



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อชอบเค็มร่วมกับน้ำมันที่
ประกอบด้วยกรดไขมันสายยาวปานกลางเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ
ในอาหารสัตว์กระเพาะเดียว

Application of halophilic archaeal lipase and medium chain
triacylglycerols as an antibiotic substitute in monogastric animal
feeds

ผศ.ดร.วรรณพร ทะพิงค์แก และ คณะ

มีนาคม 2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อขอบเค็มร่วมกับน้ำมัน
ที่ประกอบด้วยกรดไขมันสายยาวปานกลางเพื่อทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะใน
อาหารสัตว์กระเพาะเดี่ยว

ผศ.ดร.วรรณพร ทะพิงค์แก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ดร.วรรณพ วิเศษสงวน ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

สนับสนุนโดย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.และต้นสังกัดไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5480257
ชื่อโครงการ : การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อขอบเค็มร่วมกับน้ำมันที่ประกอบ
ด้วยกรดไขมันสายยาวปานกลางเพื่อทดแทนการให้ยาปฏิชีวนะในอาหาร
สัตว์กระเพาะเดี่ยว
ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร.วรรณพร ทะพิงค์แก มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
อีเมล : wanaporn.t@cmu.ac.th
ระยะเวลาโครงการ : 1 กรกฎาคม 2554 -30 มิถุนายน 2556

จากการแยกเชื้อจากตัวอย่างน้ำปลาที่เก็บจากโรงงานในจังหวัดสมุทรสงคราม และจังหวัด
สิงห์บุรี ดินนาเกลือจังหวัดสมุทรสงคราม ทั้งหมด 15 ตัวอย่าง ได้เชื้อขอบเค็มทั้งหมด 78 ไอโซเลต
จากนั้นพบว่า มีเพียง 5 สายพันธุ์เท่านั้น ได้แก่ HSB1-2 HM709 HM738 SQ1-4 และ SQ1-22
อีกทั้งเชื้อแบคทีเรียจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ FACF-9 MHS1-4 MHS1-5 MHS-4 และ SBFE-5 ถูก
แยกได้จากมะพร้าว กากมะพร้าว เปลือกมะพร้าว ผลปาล์ม และกากมะพร้าวบ่ม เชื้อ HSB1-2 และ
MHS-4 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยรวมสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่มเชื้ออาศัย และเชื้อ
แบคทีเรีย ตามลำดับ จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ เชื้อ HSB1-2 อยู่ในกลุ่ม *Halobacterium*
และเชื้อ MHS-4 อยู่ในกลุ่ม *Bacillus* เอนไซม์ไลเปสโดยรวมจากเชื้อที่คัดเลือกได้จำเพาะกับการย่อย
ไขมันที่มีกรดไขมันสายยาวปานกลาง อีกเชื้อที่คัดเลือกได้ทั้งหมดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อ
ภายในทางเดินอาหารหนู (rat intestine epithelial, IEC6) และเซลล์กล้ามเนื้อของหนู (mouse
fibroblast, L929) และทนต่อสภาวะในการทดสอบทางอาหารสัตว์ได้ดี อีกทั้งเมื่อนำไปการใช้
ส่วนผสมของอิมัลชันน้ำมันมะพร้าวและเอนไซม์ไลเปสรวมจากเชื้อ *B. licheniformis* MHS-4
สามารถลดการเจริญเติบโตของเชื้อ *E.coli*, *Streptococci*, และ total anaerobic ในสภาวะจำลอง
ระบบทางเดินอาหารของสุกรได้ การเสริมเอนไซม์ไลเปสรวมจากเชื้อ *B. licheniformis* MHS-4 ที่
ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 2 เท่า ปรับปรุงทำให้ค่าการย่อยได้ของวัตถุดิบและพลังงานรวม
น้ำหนักร้อย 56 วัน อัตราการเจริญเติบโตในช่วงอายุ 28-42 และ 28-56 วัน และน้ำหนักตัวเพิ่มต่อ
อาหารที่กินในช่วงอายุ 28-42 และ 28-56 วัน

เมื่อทดสอบการย่อยโดยใช้อาหารแข็ง HM ที่เสริมด้วยน้ำมันมะพร้าว พบว่ามีเพียง 5 สายพันธุ์เท่านั้น และพบว่า สายพันธุ์ HSB1-2 สามารถย่อย **p**NPL ได้ ทั้งในส่วนไลเปสที่อยู่ในเซลล์และไลเปสที่หลั่งออกมานอกเซลล์ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อคิดเป็นค่าเท่ากับ 30.7 ± 0.8 units per Log CFU ในช่วงเวลา 48 ถึง 120 ชั่วโมง ไลเปสที่อยู่ในเซลล์ สามารถย่อยได้สูงสุดที่ความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 1.0 M ส่วนไลเปสที่หลั่งออกมานอกเซลล์ (Extracellular lipase) ย่อยได้ดีที่ความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 4.0 M เมื่อบ่มไลเปสที่อยู่ในเซลล์ที่ความเข้มข้นเกลือสูงกับทำให้รักษากิจกรรมของเอนไซม์ได้ดีกว่าการบ่มที่ความเข้มข้นเกลือต่ำ ไลเปสที่อยู่ในเซลล์มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ pH 7.5 ส่วนไลเปสที่หลั่งออกมานอกเซลล์มีกิจกรรมสูงสุดที่ pH ประมาณ 7.0 ไลเปสในเซลล์สามารถทนการเปลี่ยนแปลง pH ได้ดีกว่า

คำสืบค้น : ไลเปส เชื้อขอบเค็ม น้ำมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันสายยาวปานกลาง สารทดแทนยาปฏิชีวนะ อาหารสัตว์กระเพาะเดียว

Abstract

Project Code : MRG5480257
Project Title : Application of halophilic archaeal lipase and medium chain triacylglycerols as an antibiotic substitute in monogastric animal feeds
Investigator : Assist. Prof. Dr.Wanaporn Tapingkae
E-mail Address : wanaporn.t@cmu.ac.th
Project Period : 1 July 2012 -1 July 2014

