

วิธีการที่รวดเร็วสำหรับคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง

Rapid Method for Screening of High Lipase Producing Bacteria

กิตติเดช สุวรรณสนธิชัย¹ วิเชียร กิจปรีชาวนิช² ลาวันย์ ไกรเดช²
และ เลอลักษณ์ จิตรดอน²

Kittidat Suwansunthichai, Vichien Kitpreechavanich, Lavanaya Kraidej
and Lerluck Chitradon

ABSTRACT

The method for screening of high lipase producing bacteria was developed on the basis of bacterial ability in changing the color of bromocresol purple (BCP) which was added to the culture media containing olive oil as sole substrate. This screening method was comparable efficiently to the method using appearance of clear zone on emulsion tributyrin agar. However, the former one was much faster than the later on which is commonly used. The isolates that showed rapid change in the color of BCP showed the tendency to have high lipase activities. There were 6 isolates among 191 isolates capable in rapidly changing the BCP color. Five of the 6 isolates were confirmed to have high lipase activity when their activities were quantitatively assayed. Therefore, the method of using BCP was recommended to be used as an initial rapid method for primary screening of the bacteria producing high lipase activity.

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาวิธีการที่รวดเร็วเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงโดยใช้วัดความสามารถของแบคทีเรียในการเปลี่ยนสี bromocresol purple (BCP) ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งอาหารในการศึกษานี้ได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรีย 191 สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงด้วย วิธีข้างต้นเปรียบเทียบกับการวัดปริมาณเอนไซม์ด้วย

การวัดความกว้างบริเวณใสบน emulsion tributyrin agar ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้อยู่ทั่วไป ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าวิธีการวัดการเปลี่ยน BCP เป็นวิธีที่รวดเร็วกว่าแม้จะมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับวิธีการวัดความกว้างบริเวณใสบน emulsion tributyrin agar พบว่าแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนสี BCP ได้รวดเร็วเป็นสายพันธุ์ที่มีแนวโน้มว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสสูง มีแบคทีเรียเพียง 6 สายพันธุ์ที่สามารถเปลี่ยนสี BCP ได้หลังการเพาะเลี้ยงเชื้อ

¹ บริษัท ไทยโมดิไฟด์สตาร์ช จำกัด ยานนาวา กรุงเทพฯ
Thai Modify starch Co.Ltd., Yannawa, Bangkok.

² ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
Dept. of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จำนวน 5 ใน 6 สายพันธุ์นี้สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงจริง เมื่อวัดปริมาณเอนไซม์ด้วยการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ดังนั้นการใช้วิธีการเปลี่ยนสี BCP เป็นวิธีการที่รวดเร็วที่นำมาใช้คัดเลือกในขั้นต้นสำหรับแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูง

คำนำ

เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมและสิ่งแวดล้อม เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาได้หลายอย่างเช่น hydrolysis, transesterification (ซึ่งประกอบด้วย acidolysis, alcoholysis, ester exchange และ aminolysis) และการสังเคราะห์ ester เป็นต้น (Yamane, 1987) การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์ไลเปสมีมากมาย เช่น อุตสาหกรรมอาหาร โดยเป็นตัวสร้างกลีเซอรอล อุตสาหกรรมผงซักฟอก ยา เครื่องสำอาง เครื่องหนัง ตลอดจนการกำจัดน้ำเสียในแหล่งชุมชน (Seitz, 1974 ; Arnold *et al.*, 1975 ; Tatara *et al.*, 1985) การแยกและคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์มีบทบาทสำคัญต่อการผลิตและการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพจำเป็นต้องคัดเลือกจากสายพันธุ์ในธรรมชาติจำนวนมาก ดังนั้นวิธีการคัดเลือกขั้นต้น (primary screening) จึงควรเป็นวิธีที่รวดเร็วและให้ผลที่ถูกต้อง สำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสนั้นนิยมอาศัยการเกิดบริเวณใสบน emulsion tributyrin agar (Lawrance *et al.*, 1967 ; De Moraes and Chandon, 1982 ; Omer *et al.*, 1987) ในรายงานนี้ได้เสนอวิธีการใหม่ที่รวดเร็วเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปสในขั้นต้น โดยวัดการเปลี่ยนสี bromocresol purple ที่เติมลงในอาหาร

