การผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยเห็ดซุกซุ่น

Production of lipase enzyme by *Scorias* sp.

สุมาลี สุทธะตั้ง[1]
บุญสม บุษบรรณ์[2]

บทคัดย่อ

ศึกษาความสามารถของเห็ดซุกซุ่น *Scorias* sp. จำนวน 6 ไอโซเลต ในการผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยการเพาะเลี้ยง *Scorias* sp. ในอาหาร 7 สูตร เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำสารละลายส่วนใสที่กรองจากน้ำเลี้ยงเชื้อมาศึกษาเอนไซม์ไลเปส โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสบน tributyrin agar ด้วยวิธี agar well diffusion และวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส โดยใช้ *p*-nitrophenyl palmitate เป็น substrate พบว่า *Scorias* sp. BS292 ที่เลี้ยงในอาหาร SC2 มีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสบน tributyrin agar สูงที่สุดเท่ากับ 17.7±0.6 mm และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.0417±0.00 U/ml สำหรับเชื้อเดียวกันนี้ที่เลี้ยงในอาหาร KC2 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.0383±0.00 U/ml *จึงคัดเลือกเชื้อไอโซเลตนี้เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ พบว่าสารละลายส่วนใสที่กรองจาก*น้ำเลี้ยงเชื้อ *Scorias* sp. BS292 ที่เลี้ยงในอาหาร KC2 โดยปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเป็น 7.0 เติม $MgSO_4$ และบ่มเชื้อ นาน 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (27±2°C) มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 0.0497±0.00 U/ml

คำสำคัญ: เห็ดซุกซุ่น เอนไซม์ไลเปส กิจกรรมเอนไซม์

Abstract

Potential of six isolates of *Scorias* sp. for lipase production was studied. Each fungal isolate was cultured in seven media for seven days. Culture filtrates of each isolate was tested for lipase activity by measurement clear zones diameters on tributyrin agar (agar well diffusion) and quantitative determination using *p*-nitrophenyl palmitate as enzyme substrate. The result showed that *Scorias* sp. BS292 cultured in SC2 medium could produce the highest clear zone of 17.7±0.6 mm on tributyrin agar and lipase activity of 0.0417±0.00 U/ml. The fungal isolate cultured in KC2 medium also produced lipase with 0.0383±0.00 U/ml. *Scorias* sp. BS292 was then selected for lipase optimization study. It was found that the isolated cultured in KC2 medium adjusted initial pH to 7.0, supplemented by $MgSO_4$ and incubated at room temperature (27±2°C) for 10 days, increased lipase activity to 0.0497±0.00 U/ml.

Keywords: *Scorias* sp. / Lipase enzyme / Enzyme activity

[1] นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
[2] อาจารย์ ดร. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทนำ

การศึกษาจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสมีความสำคัญ เนื่องจากเอนไซม์ไลเปสมีคุณสมบัติในการย่อยสลายไตรกลีเซอไรด์ให้เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล โดยสามารถทำปฏิกิริยาย้อนกลับ (trans esterification และ inter esterification) เพื่อสังเคราะห์เอซิลกลีเซอรอลจากกรดไขมันและกลีเซอรอล และทำปฏิกิริยาแลกเปลี่ยนกรดไขมันชนิดต่างๆ (Sharma *et al*., 2001; Gupta *et al*., 2004; Kademi *et al*., 2006; Singh and Mukhopadhyay, 2012) Kakugawa *et al*. (2002) พบว่า ยีสต์ *Kurtzmanomyces* sp. I-11 ที่แยกจากดินในประเทศญี่ปุ่น สร้างไลเปสที่มีคุณสมบัติคล้ายกับไลเปสที่ผลิตโดย *Candida antarctica* ซึ่งแยกได้จากดินก้นทะเลสาบแวนดา ประเทศนิวซีแลนด์ (Ishii, 1993; Patkar *et al*., 1993) และเชื้อทั้งสองชนิดนี้ยังสร้าง glycolipid ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ Liu *et al*. (2008) ได้ศึกษาในกลุ่มราดำ (sooty mold) คือ *Aureobasidium pullulans* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากทะเล Saltern เมือง Qingdao ประเทศจีน สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 8.02 U/ml เมื่อเลี้ยงใน yeast extract peptone dextrose