From the isolation of the samples from the fish sauce collected from the factory in Samut Songkhram province and Singburi province and Salted soil from Samut Songkhram. There were only 15 halophilic isolates in Samut Songkhram province. There were only 5 isolates, HSB1-2 HM709 HM738 SQ1-4 and SQ1-22. FACF-9, MHS1-4, MHS1-5, MHS-4 and SBFE-5 were isolated from coconut, coconut pulp, coconut shell, palm fruit and coconut husk. HSB1-2 and MHS-4 exhibited the highest crude lipase activity was observed when compared to that of archaea and bacteria, respectively. In addition, HSB1-2 was in the *Halobacterium* group and MHS-4 in the *Bacillus* group. The lipase profile from selected strains were specific to the lipid containing medium chain fatty acid. All of the selected isolates had no toxicity to rat intestine epithelial cells (IEC6) and mouse fibroblasts (L929), and were well tolerated in animal feed condition testing. Emulsion of coconut oil and lipase from *B. licheniformis* MHS-4 can reduce the growth of *E. coli*, *Streptococci*, and total anaerobic count in the simulative swine digestive tract. Extraction of lipase from *B. licheniformis* MHS-4 at the same level of lipase activity improved the digestibility of dry matter and gross energy. Body weight at 56 days of age, average daily gain at 28-42 and 28-56 days, and gain : feed at 28-42 and 28-56 days of age.

When tested for digestibility using HM medium supplemented with coconut oil, HSB1-2 was the representative species of *Halobacterium*. HSB1-2 was able to digest pNPL in both the cellular and extracellular lipases, which corresponded to the growth, which was consistent with 30.7 ± 0.8 units per log CFU over 48-120 hr. Intracellular lipase has maximum activity at NaCl concentration was 1.0 M. The extracellular lipase was well digested at 4.0 M NaCl concentration, when lipid contained in high-density lipoprotein and enzyme activity was better than that of low salt concentration. Lipases contained in the cell have the highest enzyme activity at pH 7.5. The lipase released from the cell has the highest activity at pH 7.0. The lipase in the cell is more resistant to pH change.

Keywords : lipase, halophilic archaea, medium chain triacylglycerols, antibiotic substitute, monogastric animal feeds

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
Abstract	ค
สารบัญ	จ
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
วัตถุประสงค์ของโครงการ	7
วิธีดำเนินการวิจัย	7
ผลการทดลอง	15
สรุปผลการทดลอง	48
ข้อเสนอแนะ	48
ภาคผนวก	49
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	49
เอกสารอ้างอิง	50

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันการเลี้ยงสัตว์ในเชิงอุตสาหกรรมเป็นการจัดการเลี้ยงดูที่ต้องการผลผลิตสูงสุดเพื่อให้ผลกำไรสูงสุด สำหรับการเลี้ยงสุกร การหย่านมที่อายุประมาณ 3-4 สัปดาห์ถือเป็นวิธีปกติที่ทำกัน ซึ่งในช่วงอายุดังกล่าวถือเป็นช่วงที่มีความสำคัญและจำเป็นต้องเอาใจใส่เป็นอย่างมาก เนื่องจากในช่วงนี้ลูกสุกรได้รับความเครียดหลายๆ ด้านทั้งจากสิ่งแวดล้อม อาหาร และระดับภูมิคุ้มกัน เช่น การถูกแยกออกจากแม่ การเคลื่อนย้ายไปยังโรงเรือนอนุบาล การเปลี่ยนอาหารจากน้ำนมไปเป็นอาหารแข็ง และระดับภูมิคุ้มกันที่ลดต่ำลง ส่งผลให้ลูกสุกรกินอาหารได้น้อยลง และยังสามารถนำพลังงานสำรองที่ร่างกายเก็บไว้มาใช้ได้ลดลง นอกจากนี้ระดับภูมิคุ้มกันที่ลดลงทำให้แบคทีเรียที่อยู่ในทางเดินอาหารมีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ และยังสามารถเกิดการติดเชื้อไวรัสได้อีกด้วย ซึ่งจะส่งผลร่วมกันทำให้ลูกสุกรย่อยอาหารได้ไม่เต็มที่ และดูดซึมได้น้อยลง จากผลต่างๆ ที่เกิดขึ้นนี้ทำให้ลูกสุกรเกิดอาการท้องเสีย เจริญเติบโตได้ไม่เต็มที่ และอาจตายได้ในที่สุด

ในการแก้ไขปัญหาดังกล่าว การปรับปรุงอาหารให้เหมาะสมต่อระบบการย่อยอาหารของลูกสุกร โดยการใช้วัตถุดิบอาหารสัตว์ต่างๆ ที่สัตว์สามารถย่อย ดูดซึม และนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่าย เช่น นมผง หางนม แลคโตส ซีรัมเลือดแห้ง (dried blood serum) สารให้กลิ่นรส (flavors) หรือไขมัน โดยเฉพาะไขมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันสายยาวปานกลาง (medium chain triglycerides, MCTG) ฯลฯ นอกจากนี้เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดอาการท้องร่วง อันมีสาเหตุจากการเจริญอย่างผิดปกติของแบคทีเรียในทางเดินอาหาร ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อสมรรถภาพการผลิตจึงมีการใช้ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) ผสมลงในอาหารสัตว์ ซึ่งพบว่าเป็นวิธีที่ได้ผลดีจึงมีการใช้กันอย่างแพร่หลาย อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างต่อเนื่องและการใช้อย่างไม่ถูกวิธีทำให้เกิดการดื้อยาได้ อีกทั้งยังเสี่ยงที่จะตกค้างในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อภาวะการดื้อยาของผู้บริโภคได้ ในประเทศไทยกระทรวงสาธารณสุขจึงออกประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 303) พ.ศ. 2550 เรื่อง อาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง โดยกำหนดชนิดของยาสัตว์ตกค้าง และปริมาณตกค้างสูงสุดในผลิตภัณฑ์ของสัตว์ ปัจจุบันยาปฏิชีวนะมีแนวโน้มที่จะถูกห้ามผสมลงในอาหารสัตว์ เนื่องจากผลที่ก่อให้เกิดการดื้อยาในคน องค์กรต่างๆ โดยเฉพาะสหภาพยุโรป (European Union, EU) ได้ออกมามาตรการสำหรับเตือนถึงการห้าม ใช้ยาปฏิชีวนะลงในอาหารสัตว์ ดังนั้นทำให้จำเป็นต้องหาทางเลือกที่สามารถทดแทนยาปฏิชีวนะได้ โดยที่มีคุณสมบัติทั้งป้องกันการเกิดอาการท้องร่วงและช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตได้ด้วย

