacillus* sp. (Stathopoulou *et al*., 2013) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้น้ำมันปาล์มเพื่อทดแทนการใช้น้ำมันมะกอกในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส ตัวอย่างเช่น การแยกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Staphylococcus warneri* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการใช้น้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน (Winayanuwattikun *et al*., 2011) ทั้งนี้ในปัจจุบันพบว่าโรงงานอุตสาหกรรมหลายแห่งนิยมนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้ประโยชน์มากขึ้น จึงมีความจำเป็นที่ต้องศึกษาความหลากหลายทางสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อรองรับความต้องการใช้ที่มากขึ้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมโดยการใช้สารตั้งต้นชนิดสังเคราะห์กลุ่ม tributyrin ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาการสังเคราะห์เอนไซม์ไลเปสชนิดหลั่งออกนอกเซลล์

**วัตถุประสงค์ของการวิจัย**

การดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้ได้จัดทำขึ้นเพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ไลเปสชนิดหลั่งออกนอกเซลล์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสาร tributyrin และจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ด้วยวิธีการทางพันธุศาสตร์โมเลกุล

**วิธีดำเนินการวิจัย**

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรม

เก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม ในเขตจังหวัดพระนครศรีอยุธยาเพื่อทำการแยกเชื้อแบคทีเรียโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth และ Nutrient agar ที่มีน้ำมันมะกอกและน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นทำการบ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 วัน แล้วจึงคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตที่เจริญได้บนจานเพาะเชื้อ เพื่อทำการเก็บรักษาสำหรับการทดสอบขั้นยืนยันต่อไป

2. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสขั้นยืนยัน

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tributyrin agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน สังเกตเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตที่สามารถสร้างวงใสรอบโคโลนี ซึ่งเกิดจากกลไกการหลั่งเอนไซม์ออกมาย่อยสารตั้งต้น tributyrin ซึ่งจัดเป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสชนิดหลั่งออกมานอนเซลล์ได้ ทำการเก็บเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตที่สร้างวงใสรอบโคโลนีเพื่อศึกษาในลำดับต่อไป

3. การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยวิธีการทางพันธุศาสตร์โมเลกุล

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสชนิดหลั่งออกนอกเซลล์ โดยการศึกษาการติดสีแกรม (Gram’s stain) แล้วจึงทำการศึกษาข้อมูลพันธุกรรมของยีนบริเวณ 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดเลือกได้ โดยทำการเลี้ยงเซลล์ในอาหารเหลว Nutrient broth แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน แล้วจึงเก็บเซลล์เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนบริเวณ 16S rDNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ 27F: 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' และ 1492R: 5' TACGGYT ACCTTGTTACGACTT 3' (Lane, 1991) ซึ่งปฏิกิริยา PCR ดำเนินการดังต่อไปนี้ ค่าอุณหภูมิเริ่มต้น 94 องศาเซลเซียส เวลา 4 นาที และตามด้วยการดำเนินการ 30 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที, 50 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที และ 72 องศาเซลเซียส เวลา 1 นาที ขั้นสุดท้ายตั้งค่าอุณหภูมิในการดำเนินปฏิกิริยาที่ 72 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที เมื่อได้ชิ้นส่วนยีนบริเวณ 16S rDNA จากการทำปฏิกิริยา PCR แล้วนั้น ทำการส่งตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

4. การศึกษาลำดับวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

เปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16S rDNA ของตัวอย่างแบคทีเรียทั้งหมดในฐานข้อมูล GenBank จาก National Center for Biotechnology Information server (NCBI) โดยใช้โปรแกรม BLASTn algorithm จากนั้นจึงสร้างแผนภูมิลำดับวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยใช้โปรแกรม PHYLIP (version 3.695) และโปรแกรมการสร้างแผนภูมิลำดับวิวัฒนาการ TREEVIEW (version 0.5.0)

**ผลการวิจัย**

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรม

จากการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากตัวอย่างน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมในเขตจังหวัดพระนครศรีอยุธยา โดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันมะกอกและน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ทั้งหมด 22 ไอโซเลต โดยคัดเลือกจากลักษณะโคโลนีและลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน จากนั้นจึงนำเชื้อทั้งหมดมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tributyrin agar เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสชนิดหลั่งออกนอกเซลล์ขั้นยืนยัน พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียเพียง 7 ไอโซเลตที่สามารถเจริญและสร้างวงใสรอบโคโลนี โดยเชื้อไอโซเลต E2I1 สร้างวงใสขนาดใหญ่ที่สุด และตามด้วยขนาดวงใสของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต B1I1, E2I2, K2I2, E2I3, E2I4 และ E2I5 ตามลำดับ โดยผลการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนีแสดงดังตารางที่ 1

2. การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียด้วยวิธีการทางพันธุศาสตร์โมเลกุล

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถแยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรม โดยการศึกษาลักษณะการติดสีแกรมพบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต B1I1, E2I1, E2I2, E2I3, E2I4, และ K2I2 เป็นแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบ ในขณะที่มีเพียงไอโซเลต E2I5 ที่จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก จากนั้นทำการศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ และเมื่อศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลนิวคลีโอไทด์กับข้อมูลพื้นฐานของสายพันธุ์แบคทีเรียในฐานข้อมูล GenBank database พบว่าแบคทีเรียไอโซเลต B1I1 และ K2I2 เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในสกุลเดียวกันแต่ต่างกันในระดับสปีชีส์ ได้แก่ *Pseudomonas fluorescens* และ *Pseudomonas* sp. ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อไอโซเลต E2I1, E2I2, E2I3,

E2I4 และ E2I5 แสดงความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Burkholderia cenocepacia*, *Acinetobacter junii*, *Rhizobium miluonense*, *Pseudoxanthomonas* sp. และ *Staphylococcus* sp. ซึ่งผลการเปรียบเทียบแสดงค่าเป็นเปอร์เซ็นต์การจัดจำแนกของข้อมูลบริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้กับข้อมูลในฐาน GenBank ดังแสดงในตารางที่ 2

**ตารางที่ 1** การผลิตเอนไซม์ไลเปสชนิดหลั่งออกนอกเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย

| ไอโซเลต | การสร้างวงใสรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ tributyrin agar |
|---|---|
| B1I1 | +++ |
| E2I1 | +++ |
| E2I2 | ++ |
| E2I3 | ++ |
| E2I4 | + |
| E2I5 | + |
| K2I2 | ++ |

**หมายเหตุ:** + เส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร, ++ เส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 10-20 มิลลิเมตร, +++ เส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 20 มิลลิเมตร

**ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบสายพันธุ์แบคทีเรียจากฐานข้อมูล GenBank database**

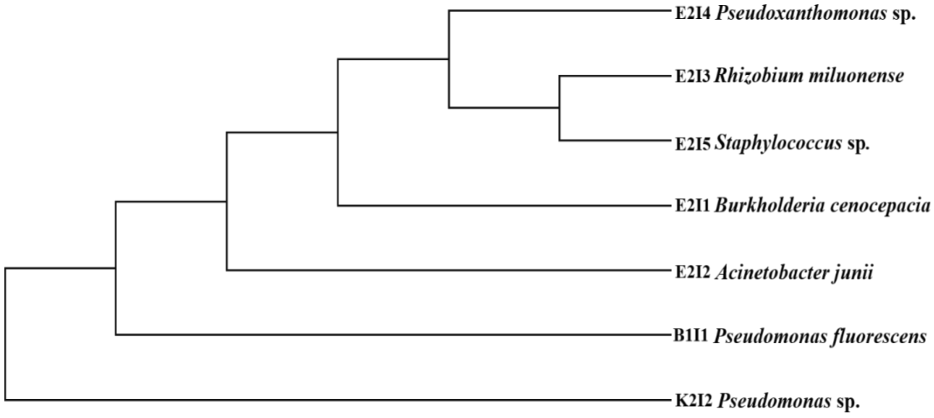
| ลำดับที่ | ไอโซเลต | สายพันธุ์ใกล้เคียง | เปอร์เซ็นต์การจัดจำแนก (% identity) |
|---|---|---|---|
| 1 | B1I1 | *Pseudomonas fluorescens* | 99% (Acc. KC814165 ) |
| 2 | K2I2 | *Pseudomonas* sp. | 99% (Acc. AY864637) |
| 3 | E2I1 | *Burkholderia cenocepacia* | 98% (Acc. KF146158) |
| 4 | E2I2 | *Acinetobacter junii* | 99% (Acc. KF772238) |
| 5 | E2I3 | *Rhizobium miluonense* | 99% (Acc. JN896360) |
| 6 | E2I4 | *Pseudoxanthomonas* sp. | 99% (Acc. JX174238) |
| 7 | E2I5 | *Staphylococcus* sp. | 99% (Acc. JN794602) |

เมื่อทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางลำดับวิวัฒนาการของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลต โดยการสร้างแผนภาพลำดับวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) แสดงในรูปที่ 1 ซึ่งเป็นการอธิบายความสัมพันธ์ของกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสชนิดหลั่งออกนอกเซลล์ที่แยกได้จากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรม ผลการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีความใกล้เคียงกันระดับสกุลโดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* จะแสดงความใกล้เคียงกันทางลำดับวิวัฒนาการในแผนภูมิเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียในสกุลอื่น

