รหัสโครงการ SUT1-104-41-24-02

รายงานการวิจัย

การสำรวจหาความหลากหลายของแบคทีเรียในลำไส้ปลาทะเล *Scomber scombrus*

A Survey of Bacteria Diversity from the Intestine of *Scomber scombrus*

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาในการดำเนินการวิจัย และการวิเคราะห์ผลการวิจัย

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2545

บทคัดย่อภาษาไทย

จากการทำเจือจางสิ่งที่อยู่ในลำไส้ปลาซาบะ (*Scomber scombrus*) ด้วยน้ำทะเลปราศจากเชื้อ และนำเอามาเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวมารีนบรอท แยกเอาเฉพาะแบคทีเรียมาได้มากกว่า 600 ไอโซเลท ส่วนใหญ่ของแบคทีเรียที่แยกมาเป็นกรัมลบและมีรูปร่างเป็นแท่ง รายงานตอนแรกของหัวข้อการวิจัยนี้มุ่งเน้นการเลือกแบคทีเรียที่แยกมาซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยลิพิด โดยอาศัยจานอาหารที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน

ในจำนวน 4 ไอโซเลท ที่ทำให้เกิดวงใสรอบโคโลนีบนจานอาหารที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน เกลือน้ำดีเป็นอีมัลซิไฟเออร์ และเมทิลเรดเป็นตัวบ่งชี้ของพีเอช พบว่าสายพันธุ์ MB 616 ก่อให้เกิดวงใสใหญ่ที่สุด จากการศึกษาการสร้างเอนไซม์ไลเปสของ MB 616 ในอาหารเหลว พบว่าสายพันธุ์แบคทีเรียนี้มีแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 0.4 หน่วย/มิลลิลิตร ขณะที่เลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลา 54 ชั่วโมง

Abstract

The intestinal contents of the Atlantic mackerels (*Scomber scombrus*) were diluted with sterilized seawater and cultured in marine broth. More than 600 isolates of bacteria were collected. Most of them are Gram-negative and rod-shaped. For the first part of this project , we aimed at selecting some bacteria with lipolytic activity by using agar plate medium consisted of olive oil as a sole carbon source .

Among 4 isolates forming colonies with clear zone around them on agar plate medium consisted of olive oil as a sole carbon source with bile salt as emulsifier and methyl red as the pH indicator showed that the isolated strain MB 616 produced the largest clear zone. Studies on lipase production from MB 616 in liquid medium revealed that this strain exhibited the highest lipase activity of 0.4 U/ml at 54 h incubation.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
ปลาทะเล *Scomber scombrus*	4
ความหลากหลายของแบคทีเรียในลำไส้ปลาทะเล	5
การคัดสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปส	6
การหาแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปส	8
วิธีการหาแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปส	9
การเตรียมน้ำเลี้ยงเพื่อวัดแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปส	10
อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์	10
pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์	10
การคำนวณแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปส	11
บทที่ 3 ผลการวิจัย	12
อภิปรายผล	18
บทที่ 4 บทสรุป	21
บรรณานุกรม	22
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	24
ภาคผนวก ข	28
ภาคผนวก ค	29

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ง	31
ประวัติผู้วิจัย	32

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ความหลากหลายของแบคทีเรียในลำไส้ปลาทะเล 12

ตารางที่ 2 ผลการทดลองการเจริญของแบคทีเรียบนจานอาหารที่เติมและไม่เติมน้ำมันมะกอก 13

ตารางที่ 3 ผลการเจริญเปรียบเทียบกับค่าแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปสของ
สายพันธุ์แบคทีเรีย MB 616 15

ตารางที่ 4 การทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากสายพันธุ์แบคทีเรีย MB 616
ที่อุณหภูมิต่าง ๆ 17

ตารางที่ 5 การทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากสายพันธุ์แบคทีเรีย MB 616
ที่ pH ต่าง ๆ 18

สารบัญภาพ

		หน้า
รูปที่ 1	ปลาทะเล *Scomber scombrus*	4
รูปที่ 2	แสดงการทำเจือจางสิ่งที่อยู่ภายในลำไส้ปลาทะเล	5
รูปที่ 3	แสดงแผนการทดลอง เพื่อพิสูจน์ว่าน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งพลังงานของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส	7
รูปที่ 4	แสดงระยะเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสเพื่อเปรียบเทียบปริมาณ เอนไซม์ไลเปสที่ปล่อยออกมาของไอโซเลทบนจานอาหาร	8
รูปที่ 5	ไดอะแกรมแสดงขั้นตอนการหาแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปส	9
รูปที่ 6	แสดงวงใสบนจานอาหาร minimal agar ที่มีน้ำมันมะกอกเป็น แหล่งคาร์บอน	14
รูปกราฟที่ 7	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปส ของสายพันธุ์แบคทีเรีย MB 616	16
รูปกราฟที่ 8	แสดงการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากสายพันธุ์แบคทีเรีย MB 616 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ	17
รูปกราฟที่ 9	แสดงการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากสายพันธุ์แบคทีเรีย MB 616 ที่ pH ต่าง ๆ	18

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

ปลาแมคเคอเรลหรือรู้จักกันในชื่อปลาซาบะนั้น มีการศึกษาถึงแบคทีเรียในลำไส้ปลาซึ่งสามารถสร้าง Eicosapentaenoic acid และ Docosahexaenoic Acid (Yazawa *et al*, 1988; Yano *et al.*,1994) ซึ่งเป็นกรดไขมันจำเป็น (โอเมกา 3 สายยาว) ในปลาซาบะที่มีบทบาทสำคัญในการลดอัตราเสี่ยงต่อโรคหัวใจ ความดันโลหิต เบาหวาน โรคทางเดินหายใจ และโรคไขข้ออักเสบ (Sanders *et al.*, 1985; Kinsella, 1987; Kinsella, 1987; Simppoulos, 1990; Ackman *et al.*, 1991; Chavali and Forse, 1994) แม้ปลาทะเลจะกินเอาแบคทีเรียจำนวนมากที่ปนมากับน้ำ โคลน และอาหาร แต่ปลาทะเลเหล่านี้สามารถปกป้องตัวเองจากพวกแบคทีเรียโดยมีกรดในกระเพาะ มีกรดน้ำดี และเอนไซม์ไลโซไซม์จากลำไส้เล็ก รวมถึงระบบภูมิคุ้มกัน (Sera *et al.*, 1974) อย่างไรก็ดีมีแบคทีเรียบางชนิดที่มีความสามารถในการอยู่ติดกับผนังเยื่อเมือกของลำไส้ปลาทะเลได้ (Olsson *et al.*, 1992) ด้วยข้อมูลที่กล่าวมาทำให้สนใจจะศึกษาถึงความหลากหลายของแบคทีเรียในลำไส้ปลาซาบะ โดยพยายามรวบรวมสายพันธุ์แบคทีเรียที่พบในลำไส้ปลาซาบะเท่าที่ทำได้ และเริ่มการศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียเหล่านี้และเนื่องจากการตรวจหาแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสได้กระทำได้ไม่ยากนักในห้องปฏิบัติการ (Sangsoda *et al.*, 1993) จึงเลือกเอาคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ไลเปสของแบคทีเรียมาตรวจสอบกับแบคทีเรียในลำไส้ปลาซาบะ ปลาซาบะมีกรดน้ำมัน (fatty acids) ซึ่งสามารถตรวจสอบด้วยไลเปสจากตับอ่อน (Ackman *et al.*, 1991) สูงถึง 1.9 % การตรวจประชากรแบคทีเรียที่พบในปลาซาบะ (Fujii *et al.*, 1994) ระหว่างการเก็บภายใต้ความดันพบว่ามีแบคทีเรีย *Bacillus* sp. *Moraxella Pseudomonas I/II* และ *Flavobacterium* sp. ก่อนการให้ความดันและแบคทีเรียเหล่านี้สูญหายไปหลังจากเนื้อปลาสดถูกเก็บภายใต้ความดัน เนื้อปลาที่เก็บภายใต้ความดันกลับพบแบคทีเรีย coryneforms, *Staphylococus* sp. และ *Micrococcus* sp. จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียที่พบในเนื้อปลาซาบะมีชื่อจีนัส คล้ายแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสดังกล่าวข้างต้น เนื่องจากปลาซาบะประกอบด้วยน้ำมันค่อนข้างสูง จึงคาดหวังว่าน่าจะพบแบคทีเรียที่ผลิตไลเปสได้สูง ซึ่งมีรายงานว่า lipase ชนิด Pancreatic carboxyl ester lipase (CEL) (Lombardo *et al.*, 1996) สามารถลดอัตราความเสี่ยงต่อการเกิดการการอุดตันของเส้นเลือดโดยลดการเกิด oxidation ของ LDL (Low density lipoprotein) ในคน โดย CEL สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไขมันที่ดี (good fats) หรือ HDL (high density lipoprotein) และไขมันที่ร้าย (bad fats) หรือ LDL การศึกษาไลเปสจากแบคทีเรียที่ย่อยกรดน้ำมันจากปลาซาบะจะเพิ่มความเข้าใจถึงกลไกของไลเปสต่อ

การเกิดไขมันที่ดี (HDL) และไขมันที่ร้าย (LDL) ปัจจุบันความนิยมในการใช้เอนไซม์ไลเปสเพื่อประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมมีสูงขึ้น มีการนำเอนไซม์ไลเปสไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องหนัง ผงซักฟอก เครื่องสำอาง และยา เป็นต้น (Odera, 1986) ความเจริญเติบโตทางด้านอุตสาหกรรมส่งออกกระทบให้มีความต้องการเอนไซม์ไลเปสไปใช้ในด้านต่าง ๆ มากมาย แบคทีเรียเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ไลเปสที่สำคัญแหล่งหนึ่ง เริ่มมีการศึกษาอย่างกว้างขวางในแง่การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสในปริมาณสูง และทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่สามารถทำงานได้ดี ในระหว่างขั้นตอนการผลิตของโรงงานอุตสาหกรรมสามารถลดต้นทุนการผลิตได้และให้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดี

เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับ ไขมัน น้ำมัน หรือไตรกลีเซอไรด์ ปฏิกิริยาดังกล่าว ได้แก่ ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไขมัน น้ำมัน และไตรกลีเซอไรด์ ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชันของอัลกอฮอล์และกรดไขมัน และปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่างเทสเทอร์หรือไตรกลีเซอไรด์ต่าง ๆ การใช้เอนไซม์ไลเปสเร่งปฏิกิริยาเหล่านี้ส่งผลให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสูงและมีคุณค่าทางการค้ามากกว่าการเร่งปฏิกิริยาด้วยวิธีการทางเคมี ประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไลเปสจะขึ้นกับความจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสที่มีต่อสับสเตรทนั้น ๆ และตำแหน่งของการเกิดปฏิกิริยาของสับสเตรทนั้น (Brockerhoff, H. and Jensen, R.G. 1974)

