บทความวิจัย

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Bacillus safensis* สายพันธุ์ PSR5631 ที่แยกได้จากดิน

ภัทรภร พิกุลขวัญ[1] อรอนงค์ พริ้งศุลกะ[1] ณัฏฐิกา สุวรรณาศรัย[1]
วัลลภา หล่อเหลี่ยม[1] สิริรักษ์ ศรวณียารักษ์[1] วิเชียร กิจปรีชาวนิช[2]
และ สุขุมาภรณ์ กระจ่างสังข์[1*]

บทคัดย่อ

เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องจากสามารถใช้เอนไซม์ไลเปสเป็นตัวเร่งทางชีวภาพซึ่งทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นในสภาวะที่ไม่รุนแรงได้ ในปัจจุบันเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากแบคทีเรียนั้นเริ่มได้รับความสนใจมากขึ้น เพราะสามารถใช้ในกระบวนการรีพอลิเมอไรเซชันพลาสติกชีวภาพ เช่น พอลิ(แอล-แลกไทด์) ได้ งานวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากดินที่มีการปนเปื้อนของไขมัน บริเวณภาคใต้ของประเทศไทยและทำการศึกษาองค์-ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยทำการเก็บตัวอย่างดิน 100 ตัวอย่างมาคัดแยกบน Tween 80 agar แล้วสังเกตโซนขุ่นรอบโคโลนี ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้ 662 ไอโซเลท โดยที่ไอโซเลท PSR5631 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสมากที่สุดทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว ดังนั้นจึงนำไอโซเลท PSR5631 มาวิเคราะห์สายพันธุ์โดยหาลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Bacillus safensis* เท่ากับ 99.6% similarity หลังจากนั้นนำไอโซเลท PSR5631 มาศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส เช่น แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน pH อุณหภูมิ และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ โดยจากการศึกษาพบว่า สายพันธุ์ PSR5631 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 68.60 U/mL ซึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย น้ำมันรำข้าว ความเข้มข้น 1.5% (v/v) ยีสต์สกัด ความเข้มข้น 0.32% (w/v) โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.16% (v/w) pH 7.0 ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 ชั่วโมง การศึกษาในครั้งนี้พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้นั้น สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณสูง ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ต่อไป

คำสำคัญ: *Bacillus safensis* เอนไซม์ไลเปส สภาวะที่เหมาะสม

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
[2]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
[*]ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: sukhumaporn@g.swu.ac.th

Optimization of Lipase Production by *Bacillus safensis* strain PSR5631 Isolated from Soil

Pattaraporn Pikunkwan[a], Onanong Pringsulaka[a], Nuttika Suwannasai[a], Wanlapa Lorliam[a], Sirirak Sarawaneeyarak[a], Vichien Kitpreechavanich[b] and Sukhumaporn Krajangsang[a*]

ABSTRACT

Lipase is one of the important enzymes for the use in biotechnological processes. Lipase is a biocatalyst which is active at mild condition. Recently, bacterial lipase has become very interesting because it can be used for re-polymerization of biodegradable plastics such as poly(L-lactide). The present work aimed to screen lipase-producing bacteria from oil-contaminated soil in the South of Thailand and the optimization of medium composition for lipase-production has also studied. Lipase-producing bacteria with 662 strains were isolated from 100 soil samples according to opaque zone formation on Tween 80 agar. Bacteria strain PSR5631 exhibited the highest lipase activities in both agar plate and production medium. It was identified as *Bacillus safensis* strain PSR5631 based on 16S rRNA gene sequencing. Moreover, factors influencing lipase production were investigated in shake flask culture, i.e. carbon and nitrogen sources, pH, temperature and incubation time. The maximum enzyme activity of 68.60 U/mL was obtained by using 1.5% (w/v) rice bran oil and 0.32% (w/v) yeast extract as carbon and nitrogen sources, respectively and using 0.16% (w/v) sodium chloride at pH 7, 37°C and 60 h cultivation. This study showed that a high lipase production could be found from bacterial isolate and can be used for further applications.

Keywords: lipase, *Bacillus safensis;* optimization

[a]Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University, Watthana, Bangkok, 10110, Thailand
[b]Department of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart University, Jatujak, Bangkok, 10900, Thailand
*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: sukhumaporn@g.swu.ac.th