น้ำมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันสายยาวปานกลาง (Medium chain triacylglycerols, MCTAGs) เป็นน้ำมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันสายยาวปานกลาง ซึ่งมีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 6 ถึง 12 อะตอม พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ โดยเฉพาะน้ำมันของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิด (ม้า หนูแรท แกะ และ กระต่าย) กรดไขมันสายยาวปานกลางทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารลูกกระต่าย และถือเป็นแหล่งพลังงานที่ใช้อย่างไรก็ตาม การเสริมกรดไขมันสายยาวปานกลางให้แก่สัตว์โดยตรงไม่เกิดผลดีนัก เนื่องจากมีกลิ่นที่รุนแรงและรสชาติที่สัตว์ไม่ชอบ และกระตุ้นฮอร์โมนบางตัวทำให้สัตว์รู้สึกอึด ทำให้สัตว์กินอาหารได้ลดลง ดังนั้นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับใช้กรดไขมันสายยาวปานกลางในอาหารสัตว์จึงน่าจะเป็นการใช้ไขมันหรือไขมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันสายยาวปานกลางร่วมกับเอนไซม์ไลเปสที่จำเพาะต่อการย่อยไขมันดังกล่าวเพื่อให้ได้กรดไขมันสายยาวปานกลางในทางเดินอาหาร

เอนไซม์ไลเปสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิสของไตรกลีเซอไรด์ได้เป็นไดกลีเซอรอล โมโนกลีเซอไรด์ กลีเซอรอล และกรดไขมันไขมันอิสระ พบทั้งในสัตว์ พืช แบคทีเรีย และรา โดยอาศัยถือเป็นแหล่งที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ อาศัยชอบเค็มถือเป็นอีกแหล่งที่มีความน่าสนใจสำหรับการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีคุณสมบัติพิเศษทั้งในเรื่องของความจำเพาะต่อการย่อยสลายสับสเตรท โดยเฉพาะน้ำมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันสายยาวปานกลาง ความคงทน และการทำงานได้ในสภาวะกรด-ด่างที่ค่อนข้างกว้าง และทนต่อการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง ซึ่งน่าจะมีความเหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในอาหารสัตว์กระเพาะเดี่ยว

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การเลี้ยงสัตว์ในเชิงอุตสาหกรรม

ปัจจุบันการเลี้ยงสัตว์ในเชิงอุตสาหกรรมเป็นการจัดการเลี้ยงดูที่ต้องการผลผลิตสูงสุดเพื่อให้ผลกำไรสูงสุด สำหรับการเลี้ยงสุกร การหย่านมที่อายุประมาณ 3-4 สัปดาห์ถือเป็นวิธีปกติที่ทำกัน ซึ่งในช่วงอายุดังกล่าวถือเป็นช่วงที่มีความสำคัญและจำเป็นต้องเอาใจใส่เป็นอย่างมาก เนื่องจากในช่วงนี้ลูกสุกรได้รับความเครียดหลายๆ ด้านทั้งจากสิ่งแวดล้อม อาหาร และระดับภูมิคุ้มกัน ได้แก่ การถูกแยกออกจากแม่ การเคลื่อนย้ายไปยังโรงเรือนอนุบาล การเปลี่ยนอาหารจากน้ำนมไปเป็นอาหารแข็งและระดับภูมิคุ้มกันที่ลดต่ำลง ส่งผลให้ลูกสุกรกินอาหารได้น้อยลง และยังสามารถนำพลังงานสำรองที่ร่างกายเก็บไว้มาใช้ได้ลดลง (Odle et al., 1996) นอกจากนี้ระดับภูมิคุ้มกันที่ลดลงทำให้แบคทีเรียที่อยู่ภายในทางเดินอาหารมีการเจริญเติบโตที่ผิดปกติ และยังสามารถเกิดการติดเชื้อไวรัส

ได้อีกด้วย ซึ่งจะส่งผลร่วมกันทำให้ลูกสุกรย่อยอาหารได้ไม่เต็มที่ และดูดซึมได้น้อยลง จากผลต่างๆ ที่เกิดขึ้นทำให้ลูกสุกรเกิดอาการท้องเสีย ทำให้เจริญเติบโตได้ไม่เต็มที่ และอาจตายได้ในที่สุด (Frydendahl, 2002)

การให้อาหารลูกสุกรหย่านม

ในการแก้ไขปัญหาดังกล่าว การปรับปรุงอาหารให้เหมาะสมต่อระบบการย่อยอาหารของ ลูกสุกร โดยการใช้วัตถุดิบอาหารสัตว์ต่างๆ ที่ย่อยได้ง่าย เช่น นมผง หางนม แลคโตส ซีรัมเลือดแห้ง (dried blood serum) สารให้กลิ่นรส (flavors) หรือไขมันที่ย่อย ดูดซึม และนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่าย นอกจากนี้ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดอาการท้องร่วงซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อสมรรถภาพการผลิตจึงมีการใช้ยาปฏิชีวนะ (antibiotics) ผสมลงในอาหารสัตว์ อย่างไรก็ตามการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างต่อเนื่อง และการใช้ที่ไม่ถูกต้องทำให้เกิดการดื้อยาได้ (Monroe and Polk, 2000) และมีความเสี่ยงที่จะตกค้างในผลิตภัณฑ์ต่างๆ จากการผลิตสัตว์ในระดับที่มากเกินไป ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อภาวะการดื้อยาของ คนได้ (Allen, 2014) ในประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขจึงออกประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 303) พ.ศ. 2550 เรื่อง อาหารที่มียาสัตว์ตกค้าง โดยกำหนดชนิดของยาสัตว์ตกค้าง และปริมาณตกค้างสูงสุดในผลิตผลของสัตว์ (กระทรวงสาธารณสุข, 2550) อย่างไรก็ตาม ยาปฏิชีวนะมีแนวโน้มที่จะถูกห้ามผสมลงในอาหารสัตว์ เนื่องจากผลที่ก่อให้เกิดการดื้อยาในคน องค์กรต่างๆ โดยเฉพาะสหภาพยุโรป (European Union, EU) ได้ออกมาตรการสำหรับเตือนถึงการห้ามใช้ยาปฏิชีวนะลงในอาหารสัตว์ (Pugh, 2002) ทำให้จำเป็นต้องหาทางเลือกที่สามารถทดแทนยาปฏิชีวนะที่มีคุณสมบัติในการป้องกันการเกิดอาการท้องร่วงและช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตได้