แหล่งของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสพบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ได้แก่ พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้มีทั้งเชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ ได้แก่ แบคทีเรียจำพวก *Leptospira, Pseudomonas, Staphylococcus, Corynebacterium, Propionibacterium shermanii, Achromobacter lipolyticum, Alcaligenes* sp และ *Chromobacterium viscosum* ปัจจุบันมีการศึกษาเอนไซม์ไลเปสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียพวกที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงเรียกว่า เทอร์โมฟิลิกแบคทีเรีย (thermophilic bacteria) หรือเทอร์โมไฟล์ (thermophile) ซึ่งสามารถเจริญได้ดีในสภาวะอุณหภูมิระหว่าง 40-80°ซ. สามารถพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ในแหล่งน้ำและแหล่งดินตามธรรมชาติที่มีอุณหภูมิสูง เช่น ภูเขาไฟ น้ำพุร้อน และน้ำทะเลลึกที่มีอุณหภูมิสูง เป็นต้น

ในการศึกษาเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์ พบว่าในเชื้อเพียงสายพันธุ์เดียวสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้มากกว่า 1 ชนิด ตัวอย่างจุลินทรีย์เหล่านี้ เช่น รา *Penicillium cyclopium, Rhizopus delemar* และ *Mucor lipolyticus* เป็นต้น การที่แบคทีเรียเพียงสายพันธุ์เดียวสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้หลายชนิด เป็นผลมาจากการทำงานของยีนที่แตกต่างกันหรือจากการเปลี่ยนแปลง

โปรตีน Tsujisaka *et al.*, (1977) สามารถแยกเอนไซม์ไลเปสได้ 3 ชนิด คือ A, B และ C ซึ่งเป็นผลจากการเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus delemar* พบว่าหลังจากทำให้บริสุทธิ์แล้วเอนไซม์ไลเปส B และ C มีรูปแบบของโปรตีนต่างไปจาก A อย่างไรก็ตามแม้เป็นจุลินทรีย์ที่มีสายพันธุ์คล้ายกันมากก็ยังให้เอนไซม์ไลเปสที่ต่างชนิดกันได้ เช่น เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรีย *Pseudomonas fragi* และ *Pseudomonas nitroreducens* จะมีความคงทนต่ออุณหภูมิต่างกัน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาคุณสมบัติพื้นฐานของแบคทีเรียในลำไส้ของปลาทะเล สำรวจความหลากหลายของแบคทีเรียในลำไส้ปลาที่อาจจะมาประยุกต์ใช้ในเชิงอุตสาหกรรม โดยมุ่งเน้นหาแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้ต้องการสำรวจหาแบคทีเรียที่สามารถสร้างไลเปสในปริมาณสูง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เข้าใจธรรมชาติของแบคทีเรียกลุ่มที่อาศัยในลำไส้ปลาทะเล *Scomber scombrus*
2. เป็นการสำรวจเบื้องต้นเพื่อหาแบคทีเรียที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรม โดยเฉพาะความสามารถในการผลิตไลเปส
3. พัฒนาวิธีการหาปริมาณไลเปสด้วยเทคนิคที่เหมาะสมควบคู่กับเทคนิคดั้งเดิม (classic technique)

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

ปลาทะเล *Scomber scombrus*

รูปที่ 1 ปลาทะเล *Scomber scombrus*

ชื่อปลาทะเล *Scomber scombrus* มีชื่อภาษาไทยเรียกตามภาษาญี่ปุ่นว่า ปลาซาบะ

ชื่อสามัญภาษาอังกฤษว่า Atlantic Mackerel

ส่วนชื่อวิทยาศาสตร์(Scientific Classification) คือ *Scomber scombrus* (Linnaeus, 1758. Systema Naturae, ed. X:297 (Atlantic Ocean))

โดยมีชื่อวิทยาศาสตร์ที่พ้องซึ่งอธิบายโดยนักวิทยาศาตร์ต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

Scomber scomber Brünnich,

Scomber vernalis Mitchill,

Scomber vulgaris S.D.W.,

Scomber scriptus Couch,

นอกจากนี้ยังมีชื่อสามัญอื่นดังนี้ - mackerel, common mackerel, Boston mackerel;

ภาษาอาเรเบีย : scomber;	ภาษาเดนมาร์ก : almindelige, makrel;
ภาษาดัชท์ : gewone makrel;	ภาษาฝรั่งเศส : maquereau;
ภาษาเยอรมัน : makrele;	ภาษาอิตาเลียน : lacerta, macarello;
ภาษาญี่ปุ่น : hirasaba, marusaba	ภาษานอร์เวย์ : makrell;
ภาษาปอตุเกต : cavalla;	ภาษาสเปน : caballa;
ภาษาสวีเดน : makrill;	ภาษาตุรกี : uskumru.

ปลาซาบะอยู่ในตระกูล Scombridae family ขนาดของปลาประมาณ 14-18 นิ้ว เป็นปลาที่ว่ายน้ำเร็ว สามารถอยู่ในน้ำลึก ชอบอยู่เป็นฝูง มีความสำคัญทั้งการจูงใจให้เยี่ยมชมและทางการค้า เป็น

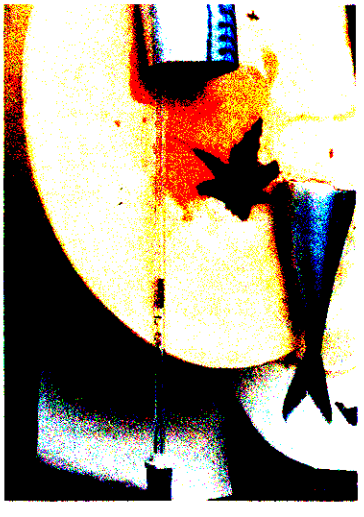
เป็นปลาที่บริโภคอาหารมากและเร็ว บางเวลาเกือบไม่พบปลาพวกนี้ แต่บางขณะพบเป็นจำนวนมาก เป็นฝูง ๆ เป็นปลาที่มีรสชาติอร่อย เป็นแหล่งโปรตีน วิตามิน เกลือแร่ มีน้ำมันมาก เนื้อแน่น ส่วนใหญ่ขายสด ๆ และแช่แข็ง ตัวอย่างของปลาที่ใช้ในการทดลองนี้ได้มาจากห้างสรรพสินค้า Makro โคราช และจาก 2 ร้านในตลาดสดข้างห้างสรรพสินค้านอรีสท์โคราช เก็บตัวอย่าง 3 ครั้ง ๆ ละ 5 ตัว จากแต่ละแหล่ง 3 แหล่ง

ความหลากหลายของแบคทีเรียในลำไส้ปลาทะเล

ฉีดน้ำทะเล (เก็บจากบ้านเพ จ.ระยอง) ที่ปราศจากเชื้อ 1 มิลลิลิตรเข้าไปเจือจางสิ่งที่อยู่ภายในลำไส้ปลาทะเล ดูดสารละลายนั้นกลับเข้าสู่ปิเปต นำสารละลายดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว มารีนบรอท (Marine broth) 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เลี้ยงที่ 30°ซ. นำเอา culture ที่ได้มาทำเจือจางด้วยน้ำทะเลปลอดเชื้อที่ความเข้มข้น 10^{-4}, 10^{-5} เกลี่ยสารละลายความเข้มข้นดังกล่าว 0.2 มิลลิลิตร บนจานอาหาร Marine agar บ่มจานอาหารที่ 30°ซ. เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

สุ่มเลือกโคโลนีเฉพาะแบคทีเรียที่แยกกัน เก็บโดยให้หมายเลขลำดับหลังอักษร MB ซึ่งย่อมาจาก marine bacteria ตัวอย่างโคโลนีแบคทีเรียที่เก็บ 640 ไอโซเลท

สุ่มเลือกไอโซเลทของแบคทีเรียมา 100 ไอโซเลท นำมาย้อมสี methylene blue (0.002%) และย้อมสีกรัม (วิธีย้อมสีดูในภาคผนวก ข) และนำมาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (หัวน้ำมัน) สังเกตและบันทึกผลการติดสีกรัม ตรวจสอบรูปร่างแบคทีเรีย

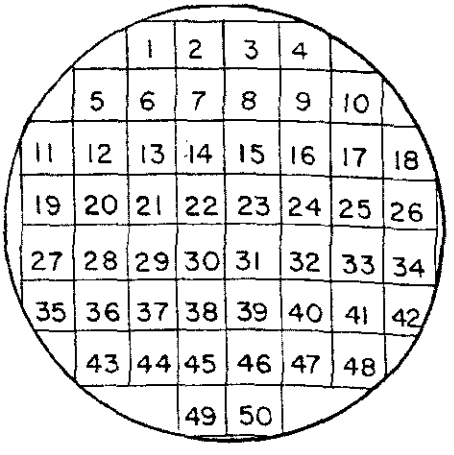


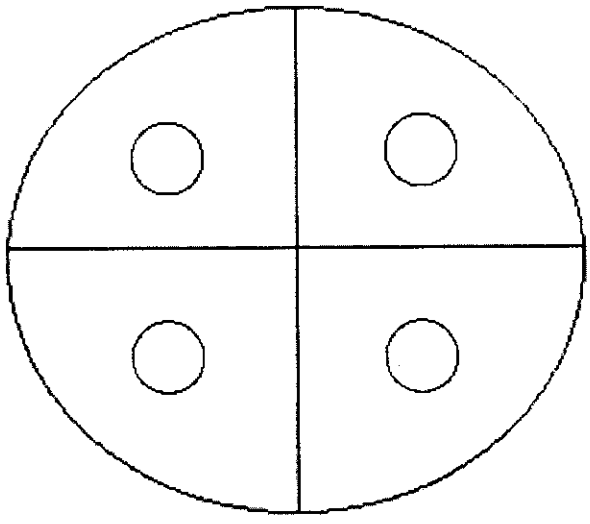
รูปที่ 2 แสดงการทำเจือจางสิ่งที่อยู่ภายในลำไส้ปลาทะเล

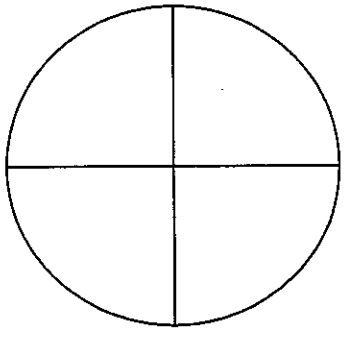
การคัดสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปส

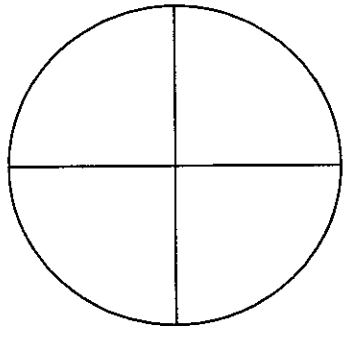
ขั้นตอนแรกเป็นการหาจานอาหารสูตรใดเหมาะสมที่จะใช้เป็น minimal salts โดยนำไอโซเลททั้ง 640 ไอโซเลทที่แยกมา smear บนจานอาหาร marine agar (ดูภาคผนวก) จานละ 50 ไอโซเลทโดยรองจานด้วยแผ่นภาพแสดงขอบเขตของวงโคโลนีดังแสดงในรูปข้างล่างนี้ บ่มจานอาหารที่ 30°ซ. เป็นเวลา 36 ชั่วโมง อาศัยผ้ากำมะหยี่ปลอดเชื้อและบล็อกโลหะถ่ายแบบ(อาศัยเทคนิคreplica plating ดูจากภาคผนวก)จานละ 50 ไอโซเลท บนจานอาหารขั้นต่ำ (minimal medium) ที่มีและไม่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้สูตรอาหาร minimal salts 9 สูตร นำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่สภาวะอุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจดูผลการเจริญของแบคทีเรีย

จานอาหารสูตรใดที่แบคทีเรียเจริญเฉพาะบนจานที่เติมน้ำมันมะกอกแสดงว่าแบคทีเรียเหล่านั้นสามารถย่อยน้ำมันมะกอกได้หรือสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ สูตรอาหาร minimal salts สูตรนั้นเหมาะสมที่ใช้ตรวจสอบว่าไอโซเลทที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ ในการเปรียบเทียบว่าไอโซเลทใดสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้มากน้อยแตกต่างกันนั้น ใช้สูตรอาหาร minimal salts ที่เหมาะสม เติม methyl red 0.01% (w/v) และ bile salt No. 3 (Difco) 0.005% ซึ่งแต่ละจานถูกแบ่งออกเป็น 4 ส่วน smear บนจานอาหารmarine agarที่รองด้วยแผ่นภาพแสดงขอบเขตของวงโคโลนีดังแสดงในรูปข้างล่างนี้ บ่มจานอาหารที่ 30°ซ. เป็นเวลา 36 ชั่วโมง อาศัยผ้ากำมะหยี่ปลอดเชื้อและบล็อกโลหะถ่ายแบบ(อบนจานอาหารขั้นต่ำ (minimal medium) ที่มีและไม่มีน้ำมันมะกอก(ใช้เป็นcontrol experiment บนจานนี้แบคทีเรียไม่เจริญและไม่มีวงใส)เป็นแหล่งคาร์บอน นำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่สภาวะอุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจดูผลการเจริญของแบคทีเรียที่ให้วงใส(อันเนื่องมาจากกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นทำให้pHเปลี่ยน)ทั้ง 4ไอโซเลทเปรียบเทียบเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสในแต่ละจานเนื่องจากความหนาของวุ้นอาหารใกล้เคียงกันในแต่ละจาน









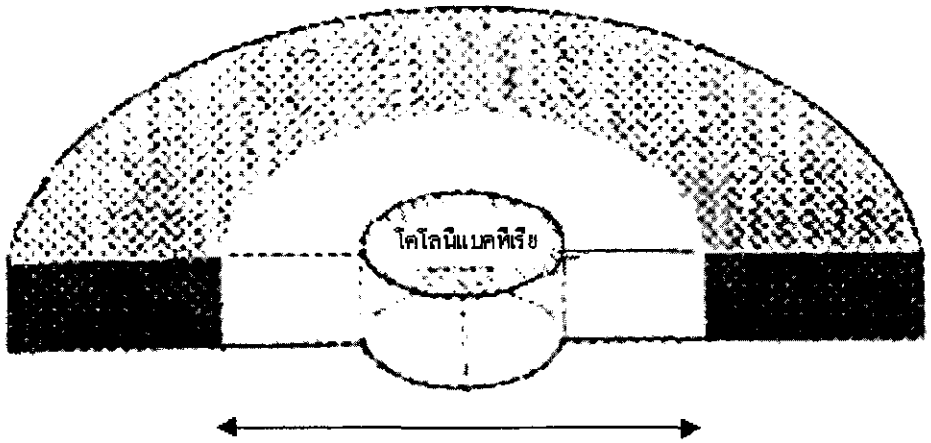
จานอาหารขั้นต่ำที่
ไม่มีน้ำมันมะกอก

จานอาหารขั้นต่ำ
ที่มีน้ำมันมะกอก

บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30°ซ.
เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตรวจดูผลการเจริญของแบคทีเรีย

รูปที่ 3 แสดงแผนการทดลองเพื่อพิสูจน์ว่าน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน
ของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสทำให้เกิดวงใส



รูปที่ 4 แสดงระยะเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสเพื่อเปรียบเทียบปริมาณเอนไซม์ไลเปสที่ปล่อยออกมาของไอโซเลทบนจานอาหาร

การหาแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปส

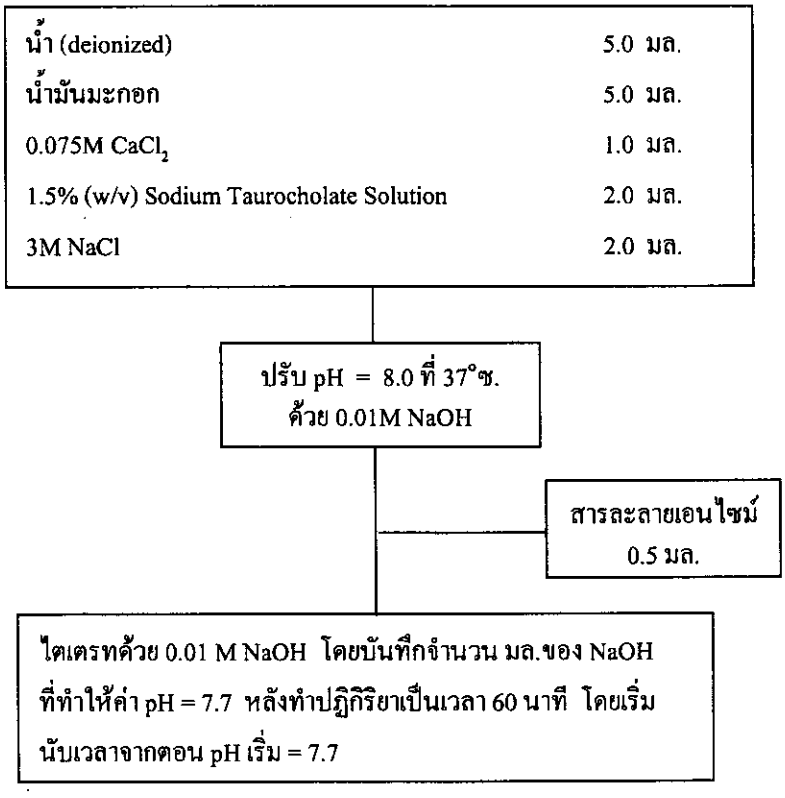
การหาแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปสนั้นมักขึ้นกับชนิดของปฏิกิริยาที่ไลเปสเร่ง เช่น การใช้ไลเปสเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส มักตรวจสอบปริมาณกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้น สรุปวิธีการใหญ่ ๆ ได้ 2 วิธี (Beisson F., Tiss A., Riviere C., Verger R., 2000) ดังต่อไปนี้

1. วิธีทางฟิสิกส์-เคมี (Physico-chemical methods) แยกออกเป็น
   1.1 การหายไปของสารตั้งต้น (Disappearance of substrate) เช่น การวัดความขุ่น (turbidimetry)
   1.2 การเกิดผลลัพท์ของปฏิกิริยา (Appearance of hydrolytic reaction products) เช่น การไตเตรท (trtrimetry) การวัดสี (colourimetric assays)
2. วิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยา (Immunological methods) เช่น ELISA สำหรับเอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์

การวัดแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปส ในการทดลองนี้ได้เลือกชุด Enzymatic Assay of Lipase (EC 3.1.1.3) ของ Sigma Quality Control Test อธิบายโดย Worthington, C.C., 1988 ซึ่งเป็นวิธีการไตเตรท (titrametry) วิธีหนึ่ง โดยมี phenolpthalein เป็น pH indicator

วิธีการหาแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปส

ใส่น้ำมันมะกอก 5.0 มิลลิลิตร ในน้ำ deionized 5.0 มิลลิลิตร 0.075M $CaCl_2$ 1.0 มิลลิลิตร สารละลาย sodium taurocholate 1.5% (w/v) 2.0 มิลลิลิตร และ 3M NaCl 2.0 มิลลิลิตร ลงใน flask ขนาด 150 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เท่ากับ 8.0 ด้วย 0.01M NaOH บ่มที่ 37°ซ. เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm เป็นเวลา 60 นาที โดยนับจากเวลาที่สารละลายทำปฏิกิริยาทั้งหมด มี pH 7.7 ไตรเตรทหาปริมาตรกรดไขมันอิสระที่เกิดขึ้นด้วย 0.01M NaOH บันทึกจำนวนมิลลิลิตรของ 0.01M NaOH คำนวณหาแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปส สรุปเป็นขั้นตอนตาม ไดอาแกรมดังต่อไปนี้



รูปที่ 5 ไดอะแกรมแสดงขั้นตอนการหาแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปส

1 <u>หน่วยเอนไซม์</u> คือ ปริมาณเอนไซม์ที่จำเป็นในการไฮโดรไลซ์ให้ได้กรดไขมันอิสระ 1 μ mol ต่อหนึ่งหน่วยนาที

การเตรียมน้ำเลี้ยงเพื่อวัดแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปส

ก. ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ไอโซเลท 1 loop จาก slant culture ลงในอาหารเหลวที่เหมาะสม 10 มิลลิลิตร เพื่อใช้เลี้ยงเป็น overnight culture ในขวดขนาด 25 มิลลิลิตร ที่ 30°ซ. เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง

ข. ถ่ายเชื้อจาก overnight culture ด้วย pipette ที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหารใหม่ 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงที่ 30°ซ. เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm

ค. วัดการดูดกลืนของแสงหรือความขุ่นของเซลล์ในน้ำเลี้ยงเชื้อทุก ๆ 6 ชั่วโมง โดยใช้ Spectronic 21ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร โดยใช้อาหารนั้นเป็นตัวปรับศูนย์

ง. นำน้ำเลี้ยงที่เก็บได้มาปั่นแยกเซลล์โดย centrifuge ที่ 10,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที เก็บ supernatant ไว้ตรวจหาแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปส

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์

นำน้ำเลี้ยงที่ปั่นแยกเซลล์มาศึกษาแอคทีวิตีเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 4° 10° 20° 30° และ 40° ซ. โดยใช้ crude enzyme 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ไตเตรทหาแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปส และนำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปสและอุณหภูมิ

pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

ก. การเตรียมบัฟเฟอร์

- 0.15 M acetate buffer pH 4.6 และ 5.6

บัฟเฟอร์ pH 4.6 เตรียมโดยชั่ง sodium acetate 0.504 กรัม glacial acetic acid 0.51 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 4.6 ด้วย 6M HCl ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

- 0.15M phosphate buffer pH 6.6, 7.2 และ 8.2

บัฟเฟอร์ pH 6.6 เตรียมโดยชั่ง dipotassium hydrogen phosphate 0.523 กรัม potassium dihydrogen phosphate 1.630 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 6.6 ด้วย 6M NaOH ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

บัฟเฟอร์ pH 7.2 เตรียมโดยชั่ง dipotassium hydrogen phosphate 1.306 กรัม potassium dihydrogen phosphate 1.020 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7.2 ด้วย 6M NaOH ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

บัฟเฟอร์ pH 8.2 เตรียมโดยชั่ง dipotassium hydrogen phosphate 2.376 กรัม potassium dihydrogen phosphate 0.185 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8.2 ด้วย 6M NaOH ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

- 0.15M carbonate buffer pH 9.2

บัฟเฟอร์ pH 9.2 เตรียมโดยชั่ง disodium carbonate 0.144 กรัม sodium dydrogen carbonate 1.146 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 9.2 ด้วย 6M HCl ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

นำน้ำเลี้ยงที่ปั่นแยกเซลล์ 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารละลาย 0.15 M ของบัฟเฟอร์ pH ต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ pH 4.6 6.6 7.2 8.2 และ 9.2 บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ. 1 ชั่วโมง หาแอคทีวิตีของไลเปส และนำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างแอคทีวิตีของไลเปสและ pH

การคำนวณแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปส

จากการกำหนดให้ 1 หน่วยเอนไซม์ (U) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่จำเป็นในการไฮโดรไลซ์ให้ได้กรดไขมันอิสระ 1 μ mol ต่อหนึ่งหน่วยนาที และจากการทราบความเข้มข้นที่แน่นอนของ KOH ที่ใช้ไตเตรท และความแตกต่างของปริมาตร NaOH ที่ใช้ไตเตรท ระหว่างสารตัวอย่างและใน blank เป็นมิลลิลิตร นำมาคำนวณหาแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปสได้โดยให้

ความเข้มข้นของสารละลาย NaOH = 0.01 M

ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ไตเตรทกรดไขมันอิสระ = 10.0 มิลลิลิตร

$\therefore$ จำนวน μ mol ของ NaOH ที่ถูกใช้ในการไตเตรท $= \frac{0.01 \times 10^6 \times 10}{1{,}000}$

$= 100$ μ mol

จากการใช้เอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร ทำปฏิกิริยานาน 60 นาที

$\therefore$ แอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปส $= \frac{100}{0.5 \times 60}$

$= 3.33$ U/ml

ดังนั้นแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปสจึงมีค่า 3.33 หน่วยต่อปริมาณเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร

บทที่ 3
ผลการวิจัย

ผลการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในลำไส้ปลาทะเล

จากการสุ่มย้อมสี methylene blue และย้อมสีกรัมของของแบคทีเรีย 100 ไอโซเลท จาก 640 ไอโซเลท และตรวจสอบรูปร่างแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Compound microscope ได้ผลสรุปดังนี้

ตารางที่ 1 ความหลากหลายของแบคทีเรียในลำไส้ปลาทะเล

รูปร่างของแบคทีเรียและย้อมสีกรัม	จำนวนไอโซเลท
กลม (coccus) กรัมบวก [1]	12
diplococcusกรัมบวก [2]	10
staphylococcus กรัมบวก [3]	9
vibrio กรัมลบ [4]	6
แท่ง (bacillus) กรัมลบ [5]	63

หมายเหตุ

1. รูปร่างแบคทีเรีย coccus เซลล์มีรูปร่างกลม เซลล์เดี่ยว เมื่อย้อมสีกรัมติดสีน้ำเงิน
2. diplococcus เซลล์มีรูปร่างกลม 2 เซลล์ติดกัน เมื่อย้อมสีกรัมติดสีน้ำเงิน
3. staphylococcus เซลล์มีรูปร่างกลม เซลล์อยู่ติดกันเป็นรูปคล้ายพวงองุ่น เมื่อย้อมสีกรัมติดสีน้ำเงิน
4. vibrio เซลล์มีรูปร่างแท่งสั้น แต่รูปร่างโค้งเล็กน้อย เซลล์เดี่ยว เมื่อย้อมสีกรัมติดสีแดง
5. bacillus เซลล์มีรูปร่างแท่ง เซลล์เดี่ยว เมื่อย้อมสีกรัมติดสีแดง

ผลการคัดสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปส

จากการทดลองใช้สูตร minimal salts หลายสูตร (ดูภาคผนวก) โดยมีน้ำมันมะกอก (0.5%) เป็นแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 2 ผลการทดลองการเจริญของแบคทีเรียบนจานอาหารที่เติมและไม่เติมน้ำมันมะกอก

สูตรอาหาร	ผลการตรวจสอบการเจริญ	
	ไม่เติมน้ำมันมะกอก	เติมน้ำมันมะกอก
สูตรอาหารที่ 1	+	+
สูตรอาหารที่ 2	+	+
สูตรอาหารที่ 3	+	+
สูตรอาหารที่ 4	+	+
สูตรอาหารที่ 5	+	+
สูตรอาหารที่ 6	−	+
สูตรอาหารที่ 7	−	+
สูตรอาหารที่ 8	−	+ +
สูตรอาหารที่ 9	−	+ + +

+++= เจริญมาก ++ = เจริญปานกลาง + =เจริญน้อย − = ไม่เจริญ

จากตารางแสดงให้เห็นว่าสูตร minimal salts ที่เอื้อให้มีการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้ของปลาทะเลที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ได้แก่สูตรอาหารที่ 6-9 และสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบว่าไอโซเลทใดสามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้มากน้อยแตกต่างกันนั้นได้แก่

สูตรอาหาร Minimal salts ที่ 9 (ดูภาคผนวก)

(ต่อ 100 มิลลิลิตร น้ำทะเล)

NH_4Cl	0.5	กรัม
NH_4NO_3	0.1	กรัม
Na_2SO_4 anhydrous	0.2	กรัม
K_2HPO_4 anhydrous	0.3	กรัม
KH_2PO_4	0.1	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
น้ำมันมะกอก	0.5	มิลลิลิตร

ดังนั้นในการเลือกคัดสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสจึงใช้สูตรอาหาร minimal agar ซึ่งมี minimal salts ดังที่แสดงข้างบนนี้ และเติม methyl red 0.01% (w/v) และ bile salt No. 3 (Difco) 0.005%

สำหรับสูตรอาหาร minimal broth เพื่อเตรียมน้ำเลี้ยงสำหรับวัดแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปส นั้นมี minimal salts ตามสูตรข้างบนเช่นเดียวกัน

ในการเลือกคัดสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปส ปรากฏว่าจานอาหารที่ไม่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นไม่พบการเจริญของแบคทีเรีย แสดงว่า bile salt ไม่สามารถเป็นแหล่งคาร์บอนได้

ได้เลือกไอโซเลทที่ก่อให้เกิดวงใสรอบโคโลนีบนจานอาหาร minimal medium ดังกล่าวข้างบนจาก 640 ไอโซเลท ได้ไอโซเลทที่ก่อให้เกิดวงใสรอบโคโลนี 18ไอโซเลท เลือก 4 ไอโซเลท ที่ก่อให้เกิดวงใสรอบโคโลนีดังต่อไปนี้

	MB 3-1	เส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส	1.2	เซนติเมตร
	MB 23	เส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส	1.2	เซนติเมตร
	MB 433	เส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส	1.0	เซนติเมตร
และ	MB 616	เส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส	1.5	เซนติเมตร

ทั้ง 4 ไอโซเลท นำเอามา smear อยู่ในจาน petri-dish เดียวกัน ดังนี้

รูปที่ 6 แสดงวงใสบนจานอาหาร minimal agar ที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน

ผลการศึกษาเพื่อหาแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปส

จากการคัดเลือกไอโซเลทแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสโดยใช้จานอาหาร minimal agar ซึ่งมี minimal salts ดังที่แสดงข้างบน และมีน้ำมันมะกอก 0.5% methyl red 0.01% (w/v) bile

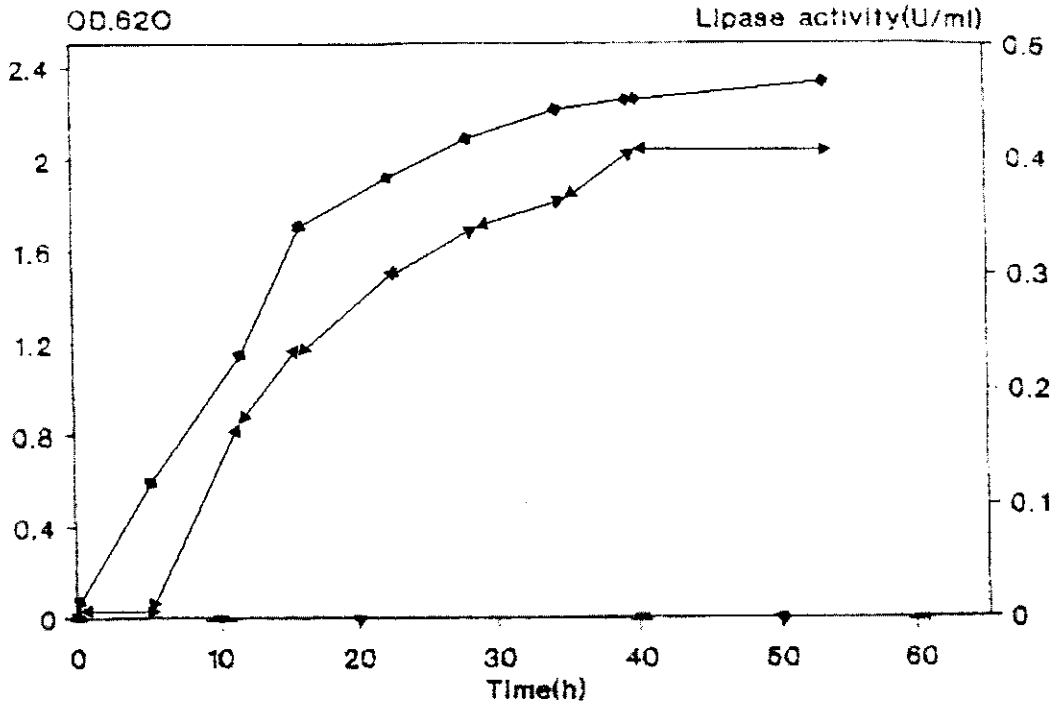
No.3 (Difco) 0.005% แสดงว่าสายพันธุ์แบคทีเรียทั้ง 4 สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ เอนไซม์ไลเปสต้องถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) มิฉะนั้นแบคทีเรียเหล่านี้ไม่สามารถเจริญบนจานอาหารนี้ได้ อย่างไรก็ดีจากวิธีการดังกล่าวไม่สามารถระบุถึงค่าแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปสที่สร้างจากสายพันธุ์แบคทีเรียที่เลือกมาได้