บทนำ

เอนไซม์ไลเปส (lipase หรือ triacylglycerol acylhydrolases EC 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสที่ตำแหน่งพันธะเอสเทอร์ในโมเลกุลของไตรกลีเซอร์ไรด์ เกิดเป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ นอกจากนี้ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะเอสเทอร์ ซึ่งเป็นปฏิกิริยาย้อนกลับได้อีกด้วย [1] เอนไซม์ไลเปสสามารถพบได้ทั้งในสัตว์ พืช แบคทีเรีย ยีสต์ และรา แต่เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ และระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณสูง ช่วยลดต้นทุนการผลิต ใช้ระยะเวลาในการเจริญที่สั้น และง่ายต่อการเก็บเกี่ยว เอนไซม์ไลเปสได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่หลากหลาย เช่น เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส สารชะล้าง เครื่องสำอาง เครื่องหนัง เวชภัณฑ์ และใช้ในกระบวนการบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสยังมีความสามารถในการสังเคราะห์และย่อยสลายพลาสติกชนิด PLA อีกด้วย [2] แต่การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์นั้นยังคงถูกจำกัดด้วยปัจจัยทางกายภาพและปัจจัยทางเคมี เช่น อุณหภูมิ pH ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ และองค์ประกอบทางเคมีของอาหารเลี้ยงเชื้อ [3] จากปัจจัยดังกล่าวจึงได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสอย่างมากมาย อาทิ Wolski และคณะ [1] ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Penicillium* sp. โดยใช้การออกแบบการทดลองทางสถิติพบว่า กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดได้เท่ากับ 9.5 U/mL เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย peptone ความเข้มข้น 20.0 g/L yeast extract ความเข้มข้น 5.0 g/L NaCl ความเข้มข้น 5.0 g/L และ olive oil ความเข้มข้น 10.0 g/L pH 4.9-5.5 อุณหภูมิ 37-40°C ต่อมางานวิจัยของ Dutta และคณะ [2] ได้ทำการศึกษาการผลิต alkaline thermostable crude lipase จากเชื้อ *Bacillus cereus* C7 พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดเท่ากับ 33 ± 0.567 IU/mL ซึ่งประกอบด้วย แป้ง ความเข้มข้น 2% (w/v) NH_4SO_2 ความเข้มข้น 0.1% (w/v) peptone ความเข้มข้น 2% (w/v) และ ยูเรีย ความเข้มข้น 0.1% (w/v) pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 30-33°C นาน 24 ชั่วโมง ส่วนงานวิจัยของ Papagora และคณะ [4] ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Debaryomyces hansenii* พบว่า องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสประกอบด้วย yeast extract ความเข้มข้น 5.0 g/L peptone ความเข้มข้น 10.0 g/L K_2HPO_4 ความเข้มข้น 4.0 g/L $MgSO_4.7H_2O$ ความเข้มข้น 1.0 g/L glucose ความเข้มข้น 13.1 g/L olive oil ความเข้มข้น 19.0 g/L และ Tween 80 ความเข้มข้น 3.8 g/L pH 6.4 ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 72 ชั่วโมง มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดคือ 7.44 U/mL และงานวิจัยของ Almeida และคณะ [3] ทำการศึกษาปัจจัยของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Candida viswanathii* จากการทดลองพบว่าเมื่อใช้ olive oil ที่ความเข้มข้น 1.5% (v/w) yeast extract ความเข้มข้น 0.2% (w/w) pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 28°C นาน 72 ชั่วโมง มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุดคือ 86.50 ± 9.62 U จากงานวิจัยข้างต้นแสดงให้เห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ โดยที่องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่นั้นประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน โดยเฉพาะแหล่งคาร์บอนที่เป็น hydrophobic substrate ซึ่งเป็นตัวเหนี่ยวนำ (inducer) เพื่อช่วยให้เกิดการชักนำในการผลิตเอนไซม์ไลเปส และแหล่งไนโตรเจนที่เป็นทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยที่ไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์นั้น

จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมได้อย่างรวดเร็ว ในขณะที่ไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์นั้นมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ และเซลล์ต้องการกรดอะมิโนเพื่อใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมและการสังเคราะห์เอนไซม์ไลเปส นอกจากนี้ปัจจัยอื่นๆ เช่น pH ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิก็มีความสำคัญต่อการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสเช่นกัน [3] ดังนั้นในงานวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด และทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากดิน

ตัวอย่างดินที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีจำนวน 100 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บดินมาจาก 3 จังหวัดทางภาคใต้ของประเทศไทย ดังนี้ จังหวัดเพชรบุรี 24 ตัวอย่าง จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 16 ตัวอย่าง และ จังหวัดชุมพร 60 ตัวอย่าง หลังจากนั้นชั่งตัวอย่างดิน 1 กรัม ใส่ลงใน Enrichment medium ปริมาตร 50 mL ซึ่งประกอบด้วย peptone ความเข้มข้น 0.05% (w/v) KH_2PO_4 0.15% (w/v) Na_2HPO_4 0.1% (w/v) $MgSO_4$ 0.05% (w/v) $(NH_4)_2SO_4$ 0.5% (w/v) NaCl 0.05% (w/v) และ Tween 80 ความเข้มข้น 12% (w/v) ดัดแปลงจาก Ma และคณะ [5] นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็ว 200 rpm นาน 2 วัน หลังจากนั้นนำตัวอย่างมาเจือจางที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (10^{-5}-10^{-7}) แล้วนำตัวอย่างที่เจือจางในแต่ละระดับมาคัดแยกแบคทีเรียโดยวิธี spread plate บนอาหาร Tween 80 agar ซึ่งประกอบด้วย peptone 10 g/L NaCl 5 g/L $CaCl_2.2H_2O$ 0.1 g/L และ agar 15 g/L หลังจากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 วัน หลังจากนั้นนับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียทั้งหมดและแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ไลเปส โดยสังเกตบริเวณขุ่นรอบๆ โคโลนี ทำการเลือกโคโลนีที่มีสี รูปร่าง และลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันในแต่ละจานอาหารเลี้ยงเชื้อมา cross streak บนอาหาร Tween 80 agar จนได้โคโลนีเดี่ยว แล้วนำไปจุดบน Tween 80 agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 วัน วัดบริเวณขุ่นรอบโคโลนี เพื่อใช้คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยใช้วิธีการคำนวณของ Bai และคณะ [6]

$$\text{ดัชนีเอนไซม์} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณขุ่น (เซนติเมตร)}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (เซนติเมตร)}}$$

เลือกโคโลนีที่มีค่าดัชนีเอนไซม์ตั้งแต่ 2.5 ขึ้นไป มาทำการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีข้อ 2 และ 3 ตามลำดับ และเมื่อได้แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด นำแบคทีเรียมาทำการจัดจำแนกโดยการศึกษาสัณฐานวิทยา การศึกษารูปร่างโดยการย้อมแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) หลังจากนั้นทำการวิเคราะห์สายพันธุ์แบคทีเรียโดยใช้วิธีการหาลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA gene โดยใช้ Universal primer 27F และ 1492R (5′ AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3′ และ 5′ TACGGYTACCTTGTTACGACTT 3′) ตามลำดับ นำลำดับเบสที่ได้มา Blast โดยใช้ฐานข้อมูลจาก National Center of Biotechnology Information (NCBI)