เหลวที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งอาหาร วิธีการนี้อาศัยหลักการว่าอัตราการเปลี่ยนสี bromocresol purple ขึ้นอยู่กับปริมาณกรดไขมันที่เกิดจากการย่อยสลายไขมันซึ่งจะสัมพันธ์กับปริมาณเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส

ทำการแยกสายพันธุ์แบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่เก็บจากที่ต่าง ๆ ในเขตจังหวัดกรุงเทพมหานคร นครปฐม และราชบุรี โดยเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นถ่ายลงในหลอดอาหารซึ่งบรรจุอาหารเหลวที่มีองค์ประกอบดังนี้ น้ำมันมะกอก 2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%, K_2HPO_4 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%, โดยปรับ pH ให้ได้ 7.0 ด้วย 0.1 N HCl บ่มหลอดอาหารที่อุณหภูมิ 30°C บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 100 ครั้งต่อนาที เป็นเวลา 1-3 วัน เมื่อมีการเจริญของจุลินทรีย์เกิดขึ้นทำการถ่ายเชื้อลงสู่หลอดอาหารหลอดใหม่ที่มีองค์ประกอบเหมือนข้างต้น และทำการบ่มในลักษณะเดียวกันอีกครั้งหนึ่ง เพื่อให้แน่ใจว่าจุลินทรีย์ที่เจริญสามารถใช้ไขมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานได้ จากนั้นทำการแยกเชื้อที่เจริญในอาหารด้วยวิธี double layer technique โดยใช้อาหารวุ้นที่มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับอาหารเหลว ยกเว้นใช้น้ำมันมะกอกที่ปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกันความเข้มข้น 0.5% แทน แยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างบริเวณใสรอบโคโลนีบนอาหารวุ้นโดยเลือกลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน นำเชื้อที่แยกได้แต่ละสายพันธุ์มาทำการเพาะเลี้ยงและแยกเชื้ออีกครั้งในลักษณะเดียวกัน เพื่อให้แน่ใจว่าได้สายพันธุ์บริสุทธิ์เก็บสายพันธุ์ทั้งหมดที่แยกได้บนอาหาร nutrient agar

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

2.1 การใช้วิธีการเปลี่ยนสี bromocresol purple (BCP)

เตรียมเชื้อเริ่มต้น (inoculum) โดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ที่แยกได้ในอาหารเหลวซึ่งบรรจุในหลอดทดสอบ (20×150 มิลลิเมตร) ปริมาตร 5 มิลลิเมตร องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยน้ำมันมะกอก 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%, K_2HPO_4 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03%, และ yeast extract 0.03% โดยปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 บ่มหลอดอาหารที่อุณหภูมิ 30°C บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 100 ครั้งต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ด้วยเครื่อง spectrophotometer (spectronic 20) ให้มีความขุ่นที่ 860 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 จุดเชื้อเริ่มต้นของแต่ละสายพันธุ์ ปริมาตร 1 มิลลิเมตร ลงในหลอดอาหารที่มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับอาหารที่เตรียมเชื้อเริ่มต้น แต่เติม bromocresol purple ความเข้มข้น 0.064% ซึ่งบรรจุหลอดทดสอบขนาด 25×200 มิลลิเมตร ปริมาตร 10 มิลลิเมตร บ่มหลอดอาหารในลักษณะเอียง 50° บนเครื่องเขย่าแบบวงกลม ที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C ตรวจสอบการเปลี่ยนสี BCP จากสีม่วงเป็นเหลือง ทุก ๆ 2 ชั่วโมง ดังแสดงใน Figure 1. คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนสี BCP ได้รวดเร็ว เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ต่อไป

2.2 การใช้วิธีการวัดความกว้างของบริเวณใสบน emulsion tributyrin agar (Lowrance *et al.*, 1967) เตรียมเชื้อเริ่มต้นในลักษณะเดียวกับข้อ 2.1 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบดังนี้ น้ำมันมะกอก 1%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.13%, K_2HPO_4 0.09%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02% และ yeast extract