นำเอาสายพันธุ์แบคทีเรีย MB616 ที่ได้จากการคัดเลือกโดยใช้จานอาหาร minimal agar ที่มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนที่ก่อให้เกิดวงใสรอบโคโลนีที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสยาวที่สุด โดยถ่ายเชื้อสายพันธุ์แบคทีเรีย MB616 1 loop จาก slant culture ลงในอาหารเหลว marine broth 10 มิลลิลิตร เพื่อใช้เลี้ยงเป็น overnight culture ในขวดขนาด 25 มิลลิลิตร ที่ 30°ซ. เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง จากนั้นนำ overnight culture มาถ่ายเชื้อด้วย pipette ที่ฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหาร minimal broth 100 มิลลิลิตร ที่มี minimal salts เหมือนจานอาหารที่ใช้คัดเลือกไอโซเลทแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสและมีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน ปรับ pH เท่ากับ marine broth (pH=7.6) minimal broth 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงที่ 30°ซ. เขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm

วัดค่าการดูดกลืนแสงหรือความขุ่นของเซลล์ (OD.620) โดยใช้ Spectronic 21 เป็นระยะ เพื่อติดตามการเจริญของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับค่าแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปสที่ 30°ซ.

ตารางที่ 3 ผลการเจริญของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับค่าแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปสของสายพันธุ์แบคทีเรีย MB616

เวลา (ชั่วโมง)	ความขุ่นของเซลล์ OD.620	NaOH ที่ใช้ไตรเตรท (เข้มข้น 0.01 M) (ml)	แอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปส (U/ml) ที่ 30°ซ.
0	0.05	0.0	0.0
6	0.65	0.0	0.0
12	1.20	0.5	0.16
18	1.75	0.7	0.23
24	1.94	0.8	0.26
30	2.16	1.0	0.33
36	2.20	1.1	0.36
42	2.30	1.2	0.40
54	2.35	1.2	0.40



รูปกราฟที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ (♦——♦) และแอคทีวิตีของ
เอนไซม์ไลเปส (◄——►) ของสายพันธุ์แบคทีเรีย MB616

ผลการศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไลเปสที่ได้จากสายพันธุ์แบคทีเรีย MB616

การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับค่าแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปสของสายพันธุ์แบคทีเรียMB616 ทำให้ทราบว่าแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปสมีค่าค่อนข้างคงที่โดยประมาณเมื่อเลี้ยงสายพันธุ์แบคทีเรีย MB616 ตามสภาวะข้างต้นเป็นเวลา 60 ชั่วโมง

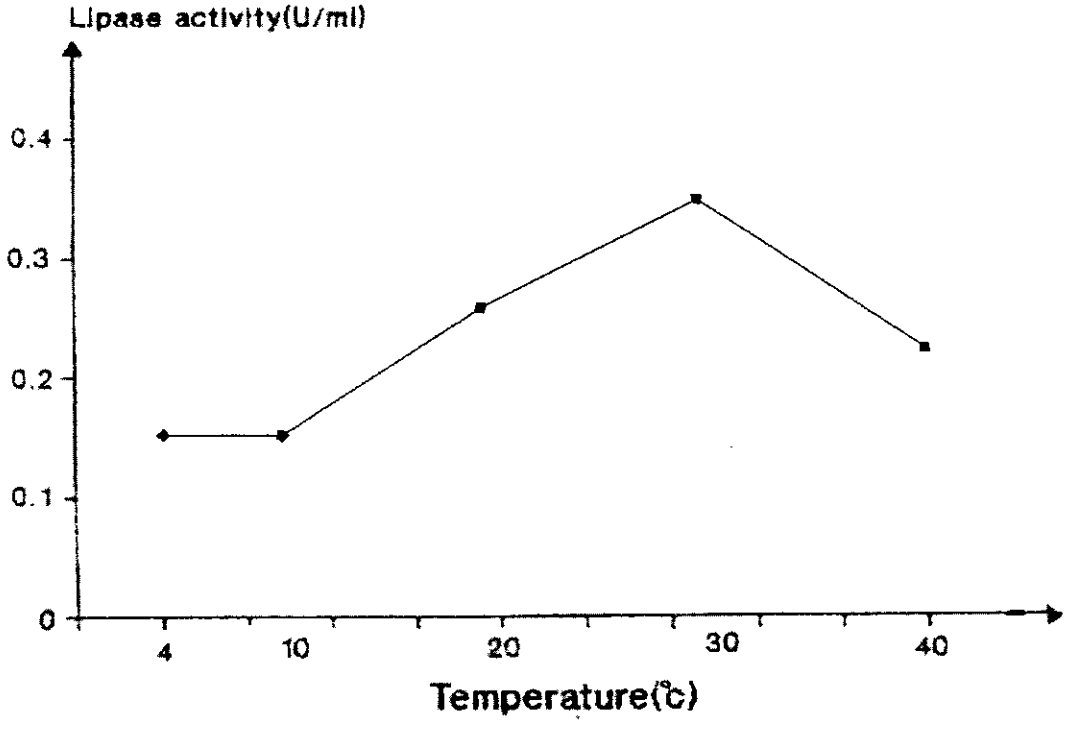
นำน้ำเลี้ยงที่เก็บได้มาปั่นแยกเซลล์โดย centrifuge ที่ 10,000 rpm. เป็นเวลา 10 นาที เมื่อเลี้ยงสายพันธุ์แบคทีเรีย MB616 ตามสภาวะข้างต้นเป็นเวลา 60 ชั่วโมง มาศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ ได้แก่ อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์

ผลอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์

นำน้ำเลี้ยงที่ปั่นแยกเซลล์มาศึกษาแอคทีวิตีเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้แก่ 4° 10° 20° 30° และ 40°ซ. โดยใช้ 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ไตเตรทหาแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปส และนำข้อมูลที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปสและอุณหภูมิ

ตารางที่ 4 การทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากสายพันธุ์แบคทีเรีย MB616 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิ (°ซ.)	แอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปส (U/ml)
4	0.16
10	0.16
20	0.26
30	0.33
40	0.23



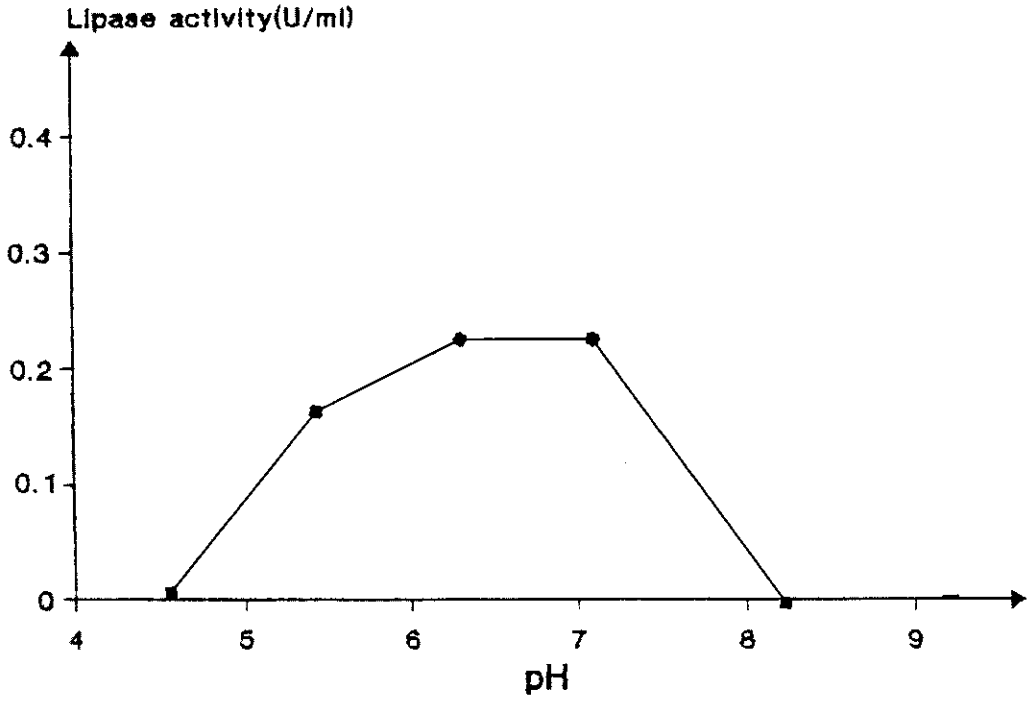
รูปกราฟที่ 8 แสดงการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากสายพันธุ์แบคทีเรีย MB616 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ผล pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์

นำน้ำเลี้ยงที่ปั่นแยกเซลล์มาศึกษาแอคทีวิตีเอนไซม์ไลเปสที่ pH ต่าง ๆ ได้แก่ 4.6 5.6 6.6 7.2 8.2 และ 9.2 โดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากสายพันธุ์แบคทีเรีย MB616 ที่ pH ต่าง ๆ

pH	แอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปส (U/ml)
4.6	0.0
5.6	0.16
6.6	0.23
7.2	0.23
8.2	0.0
9.2	0.0



รูปกราฟที่ 9 แสดงการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากสายพันธุ์แบคทีเรีย MB616 ที่ pH ต่าง ๆ

อภิปรายผล

การสุ่มเลือกไอโซเลทของแบคทีเรียมา 100 ไอโซเลท นำมาย้อมสี methylene blue และย้อมสีกรัม (วิธีย้อมสีกรัม ดูในภาคผนวก ง) และนำมาดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope) เพื่อตรวจสอบหาความหลากหลายของแบคทีเรียในลำไส้ปลาทะเล ปรากฏได้รูปร่างแตกต่างกันเพียง 5 ชนิดนั้นอาจมีสาเหตุมาจากตัวอย่างของปลาทะเลที่นำมาศึกษาอยู่ในสภาพเยือกแข็งทำให้สูญเสีย