2. การเตรียมหัวเชื้อและการผลิตเอนไซม์

นำแบคทีเรียที่คัดแยกมาเลี้ยงในอาหาร Tween 80 broth ปริมาตร 50 mL หลังจากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 5 mL ลงใน inoculum medium ปริมาตร 50 mL นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็ว 200 rpm นาน 1 วัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm โดยให้อยู่ในช่วง 0.8-1.0 หลังจากนั้นถ่ายหัวเชื้อ ปริมาตร 5 mL ลงใน production medium ที่ประกอบด้วย น้ำมันมะกอก (olive oil) ความเข้มข้น 0.5% (v/v) CASO ความเข้มข้น 0.12% (v/v) (ซึ่งประกอบด้วย casein peptone 17 g/L, glucose 2.5 g/L และ soy peptone 3 g/L) และ NaCl ความเข้มข้น 0.16% (w/v) ดัดแปลงจาก Liu และคณะ [7] ปริมาตร 50 mL บ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ความเร็ว 200 rpm นาน 2 วัน

3. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

หลังจากลงหัวเชื้อใน production medium นาน 2 วัน ทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็วรอบ 14,000 xg เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ดูดส่วนใสเพื่อใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส ซึ่งการวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสนั้นดัดแปลงจาก Anbu และคณะ [8] ทำโดยใช้เอนไซม์ไลเปสปริมาตร 240 µL ทำปฏิกิริยากับสารละลาย *p*-nitrophenylpalmitate ปริมาตร 240 µL ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% (v/v) ปริมาตร 560 µL นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 nm แล้วนำมาเทียบกับกราฟมาตรฐานของ *p*-nitrophenol โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ไลเปส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อย *p*-nitrophenylpalmitate ให้ได้ *p*-nitrophenol 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทดลอง

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

4.1 ศึกษาผลของระยะเวลาและการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ มาทำการศึกษาผลของระยะเวลา โดยการถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 5 mL ลงใน production medium ปริมาตร 50 mL ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง โดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงวันที่ 5 หลังจากนั้นนำมาศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย โดยนำตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (10^{-4}-10^{-6}) แล้วนำตัวอย่างที่เจือจางในแต่ละระดับมาคัดแยกแบคทีเรียโดยวิธี spread plate บนอาหาร Nutrient Agar (NA) นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 วัน นับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียทั้งหมด และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีข้อ 3

4.2 ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ซึ่งที่ผ่านการศึกษาผลของระยะเวลาในการเจริญของแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด มาทำการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยนำหัวเชื้อปริมาตร 5 mL ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ production medium ปริมาตร 50 mL ซึ่งประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ดังนี้ น้ำมันมะกอก (olive oil) น้ำมันข้าวโพด (corn oil) น้ำมันคาโนล่า (canola oil) น้ำมันงา (sesami oil) น้ำมันดอกทานตะวัน (sunflower oil) น้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil) น้ำมันมะพร้าว (coconut cooking oil) น้ำมันเมล็ดชาดอกคามิลเลีย

(camellia tea oil) และน้ำมันรำข้าว (rice bran oil) ที่ความเข้มข้น 0.5% (v/v) CASO ความเข้มข้น 0.12% (v/v) และ NaCl ความเข้มข้น 0.16% (w/v) หลังจากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีข้อ 3 ทำการเลือกแหล่งคาร์บอนที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณที่สูงสุด มาศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ตามวิธีการทดลองข้างต้น โดยศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน เท่ากับ 0.5, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5 และ 5.5% (v/v) ตามลำดับ

4.3 ศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาทำการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยนำหัวเชื้อปริมาตร 5 mL ถ่ายลงใน production medium ปริมาตร 50 mL ซึ่งประกอบด้วย การศึกษาผลของระยะเวลาในการเจริญของแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด แหล่งและความเข้มข้นของคาร์บอนที่เหมาะสมจากการทดลองที่ผ่านมา NaCl ความเข้มข้น 0.16% (w/v) และใช้ yeast extract, peptone tryptose, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3 และ NH_4Cl เป็นแหล่งไนโตรเจนแทน CASO ที่ความเข้มข้น 0.12% (v/v) หลังจากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีข้อ 3 ทำการเลือกแหล่งไนโตรเจนที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณที่สูงสุด มาศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนตามวิธีการทดลองข้างต้น โดยศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.02, 0.12, 0.22, 032, 0.42 และ 0.52% (w/v) ตามลำดับ

4.4 ศึกษาความเข้มข้นของ NaCl

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาทำการศึกษาความเข้มข้นของ NaCl ในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยนำหัวเชื้อปริมาตร 5 mL ถ่ายลงใน production medium ปริมาตร 50 mL ซึ่งประกอบด้วย การศึกษาผลของระยะเวลาในการเจริญของแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด ชนิดและความเข้มข้นของคาร์บอน ชนิดและความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสม หลังจากนั้นศึกษาความเข้มข้นของ NaCl ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0, 0.16, 0.32, 0.48 และ 0.64% (w/v) ตามลำดับ หลังจากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีข้อ 3

4.5 ศึกษา pH

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาทำการศึกษาผลของค่าพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยนำหัวเชื้อปริมาตร 5 mL ถ่ายลงใน production medium ปริมาตร 50 mL ทำการปรับ pH ของ production medium ที่ผ่านการศึกษาผลของระยะเวลาในการเจริญของแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด ชนิดและความเข้มข้นคาร์บอน ชนิดและความเข้มข้นไนโตรเจน และความเข้มข้น NaCl ที่เหมาะสมแล้ว โดยปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 5, 5.5, 6.0, 6.5, 7, 7.5 และ 8 หลังจากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีข้อ 3

4.6 ศึกษาผลของอุณหภูมิ

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ มาทำการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยนำหัวเชื้อปริมาตร 5 mL ถ่ายลงใน production medium ปริมาตร 50 mL ที่ผ่านการศึกษาผลของระยะเวลาในการเจริญของแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด, ชนิดและความเข้มข้นคาร์บอน, ชนิดและความเข้มข้นไนโตรเจน ความเข้มข้น NaCl และ pH ที่เหมาะสมแล้ว โดยนำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37, 40, 45 และ 50°C หลังจากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีข้อ 3

5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ one way ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LSD ที่ระดับนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยใช้โปรแกรม PASW Statistic 18, SPSS Inc.