0.02% โดยปรับ pH ให้เท่า 7.0 จุดเชื้อ 1 มิลลิเมตร ลงในอาหารที่มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับอาหารที่เตรียมเชื้อเริ่มต้นที่เติม CaCO_3 0.05% เพื่อช่วยรักษาภาวะความเป็นกรดและด่างของอาหารให้เปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 100 ครั้งต่อนาที เมื่อครบ 48 ชั่วโมง เหยี่ยงเพื่อแยกเอาเซลล์ออกจากด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ 4°C ความเร็ว 19,000 g นาน 10 นาที นำส่วนใสปริมาตร 0.25 มิลลิเมตร ใส่ลงในถ้วยมาตรฐานที่ตั้งวางบน emulsion tributyrin agar ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดความกว้างของบริเวณใสที่เกิดขึ้น คัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดบริเวณได้กว้างไปทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ต่อไป

3. การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไลเปสของสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือก

นำสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกไว้ในข้อ 2 มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ด้วยการตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activity) เตรียมเชื้อเริ่มต้นของแต่ละสายพันธุ์ในลักษณะเดียวกันกับข้อ 2.2 จุดเชื้อเริ่มต้นแต่ละสายพันธุ์ปริมาตร 2.5 มิลลิเมตร ใส่ลงในอาหารที่มีองค์ประกอบเดียวกับข้อ 2.2 ที่เติม CaCO_3 0.05% ซึ่งบรรจุในพลาสติกขนาด 500 มิลลิเมตร ปริมาตร 50 มิลลิเมตร บ่มพลาสติกอาหารบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่ 30°C เมื่อครบ 48 ชั่วโมง เหยี่ยงเอาเซลล์ออกจากด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ 4°C ด้วยความเร็ว 19,000 $\times$ g นาน 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

4. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยอาศัยหลักการวัดปริมาณกรดไขมันที่ได้จากการย่อยสลายน้ำมันมะกอก โดยการไตเตรดกับสายละลายต่าง

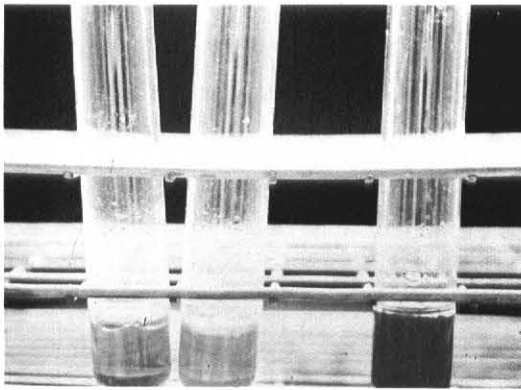


Figure 1 Olive oil medium with 0.064% bromocresal purple (BCP) which is used in screening of the bacteria capable of lipase production. Two tubes (left) show the changing of BCP colour from purple to yellow during the bacterial growth compare to tube without inoculation (right).

(Odera *et al.*, 1986) ส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วยสับสเตอร์ด (10% emulsion olive oil ใน 0.09% polyvinyl alcohol) ปริมาตร 2 มิลลิเมตร, 0.2 M phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตร 2 มิลลิเมตร และปริมาณเอนไซม์ในความเจือจางที่เหมาะสม ปริมาตร 4 มิลลิเมตร บ่มปฏิกิริยาที่ 35°C และเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย acetone : alcohol (1 : 1) ปริมาตร 20 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปไตเตรดกับสายละลาย NaOH มาตรฐาน ความเข้มข้น 0.05 N กำหนดเป็นปริมาณกรดไขมันที่เกิดขึ้น กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์คือปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายน้ำมันมะกอกให้ได้กรดไขมันคิดเทียบเป็น oleic acid ปริมาณ 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

ผลและวิจารณ์

การแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส

ได้แยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญในอาหาร

ที่มีเฉพาะน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานจากดินแหล่งต่าง ๆ ด้วยวิธี double layer technique โดยใช้อาหารวุ้นที่มีน้ำมันมะกอกที่ปั่นให้เป็นเนื้อเดียวกัน พบว่าได้เชื้อแบคทีเรียที่สร้างบริเวณใสบนอาหารดังกล่าว 191 สายพันธุ์ จำนวน 171 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ แท่งสั้น อีก 20 สายพันธุ์เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ทรงกลม