การใช้กรดไขมันสายยาวปานกลางในอาหารลูกสุกรหย่านม

น้ำมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันสายยาวปานกลาง (Medium chain triacyl- glycerols, MCTAGs) เป็นน้ำมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันสายยาวปานกลาง ซึ่งมีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 6 ถึง 12 อะตอม ตัวอย่างที่พบในธรรมชาติ ได้แก่ น้ำมันมะพร้าว (coconut oil) น้ำมันเมล็ดในของปาล์ม (palm kernel oil) น้ำมันปาล์มบาบาซุ (babassu oil) น้ำมันปาล์มโคฮูเน (cohune oil) น้ำมันจากดอกตระกูล *Cuphea* (cuphea oil) น้ำมันของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิด (นม หนูแรท แกะ และ กระต่าย) และไขมันเนย (butterfat) ความสำคัญของกรดไขมันสายยาวปานกลางในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารเริ่มต้นจากการค้นพบว่ากระเพาะอาหารและลำไส้เล็กของลูกกระต่ายที่อยู่ในช่วงดูดนมมีสภาพปราศจากจุลินทรีย์โดยสิ้นเชิง เมื่อพิจารณาจากองค์ประกอบของไขมันนมและเอนไซม์ไลเปสที่สร้างจากผนังกระเพาะอาหาร ทำให้สามารถบอกได้ว่ากรดไขมันสายยาว

ปานกลางทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในกระเพาะอาหาร (Cañas-Rodriguez and Smith, 1966) และยังพบว่าระดับของกรดไขมันสายยาวปานกลางที่เป็นองค์ประกอบของไขมันนมสัมพันธ์ผกผันกับความผิดปกติของลูกสัตว์ด้วย (Smith, 1980) นอกจากนี้ กรดไขมันสายยาวปานกลางยังมีคุณสมบัติที่เฉพาะ คือ ถูกขนส่งจากเส้นเลือดใหญ่ไปยังตับโดยตรงและเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในไมโทคอนเดรียโดยไม่ต้องอาศัยการทำงานของคาร์นิทีน ช่วยให้ลูกสัตว์ที่เพิ่งคลอดสามารถใช้พลังงานได้ทันที ประโยชน์ของการใช้ไขมันที่ประกอบ ด้วยกรดไขมันสายยาวปานกลาง (medium chain triglycerides, MCTG) เป็นแหล่งพลังงานถูกค้นพบทั้งในลูกสุกรแรกเกิด (Odle, 1998) และลูกสุกรหย่านม (Cera et al., 1989) อย่างไรก็ตาม กรดไขมันสายยาวปานกลางมีกลิ่นที่รุนแรงและรสชาติที่สัตว์ไม่ชอบ ทำให้สัตว์กินอาหารได้ลดลง (Cera et al., 1989) นอกจากนี้ การให้กรดไขมันสายยาวปานกลางในปริมาณที่มากเกินไปจะส่งผลเสียต่อลูกสัตว์ได้ เช่น การบ่อนก้นอาหารที่มีไขมันชั้นของไขมันในลูกสุกรแรกเกิดจะทำให้เป็นโรคคีโตสิส และอาจสลับได้ (Lin et al., 1995) นอกจากนี้ กรดไขมันสายยาวปานกลางยังกระตุ้นฮอร์โมน cholestykinin (CCK) อย่างรุนแรงและรวมถึงฮอร์โมนชนิดอื่นๆ ในลำไส้ ทำให้สัตว์รู้สึกอิ่ม ซึ่งส่งผลกระทบต่อปริมาณอาหารที่กิน (Lepine et al., 1989) ดังนั้นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับใช้กรดไขมันสายยาวปานกลางในอาหารสัตว์จึงน่าจะเป็นการใช้ไขมันหรือไขมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันสายยาวปานกลางร่วมกับเอนไซม์ไลเปสที่จำเพาะต่อการย่อยไขมันดังกล่าวเพื่อให้ได้เป็นกรดไขมันสายยาวปานกลางในทางเดินอาหารในปริมาณที่เหมาะสม

เอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปส (Triacylglycerol ester hydrolases, EC 3.1.1.3)

เอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไขมันโดยการไฮโดรไลซิสของไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) ได้เป็นไดกลีเซอรอล (Diglyceride) โมโนกลีเซอไรด์ (Monoglyceride) กลีเซอรอล (Glycerol) และกรดไขมันอิสระ (Free fatty acid) หลังจากนั้นกรดไขมันถูกออกซิไดส์ (oxidize) เป็น Acetyl CoA และจะถูกนำเข้าสู่วงจร TCA เพื่อเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ พลังงาน กรดอะมิโน และสารอื่นๆ นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาย้อนกลับได้ โดยจะเร่งการสร้างพันธะเอสเทอร์ระหว่างกลีเซอรอลกับ กรดไขมันอิสระ