ผลการวิจัย

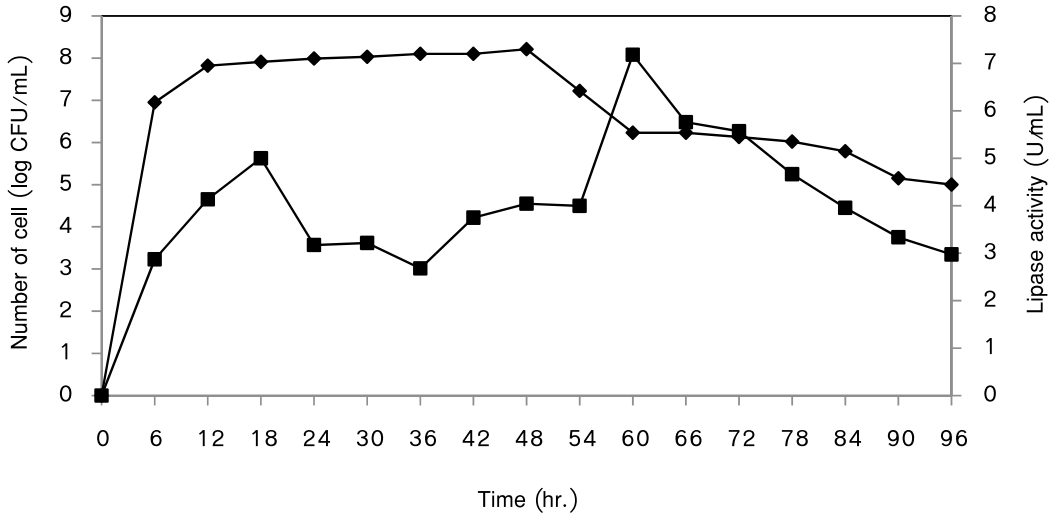
1. การคัดเลือกและจัดจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากตัวอย่างดิน 100 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ทั้งหมด 662 ไอโซเลท จากนั้นทำการคัดเลือกไอโซเลทที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดบนอาหาร Tween 80 agar โดยทำการสังเกตโซนขุ่นรอบๆ โคโลนี แล้วนำมาคำนวณดัชนีเอนไซม์ หลังจากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีค่าดัชนีเอนไซม์มากกว่า 2.5 ซึ่งมีทั้งหมด 74 ไอโซเลท และเมื่อนำมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่า ไอโซเลท PSR5631 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดคือ 8.89 U/mL รองลงมาคือไอโซเลท TWL962 PNT7521 และ PNT1153 มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 7.69, 7.51 และ 7.45 U/mL ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกไอโซเลท PSR5631 มาจัดจำแนก โดยการศึกษาสัณฐานวิทยา พบว่าลักษณะโคโลนีมีขนาดเล็ก ขอบหยักเล็กน้อย โคโลนีนูนเยิ้ม โคโลนีมีสีนวล เมื่อนำมาย้อมแกรมพบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อน สร้างเอนโดสปอร์ และเมื่อวิเคราะห์หาลำดับเบสบริเวณ 16S rRNA พบว่า PSR5631 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Bacillus safensis* เท่ากับ 99.6% similarity ดังนั้นจึงระบุได้ว่าเป็นเชื้อ *B. safensis* สายพันธุ์ PSR5631

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

2.1 ผลของระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ

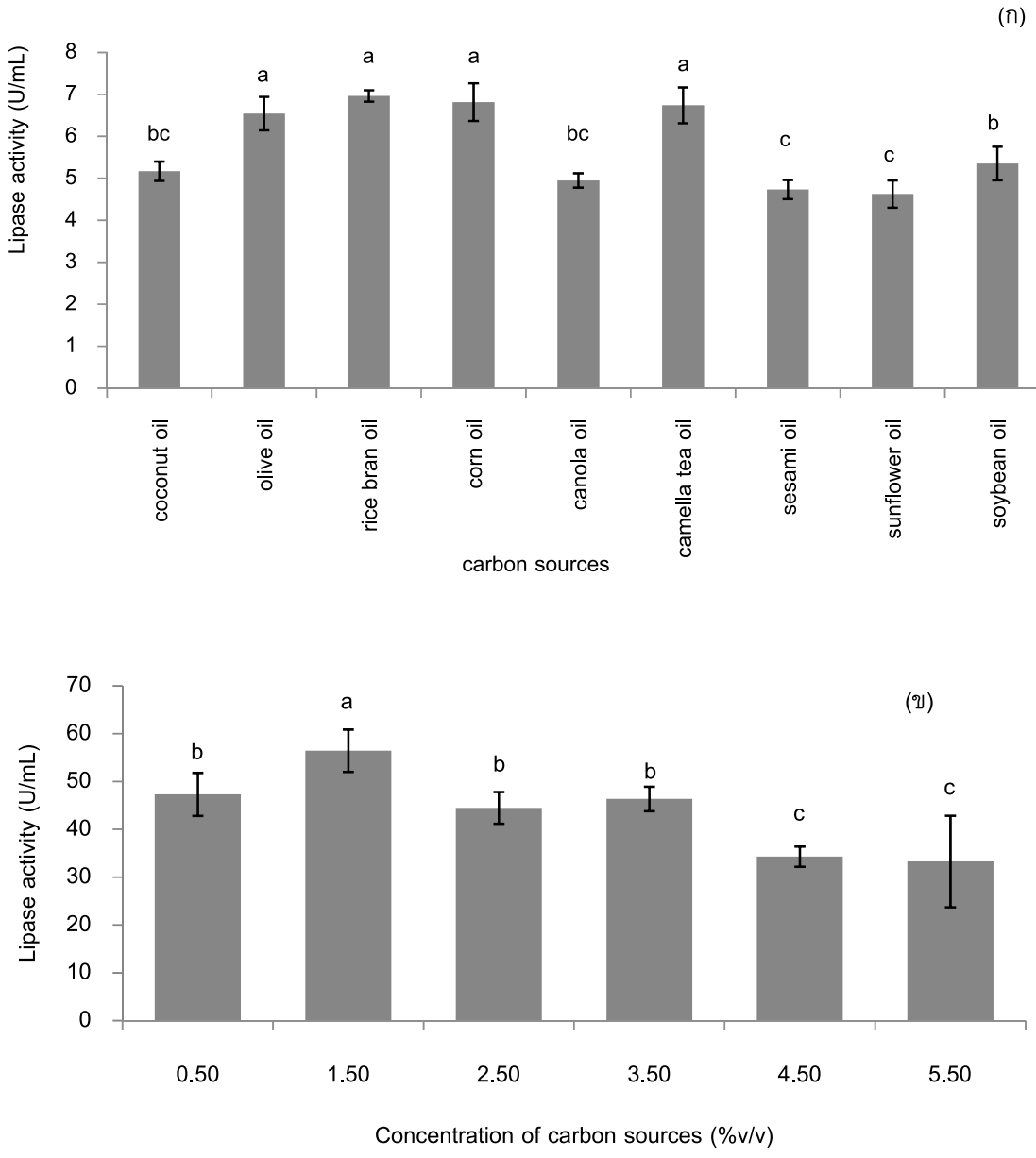
จากการศึกษาระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากสายพันธุ์ PSR5631 พบว่า ที่ระยะเวลา 60 ชั่วโมง โดยที่การเจริญของแบคทีเรียนั้นอยู่ในช่วงปลายของ stationary phase เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 7.18 U/mL และเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญของแบคทีเรียที่อยู่ในระยะ death phase (รูปที่ 1) จากงานวิจัยของ Ma และคณะ [5] ได้ทำการคัดแยกและระบุลักษณะของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสในมณฑลไหหลำ ประเทศจีน พบว่า *Burkholderia cepacia* ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 72 ชั่วโมง สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 10.5 U/mL ในขณะที่งานวิจัยของ Kaushik และคณะ [9] ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปส จากเชื้อ *Aspergillus carneus* โดยใช้ RSM จากการทดลองพบว่าที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 12.7 U/mL ส่วนงานวิจัยของ Marimuthu [10] พบว่าที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ส่งผลให้ *Staphylococcus hominis* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด คือ 17.8 U/mL