การแยกเชื้อด้วยวิธี double layer technique นี้มีข้อดีว่าการแยกเชื้อที่ใช้กันอยู่โดยทั่วไป กล่าวคือ ที่ความเจือจางของเชื้อที่เหมาะสมสามารถแยกแบคทีเรียให้ได้โคโลนีเดี่ยวได้ง่ายและสามารถเห็นขนาดของบริเวณใสได้ชัดเจน (Figure 2.) จากการศึกษเบื้องต้นพบว่าการใช้น้ำมันมะกอกความเข้มข้น 0.5% นั้น เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สามารถเห็นบริเวณใสได้ชัดเจน นอกจากนี้วิธีการนี้ยังสามารถแยกแบคทีเรียที่มีเมือกได้ดีกว่าวิธีการ streak plate

เมื่อเปรียบเทียบวิธีการแยกเชื้อด้วยวิธี double layer technique โดยใช้ น้ำมันมะกอกกับ

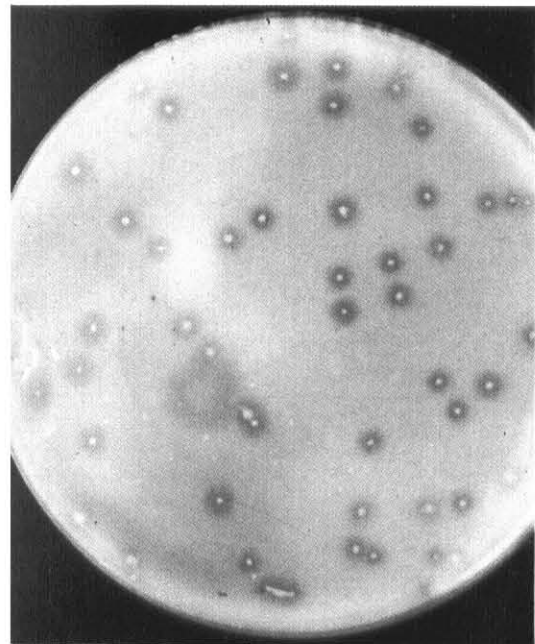


Figure 2 Colonies with clear zones on 0.5% emulsion olive oil medium isolated using double layer technique.

วิธีของ Fryer *et al.* (1967) ที่ใช้อาหาร tributyrin agar นั้นการใช้น้ำมันมะกอกจะมีข้อได้เปรียบ เนื่องจากมีโครงสร้างที่ซับซ้อนกว่า tributyrin ดังนั้นแบคทีเรียที่เจริญและทำให้เกิดบริเวณใสบนอาหารที่มีน้ำมันมะกอกเป็นสับเตรนต์นั้นเป็นแบคทีเรียที่สามารถใช้ complex triglyceride ได้อย่างแท้จริง

ดังนั้นการแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธี double layer technique โดยใช้น้ำมันเป็นแหล่งอาหารนั้นเป็นวิธีที่ประหยัดที่สามารถเตรียมได้ง่ายและสะดวก และให้ผลที่ชัดเจน

การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสที่แยกได้ทั้งหมด 191 สายพันธุ์เมื่อนำมาคัดเลือกประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ โดยดูเวลาที่ที่ใช้ในการเปลี่ยนสี bromocresol purple (BCP) พบว่าสามารถแบ่งแบคทีเรียออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ดังแสดงใน Table 1 กลุ่มที่ 1 เปลี่ยนสี BCP ได้เร็วภายใน 8 ชั่วโมงหลังจากการบ่มเชื้อ มีทั้งหมด 6 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 2 เปลี่ยนสี BCP ได้เร็วปานกลางระหว่าง 8-10 ชั่วโมง มีทั้งหมด 78 สายพันธุ์และกลุ่มที่ 3 ที่เปลี่ยนสี BCP ได้ช้า คือใช้เวลามากกว่า 10 ชั่วโมง มี

ทั้งหมด 107 สายพันธุ์ เมื่อคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีการวัดบริเวณใสบน emulsion tributyrin agar สามารถคัดเลือกได้แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ได้สูงถึง 9 สายพันธุ์ โดยทำให้เกิดบริเวณใสได้กว้างมากกว่า 20 มิลลิเมตร (Table 1) ส่วนอีก 79 สายพันธุ์สามารถทำให้เกิดบริเวณใสกว้างระหว่าง 16-20 มิลลิเมตร และที่เหลือ 103 สายพันธุ์ สามารถให้บริเวณใสกว้างน้อยกว่า 16 มิลลิเมตร

จากการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างการวัดเวลาในการเปลี่ยนสี BCP ได้นานกว่า 10 ชั่วโมงนั้นไม่มีสายพันธุ์ใดเลยที่จะสามารถสร้างบริเวณใสได้กว้างถึง 20 มิลลิเมตร และส่วนใหญ่ถึง 86 สายพันธุ์เป็นพวกที่สร้างบริเวณใสได้น้อยกว่า 16 มิลลิเมตร สำหรับแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยนสี BCP ได้ระหว่าง 8-10 ชั่วโมงนั้น มี 56 สายพันธุ์ที่จะสร้างบริเวณใสได้กว้างระหว่าง 16-20 มิลลิเมตร แต่มี 5 สายพันธุ์ที่สามารถให้บริเวณใสกว้างกว่า 20 มิลลิเมตร สำหรับแบคทีเรียที่สามารถเปลี่ยน BCP ได้รวดเร็วคือใช้เวลาใน 8 ชั่วโมงที่มีเพียง 6 สายพันธุ์เท่านั้น และพบว่า 4 สายพันธุ์ ให้บริเวณใสกว้างกว่า 20 มิลลิเมตร ส่วนอีก 2 สายพันธุ์ให้บริเวณใสอยู่ระหว่าง 16-20

Table 1 Comparison between grouping of the bacterial isolates capable of changing the BCP color at appropriate time and grouping of those produced different width of clear zone emulsion tributyrin agar.

Time used in changing the BCP color	Width of clear Zone on emulsion tributyrin agar			Total
	(h)	less than 16 mm	16 - 20 mm	
more than 10.0	86	21	0	107
8.0 - 10.0	17	56	5	78
6.0 - 8.0	0	2	4	6
Total	103	79	9	191

มิลลิเมตร

การคัดเลือกขึ้นต้นจากสายพันธุ์แบคทีเรีย 191 สายพันธุ์ โดยทั้งสองวิธีดังกล่าวได้แบคทีเรีย 11 สายพันธุ์จึงนำไปคัดเลือกขึ้นต้นด้วยสองวิธีนี้ ที่นำไปตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปส โดยการตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ด้วยการวัดประสิทธิภาพของเอนไซม์ต่อไป เพื่อเป็นการยืนยันถึงประสิทธิภาพของการใช้วิธี BCP เพื่อคัดเลือกเชื้อในขั้นต้น

ผลการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ได้แสดงใน Table 2 พบว่าแบคทีเรียจำนวน 6 สายพันธุ์ที่คัดเลือกขึ้นต้นด้วยวิธีการวัดประสิทธิภาพการเปลี่ยนสี BCP (กลุ่มที่ 1) มี 3 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงกว่า 2 หน่วยต่อมิลลิเมตร ส่วนแบคทีเรีย 9 สายพันธุ์ที่คัดเลือกจากการวัดขนาดของบริเวณใส่นั้นมีเพียง 3 สายพันธุ์ ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงกว่า 2 หน่วยต่อมิลลิเมตร สำหรับแบคทีเรียที่เปลี่ยนสี BCP ในกลุ่มที่ 2 แต่ให้บริเวณใสได้กว้างกว่า 20 มิลลิเมตรจำนวน 5 สายพันธุ์นั้นมีเพียง 1 สายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงกว่า 2 หน่วยต่อมิลลิเมตร อย่างไรก็ตามสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ

สายพันธุ์ KM-2 ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงถึง 5.5 หน่วยต่อมิลลิเมตร เป็นสายพันธุ์ที่เปลี่ยนสี BCP ได้เร็วที่สุดคือภายใน 6 ชั่วโมง และให้บริเวณใสได้กว้างสายพันธุ์หนึ่ง

ถึงแม้ว่า Lawrance *et al.* (1967) และ De MoRoes and Chandon (1982) รายงานว่าความกว้างของบริเวณใสบนอาหาร emulsion tributyrin agar มีแนวโน้มสอดคล้องกับการวัดประสิทธิภาพการทำงานของ lipase อย่างไรก็ตามจากการทดลองพบว่าความกว้างของบริเวณใสกับประสิทธิภาพการทำงานของไลเปสโดยวิธีใดก็ตามไม่มีความสัมพันธ์เชิงประมาณ (quantitative) ซึ่งจะเห็นได้จากสายพันธุ์ที่ให้บริเวณใสกว้าง 23 มิลลิเมตรเท่ากัน แต่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ที่ต่างกัน สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนสี BCP กับประสิทธิภาพการทำงานของไลเปสก็ไม่มีความสัมพันธ์เชิงปริมาณเช่นเดียวกับการวัดความกว้างของบริเวณใส

โดยสรุปจะเห็นได้ว่าการคัดเลือกขึ้นต้นสำหรับแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ไลเปสด้วยการวัดความสามารถในการเปลี่ยนสี

Table 2 Efficiency in lipase production of some selected 1 isolates considering rapidly change the BCP color and large clear zone formation on the emulsion tributyrin agar.