Scorias sp. หรือเห็ดซุกซุ่น เป็นรากลุ่ม sooty mold ซึ่งเป็นราชั้นสูงใน phylum Ascomycota ราชนิดนี้มักพบเจริญเติบโตอยู่บนกิ่งไม้และใบไม้ ที่มีแมลงปากดูด เช่น เพลี้ยแป้งและเพลี้ยหอย เข้ากินน้ำเลี้ยงและช่อดอกของพืชแล้วถ่ายมูลทิ้งไว้ เมื่อมีความชื้นและอุณหภูมิที่เหมาะสม สปอร์ราดำที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมก็จะเจริญบนกิ่งหรือผิวใบพืชที่มีน้ำเลี้ยงและมูลของแมลงนั้นได้ sooty mold ไม่ใช่ราก่อโรคพืชโดยตรง แต่บริเวณที่เชื้อเจริญอาจรบกวนการสังเคราะห์แสงและการได้รับสารอาหารของพืชทำให้พืชอาศัยตาย หรืออาจทำให้บริเวณที่มีการเจริญของกลุ่มราดำที่เจริญนั้นถูกทำลายได้ (Chomnunti *et al*., 2014) ในธรรมชาติพบการเจริญของเห็ดซุกซุ่นบนกิ่งไผ่ช่วงปลายฤดูฝน (กันยายนถึงตุลาคม) 'ดอกเห็ด' มีลักษณะคล้ายเห็ดปะการัง มีกิ่งก้านแตกแขนง เนื้อนุ่ม เหนียว สีใส เมื่อแก่ดอกเห็ดจะมีสีเขียวเข้มขึ้น ประชาชนนิยมเก็บเห็ดนี้มาประกอบอาหารประเภทยำและน้ำพริก หรือนำมาทานเป็นกับแกล้มร่วมกับอาหารอื่น เมื่อศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า เส้นใยมีผนังกั้นตามขวาง สร้าง conidia เป็นเซลล์เดียว รูปร่างรี ไม่มีสี ในโครงสร้างสืบพันธ์แบบไม่อาศัยเพศ รูปร่างคล้ายคนโท หรือ pycnidia (Reynolds and Volk, 2007) เนื่องจากข้อมูลการศึกษาเพาะเลี้ยงเห็ดซุกซุ่นในห้องปฏิบัติการมีน้อย (ธริกา, 2554) งานวิจัยนี้จึงทดสอบการสร้างเอนไซม์ไลเปสจากเห็ดซุกซุ่นที่เก็บรักษาไว้ ณ ห้องปฏิบัติการวิจัยสู่ความเป็นเลิศทางวิชาการด้านการพัฒนาแบบยั่งยืนของทรัพยากรชีวภาพ (SDBR Laboratory) ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการสร้างเอนไซม์ไลเปส และกิจกรรมเอนไซม์ไล-เปส ของเห็ดซุกซุ่น

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การศึกษาลักษณะสัณฐานของเห็ดซุกซุ่นและการเตรียมเชื้อตั้งต้น

เพาะเลี้ยง *Scorias* sp. จำนวน 6 ไอโซเลต (BS221, BS222, BS223, BS291, BS292 และ BS320) บน potato dextrose agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (27±2°C) นาน 3 วัน สังเกตลักษณะโคโลนี จากนั้นเตรียมสไลด์ ย้อมด้วย lactophenol cotton blue แล้วนำมาตรวจสอบลักษณะสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอและเลนส์ประกอบ และบันทึกโครงสร้างสืบพันธุ์ สำหรับการเตรียมเชื้อตั้งต้นทำโดยตัดโคโลนีของเชื้อให้เป็นชิ้น ขนาดประมาณ 5 mm x 5 mm และเพาะเลี้ยงเชื้อ 40 ชิ้น ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml ที่บรรจุ coconut dextrose broth (CDB) (ธริกา, 2554) 20 ml บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบซ้าย-ขวา ความเร็ว 100 rpm ที่อุณหภูมิห้อง (27±2^{O}C) 5 วัน

2. การเลี้ยงเชื้อเห็ดซุกซุ่นเพื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปส

เตรียมอาหารเหลว 7 สูตร ที่ปรับปริมาณและแหล่งคาร์บอนต่างกัน (ธริกา, 2554; Kim *et al*., 2000; Silva *et al*., 2005) ได้แก่ CDB, Kim's medium ผสมน้ำมันข้าวโพด 2% (KC2), Kim's medium ผสมน้ำมันถั่วเหลือง 2% (KS2), Sliva's medium ผสมน้ำมันข้าวโพด 1% (SC1), Sliva's medium ผสมน้ำมันข้าวโพด 2% (SC2), Sliva's medium ผสมน้ำมันถั่วเหลือง 1% (SS1) และ Sliva's medium ผสม น้ำมันถั่วเหลือง 2% (SS2) โดยบรรจุอาหาร แต่ละสูตร 30 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml หลังนำไปฆ่าเชื้อและทิ้งไว้ข้ามคืน ปลูกเชื้อตั้งต้นที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ลงไป บ่มเชื้อที่สภาวะเดิมนาน 7 วัน จากนั้นกรองแยกเส้นใย นำน้ำเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm 30 นาที และนำส่วนใสด้านบน (supernatant) ที่ได้ ทดสอบการผลิตไลเปส และกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

3. การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสของเห็ดซุกซุ่น

ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของเอนไซม์ไลเปสใน supernatant ที่เตรียมได้ในข้อ 2 ด้วยวิธี agar well diffusion โดยเตรียม tributyrin agar และเติม nile blue เป็นสารบ่งชี้ปฏิกิริยาโดยเปลี่ยนแปลงสีที่เติมลงในอาหาร (indicator) เมื่อเกิดการย่อยสลาย tributyrin โดยเอนไซม์ไลเปสจะเกิดวงใสรอบหลุมที่หยดน้ำเลี้ยงเชื้อ (Samad *et al*., 1989; Kumar *et al*., 2012) เจาะหลุมด้วย Pasteur pipette เส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 mm หยด supernatant 35 µl ลงในหลุมที่เจาะไว้ นำเพลทไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 3 วัน แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสที่ปรากฏ (mm) และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm ด้วย spectrophotometer โดยใช้ *p*-nitrophenyl palmitate (Sigma) เป็น substrate เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานและคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ที่ได้ โดยกำหนดให้ เอนไซม์หนึ่งยูนิต (U) คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ปลดปล่อย *p*-nitrophenol 1 µmol ต่อนาที (Bisht *et al*., 2013)

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ไลเปสของเห็ดซุกซุ่น

ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์ไลเปสของเห็ดซุกซุ่น ได้แก่ pH ของอาหาร สารบางชนิด และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง โดยคัดเลือก *Scorias* ที่เลี้ยงในอาหารสูตรที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด โดยปรับ pH ของอาหารตั้งแต่ 1.0-9.0 สำหรับอิทธิพลของสารบางชนิดทำโดยเติมสาร $MnSO_4$, $FeSO_4$, $MgSO_4$ หรือ NaCl ชนิดละ 1.0 g/l ลงในอาหาร และศึกษาช่วงเวลาเพาะเลี้ยงตั้งแต่ 1-14 วัน 3 และ 4 สัปดาห์ จากนั้นกรองแยกนำน้ำเลี้ยงเชื้อ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 rpm 30 นาที และนำ supernatant ที่ได้ ทดสอบการผลิตไลเปส และกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3

5. การคำนวณสถิติ

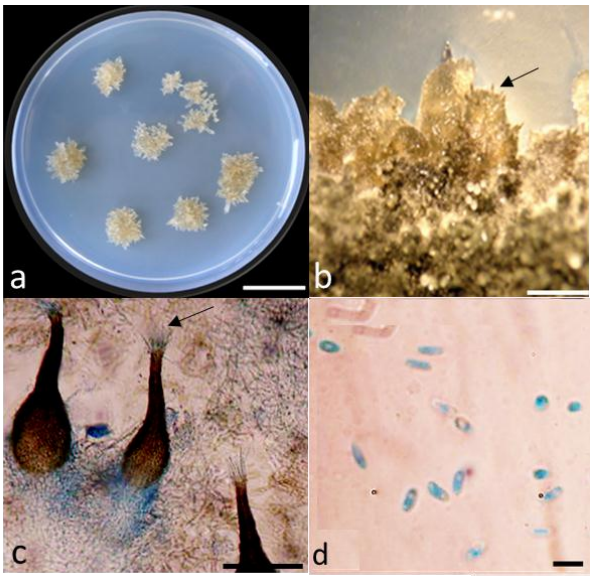
ข้อมูลกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ศึกษา นำมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้ Duncan's multiple range test โดยโปรแกรมวิเคราะห์สถิติ SPSS software program version 17.0