รูปที่ 1 การศึกษาระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *B. safensis* สายพันธุ์ PSR5631 (◆ Number of cell (log CFU/mL), ■ Lipase activity (U/mL))

2.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

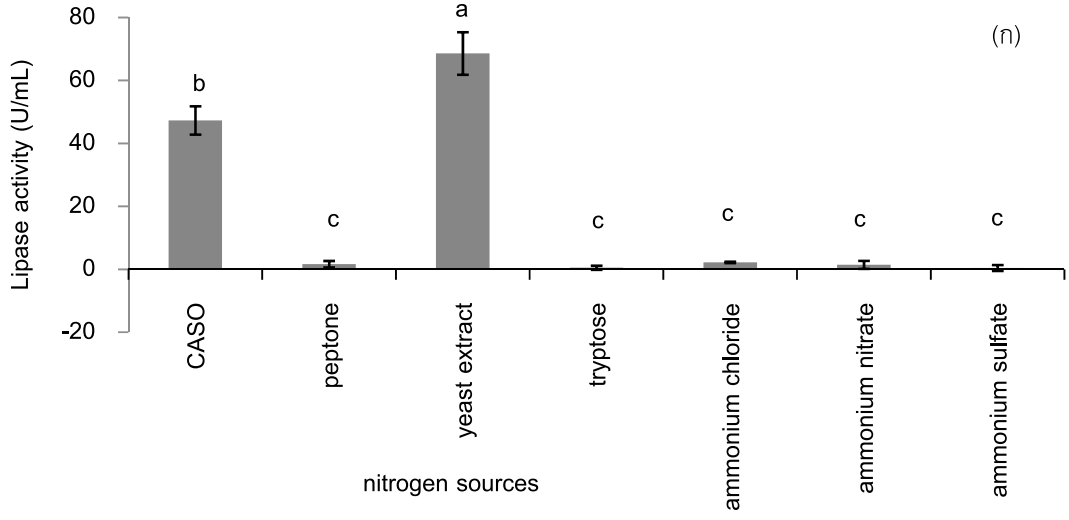
จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยสายพันธุ์ PSR5631 พบว่าแหล่งคาร์บอน เมื่อใช้น้ำมันรำข้าว น้ำมันข้าวโพด น้ำมันเมล็ดชาดอกคามิลเลีย และน้ำมันมะกอก สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่ากับ 6.94, 6.89, 6.71 และ 6.57 U/mL ตามลำดับ (รูปที่ 2ก) ดังนั้นจึงเลือกน้ำมันรำข้าวเป็นแหล่งคาร์บอนเนื่องจากมีราคาถูกกว่าน้ำมันที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสดังที่กล่าวมาข้างต้น ต่อมาทำการศึกษาความเข้มข้นของน้ำมันรำข้าว พบว่าที่ความเข้มข้น 1.5% (v/v) สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยผลิตเอนไซม์ได้ 56.45 U/mL รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 0.5% (v/v) และ 3.5% (v/v) ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่ากับ 47.32 และ 46.36 U/mL ตามลำดับ (รูปที่ 2ข) จากงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ไลเปส ซึ่งพบว่าชนิดและความเข้มข้นของคาร์บอนนั้น มีความแตกต่างกันไปซึ่งขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ เช่น งานวิจัยของ Hamid และคณะ [11] ทำการคัดแยกและระบุลักษณะของแบคทีเรียชอบร้อน ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในบริเวณบ่อน้ำพุร้อน ประเทศมาเลเซีย พบว่า *Bacillus* sp. สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงถึง 4.58 U/mL โดยใช้น้ำมันมะกอกความเข้มข้น 10% (v/v) เป็นแหล่งคาร์บอน แต่จากการทดลองของ Ma และคณะ [5] พบว่า *Burkholderia cepacia* สามารถใช้น้ำมันถั่วลิสงที่ความเข้มข้น 2% (v/v) ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 10.5 U/mL ส่วนการทดลองของ Burkert และคณะ [12] ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Geotrichum* sp. โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ factorial design โดยทำการออกแบบการทดลอง โดยนำระดับของปัจจัยทั้งหมดที่ต้องการศึกษามาใช้ในการออกแบบ จากการทดลองพบว่า เมื่อใช้น้ำมันถั่วเหลืองที่ความเข้มข้น 0.6% (v/v) เป็นแหล่งคาร์บอนสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 20 U/mL แต่เมื่อใช้น้ำมันมะกอกที่ความเข้มข้น 0.6% (v/v) สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เพียง 17 U/mL ซึ่งจากการทดลองพบว่าสามารถใช้น้ำมันรำข้าวผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงถึง 56.45 U/mL เมื่อใช้น้ำมันรำข้าวเพียง 1.5% (v/v) เท่านั้น