Code of strains	Time used in changing BCP color (h)	Width clear zone on emulsion tributyrin (mm)	Lipase activity (unit/ml)
MK - 2	6.0	22.50	5.53
S - 10	6.5	16.00	2.19
CS - 8	7.0	23.00	3.29
CS - 5	8.0	20.56	1.64
CS - 6	8.0	19.00	0.55
CA - 10	8.0	23.00	1.64
CA - 26	8.5	21.40	0.55
CA - 13	8.5	20.20	2.19
CA - 23	9.5	22.40	1.10
CA - 18	10.0	23.00	1.10
CA - 4	10.0	20.60	0.55

BCP เป็นวิธีที่ได้ผลใกล้เคียงหรือดีกว่าการคัดเลือกด้วยวิธีการวัดขนาดของบริเวณใสบน emulsion tributyrin agar การวัดความสามารถการเปลี่ยนสี BCP เป็นวิธีที่รวดเร็วกว่าและประหยัดกว่าการวัดขนาดของบริเวณใสแล้วยังเป็นวิธีที่ใช้น้ำมันมะกอกซึ่งเป็น complex triglyceride ที่น่าเป็นตัวแทนการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อย่อย complex triglyceride ได้ดี อย่างไรก็ตามการคัดเลือกด้วยวิธีการวัดความสามารถในการเปลี่ยนสี BCP มีข้อจำกัดสำหรับการคัดเลือกสายพันธุ์ ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสอยู่ภายในเซลล์ และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มี buffer capacity ก่อนข้างต่ำซึ่งอาจทำให้การเจริญของแบคทีเรียลดลงโดยส่งผลให้การผลิตเอนไซม์ของสายสายพันธุ์ลดน้อยลง

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ Prof. Dr.S. Okuda และ Dr. K. Ito คณะเกษตร มหาวิทยาลัย Tohoku ประเทศญี่ปุ่น ที่ช่วยกรุณาให้คำปรึกษาในเรื่องวิธีการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพและวิธีการวัดการเปลี่ยนสี bromocresol purple

เอกสารอ้างอิง

- Arnold, R.G., R.M. Shahani and B.K. Dwivedi. 1975. Application of lipolytic enzymes to flavor development in dairy products. J. Dairy Sci. 58 (8) : 1127-1143.
- De Modoes, J. and R.C. Chandan. 1982. Factor influencing the production and activity of *Streptococcus thermophilus* lipase. J. Food Sci. 47 : 1579-1583.
- Fryer, T.F., B. Reiter and R.C. Lawrence. 1967. Methods isolation and enumeration of lipolytic organism. J. Dairy Sci. 50 (4) : 477-484.
- Lawrance, K.C., T.F. Fryer and B. Reiter, 1967. Rapid method for the quantitative estimation of microbial lipase, Nature 25 : 1264-1265.
- Odera, M., K. Takeuchi and A. Toh-e. 1986. Molecular cloning of lipase genes from *Alcaligenes denitrificans* and their expression in *Escherichia coli*. J. Ferment. Technol. 64 (5) : 363-371.
- Omar, I.C., N. Nishio and S. Nagai. 1987. Production of a thermostable lipase by *Humicola lanuginosa* grown on sorbital corn steep liquor medium. Agri. Biol Chem. 51 (8) : 2145-2151.
- Seitz, E.W. 1974. Industrial application of microbial lipase : a review. J. Amer. Oil. Chem. Soc. 51 (2) : 12-16.
- Tatara, T., Fujii, T. Kawase and M. Minogawa. 1985. Studies on applications of lipolytic enzyme in detergent, II. Evaluation of adaptability of various kinds of lipase in practical laundry conditions. J. Amer. Oil. Chem. Soc. 62 (5) : 1053-1058.
- Yamane T. 1987. Enzyme technology for the lipids industry an engineering overview. J. Amer. Oil. Chem. Soc. 64 (2) : 1657-1661.