แหล่งที่มาของเอนไซม์ไลเปส

เอนไซม์ไลเปสพบได้ทั้งในสัตว์ พืช แบคทีเรีย และรา ในสัตว์พบในน้ำนมและตับอ่อน (pancrease) ในพืชพบในเมล็ดที่กำลังงอกเช่น เมล็ดข้าวสาลี ข้าวโอ๊ต ข้าวไรย์ ฝ้าย ถั่วเหลืองและละหุ่ง เป็นต้น เอนไซม์ไลเปสจากพืชและสัตว์มีความเสถียร (stability) ต่ำกว่าที่มาจากจุลินทรีย์ เอนไซม์ไลเปสที่ผลิตโดยแบคทีเรียพบทั้งที่สร้างอยู่ในเซลล์และขับออกมานอกเซลล์ ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์มีข้อดีกว่าที่ผลิตจากพืชและสัตว์ เนื่องจากจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้เร็วกว่า เพาะเลี้ยงง่าย ใช้พื้นที่น้อยกว่า และไม่ขึ้นอยู่กับฤดูกาล นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มผลผลิตได้โดยวิธีปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์ (ทั้งวิธีการทำให้กลายพันธุ์และใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม) จุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตไลเปสได้ ซึ่งไลเปสจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดก็มีคุณสมบัติที่ต่างกัน จุลินทรีย์บางชนิดผลิตไลเปสที่ทำงานที่พีเอชเป็นด่าง (alkaline lipase) เช่น *Alcaligenes* sp. No. 579 บางชนิดผลิตไลเปสที่ทำงานที่พีเอชเป็นกลาง (neutral lipase) เช่น ไลเปสชนิด A และ B จาก *Chromobacterium* sp. และบางชนิดผลิตไลเปสที่ทนอุณหภูมิได้ถึง 100 °ซ เช่น ไลเปสจาก *Candida cylindracea* การที่จุลินทรีย์สามารถผลิตไลเปสที่มีคุณสมบัติที่ต่างกันทำให้สามารถเลือกไลเปสมาใช้ประโยชน์ให้เหมาะสมกับอุตสาหกรรมต่างๆ ได้มากมาย

ความจำเพาะต่อกรดไขมัน (Fatty acid specificity)

ไลเปสแต่ละชนิดสามารถย่อยไขมันซึ่งประกอบด้วยกรดไขมันชนิดต่างๆ ด้วยอัตราที่แตกต่างกัน ถ้าหากการย่อยเกิดขึ้นด้วยอัตราที่สูง แสดงว่าเอนไซม์ไลเปสมีความจำเพาะต่อกรดไขมันชนิดนั้น เช่น เอนไซม์ไลเปสที่จำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดสั้น (ต่ำกว่า C8) จากเชื้อ *Penicillium cyclopium* (Chahinian et al., 2000) เอนไซม์ไลเปสที่จำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดกลาง (C8-C14) จาก *Aspergillus niger* และ *Rhizopus delemar* (Klein et al., 1997; Elibol and Ozer, 2000) และเอนไซม์ไลเปสที่จำเพาะต่อกรดไขมันที่มีความยาวโมเลกุลขนาดยาว (ตั้งแต่ C14 เป็นต้นไป) จากเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas* (Chakraborty and Paul Raj, 2009) จากความจำเพาะของไลเปสที่มีต่อกรดไขมันชนิดต่างๆ ทำให้สามารถนำเอนไซม์ไลเปสไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้อย่างมากมาย โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหารหมัก เพราะเอนไซม์ไลเปสจะย่อยสลายไขมันจนทำให้ได้สารที่มีกลิ่นและรสที่เฉพาะตัวและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค โดยพบว่าในอุตสาหกรรม การหมักมักใช้เอนไซม์ไลเปสบริสุทธิ์เติมลงไปในการผลิตภัณฑ์ เช่น โยเกิร์ต และ ซีสท์ หรือ ใช้จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสเติมลงในอาหาร เช่น ใช้ lactic acid bacteria ในการผลิตนมเปรี้ยว หรือ โยเกิร์ต ทำให้อาหารหมักนั้นมี กลิ่น และรส เฉพาะ (Hasan et al., 2006)

ฮาเคียชอบเค็ม

ฮาเคียชอบเค็ม (halophilic archaea) อาเคียกลุ่มนี้เจริญได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือความเข้มข้นตั้งแต่ 15% (w/v) จนถึงความเข้มข้นของเกลืออิ่มตัว (saturated NaCl) และความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต คือ 20-25% ดังนั้นในอาหารหมักที่มีเกลือสูง (22-29%) เช่น น้ำปลา จึงเป็นแหล่งที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของฮาเคียชอบเค็มสูง (Lopetcharat et al., 2001)

เอนไซม์จากฮาเคียชอบเค็ม เอนไซม์จากฮาเคียชอบเค็มส่วนใหญ่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิในช่วง 50 ถึง 65 °ซ และที่ค่าความเป็นกรด - เบส ในช่วงประมาณ 7 (Gomes and Steiner, 2004) และยังพบว่าเอนไซม์จากฮาเคียชอบเค็มหลายสายพันธุ์สามารถทนต่ออุณหภูมิในช่วง 37 - 80 °ซ เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 2 ชั่วโมง โดยมีกิจกรรมคงเหลือประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ (Vidyasagar et al., 2006) ซึ่งเหมาะต่อการทำงานในสภาวะทางเดินอาหารของสัตว์ (37 - 40 °ซ) และยังมีแนวโน้มทนต่อสภาวะในการอัดเม็ดของอาหารสัตว์ที่อุณหภูมิ 80 °ซ ซึ่งเป็นช่วงเวลาเพียง 25-30 วินาที

เอนไซม์ไลเปสจากฮาเคียชอบเค็ม เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มฮาเคียชอบเค็มหลายสายพันธุ์ มีแนวโน้มที่จะผลิตเอนไซม์ไลเปสที่จำเพาะต่อการย่อยน้ำมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันสายยาวปานกลาง ได้แก่ *Halorhabdus tiamatea*, *Halogranum rubrum*, *Halopelagius inordinatus*, *Haladaptatus litoreus*, *Halomicrobium katesii* และ *Halobacterium piscisalsi* (Antunes et al., 2008; Kharroub et al., 2008; Yachai et al., 2008; Cui et al., 2010a; Cui et al., 2010b; Cui et al., 2010c) โดยพิจารณาจากกิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอร์ ไลเปสที่ย่อยสารตั้งต้นที่ประกอบด้วยกรดไขมันที่มีความยาว 8 คาร์บอนอะตอมที่วัดโดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM อย่างไรก็ตาม การศึกษาและใช้ประโยชน์เอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ยังมีค่อนข้างจำกัด เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ได้พบโดยทั่วไป ความรู้เกี่ยวกับจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ยังมีไม่มากและจำกัดอยู่ในกลุ่มนักวิจัยบางกลุ่มเท่านั้น จึงเป็นโอกาสที่จะค้นพบจุลินทรีย์และเอนไซม์ไลเปสชนิดใหม่ที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในงานที่หลากหลายมากขึ้น