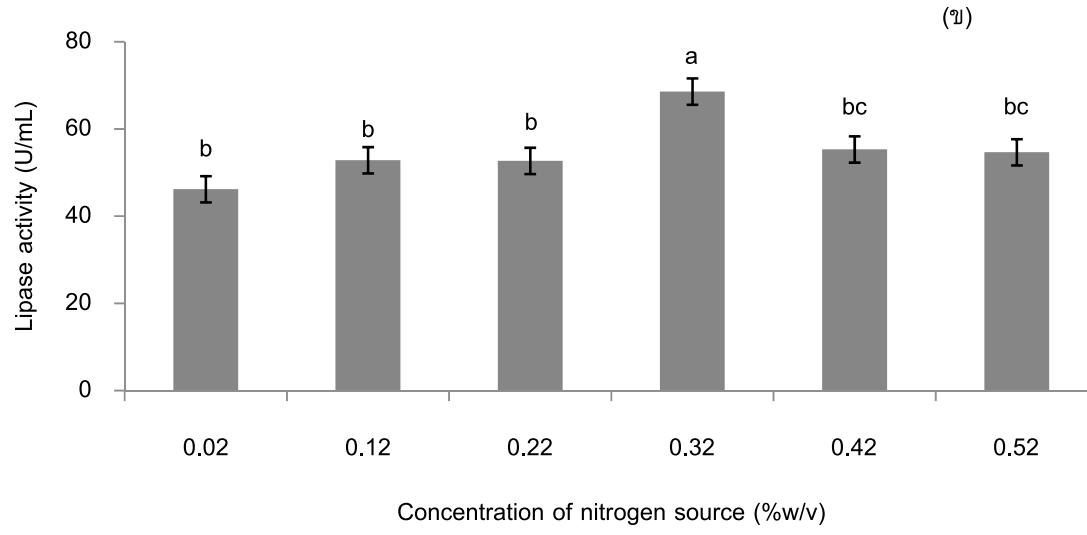


รูปที่ 2 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *B. safensis* สายพันธุ์ PSR5631 (ก) ชนิดของแหล่งคาร์บอน (ข) ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน โดยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในกราฟ แสดงให้เห็นความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองที่ $p < 0.05$

2.3 ผลของชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

จากการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์ไลเปส พบว่าสายพันธุ์ PSR5631 เมื่อใช้ yeast extract ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดอย่างมีระดับนัยสำคัญท่ากับ 68.60 U/mL (รูปที่ 3ก) ในขณะที่แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์นั้นสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในระดับที่ต่ำมาก ดังนั้นจึงเลือก yeast extract มาศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน พบว่าที่ความเข้มข้น 0.32% (w/v) สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่ากับ 68.60 U/mL (รูปที่ 3ข) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Marimuthu [10] พบว่าเมื่อใช้ yeast extract ที่ความเข้มข้น 0.5% (w/v) ส่งผลให้ *Staphylococcus hominis* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด คือ 19.5 U/mL แต่งานวิจัยของ Salihu และคณะ [13] ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea* ในโรงโม่น้ำมันปาล์ม พบว่าเมื่อใช้ peptone ที่ความเข้มข้น 0.45% (w/v) จะสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 20.26 U/mL เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Kaushik และคณะ [9] ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Aspergillus carneus* โดยใช้ RSM จากการทดลองพบว่าเมื่อใช้ peptone ที่ความเข้มข้น 0.8% (w/v) สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด คือ 12.7 U/mL ซึ่งจากการทดลองพบว่าสามารถใช้ yeast extract ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงถึง 68.60 U/mL เมื่อใช้สารสกัดจากยีสต์เพียง 0.32% (w/v) เท่านั้น

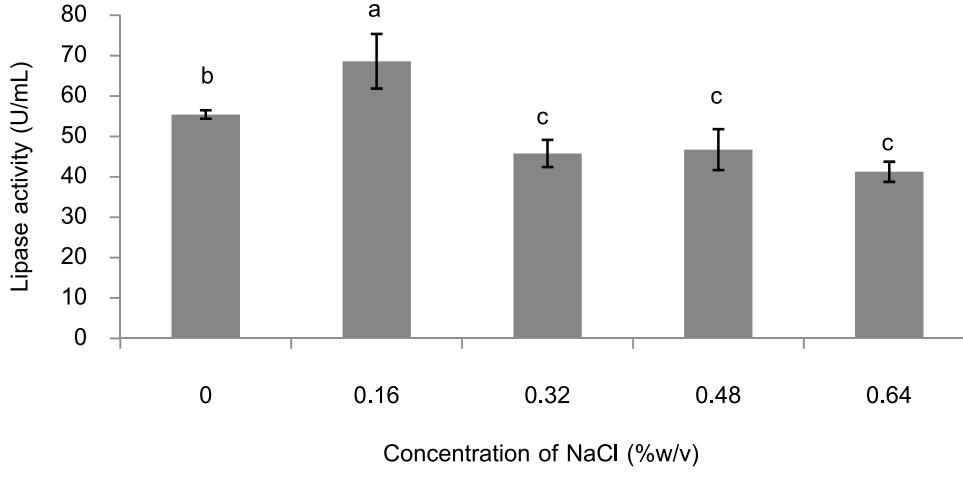




รูปที่ 3 การศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *B. safensis* สายพันธุ์ PSR5631 (ก) ชนิดของแหล่งไนโตรเจน (ข) ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน โดยจากตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในกราฟ แสดงให้เห็นความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองที่ $p < 0.05$