สรุปผลการวิจัย

1. ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อเห็ดซุกซุ่น

เมื่อเพาะเลี้ยง *Scorias* sp. แต่ละไอโซเลต ได้แก่ BS221, BS222, BS223, BS291, BS292 และ BS320 ลงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 3 วัน พบว่า โคโลนีของ *Scorias* sp. ดังกล่าว มีลักษณะคล้ายกันคือ มีเนื้อนุ่ม สีเขียวอ่อน (ภาพ 1a) เมื่อศึกษาภายใต้กล้องสเตอริโอ พบโคนิเดีย (conidia) ซึ่งเป็นสปอร์ระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) ในโครงสร้างรูปร่างคล้ายคนโท หรือ pycnidia ซึ่งบริเวณปลายเปิดของ pycnidia เป็นทางออกของ conidia ซึ่งมารวมกันเป็นกลุ่ม มีลักษณะคล้ายกับหยดน้ำ (ภาพ 1b) เมื่อศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ พบระยางค์เป็นเส้นปลายแหลมประมาณ 11-20 อัน ที่บริเวณปลาย pycnidia (ภาพ 1c) และ

conidia ที่สร้างเป็นเซลล์เดียวไม่มีสี (ภาพ 1d)



ภาพ 1 เห็ดซุกซุ่น (*Scorias* sp. BS292) a. โคโลนีอายุ 3 วันบนอาหาร potato dextrose agar b,c. โครงสร้างสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (pycnidia) บริเวณปลายมีระยางค์ (ลูกศรชี้) d. conidia. Scale bars: a = 2 cm, b = 1,000 μm, c = 100 μm, d = 5 μm.

2. ความสามารถของเห็ดซุกซุ่นในการผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากการเพาะเลี้ยง *Scorias* sp. แต่ละไอโซเลต ในอาหาร 7 สูตร คือ CDB, KC2, KS2, SC1, SC2, SS1 และ SS2 แล้วนำ supernatant มาทดสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปส แล้ววิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (ANOVA) ด้วยวิธี F test พบว่าไอโซเลตของเชื้อและชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีอิทธิพลต่อการสร้างเอนไซม์ไลเปส โดยปัจจัยทั้งสองมีความสัมพันธ์กัน และพบว่า *Scorias* sp. แต่ละไอโซเลตสร้างเอนไซม์ไลเปสน้อยกว่า 1 U/ml โดย *Scorias* sp. BS292 ที่เลี้ยงในอาหาร SC2 มีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของกิจกรรมเอนไซม์บน tributyrin agar สูงที่สุดเท่ากับ 17.7±0.6 mm และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.0417±0.00 U/ml เชื้อไอโซเลตเดียวกันนี้ที่เลี้ยงในอาหาร KC2 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์รองลงมาเท่ากับ 0.0383±0.00 U/ml (ตาราง 1) ถึงแม้ว่า *Scorias* sp. BS292 ที่เลี้ยงในอาหาร KC2 จะมีกิจกรรมเอนไซม์น้อยกว่าที่เลี้ยงในอาหาร SC2 แต่เชื้อไอโซเลตนี้ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร KC2 สามารถสร้างสารชีวภาพอื่นได้ คือ สารลดแรงตึงผิวชีวภาพและสารยับยั้งจุลินทรีย์ (ไม่ได้แสดงผล) จึงทำการคัดเลือก *Scorias* sp. BS292 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร KC2 ไปศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างเอนไซม์ไลเปสต่อไป

ตาราง 1 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์เลเปสของ *Scorias* sp. จำนวน 6 ไอโซเลต ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร 7 สูตร