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อแยกและคัดเลือกเชื้อแอเคียชอบเค็มที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสมต่อการย่อยน้ำมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันสายยาวปานกลาง
2. เพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อแอเคียชอบเค็ม
3. เพื่อศึกษาการทำเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแอเคียชอบเค็มให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปส
4. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อแอเคียชอบเค็มเพื่อย่อยไขมันในสภาวะจำลองของทางเดินอาหารสัตว์กระเพาะเดี่ยว

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่างและการแยกแอเคียชอบเค็มสูง

การเก็บและการเตรียมตัวอย่าง เก็บตัวอย่างดินบริเวณนาเกลือและอาหารหมักเกลือ เช่น น้ำปลา ปลาร้า ปูเค็ม ฯลฯ ที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ กัน การเก็บตัวอย่างใช้เทคนิคทำให้ปลอดเชื้อ (aseptic technique)

การแยกเชื้อและทำให้บริสุทธิ์ นำตัวอย่าง 5 กรัม (ก.) ตีผสมกับสารละลาย NaCl เข้มข้น 250 กรัมต่อลิตร (ก. ต่อ ล.) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 45 มิลลิลิตร (มล.) (สำหรับตัวอย่างน้ำปลาไม่ต้องผสมกับสารละลาย NaCl) ดูดตัวอย่างปริมาตร 1 มล. ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเทอาหารแข็ง Halophilic medium (HM) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (°ซ) ผสมให้เข้ากัน และบ่มที่ อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นระยะเวลา 7 วัน คัดเลือกโคโลนีที่มีความแตกต่างกัน นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Cross streak จากนั้นเก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ในอาหารวุ้นเอียง (slant agar) ที่อุณหภูมิ 5 °ซ เพื่อใช้เป็นเชื้อ ใช้งาน (working stocks) และเก็บในกลีเซอรอลเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -80 °ซ เพื่อใช้เป็นเชื้อ ต้นตอ (primary stocks) อาหารเหลว HM 1 ลิตร (ล.) ประกอบด้วย Casamino acid 5 ก. Yeast extract 10 ก. sodium glutamate 1 ก. Potassium chloride 2 ก. trisodium citrate 3 ก. Magnesium sulphate heptahydrate 2 ก. Ferrous chloride tetrahydrate 0.036 ก. และ Manganese chloride tetrahydrate 0.00036 ก. และ Sodium chloride (NaCl) 250 ก. ปรับความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7.2 การเตรียมอาหารแข็งทำโดยเติมวุ้น 20 ก. (Tapingkae et al., 2008)

การคัดเลือกอาศัยชอบเค็มสูงที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส เตรียมอาหารแข็ง HM ที่เสริมด้วยน้ำมันมะพร้าว (halophilic oil medium; HOM) โดยอุ่นน้ำมันแต่ละชนิดและอาหารแข็ง HM ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 60°C เติมน้ำมันปริมาตร 25 มล. ลงในอาหารปริมาตร 1,000 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Homogenizer (IKA-Labortec-hnik) ที่ความเร็ว 9,500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 นาที จากนั้นทิ้งให้อุณหภูมิลดลงเหลือ ประมาณ 45°C จึงเติมสารละลาย victoria blue เข้มข้น 10 มก. ต่อ มล. ปริมาตร 1 มล. ชีดเชื้ออาศัยที่แยกได้บนอาหารแข็ง HOM บ่มที่ 37 °ซ เป็นระยะเวลา 7 วัน คัดเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยพิจารณาจากโซนสีน้ำเงิน ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาของกรดไขมันและสารสี (Rohban et al., 2009)

การพิสูจน์เอกลักษณ์

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ และชีวเคมีของอาศัยชอบเค็มสูง (Oren et al., 1997)

ชีดแยกเชื้ออาศัยบนอาหารแข็ง HM จนกระทั่งเชื้อเจริญดี ศึกษาลักษณะโคโลนี โดยพิจารณา รูปร่าง ขนาด สี ลักษณะผิว ความโปร่งแสง จากนั้นนำไปย้อมสีแกรม ดูรูปร่างและขนาดของเซลล์ การสร้างเอนโดสปอร์ และการเคลื่อนที่ การสร้างเอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ ออกซิเดส คาตาเลส และยูรีเอส การทดสอบ เอ็มอาร์วีพี การย่อยสลาย แป้ง เจลาติน ไทโรซีน อาร์จินีน ไตรบูไทลิน แชนทีน และไฮโปร-แชนทีน การสร้างอินโดล การทดสอบ Oxidation-Fermentation และการทดสอบเมทิลเรด ความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ การเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน การเจริญภายใต้สภาวะต่างๆ ได้แก่ ความเข้มข้น NaCl (0 - 300 ก. ต่อ ล.) ความเป็นกรด-เบส (4 - 9) และอุณหภูมิ (25 - 50°C)

การศึกษาลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี (chemotaxonomic characteristics)

เพาะเชื้ออาศัยที่คัดแยกได้ลงในอาหารเหลว HM ปริมาตร 500 มล. โดยเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นระยะเวลา 7 วัน นำเชื้อที่เลี้ยงได้ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาที แยกเก็บเซลล์ ล้างด้วยสารละลาย NaCl เข้มข้น 250 ก. ต่อ ล. 2 รอบ และทำแห้งโดยใช้เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dry) สกัดและวิเคราะห์ชนิดของไขมันที่มีขั้ว (Polar lipids) ตามวิธีของ (Minnikin et al., 1984) และ ชนิดของ menaquinones ตามวิธีการของ Komagata and Suzuki (1987)