2.4 ผลของ NaCl

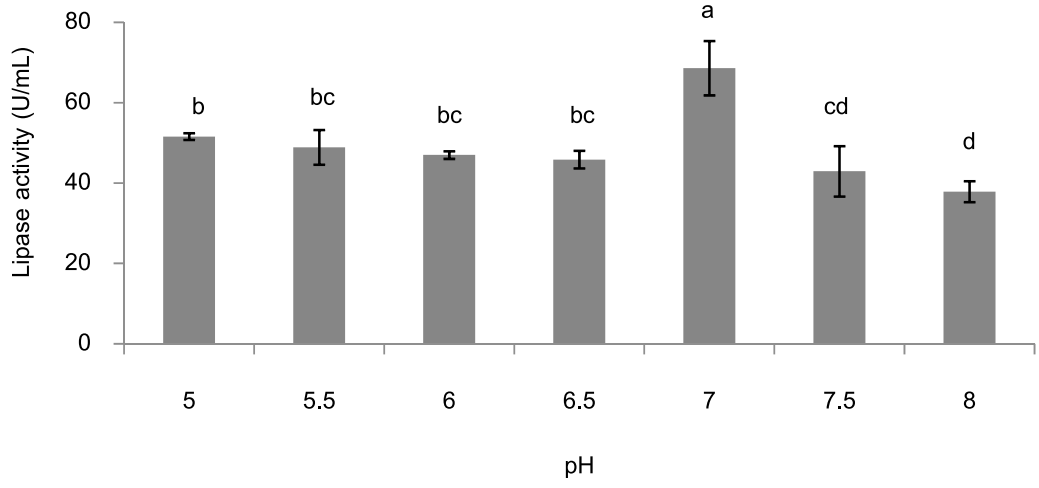
จากการศึกษาผลของ NaCl ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากสายพันธุ์ PSR5631 พบว่าที่ความเข้มข้น 0.16% (w/v) สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ PSR5631 เป็นสายพันธุ์ที่ต้องการ NaCl เพียงเล็กน้อยในการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไลเปส (รูปที่ 4) ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยของ Liu และคณะ [7] พบว่าเมื่อใช้ NaCl ที่ความเข้มข้น 0.16% (w/v) *Burkholderia* sp. C20 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดเท่ากับ 3.9 U/mL



รูปที่ 4 การศึกษาผลของความเข้มข้นของ NaCl ต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *B. safensis* สายพันธุ์ PSR5631 โดยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในกราฟ แสดงให้เห็นความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองที่ $p < 0.05$

2.5 ผลของ pH

จากการศึกษาผลของ pH ในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากสายพันธุ์ PSR5631 พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่ pH 7.0 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ PSR5631 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่เป็นกลาง นอกจากนี้สายพันธุ์ PSR5631 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ที่ช่วง pH ค่อนข้างกว้าง คือ pH 5-8 (รูปที่ 5) โดยที่งานวิจัยของ Marimuthu [11] พบว่าที่ pH 7.0 ส่งผลให้ *Staphylococcus hominis* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุด คือ 14.7 U/mL งานวิจัยของ Xing และคณะ [14] พบว่าที่ pH 8.0 *Pseudomonas* sp. ZBC1 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 19.5 U/mL ส่วนงานวิจัยของ Ma และคณะ [5] พบว่า *Burkholderia cepacia* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 10.5 U/mL ที่ pH 8.0 และงานวิจัยของ Liu และคณะ [7] พบว่าที่ pH 9.0 *Burkholderia* sp. C20 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่ากับ 3.9 U/mL

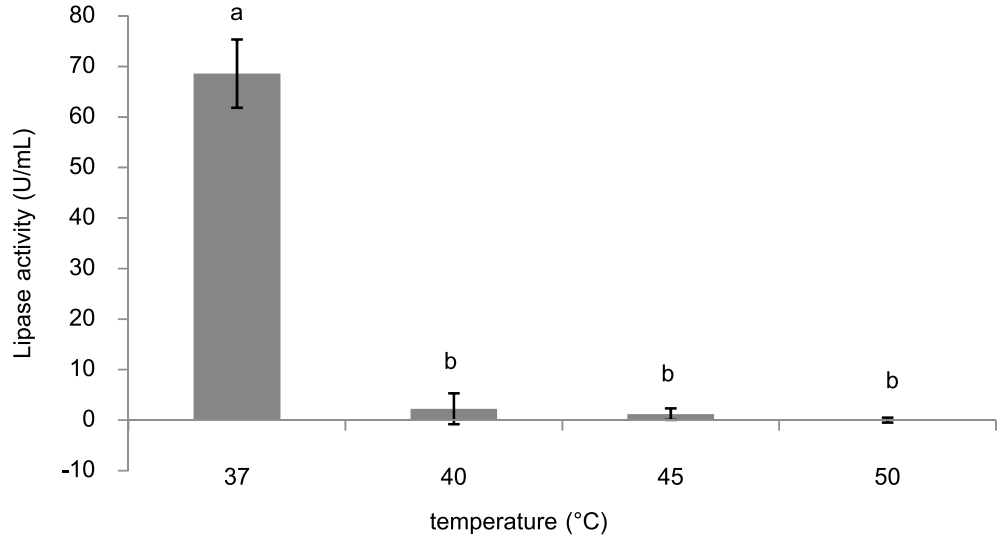


รูปที่ 5 การศึกษาผลของ pH ต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *B. safensis* สายพันธุ์ PSR5631 โดยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในกราฟ แสดงให้เห็นความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองที่ $p < 0.05$