แบคทีเรียบางกลุ่มไป นอกจากนี้การเลี้ยงแบคทีเรียจากลำไส้ปลาทะเลใช้ marine broth เพียงอย่างเดียว อาจทำให้แบคทีเรียบางกลุ่มไม่สามารถเจริญได้อันเนื่องมาจากต้องการอาหารแตกต่างไปจาก marine broth ปัจจัยอีกหลายประการซึ่งเป็นสาเหตุให้ได้ชนิดของความหลากหลายของแบคทีเรียในลำไส้ปลาทะเลดังปรากฏในผลการทดลอง เช่น กลุ่มแบคทีเรียบางกลุ่มที่เจริญช้ากว่ากลุ่มอื่น บางกลุ่มของแบคทีเรียอาศัยเวลาในการเจริญเป็นสัปดาห์ขึ้นไป กลุ่มแบคทีเรียบางกลุ่มไม่เจริญที่อุณหภูมิ 30°ซ. กลุ่มแบคทีเรียบางกลุ่มไม่เจริญที่ pH ของ marine broth (pH = 7.6)

เป็นไปได้ที่กลุ่มแบคทีเรียแท่ง (bacillus) กรัมลบ ซึ่งเป็นพวกที่พบมากที่สุดมีการปรับตัวให้เข้ากับระบบนิเวศของลำไส้ปลาทะเล กลุ่มแบคทีเรียพวกนี้หลังจากการตรวจสอบการเคลื่อนที่ (motile) โดยแทงลงในอาหารกึ่งแข็ง (semi-solid) ปรากฏว่าส่วนใหญ่มีการเคลื่อนที่ การเคลื่อนที่ดังกล่าวแสดงถึงว่ากลุ่มแบคทีเรียพวกนี้อาจมีระยางค์ช่วย ระยางค์เหล่านี้อาจช่วยให้กลุ่มแบคทีเรียพวกนี้เหมาะสมที่จะอาศัยในระบบนิเวศของลำไส้ปลาทะเล

สำหรับการเลือกคัดสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสโดยใช้สูตรอาหาร minimal agar ซึ่งมี minimal salts ที่เหมาะสมดังที่แสดงข้างบนนี้ และมี methyl red 0.01% (w/v) และ bile salt No.3 (Difco) 0.005% การใช้ bile salt เป็น emulsifier เพื่อให้ลิพิดของน้ำมันมะกอกแตกตัวให้เอนไซม์ไลเปสย่อย ส่วน methyl red เป็น pH indicator 4.2-6.3 ทำให้เกิดสีแดง-สีเหลือง ตามลำดับ แบคทีเรียที่เจริญบนจานอาหารนี้สามารถปล่อยเอนไซม์ไลเปสออกมาย่อยน้ำมันมะกอกซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ แสดงว่าแบคทีเรียเหล่านี้สร้างเอนไซม์ไลเปสชนิด extracellular enzyme ถ้าลิพิดถูกไฮโดรไลซ์ได้กรดไขมันอิสระทำให้ pH ลดลงเป็นกรด methyl red จึงทำให้เกิดสีแดงรอบโคโลนี

สำหรับการหาแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปสจากสายพันธุ์แบคทีเรีย MB616 ซึ่งก่อให้เกิดวงใสใหญ่ที่สุด สภาวะในการเลี้ยงเชื้อนั้นพยายามให้ใกล้เคียงกับตอนแยกเอาไอโซเลทมาด้วย marine broth โดยให้อาหาร minimal broth มี pH = 7.6 เท่า pH ของ marine broth และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซ. ได้ค่าแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปสของสายพันธุ์แบคทีเรีย MB616 ในน้ำเลี้ยงซึ่งปั่นแยกเซลล์ออกสูงสุดที่ 0.4 หน่วย/มิลลิลิตร ขณะที่เลี้ยงต่อเนื่องเป็นเวลา 54 ชั่วโมง ซึ่งถือได้ว่ามีค่าแอคทีวิตีของเอนไซม์ไลเปสในระดับพอใช้ แต่ไม่สูงมากพอที่จะใช้พัฒนาไปผลิตใช้ในเชิงอุตสาหกรรมได้ทันที อย่างไรก็ดีน่าศึกษาต่อไปว่าเอนไซม์ไลเปสชนิดนี้เจาะจงการย่อยsubstrateชนิดใด เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในเชิงอุตสาหกรรมบางอย่างเช่นช่วยย่อยไขมันที่ไม่ต้องการในเชิงการค้าเพื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของกรดไขมันจำเป็นที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์เช่นโอเมกา 3สายยาว สำหรับปริมาณเอนไซม์สามารถเพิ่มได้โดยการโคลนจีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ไลเปสนี้ถ้าเอนไซม์นี้มีประโยชน์ในเชิงการค้า

สำหรับผลการศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไลเปส โดยศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากสายพันธุ์แบคทีเรีย MB616 นั้น ปรากฏว่าเอนไซม์ไลเปสทำงานได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ pH ประมาณ 7 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไลเปสของสายพันธุ์แบคทีเรีย MB616 เป็นชนิด neutral lipase

บทที่ 4
บทสรุป

การสุ่มเลือกไอโซเลทของแบคทีเรียมา 100 ไอโซเลท นำมาย้อมสี methylene blue และย้อมสีกรัมได้รูปร่างแตกต่างกันเพียง 5 ชนิด แบคทีเรียแท่ง (bacillus) กรัมลบ ซึ่งเป็นพวกที่พบมากที่สุด ส่วนอีก 4 กลุ่ม ได้แก่ กลม (coccus) กรัมบวก diplococcus กรัมบวก staphylococcus กรัมบวก และ vibrio กรัมลบ สำหรับการเลือกคัดสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสโดยใช้สูตรอาหาร minimal agar มีน้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอน จาก 640 ไอโซเลท พบว่ามี 18 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญบนจานอาหารคัดเลือกโดยมีสายพันธุ์ MB616 ก่อให้เกิดวงใสมีเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส 1.5 เซนติเมตร

สำหรับผลการศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไลเปส โดยศึกษาอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไลเปสจากสายพันธุ์แบคทีเรีย MB616 นั้น ปรากฏว่าเอนไซม์ไลเปสทำงานได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 30°ซ. และ pH ประมาณ 7

ในการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบว่าแบคทีเรียที่อาศัยในทางเดินอาหารของปลาทะเลชนิดนี้มีหลากหลายชนิด แม้หน้าที่ของแบคทีเรียเหล่านี้ยังไม่เป็นที่เข้าใจมากนัก อย่างน้อยมีเอกสารการวิจัยระบุว่าแบคทีเรียชนิดหนึ่งในพวกนี้ทำหน้าที่สังเคราะห์กรดไขมันจำเป็นพวก โอเมกา 3 สายยาว และในงานวิจัยนี้ได้ระบุถึงแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ สำหรับแนวทางประยุกต์ใช้แบคทีเรียเหล่านี้ทางอุตสาหกรรมนั้นนอกจากจะปรับปรุงสายพันธุ์ MB616 ให้สร้างเอนไซม์ไลเปสได้มีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยวิธีพันธุวิศวกรรมแล้วอาจตรวจสอบว่าแบคทีเรียที่แยกได้นี้มีสายพันธุ์ใดที่เหมาะสมใช้เป็นที่จะใช้เป็น probiotics เช่นสามารถสังเคราะห์กรดไขมันจำเป็นโอเมกา 3 สายยาวให้กับบุคคลที่ไม่สามารถเปลี่ยนกรดไขมันไลโนลิอิคจากน้ำมันพืชให้เป็นน้ำมันปลาได้

สำหรับการพัฒนาวิธีการหาปริมาณไลเปสด้วยเทคนิคที่เหมาะสมควบคู่กับเทคนิคดั้งเดิมนั้นได้พยายามหาsubstrate ที่เหมาะสมกว่าน้ำมันมะกอกเช่น 1,2 diglyceride และ 1(3)-o-alkyl-2,3(3,2)- diacyl glycerols ปรากฏว่าผลการทดลอง ยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าsubstrateเหล่านี้เหมาะสมมากกว่าน้ำมันมะกอกอย่างที่คาดหวัง

บรรณานุกรม

1. Ackman R.G., Orozco, V.R., and Ratnayake, W.M.N. 1991. Aspects of Positional Distribution of Fatty Acids in Triacylglycerols of Skin White and Dark muscle of Mackerel (*Scomber scombrus*) in Relation to Hypertension. *Fett Wissenschaft Technologie*, 93 : 447-450.
2. Beisson F., Tiss A., Riviere C., Verger R. 2000. Methods for Lipase Detection and Assay: a Critical Review, European Journal Lipid Science Technology, 2000 : 133-153.
3. Brockerhoff, H., and Jensen, R.G. 1974. Lipolytic Enzymes. Academic Press, New York. 139-167.
4. Chavali, S.R., and Forse, R.A. 1994. The Role of Ω-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Immune. *In* Forse, R.A., Bell, S.J., Blachburn, G.L., and Kabbash, L.G. Eds., CRC press, Ann Arbor, pp.179-186.
5. Fujii,T., Satomi, M., Nakatsuka, G., Yamaguchi, T., and Okuzumi, M. 1994. Changes in Freshness Indexes and Bacterial Flora during Storage of Pressurized Mackerel. *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, 35 : 195-200.
6. Kinsella, J.E. 1987. Dietary Fats and Cardiovascular Disease. *In* Kinsella, J.G., Eds., Seafoods and Fishoils in Human Health and Disease. Marcel Dekker, Inc., New York., pp.1-23.
7. Kinsella, J.E. 1987. The Effects of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Consumption on the Plasma, Platelet, Vessel Wall, and Erythrocyte Characteristics of Human Subjects in Feeding trials. *In* Seafoods and Fish Oils in Human Health and Disease. Kinsella, J.E. Eds., Marcel Dekker, Inc, New York, pp. 41-105.
8. Lombardo, D., Morel, D.W., and Fisher, E.A. 1996. Parcreatic Carboxyl Ester Lipase : A Circulating Enzyme that Modifies Normal and Oxidized Lipoproteins *in vitro*. *Journal of Clinical Investigation*, 97 : 1696-1704.
9. Odera, M., Takeuchi, K., and Toh-e, A. 1986. Molecular Cloning of Lipase Genes from *Alcoligenes denitrificans* and Their Expression in *Escherichia coli*, *Fermentation Technology*, 64: 363-371.
10. Olsson, J.C., Westerdahl,A., Conway,P.L., and Kjelleberg, S. 1992. Intestinal Colonization Potential of Turbot (*Scaphthalmus maxima*) and dub (*Limanda limanda*) associated

Bacteria with Inhibitory Effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ Microbiol.*, 58 : 551-556.