ชนิดอาหารและไอโซเลต	วงใสของเอนไซม์ไลเปสบนอาหาร tributyrin (mm)*	กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (U/ml)*
CDB		
BS221	0.0 ± 0.0^{n}	0.0000 ± 0.00^{t}
BS222	0.0 ± 0.0^{n}	0.0000 ± 0.00^{t}
BS223	0.0 ± 0.0^{n}	0.0000 ± 0.00^{t}
BS291	0.0 ± 0.0^{n}	0.0000 ± 0.00^{t}
BS292	0.0 ± 0.0^{n}	0.0000 ± 0.00^{t}
BS320	0.0 ± 0.0^{n}	0.0000 ± 0.00^{t}
KC2		
BS221	11.3 ± 0.6^{ghi}	0.0283 ± 0.00^{lm}
BS222	15.0 ± 1.0^{def}	0.0378 ± 0.00^{e}
BS223	14.3 ± 0.6^{ef}	0.0386 ± 0.00^{cde}
BS291	15.7 ± 0.6^{cd}	0.0346 ± 0.00^{g}
BS292	15.0 ± 0.0^{ef}	0.0383 ± 0.00^{de}
BS320	17.3 ± 0.6^{ab}	0.0325 ± 0.00^{ij}
KS2		
BS221	12.3 ± 0.6^{g}	0.0298 ± 0.00^{k}
BS222	14.3 ± 0.6^{ef}	0.0397 ± 0.00^{b}
BS223	14.7 ± 0.6^{def}	0.0280 ± 0.00^{lmn}
BS291	15.0 ± 1.0^{def}	0.0341 ± 0.00^{gh}
BS292	14.0 ± 1.0^{f}	0.0393 ± 0.00^{bcd}
BS320	16.3 ± 0.6^{bc}	0.0320 ± 0.00^{j}
SC1		
BS221	9.3 ± 0.58^{k}	0.0267 ± 0.00^{p}
BS222	10.0 ± 1.0^{jk}	0.0167 ± 0.00^{r}
BS223	7.7 ± 0.6^{lm}	0.0115 ± 0.00^{s}
BS291	16.3 ± 0.6^{bc}	0.0272 ± 0.00^{op}
BS292	15.7 ± 0.6^{cd}	0.0213 ± 0.00^{q}
BS320	17.3 ± 0.6^{ab}	0.0422 ± 0.00^{a}

ตาราง 1 (ต่อ)

ชนิดอาหารและไอโซเลต	วงใสของเอนไซม์ไลเปสบนอาหาร tributyrin (mm)*	กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (U/ml)*
SC2		
BS221	15.3±0.6^{cde}	0.0358±0.00^{f}
BS222	14.0±0.0^{f}	0.0379±0.00^{e}
BS223	11.7±1.2^{gh}	0.0268±0.00^{p}
BS291	15.3±0.6^{cde}	0.0384±0.00^{cde}
BS292	17.7±0.6^{a}	0.0417±0.00^{a}
BS320	15.3±0.6^{cde}	0.0383±0.00^{de}
SS1		
BS221	8.0±1.7^{l}	0.0400±0.00^{b}
BS222	10.3±0.6^{ijk}	0.0298±0.00^{k}
BS223	6.7±0.6^{m}	0.0378±0.00^{e}
BS291	15.3±0.6^{cde}	0.0277±0.00^{nop}
BS292	14.0±0.0^{f}	0.0348±0.00^{g}
BS320	14.0±0.0^{f}	0.0298±0.00^{k}
SS2		
BS221	10.7±1.2^{hij}	0.0287±0.00^{lm}
BS222	15.7±0.6^{cd}	0.0394±0.00^{bc}
BS223	11.0±1.0^{hij}	0.0334±0.00^{hi}
BS291	16.3±0.6^{bc}	0.0171±0.00^{r}
BS292	15.3±0.6^{cde}	0.0289±0.00^{kl}
BS320	17.3±0.6^{ab}	0.0394±0.00^{bc}
DI water	0.0±0.0^{n}	nt
1%SLS	nt	nt

*ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงแบนมาตรฐานจาก 3 ซ้ำ

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละ column แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$, ANOVA and Duncan's multiple range test)

nt = ไม่ได้ทำการทดลอง

อาหารเลี้ยงเชื้อ CDB = Coconut dextrose broth, KC2 = Kim's medium + 2% corn oil, KS2 = Kim's medium + 2% soybean oil, SC1 = Sliva's medium + 1% corn oil, SC2 = Sliva's medium + 2% corn oil, SS1 = Sliva's medium + 1% soybean oil, SS2 = Sliva's medium + 2% soybean oil

3. สภาวะที่เหมาะสมในการสร้างเอนไซม์ไลเปส

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ไลเปสของไอโซเลตที่คัดเลือก คือ *Scorias* sp. BS292 โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร KC2 พบว่า เมื่อปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 เติม $MgSO_4$ และเพาะเลี้ยงเป็น

ระยะเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (27±2°C) supernatant ที่ได้ มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยให้ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสบน tributyrin agar เท่ากับ 12.17±0.29 mm และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 0.0497±0.00 U/ml

อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

อภิปรายผล

Scorias sp. ทั้ง 6 ไอโซเลต มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ ไลเปสได้แตกต่างกันในอาหาร 7 สูตร ใน CDB ที่ไม่เติมน้ำมันข้าวโพดและน้ำมันถั่วเหลืองไม่พบการสร้างเอนไซม์นี้ แต่สร้างได้ในอาหาร 6 สูตร คือ KC2, KS2, SC1, SC2, SS1 และ SS2 อย่างไรก็ตาม มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสบนอาหาร tributyrin และกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสเกิดขึ้นน้อย ถึงแม้ว่าจะมีการปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เติมเกลือแร่ และปรับระยะเวลาเพาะเลี้ยงแล้วก็ตาม ควรต้องศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่อาจจะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์นี้ต่อไป ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสซึ่งมีปริมาณน้อย อาจเกิดขึ้นจากสาเหตุหลายประการ เช่น จากรายงานของ Thakur (2012) พบว่า การสร้างเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อรามีความหลากหลายขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ สภาวะการเพาะเลี้ยง ส่วนประกอบของอาหาร อุณหภูมิ pH และแหล่งไนโตรเจน เป็นต้น โดยเชื้อราบางชนิดที่สร้างเอนไซม์ไลเปสได้ดี เช่น *Aspergillus* sp. ที่แยกได้จากดินประเทศตุรกี มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส 17 U/ml (Cihangir and Sarikaya, 2004) และ *Rhizopus chinensis* จาก China Center for Type Culture Collection ประเทศจีน มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส 14 U/ml (Teng and Xu, 2008; Thakur, 2012) *Aureobasidium pullulans* HN2.3 ที่แยกได้จากทะเล Saltern เมือง Qingdao ประเทศจีน มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส 8.02 U/ml (Liu *et al*., 2008) ในขณะที่การสร้างเอนไซม์ไลเปสโดยแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Bacillus* spp. ที่แยกจากน้ำเสียโรงงานน้ำมันมะกอก ประเทศตุรกี มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส 168 U/ml (Ertugual *et al*., 2007) *B. licheniformis* MTCC-10498 ที่แยกจากน้ำพุร้อน ประเทศอินเดีย มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส 2.0 U/ml (Sharma and Kanwar, 2012) *Pseudomonas* sp. MSI057 แยกจากฟองน้ำทะเล (*Dendrodroris nigra*) ประเทศอินเดีย มีกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส 750 U/ml (Kiran *et al*., 2008) และ *Burkholderia* sp. ซึ่งแยกได้จากดินปนเปื้อนน้ำมัน ประเทศจีน มีกิจกรรมเอนไซม์เอนไซม์ไล-เปส 122.30 U/ml (Lo *et al*., 2012) อย่างไรก็ตาม การศึกษาวิจัยเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ตลอดจนตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ ที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสที่สูง มีความจำเป็นและควรศึกษาต่อไป เนื่องจากจุลินทรีย์มีข้อจำกัดในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่าสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ทั้งนี้ เพื่อนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์หรืออุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ธริกา แก้วเพ็ง. (2554). การเปรียบเทียบสูตรอาหารและสภาพที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเห็ดซุกซุ่น. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Bisht, D., Yadav, S.K. and Darmwal, N.S. (2013). An oxidant and organic solvent tolerant alkaline lipase by *Pseudomonas aeruginosa* mutant: Downstream processing and biochemical characterization. Brazilian Journal of Microbiology 44: 1205-1314.