2.6 ผลของอุณหภูมิ

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากสายพันธุ์ PSR5631 แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ PSR5631 เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม mesophile ชอบเจริญในที่มีอุณหภูมิปานกลาง และสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ดีที่สุดในอุณหภูมิ 37°C โดยพบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเป็น 45 และ 50°C ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไลเปสลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 6) จากงานวิจัยของ Ma และคณะ [5] พบว่า *Burkholderia cepacia* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 10.5 U/mL ที่อุณหภูมิ 37°C และงานวิจัยของ Kaushik และคณะ [9] พบว่า ที่อุณหภูมิ 37°C เชื้อ *Aspergillus carneus* สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 12.7 U/mL แต่ในขณะที่งานวิจัยของ Burkert และ

คณะ [12] พบว่า *Geotrichum* sp. ที่อุณหภูมิ 30°C สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงถึง 20 U/mL ส่วนงานวิจัยของ Liu และคณะ [7] *Burkholderia* sp. C20 ที่อุณหภูมิ 55°C สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เท่ากับ 3.9 U/mL และงานวิจัยของ Xing และคณะ [14] พบว่าที่อุณหภูมิ 80°C *Pseudomonas* sp. ZBC1 สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดคือ 19.5 U/mL



รูปที่ 6 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจาก *B. safensis* สายพันธุ์ PSR5631 โดยตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันในกราฟ แสดงให้เห็นความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละการทดลองที่ $p < 0.05$

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ PSR5631 ได้จากตัวอย่างดินซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงที่สุดบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว และเมื่อทำการจัดจำแนกแบคทีเรียไอโซเลทดังกล่าวพบว่ามีความคล้ายคลึงกับ *B. safensis* จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากสายพันธุ์ PSR5631 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสประกอบด้วย น้ำมันรำข้าว ความเข้มข้น 1.5% (v/v) yeast extract ความเข้มข้น 0.32% (w/v) NaCl ความเข้มข้น 0.16% (w/v) pH 7.0 ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 60 ชั่วโมง สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้สูงสุดอย่างมีระดับนัยสำคัญทางสถิติ คือ 68.60 U/mL

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่มอบทุนอุดหนุนทำปริญญานิพนธ์ ประจำปีงบประมาณ 2558 และได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.) ประจำปี 2556

เอกสารอ้างอิง

1. Wolisk, E., Rigo, E., Luccio, M. D., Oliveira, J.V., Oliveira, D. D., and Treichel, H. 2009. Production and Pratial Characterization of Lipase from a Newly Isolation *Penicillium* sp. using Experimental Design. *Letter in Applied Microbiology.* 49: 60-66.
2. Dutta, S., and Ray, L. 2009. Production and Characterization of an Alkaline Thermostable Crude Lipase from an Isolate Strain of *Bacillus cereus* C7. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 159: 142-154.
3. Almeida, A. F., Taulk-Tornisielo, S. M., and Carmona, E. C. 2013. Influence of Carbon and Nitrogen Sources on Lipase Production by a Newly Isolated *Candida viswanathii* strain. *Annals of Microbiology.* 63: 1225-1234.
4. Papagora, C., Roukas, T., and Kotzekidou, P. 2013. Optimization of Extracellular Lipase Production by *Debaryomyces hansenii* Isolated from Dry-salted Olives using Response Surface Methodology. *Food and Bioproducts Processing.* 91: 413-420.
5. Ma, Q., Sun, X., Gong, S., and Z. 2010. Screening and Identification of a Highly Lipolytic Bacterial Strain from Barbecue Site in Hainan and Characterization of Its Lipase. *Annals of Microbiology.* 60: 429-437.
6. Bai, N. S., Remadevi, O. K., Sasidharan, T. O., Balachander, M., and Dharmarajan, P. 2012. Cuticle Degradating Enzyme Production by some Isolates of the Entomopathogenic Fungus. *Metarhizium anisopliae (METSCH).* : 25-32.
7. Liu, C.-H., Lu, W.-B., and Chang, J.-S. 2006. Optimizing Lipase Production of *Burkholderia* sp. by Response Surface Methodology. *Process Biochemistry.* 41: 1940-1944.
8. Anbu, P., Noh M. J., Kim, D. H., Seo, J. S., Hur, B. K., and Min, K. H. 2011. Screening and Optimization of Extracellular Lipase by *Acinetobacter* speciec Isolation from Oil-contaminated Soil in South Korea. *African Journal of Biothechnology.* 10: 4147-4156.
9. Kaushik, R., Saran, S., Isar, J., and Saxena, R. K. 2006. Statistical Optimization of Medium Components and Growth Condition by Response Surface Methodology to Enhance Lipase Production by *Aspergillus carneus. Journal of Molecular Catalysis Enzymatic.* 40: 121-126.
10. Marimuthu, K. 2013. Isolation and Characterization of *Staphylococcus hominis* JX961712 from Oil-contaminated Soil. *Journal of Pharmacy Research.* 7: 252-256.

11. Hamid, N. S. A., Zen, H. B., Tein, O. B., Halofah, Halofah, Y. M., Saari, N., and Bakar, F. A. 2003. Screening and Identification of Extracellular Lipase-producing Thermophilic Bacteria from a Malaysian Hot Spring. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 19: 961-968.
12 Burkert, J.F. M., and Maugeri, F. 2004. Optimization of Extracellular Lipase Production by *Geotrichum* sp. using Factorial Design. *Bioresource Technology.* 91: 77-84.
13. Salihu, A., Alam, M. Z., Abdulkarim, M. I., and Salleh, H. M. 2012. Lipase Production: An insight in the Utilization of Renewable Agricultural Residues. *Resources, Conservation and Recycling.* 58: 36-44.
14. Xing, C., You-guang, P., Chen-xi, Z., Zhi-lin, R., Ming-xing, J., Yan, C., and Bu-chang, Z. 2013. Screening of Thermphile Neutral Lipase-producing *Pseudomonas* sp. ZBC1 and Improving Its Enzymatic Activity. *African Journal of Biotechnology.* 12(9): 949-957.

ได้รับบทความวันที่ 3 กันยายน 2558
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 29 ตุลาคม 2558