11. Sanders, T.A.B., Sullivan, D.R., Reeve, J., and Thompson, G.R. 1985. Triglyceride Lowering Effect of Marine Polyunsaturates in Patients with Hypertriglyceridemia. *Arteriosclerosis*, 5 : 459-465.

12. Sangsoda, S., Maneerat. S., Kanasawad, P., and Phutrakul, S. 1993. Specific Plate for Isolation of Bacteria Producing Lipases. The 5th Annual Meeting of Thai Society for Biotechnology, 25-27 November 1993.

13. Simppoulos, A.P. 1990. Omega-3 Fatty Acids in Growth and Development. *In*: Omega-3 Fatty Acids in Health and Disease. *In* Lees, R.S. and Karel, M., Eds., Marcel Dekker, Inc., New York pp.115-156.

14. Sera H., Ishida. Y., and Kadota, H. 1974 . Bacteria Flora in the Digestive Tracts of Marine Fish. *In* Colwell R.R. and Morita, R.Y.(ed), Effect of the Ocean Environment on Microbial Activities, University Park Press. Baltimore, Md., pp. 467-490.

15. Tsujisaka, S., Okumura, S., and Iwai, M. 1977 Glyceride Synthesis by Four Kinds of Microbial Lipases, *Biochem. Biophys. Acta.*, 489 : 415-422.

16. Worthington, C.C. 1988. *In* Worthington Enzyme Manual (Worthington, C.C. ed.), Worthington Biochemical Corporation, Freehold, NJ, pp. 212-214.

17. Yano, Y., Nakayama,A., Saito, H., and Ishihara, K., 1994. Production of Docosahexaenoic Acid by Marine Bacteria isolated from Deep Sea Fish. *Lipids*, 29(7) : 527-528.

18. Yazawa, K., Araki, K., Noriko, O., Watanabe, K., Ishikawa, C., Inoue, A., Numao, N., and Kondo, K. 1988. Production of Eicosapentaenoic Acid by Marine Bacteria. *Journal of Biochem*, 103 : 5-7.

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลอง

อาหารสูตร 1 (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

Base mixture	10	มิลลิลิตร
Yeast extract	0.25	กรัม
Tryptone	0.25	กรัม
น้ำทะเล	89.5	มิลลิลิตร
น้ำมันมะกอก	0.5	มิลลิลิตร

อาหารสูตร 2 (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

Base mixture	10	มิลลิลิตร
0.2 M Phosphate buffer pH 7.2	10	กรัม
Yeast extract	0.25	กรัม
Tryptone	0.25	กรัม
น้ำทะเล	79.5	มิลลิลิตร
น้ำมันมะกอก	0.5	มิลลิลิตร

อาหารสูตร 3 (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

Base mixture	20	มิลลิลิตร
0.2 M Phosphate buffer pH 7.2	10	กรัม
Yeast extract	0.25	กรัม
Tryptone	0.25	กรัม
น้ำทะเล	69.5	มิลลิลิตร
น้ำมันมะกอก	0.5	มิลลิลิตร

อาหารสูตร 4 (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

Base mixture	10	มิลลิลิตร
0.2 M Phosphate buffer pH 7.2	20	กรัม
Yeast extract	0.25	กรัม
Tryptone	0.25	กรัม
น้ำทะเล	69.5	มิลลิลิตร
น้ำมันมะกอก	0.5	มิลลิลิตร

อาหารสูตร 5 (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

Base mixture	10	มิลลิลิตร
0.2 M Phosphate buffer pH 7.2	10	กรัม
Nutrient broth	0.25	กรัม
น้ำทะเล	79.5	มิลลิลิตร
น้ำมันมะกอก	0.5	มิลลิลิตร

อาหารสูตร 6 M63 (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

KH_2PO_4	1.36	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	0.2	กรัม
$FeSO_4.7H_2O$	0.05	มิลลิกรัม
น้ำทะเล	99.5	มิลลิลิตร
น้ำมันมะกอก	0.5	มิลลิลิตร

ปรับ pH เท่ากับ 7.0 ด้วย KOH

อาหารสูตร 7 M9 (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

Na_2HPO_4	0.6	กรัม
KH_2PO_4	0.3	กรัม
NaCl	0.05	กรัม
NH_4Cl	0.1	กรัม
น้ำทะเล	99.5	มิลลิลิตร
น้ำมันมะกอก	0.5	มิลลิลิตร

เติมสารละลาย 0.01 M $CaCl_2$ 10 มิลลิลิตร หลัง autoclave

อาหารสูตร 8 Minimal A (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

K_2HPO_4	1.05	กรัม
KH_2PO_4	0.45	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	0.1	กรัม
Sodium citrate. $2H_2O$	0.05	กรัม
น้ำทะเล	99.5	มิลลิลิตร
น้ำมันมะกอก	0.5	มิลลิลิตร

อาหารสูตร 9 Minimal salts B (ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

NH_4Cl	0. 5	กรัม
NH_4NO_3	0.1	กรัม
Na_2SO_4 anhydrous	0.2	กรัม
K_2HPO_4 anhydrous	0.3	กรัม
KH_2PO_4	0.1	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
น้ำทะเล	99.5	มิลลิลิตร
น้ำมันมะกอก	0.5	มิลลิลิตร

นำอาหารทุกชนิดที่เตรียมได้ไปทำไร้เชื้อ โดยใช้หม้อนึ่งอัดไอน้ำที่ความดัน 1 kg/cm^3 อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที

Marine Broth 2216 (Difco Laboratories Detroit, MI)

ส่วนประกอบต่อลิตร	
Na Cl	19.45 กรัม
$MgCl_2$	8.8 กรัม
Peptone	5.0 กรัม
Na_2SO_3	3.24 กรัม
$CaCl_2$	1.8 กรัม
Yeast extract	1.0 กรัม
KCl	0.55 กรัม
$NaHCO_3$	0.16 กรัม
Ferric citrate	0.1 กรัม
KBr	0.08 กรัม
$SrCl_2$	0.03 กรัม
H_3BO_3	0.02 มิลลิกรัม
Na_2HPO_4	8.0 มิลลิกรัม
Na_2SiO_3	4.0 มิลลิกรัม
NaF	2.4 มิลลิกรัม
NH_4NO_3	1.6 มิลลิกรัม
pH 7.6 M ที่ 25°ซ.	

Marine agar 2216 เติม agar 1.5%

ภาคผนวก ข

ย้อมสี methylene blue

ใช้สีย้อม methylene blue 0.002 % (w/v) Sigma M-1459

วิธีการย้อมสีแบบกรัม

มีขั้นตอนดังนี้

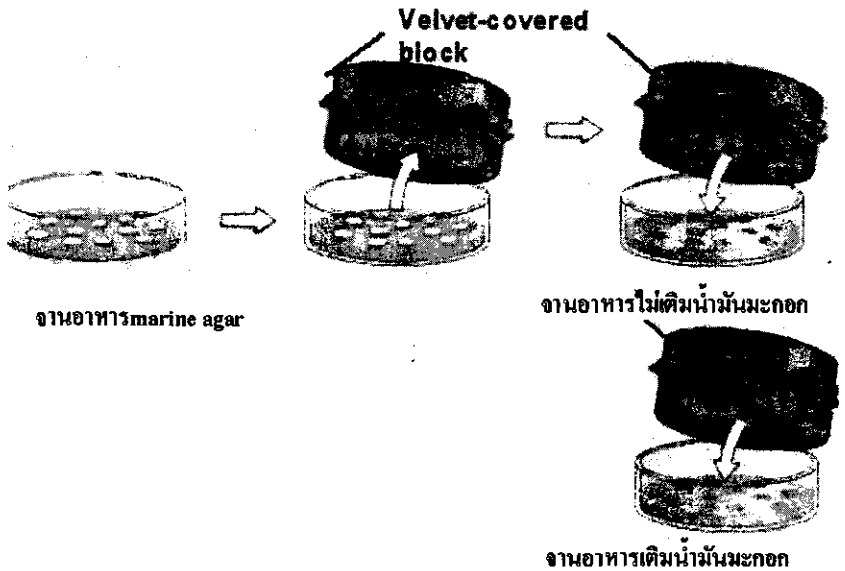
1. ใช้ห่วงลวดที่ฆ่าเชื้อแล้ว โดยการลนกับเปลวไฟจากตะเกียงบุนเสน นำไปแตะเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบมาผสมกับหยดน้ำบนสไลด์ที่สะอาด
2. ละเลง (smear) เชื้อที่อยู่บนสไลด์ให้กระจายออกเป็นบริเวณรอบ ๆ
3. ปล่อยสไลด์ทิ้งไว้ในอากาศให้แห้ง (air dry)
4. ทำให้แบคทีเรียติดแน่นบนสไลด์โดยความร้อน (heat-fixed) โดยนำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟอ่อน ๆ จากตะเกียงบุนเสน ถ้าลนไฟนานเกินไปจะทำให้เซลล์ไหม้ ลองเอาสไลด์แตะบนหลังมือ ถ้าสไลด์อุ่น ๆ แสดงว่าใช้ได้
5. ปล่อยให้สไลด์เย็นลง แล้วจึงนำสไลด์วางบนแท่นย้อมหยดน้ำยา Crystal violet ปล่อยทิ้งไว้นาน 1 นาที
6. เทสีออก ล้างด้วยน้ำก๊อก แล้วใส่น้ำยาไอโอดีนไว้นาน 1 นาที เพื่อช่วยให้ติดสีดีขึ้น (mordant)
7. ล้างด้วยน้ำที่ไหลอ่อน ๆ สลัดน้ำออกจากสไลด์จนหมด
8. ใช้น้ำยาล้างสี (decolorizer) หยดให้ไหลผ่านสไลด์จนน้ำที่หยดผ่านไม่มีสีติดออกมาด้วย ขั้นนี้ใช้เวลา 3-10 วินาที ขึ้นอยู่กับความหนาบางของเชื้อที่ทาบนสไลด์ ระวังอย่าล้างสีออกมากเกินควร เพราะจะทำให้ได้ผลที่ผิดพลาด
9. ล้างด้วยน้ำอย่างรวดเร็ว สลัดน้ำออกจากสไลด์จนหมด
10. ย้อมควบด้วยสีย้อมควบคู่ (Counterstain) คือ Safranin 0 นาน 1 นาที
11. ล้างออกด้วยน้ำ
12. ซับน้ำออก และปล่อยให้สไลด์แห้งสนิท แล้วดูด้วยหัวน้ำมันของกล้องจุลทรรศน์ แบคทีเรียที่เป็นกรัมบวกจะติดสีม่วงหรือสีน้ำเงินของ crystal violet ส่วนพวกที่เป็นกรัมลบจะติดสีแดงหรือสีชมพูของ Safranin 0