Chomnunti, P., Hongsanan, S., Aguirre-Hudson, B., Tian, Q., Peršoh, D., Dhami, M.K., Alias, A.S., Xu, J., *et al*. (2014). The sooty moulds. Fungal Diversity 66: 1-36.

Cihangir, N. and Sarikaya, E. (2004). Investigation of lipase production by a new isolated of *Aspergillus* sp. World Journal of Microbiology and Biotechnology 20: 173-197.

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

Gupta, R., Gupta, N. and Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. Applied Microbiology and Biotechnology 64: 763-781.

Ishii, M. (1993). Thermally stable and positionally non-specific lipase isolated from *Candida*. US Patents 5: 1-6.

Kademi, A.A., Danielle, L. and Ajain, H. (2006). Lipase. In Wiseman, A. (ed.). Handbook of Enzyme Biotechnology. 2th ed., pp. 297-318. New Delhi: Ellis Horwood.

Kakugawa, K., Shobayashi, M., Suzuki, O. and Miyakawa, T. (2002). Purification and characterization of a lipase from the glycolipid producing yeast *Kurtzmanomyces* sp. I-11. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 66: 978-985.

Kim, S.H., Lim, E.J., Lee, S.O., Lee, J.D. and Lee, T.H. (2000). Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. Biotechnology and Applied Biochemistry 31: 249-253.

Kiran, G.S. Shanmughapriya, S., Jayalakshmi, J., Selvin, J., Gandhimathi, R. andIvaramakrishnan, S. (2008). Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine *Pseudomonas* sp. (MSI057). Bioprocess and Biosystems Engineering 31: 483-492.

Kumar, R., Sharma, A.A., Kumar, A. and Singh, D. (2012). Lipase from *Bacillus pumilus* RK31: production, purification and some properties. World Applied Sciences Journal 16: 940-948.

Liu, Z., Chi, Z., Wang, L. and Li, J. (2008). Production, purification and characterization extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application the hydrolysis of edible oil. Biochemical Engineering Journal 40: 445-451.

Lo, C.F., Yu, C.Y., Kuan, C.I. and Lee, S.L. (2012). Optimization of lipase production by *Burkholderia* sp. using response surface methodology. International Journal of Molecular Sciences 13: 14889-14897.

Patkar, S.A, Bjorking, F., Zundel, M., Schulein, M., Svendsen, A., Hansen, H.H.P. and Gormsen, E. (1993). Purification of two lipase from *Candida antarctica* and their various inhibitions by various inhibitors. Indian Journal of Chemistry 32: 78-80.

Reynolds, H. and Volk T. (2007). *Scorias spongiosa*, the beech aphid poop-eater. Retrieved Jun 4, 2011. from http://botit.botany.wisc.edu/toms_fungi/sep2007.html

Samad, M.Y.A., Razak, C.N.A., Salleh, A.B., Yunus, W.Z.W., Ampon, K., and Basri, M. (1989). A plate assay for primary screening of lipase activity. Journal of Microbiological Methods 9: 51-56.

Sharma, C.K. and Kanwar, S.S. (2012). Purification of a novel thermophilic lipase from *Bacillus licheniformis*. International Research Journal of Biological Sciences 1: 43-48.

Sharma, A.K., Tiwari, R.P. and Hoondal, G.S. (2001). properties of a thermostable and solvent stable extracellular lipase from a *Pseudomonas* sp. AG-8. Journal of Basic Microbiology 41: 363-366.

Silva, W.O.B, Mitidieri, S., Schrank, A. and Vainstein, M.H. (2005). Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Process Biochemistry 40: 321-326.

Singh, A.K. and Mukhopadhyay, M. (2012). Overview of fungal lipase: a review. Application Biochemical Biotechnology 166: 486-520.

Teng, Y. and Xu, Y. (2008). Culture condition improvement for whole cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. Bioresource Technology 99: 3900-3907.

Thakur, S. (2012). Lipases, its sources, properties and applications: A review. International Journal of Scientific and Engineering Research 3: 1-29.