**สรุปและอภิปรายผลการวิจัย**

การศึกษาครั้งนี้สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสชนิดหลั่งออกนอกเซลล์ได้จากน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมในเขตจังหวัดพระนครศรีอยุธยา ผลจากการศึกษาการคัดแยกเชื้อเบื้องต้นด้วยการใช้น้ำมันมะกอกและน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียจำนวน 22 ไอโซเลตที่สามารถเจริญได้ และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 22 ไอโซเลตมาทำการศึกษาขั้นยืนยันโดยการใช้สารตั้งต้น tributyrin เป็นแหล่งคาร์บอนพบการสร้างวงใสรอบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ได้ทั้งสิ้น 7 ไอโซเลต ซึ่งแสดงถึงการหลั่งเอนไซม์ไลเปสออกมานอกเซลล์อันเกิดจากกิจกรรมการย่อย tributyrin (Wu และ Tsai, 2004) และเมื่อศึกษาเปรียบเทียบสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด 7 ไอโซเลต พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas* sp., *Burkholderia cenocepacia*, *Acinetobacter junii*, *Rhizobium miluonense*, *Pseudoxanthomonas* sp. และ *Staphylococcus* sp. ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่ามีรายงานวิจัยที่กล่าวถึงสายพันธุ์แบคทีเรียซึ่งใกล้เคียงกับเชื้อที่คัดแยกได้ เช่น การศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *P. fluorescens* พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ที่อุณหภูมิค่อนข้างสูง 55 องศาเซลเซียส (Kulkarni และ Gadre, 2002) และเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งในการแสดงกิจกรรมการย่อยกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว (Polyunsaturated fatty acid, PUFA) ซึ่งได้ทดสอบการย่อยกรดไขมัน 2 ชนิด ได้แก่ กรดไอโคซะเพนทีโนอิคแอซิด (Eicosapentaenoic acid, EPA) และ โดโคซะเฮกซีโนอิคแอซิด (Docosahexaenoic acid, DHA) พบว่าเอนไซม์ไลเปสที่สร้างจาก *P. fluorescens* สามารถย่อยกรดไขมันดังกล่าวและใช้เป็นแหล่งคาร์บอนโดยเฉพาะกรดไขมัน EPA ที่เอนไซม์แสดงกิจกรรมการย่อยได้ดี (Kojima และ Shimizu, 2003) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Burkholderia cenocepacia* โดยวิธีการหมักแบบอาหารแข็ง (solid state

fermentation) โดยใช้กากอ้อยและเมล็ดทานตะวันเป็นสารตั้งต้น ทั้งยังนำเอนไซม์ไปใช้ในการสังเคราะห์น้ำมันไบโอดีเซลด้วยปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอริฟิเคชัน (Transesterification) (Liu *et al*., 2013; Liu *et al*., 2014) ทั้งนี้ยังมีการศึกษาวิจัยการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Acinetobacter junii* และ *Staphylococcus* sp. ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสซึ่งแยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนน้ำมัน (Pogaku *et al*., 2009; Anbu *et al*., 2011)




**รูปที่ 1** แผนภาพลำดับวิวัฒนาการแสดงความสัมพันธ์ของสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด 7 ไอโซเลต

จากการศึกษาถึงรายงานวิจัยที่เกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียพบว่าในปัจจุบันยังคงมีการศึกษาความหลายหลายของแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ๆ รวมทั้งการพัฒนาและคิดค้นเพื่อหาแนวทางในการเพิ่มปริมาณการผลิต ทั้งยังมีทิศทางการนำไปใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมที่หลากหลายมากยิ่งขึ้น ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้พบว่ามีแบคทีเรียไอโซเลตที่สามารถคัดแยกได้บางสายพันธุ์ยังมีการรายงานถึงความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสไม่มากนัก เช่น เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Rhizobium* จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจในการศึกษาและพัฒนาเพื่อนำไปสู่การผลิตให้ได้ปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการ รวมทั้งสนับสนุนการค้นคว้าและพัฒนาแนวทางการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ไลเปสต่อไป

**ข้อเสนอแนะ**

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นศึกษาสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ ซึ่งจากผลการทดลองนั้นสามารถนำไปพัฒนาในด้านการศึกษาสภาวะการเพาะเลี้ยงเพื่อกระตุ้นให้เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้นั้นสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณสูงและอาจนำไปสู่การทดลองเพื่อนำไปประยุกต์ใช้จริง เช่น การทดลองใช้ในระบบบำบัดน้ำเสียที่มีการปนเปื้อนของไขมันหรือน้ำมัน เป็นต้น ทั้งยังสามารถพัฒนาการผลิตโดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมซึ่งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูง และยังเป็นแนวทางที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่งในปัจจุบัน