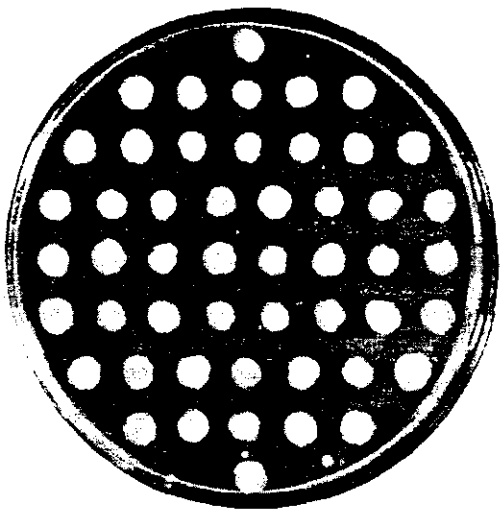
ภาคผนวก ค

เทคนิคReplica plating

มีขั้นตอนดังนี้

1. ใช้ไม้จิ้มฟันปลอดเชื้อแตะโคโลนีแบคทีเรียเดี่ยวๆแล้วsmearบนจานอาหารcomplete medium(เช่น marine agar) ในแต่ละช่องของแม่แบบตารางที่รองใต้จานอาหาร
2. บ่มจานอาหาร ให้ โคโลนีแบคทีเรียเจริญ
3. นำผ้ากำมะหยี่ปลอดเชื้อวางบนบล็อกโลหะรัดผ้ากำมะหยี่กับบล็อกโลหะ กดให้ผิวผ้ากำมะหยี่สัมผัสกับโคโลนีแบคทีเรียบนจานอาหารcomplete medium
4. แบบและตำแหน่งของโคโลนีแบคทีเรียนี้สามารถนำไปถ่ายแบบให้กับจานอาหารชนิดต่างๆได้
5. นำจานอาหารชนิดต่างๆไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่สภาวะอุณหภูมิเหมาะสม
6. ตรวจผลการเจริญของโคโลนีแบคทีเรียจานอาหารชนิดต่างๆเปรียบเทียบกัน





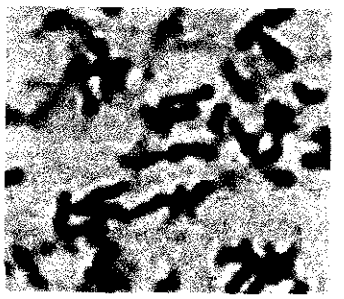
รูปตัวอย่าง จานอาหารที่มีโคโลนีแบคทีเรีย 50 โคโลนี

ภาคผนวก ง

คุณลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของ MB616 (เพิ่มเติม)

คุณลักษณะ	ผลลัพท์
ย้อมสีกรัม	G^-
รูปร่าง	แท่ง
สีโคโลนี	ขาว
motile	+
Nitrate reduction	+
Denitrification	–
Starch hydrolysis	+
Urease	–

สายพันธุ์แบคทีเรีย MB616 ย้อมสี methylene blue



สายพันธุ์แบคทีเรีย MB616 ย้อมสีกรัม

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-สกุล นายสิทธิโชค แสงโสดา

เกิด 23 ธันวาคม 2489

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา (ตรี โท เอก และประกาศนียบัตร)	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2512	ตรี	วท.บ.(ชีววิทยา) (วิทยาศาสตร์บัณฑิต)	ชีววิทยา	ชีววิทยา	ม. เชียงใหม่	ไทย
2525	โท	D.E.A.(Microbiology) Diplome d'etude Approfondie	Biology	Microbiology	Paris XI	France
2527	เอก	Doctor de 3emecycle (Microbiology)	Biology	Microbiology	Paris XI	France

สาขาวิชาที่มีความชำนาญ Microbiology, Molecular biology

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1. Cherest, H., Sangsoda, S., and Surdin-Kerjan, Y. (1984) Regulation de l'expression des gene MET3 et MET25 chez Saccharomyces cerevisiae. Collogue "Recherches Fondamentales en amont des Biotechnologies" Centre National de la Recherche Scientifique au Ministere de la Technologie, 19 November 1984.
2. Sangsoda, S., Cherest, H., and Surdin-Kerjan, Y. (1985) The expression of the MET25 gene of Saccharomyces cerevisiae is regulated transciptionally. Mol. Gen. Genet., 200 : 407-414.
3. Sangsoda, S. (1987). A simple microscale technique for isolation of plasmid DNA from bacteria. 5th Seminar of Genetics at Prince Songkla University, 13-15 May 1987.
4. Sangsoda, S., S. Ploykasem and A. Hanpongkitikul. (1987) Amylase/glucoamylase complex enzymes XIV Conf. Sci. Soc., Thailand.

5. Tantayapinan. O., S. Sangsoda and S. Phutrakul. (1987) Cloning of endocellulase gene from edible mushroom on pFL2 in *E. coli* C600 eclls. XIV conf. Sci. Soc., Thailand.
6. Sangsoda, S., S. Phutrakul and P. Kanasawad. (1992) Extracellular hydrolases by extremely thermophilic bacteria form Teppanom Hot Spring. The Second Princess Chulabhorn Science Congress Environment. Science and Technology: The Challenges of the 21th Century November 2-6 1992, Bangkok, Thailand.
7. Sangsoda. S., S. Maneerat., P. Kanasawad and S. Phutrakul. (1993) Specific plate for isolation of bacteria producing lipases. The 5th Annual Meeting of Thai Society for Biotechnology, 25-27 November 1993.
8. Phutrakul, S., P.Kanasawad, and S. Sangsoda. (1993) Hydrolases from hot spring thermophiles and their catalytic activities in non-aqueous media. 10th Federation of Asian and Oceanian Biochemists Symposium. 8-10 December 1993.

ประวัติผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ-สกุล นางเบญจมาศ จิตรสมบูรณ์

ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา (ตรี โท เอก และประกาศนียบัตร)	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2520	ตรี	วท.บ. (วิทยาศาสตร์บัณฑิต)	วิทยาศาสตร์ทั่วไป	เคมี ชีววิทยา	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2523	โท	M.P.H. Master of Public Health (Toxicology)	Environmental Health	Toxicology	Univ. of Michigan	USA
2529	เอก	Ph.D. (Doctor of Philosophy)	Biology	Toxicology	Utah State University	USA

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ immunology, immunotoxicology, molecular biology

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1. Fayen, J., Srisuchart, B., Meyerson, H., Kaplan, D., and Tykocinski, M.L. (1992) High Level Expression of Glycophosphatidylinostol (GPI)-modified $CD8_{\alpha}$. FASEB J., 6(5) : A1608
2. Srisuchart, B., LaCelle, K.A., Tykocinski, M.L., and Kaplan, D.R. (1995) CD8-depedent immunoregulation in a murine in vivo model. J. Immunology, 150(8) : 280A.
3. Dooley, R.K., Morris, D.L., Kramer, C.M., Srisuchart, B., and Holsapple, M.P. (1995) Elucidation of cellular targets responsible for tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced suppression of antibody responses : II. The role of the T-lymphocyte. Int. J. Immunopharmac. (in press).
4. Srisuchart, B., Fuchs, B.A., Sikorski, L.E., Munson, A.E., and Loveless, S.E. (1989) Antitumor activity of enkephalin analogues in inhibiting PYB6 tumor growth in mice and immunological effects of methionine enkephalinamide. Int. J. Immunopharmac., 11(5) : 487-500
5. Srisurhart, B., Taylor, M.J., and Sharma, R.P. (1987) Alteration of humoral and cellular immunity in manganese chloride treated mice. J. Toxicol. Environ. Health, 22 : 91-99.
6. Srisuchart, B. (1986) Manganese toxicity in mice: Evaluation of neurochemical and immunological alterations (Ph.D. dissertation).
7. Sharma, R.P., Coulombe, R.A. Jr., and Srisuchart, B. (1986) Effect of dietary vanadium exposure on regional brain neurotransmitter levels and their metabolites. Biochem. Pharmacol., 35(3) : 461-465.
8. B. Srisuchart, and A.E. Munson. Suppression of cytotoxic T lymphocyte response by gallium arsenide in B6C3F1 mice. FASEB, New Orleans, 19-23 Mar, 1989.
9. B. Srisuchart, B.A. Fuchs, L.E. Sikorski, A.E. Munson, and S.E. Love-less (1988) The immunomodulatory roles of D-[ALA2]-Methionine enkephalinamide in inhibition the tumor expression of PYB6 treated mice. The Toxicologist, 8(1) : 81.
10. A.E. Munson, B. Srisuchart, K.S. Campbell, and S.E. Loveless (1988) Enhancement of cellmediated immunity and inhibition of tumor growth by the adrenergic beta-2 agonist, Terbutaline. Proc. AACR, 29 : 320.

11. B.A. Fuchs, J.A. McCay, B. Srisuchart, M.M. Fouant, D.L.Musgrove, T.T. Kawabata, K.L.Jr. White, M.I. Luster, and A.E. Munson. Effects of LP-BM5 (MAIDS) retrovirus infection on the C57B1/6 murine humoral and cellular immune response. American College of Toxicology, Baltimor, Oct. 31-Nov. 2, 1988.

12. B. Srisuchart. K.L White, Jr., J.A. McCay, M.C. Thomas, M.P. Thomas, M.P. Holsapple, and A.E. Munson. Suppression of cell-mediated immunity by gallium arsenide in B6C3F1 mice. American College of Toxicology, Baltimore, Oct. 31-Nov. 2, 1988.

13. M.M. Fouant, J.A. McCay, K.L. White, Jr., B.Srisuchart, M.L.Stern, D.L.Musgrove, R.D.Brown, D.Germolec, M.Luster, and A.E. Munson. Immunomodulation produced by dideoxyadenosine in C57B1/6 mice. American College of Toxicology, Baltimore, Oct.31-Nov.2, 1988.

14. B. Srisuchart, and R.P. Sharma (1986) Effect of manganese exposure on regional brain biogenic aminnes in mice. The Toxicologist, 6(1): 20.

15. M.J.Taylor, B. Srisuchart, and R.P. Sharma (1986) Immunological assessment of ethanol treated mice. Society of Toxicology. The Toxicologist, 6(1) : 68.

16. B. Srisuchart, and R.P. Sharma (1985) Neurotoxic effect of manganese on biogenic amine levels and turnover in different regions of mouse brain. The Toxicologist, 5(1) : 192.

17. R.P. Sharma, and B. Srisuchart (1984) Synthesis and trunover rates of biogenic amines in brain regions of rat using alpha-monofluoromethyldopa (MFMD). IUPHAR 9th International Congress of Pharmacology, France.

18. S. Chiyarach, and B. Srisuchart (1983) Health hazards of heavy metal pollution in cell battery manufacture. International Conference Heidelberg., 6-9 Sep. 1983.