**กิตติกรรมประกาศ**

การทำวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยาที่พิจารณาสนับสนุนเงินทุนในการทำวิจัย ตลอดจนความอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ สำหรับการดำเนินงานวิจัย

**เอกสารอ้างอิง**

Anbu, P., Noh, M. J., Kim, D. H., Seo, J. S., Hur, B. K., & Min, K. H. (2011). Screening and optimization of extracellular lipases by *Acinetobacter* species isolated from oil-contaminated soil in South Korea. *African Journal of Biotechnology, 10*, 4147-4156.

Borkar, P. S., Bodade, R. G., Rao, S. R., & Khobragade, C. N. (2009). Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9. *Brazilian Journal of Microbiology, 40*, 358-366.

Ertuğrul, S., Dönmez, G., & Takaç, S. (2007). Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials, 149*, 720-724.

Ghaima, K. K., Mohamed, A. I., & Mohamed, M. M. (2014). Effect of some factors on lipase production by *Bacillus cereus* isolated from diesel fuel polluted soil. International Journal of Scientific and Research Publications, 4, ISSN 2250-3153.

Gupta, N., Sahai, V., & Gupta, R. (2007). Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. *Process Biochemistry, 42*, 518-526.

Houde, A., Kademi, A., & Leblanc, D. (2004). Lipases and their industrial applications: an overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology, 118*, 155-170.

Kojima, Y. & Shimizu, S. (2003). Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 96*, 219-226.

Kulkarni, N. & Gadre, R.V. (2002). Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 28*, 344-348.

Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing In: Nucleic acid techniques in bacterial systematics (Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds.), pp. 115–175. Wiley, Chichester, UK.

Lee, L. P., Karbul, H. M., Citartan, M., Gopinath, S. C. B., Lakshmipriya, T., & Tang, T. H. (2014). Lipase-secreting Bacillus species in an oil-contaminated habitat: Promising strains to alleviate oil pollution. *BioMed Research International, 2015,* http://dx.doi.org/10.1155/ 2015/820575.

Liu, Y., Li, C., Meng, X., & Yan, Y. (2013). Biodiesel synthesis directly catalyzed by the fermented solid of *Burkholderia cenocepacia* via solid state fermentation. *Fuel Processing Technology, 106*, 303-309.

Liu, Y., Li, C., Wang, S., & Chen, W. (2014). Solid-supported microorganism of *Burkholderia cenocepacia* cultured via solid state fermentation for biodiesel production: Optimization and kinetics. *Applied Energy, 113*, 713-721.

Pogaku, P., Suresh, A., Srinivas, P., & Reddy, S. R., (2009). Optimization of lipase production by *Staphylococcus* sp. Lp12. *African Journal of Biotechnology, 9*, 882-886.

Saxena, R. K., Sheoran, A., Giri, B., & Davidson, S. W. (2003). Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods, 52*, 1-18.

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

Sirisha, E., Rajasekar, N., & Narasu, M. L. (2010). Isolation and optimization of lipase producing bacteria from oil contaminated soils. *Advances in Biological Research, 4*, 249-252.

Stathopoulou, P. M., Savvides, A. L., Karagouni, A.D., & Hatzinikolaou, D. G. (2013). Unraveling the lipolytic activity of thermophilic bacteria isolated from a volcanic environment. *BioMed Research International*, http://dx.doi.org/10.1155/2013/703130.

Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L., & Wang, F. (2010). Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances, 28*, 628-634.

Treichel, H., Oliveira, D. D., Mazutti, M. A., Luccio, M. D., & Oliveira, J. V. (2010). A review on microbial lipases production. *Food and Bioprocess Technology, 3*, 182-196.

Veerapagu, M., Narayanan, A. S., Ponmurugan, K., & Jeya, K. R. (2013). Screening selection identification production and optimization of bacterial lipase from oil spilled soil. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 6*, 62-67.

Winayanuwattikun, P., Kaewpiboon, C., Piriyakananon, K., Chulalaksananukul, W., Yongvanich, T., & Svasti, J. (2011). Immobilized lipase from potential lipolytic microbes for catalyzing biodiesel production using palm oil as feedstock. *African Journal of Biotechnology, 10*, 1666-1673.

Wu, H. S, & Tsai, M. J. (2004). Kinetics of tributyrin hydrolysis by lipase. *Enzyme and Microbial Technology, 35*, 488-493.