การหาลำดับเบสของชิ้นส่วน 16S rDNA

แยก DNA และทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีของ Marmur (1961) เพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 16S rDNA โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) จากนั้นแยกชิ้นส่วน 16S rDNA โดยใช้เทคนิค Agarose gel electrophoresis และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ prep-A-Gene DNA purification kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif) หาลำดับเบสของชิ้นส่วน 16S rDNA โดยใช้ ABI PRISM BigDye Terminator Cycle sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems) วิเคราะห์ลำดับเบสโดยเครื่อง ABI PRISM 377 Genetic Analyser (Applied Biosystems) เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสของ 16S rDNA กับยีนอื่นๆ ในฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม BLAST จาก www.ncbi.nlm.nih.gov เพื่อระบุกลุ่มเชื้อ ที่มีความใกล้เคียงกันมากที่สุด จากนั้นวิเคราะห์เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสส่วน 16S rDNA กับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน (type strain) ของแต่ละกลุ่มที่คัดเลือกด้วยโปรแกรม ClustalW (Larkin et al., 2007) โดยพิจารณาจากค่าร้อยละการเข้าคู่กันระหว่างลำดับเบสส่วน 16S rDNA (16S rDNA sequence similarity) และสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ซึ่งสร้างด้วยวิธี Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987) โดยทดสอบความเชื่อมั่นโดยกำหนดค่า bootstrap จำนวน 1,000 ครั้ง (Felsenstein, 1985) โดยใช้โปรแกรม MEGA4 (Kumar et al., 2008)

การศึกษาความคล้ายคลึงของ DNA (DNA-DNA hybridization)

คัดเลือกเชื้อที่มีค่าร้อยละการเข้าคู่กันระหว่างลำดับเบสส่วน 16S rDNA กับเชื้อสายพันธุ์มาตรฐานน้อยกว่า 97 ซึ่งคาดว่าจะจะเป็นสายพันธุ์ใหม่ ศึกษาความคล้ายคลึงของลำดับ DNA ของเชื้อที่คัดเลือกกับสายพันธุ์มาตรฐาน (type strain) ทุกสายพันธุ์ซึ่งอยู่ในสกุล (species) เดียวกันตามวิธีของ Ezaki et al. (1989) และเปรียบเทียบระดับความเหมือนของ DNA โดยใช้วิธีการทดสอบด้วยการดูสี (colorimetric method) ตามวิธีของ Tanasupawat et al (2000)

การวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส

การเตรียมเอนไซม์ เลี้ยงเชื้ออาศัยที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดจากการเลือกโดยใช้วิธีอาหารแข็ง HM ที่เสริมด้วยน้ำมันมะพร้าว โดยใช้หัวงีเยื่อและเชื้อจากจานอาหาร HM แข็งเต็มหัวงี (1 loopful) ลงในอาหารเหลว HOM ปริมาตร 5 มล. นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นระยะเวลา 15 นาที และเก็บส่วนใส (เอนไซม์โดยรวม) ในตู้เย็นจนกระทั่งวัดกิจกรรมของเอนไซม์

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้สารตั้งต้นสังเคราะห์ (synthetic substrate) โดยใช้สารประกอบเอสเทอร์ระหว่างไนโตรฟินอล (nitrophenol) และกรดไขมันที่มีจำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 2 – 18 อะตอม (C2-C18 fatty acid) ตามวิธีของ Kordel et al. (1991) โดยกำหนดสภาวะมาตรฐานที่ความเป็น กรด-ด่างเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 37 °ซ และความเข้มข้น NaCl 250 ก. ต่อ ล. แบ่งเตรียมสารตั้งต้นออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ส่วน A ประกอบด้วยสารตั้งต้นสังเคราะห์แต่ละชนิดเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (mM) ซึ่งละลายใน 2-โพรพานอล (2-propanol) และส่วน B ประกอบด้วย Triton X-100 4 ก. ต่อ ล. และ gum arabic 1 ก. ต่อ ล. ซึ่งละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl เข้มข้น 50 (mM) ที่ประกอบด้วย NaCl 250 ก. ต่อ ล. (สารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐาน) สำหรับส่วน B ที่จะใช้ผสมกับส่วน A ของสารประกอบเอสเทอร์ที่มีกรดไขมัน ที่มีหมู่จำนวนคาร์บอนตั้งแต่ 8-14 อะตอม ใช้เพียงสารละลายบัฟเฟอร์เท่านั้น โดยทั้งสารละลาย A และ B สามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นได้เป็นระยะเวลาประมาณ 2 สัปดาห์ การเตรียมสารตั้งต้นทำโดยผสม สารตั้งต้นส่วน A 1 ส่วนกับส่วน B 9 ส่วน โดยต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ จากนั้นทำปฏิกิริยาระหว่างสารตั้งต้น ปริมาตร 0.9 มล. และเอนไซม์ปริมาตร 0.1 มล. โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ โดยบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร กิจกรรม ของเอนไซม์ 1 หน่วยเท่ากับ ปริมาณเอนไซม์ซึ่งสามารถปลดปล่อยไนโตรฟินอล 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้ สภาวะที่กำหนด การวัด กิจกรรมของเอนไซม์จะแยกวัด 2 ครั้งโดยแต่ละครั้งใช้เอนไซม์เข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้น้ำมันเป็นสารตั้งต้น และวัดปริมาณกรดไขมัน ที่เกิดขึ้นตามวิธีของ Kwon and Rhee (1986) เตรียมสารตั้งต้นให้อยู่ในรูปของอิมัลชัน (emulsion) โดยผสมน้ำมันมะพร้าวหรือน้ำมันเมล็ดในปาล์ม 0.5 ก. กับสารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐานปริมาตร 2 มล. ด้วย เครื่อง Homogenizer ที่ความเร็ว 9,500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ ปริมาตร 0.5 มล. โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยเติมกรดเกลือเข้มข้น 6 นอร์มัล (N) ปริมาตร 0.2 มล. ไอโซออกเทนปริมาตร 3 มล. เขย่าให้เข้ากันและต้มเดือดเป็นระยะเวลา 5 นาที หลังจากทิ้งให้เย็น ดูดสารละลายส่วนบน (ไอโซออกเทน) ซึ่งจะมีกรดไขมันละลายอยู่ปริมาตร 2 มล. ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย cupric acetate-pyridine ปริมาตร 0.5 มล. จะทำให้เกิดการแยกชั้น ผสมให้ เข้ากันโดยใช้ vortex mixture เป็นระยะเวลา 90 วินาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 10-20 นาที จนกระทั่งส่วนที่เป็นน้ำ แยกชั้นจากไอโซออกเทนอย่างชัดเจน วัดค่าการดูดกลืนแสงของตัวทำละลายไอโซออกเทนที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันที่ได้โดยใช้กราฟมาตรฐานของกรดไขมันลอริก (Lauric acid) ในช่วง 2-50 ไมโครโมล กิจกรรมของเอนไซม์ 1 หน่วยเท่ากับปริมาณเอนไซม์ซึ่งสามารถปลดปล่อยกรดไขมัน 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ไลเปสด้วยวิธีของ Bradford (1976) โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน

การศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสเพื่อย่อยไขมันในสภาวะจำลองของทางเดินอาหารสัตว์ กระเพาะเดียว

ผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้ออากีที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด 3 อันดับจากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้สารตั้งต้นสังเคราะห์ และเตรียมอิมัลชันของน้ำมันมะพร้าวที่ประกอบด้วยน้ำมันมะพร้าว 10 มล. น้ำกลั่น 10 มล. และสารละลาย Dispersion 20 มล. [ซึ่งประกอบด้วยกลีเซอรอล 540 มล. กัมอะราบิก 10 ก. โซเดียมคลอไรด์ 18 ก. และ KH_2PO_4 0.4 ก. ในน้ำกลั่น 1 ล. ตามวิธีของ Arroyo et al. (1996) โดยใช้เครื่อง homogenizer ที่ความเร็วรอบ 20,500 rpm เป็นระยะเวลา 1 นาที และต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งก่อนใช้ในการทดลอง

กำหนดสภาวะที่ใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสตามวิธีของ Dierick et al. (2002) เตรียมส่วนผสมอาหารที่ประกอบด้วยอิมัลชันของน้ำมันมะพร้าว 1 ก. อาหาร (ประกอบด้วยข้าวโพดบด กากถั่วเหลือง และวิตามิน-แร่ธาตุผสม) 2.5 ก. สารละลายบัฟเฟอร์ pH 3.0 10 มล. สารละลายจากลำไส้ลูกสุกร 1 มล. และเอนไซม์ไลเปส 1 มล. บ่มส่วนผสมทั้งหมดในหลอดทดลองเป็นระยะเวลา 180 นาที ที่อุณหภูมิ 37 °C โดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าได้ จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยเติมกรด HCl เข้มข้น 3 N ปริมาตร 1 มล. และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,500 × g เป็นระยะเวลา 10 นาที

ทำปฏิกิริยาของสารประกอบเอสเทอร์ของกรดไขมันและเมทิล (Fatty acid methyl ester; FAME) โดยทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลายส่วนใส 0.15 มล. เฮกเซน 1.5 มล. ที่ประกอบด้วยลิโมเนน 0.3 ไมโครลิตร (สารมาตรฐานภายใน) และ สารละลาย methanolic sodium methoxide 1 M 60 ไมโครลิตร (Chang et al., 1999) เขย่าส่วนผสมโดยใช้ vortex mixture เป็นระยะเวลา 3 นาที และเขย่าต่อโดยใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 350 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,500 × g เป็นระยะเวลา 5 นาที วิเคราะห์ FAME ในสารละลายส่วนใสด้วยเครื่อง gas-liquid chromatography ยี่ห้อ Hewlett-Packard (HP) 6890 series ที่ต่อกับ flame ionization detector และ คอลัมน์ HP-5 capillary column (30 m × 0.32 mm i.d. และ 0.25 µm film thickness) ตั้งอุณหภูมิของตู้เก็บคอลัมน์ เริ่มจาก 40 เป็น 100 °C ที่อัตรา 17 °C ต่อนาที และจาก 100 เป็น 220 °C ที่อัตรา 10 °C ต่อนาที จากนั้นคงอุณหภูมิที่ 220 °C เป็นระยะเวลา 4 นาที อุณหภูมิที่ตัวฉีดและตัวตรวจจับสัญญาณเท่ากับ 220 และ 230 °C, ตามลำดับ ใช้ก๊าซฮีเลียมเป็นก๊าซสำหรับพาโดยกำหนดอัตราการไหลเท่ากับ 1.9 มล. ต่อ นาที คำนวณปริมาณกรดไขมันแต่ละตัวโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานภายใน

การประเมินค่าการย่อยได้ในสัตว์ (*In vivo* digestibility) และสมรรถภาพการผลิตของลูกสุกรหย่านม

สัตว์ทดลองและการจัดสูตรอาหาร ใช้ลูกสุกรหย่านมเพศผู้อายุ 4 สัปดาห์ จำนวน 24 ตัว โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์แบ่งออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 4 ตัว ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสนำเข้าจากต่างประเทศ 3 ชนิด เอนไซม์ไลเปสโดยรวมที่ผลิต 3 ระดับ ได้แก่ ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับที่แนะนำของเอนไซม์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสน้อยกว่าที่แนะนำของเอนไซม์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ 0.5 เท่า และระดับกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสมากกว่าที่แนะนำของเอนไซม์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ 1.0 เท่า

การให้อาหาร และการเก็บตัวอย่างอาหารที่เหลือ ปัสสาวะและมูล แบ่งการให้อาหารสุกรเป็น 4 ช่วงๆ ละ 7 วัน โดยในแต่ละช่วงแบ่งเป็น 4 วัน สำหรับการปรับตัวซึ่งให้อาหารที่ไม่เสริมไททาเนียมออกไซด์ และ 3 วัน สำหรับการเก็บตัวอย่างมูลและปัสสาวะซึ่งให้อาหารที่เสริมไททาเนียมออกไซด์ แบ่งให้อาหารวันละ 3 มื้อ ทดลองเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ บันทึกปริมาณอาหารที่กิน และน้ำหนักตัวของสุกรแต่ละคอกทุกสัปดาห์ คำนวณปริมาณอาหารที่กินเฉลี่ย อัตราการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหาร และ ต้นทุนค่าอาหารต่อการเพิ่มน้ำหนักตัว

นำตัวอย่างอาหารและมูลที่แช่แข็งของแต่ละช่วงที่เก็บตัวอย่างมาละลายน้ำแข็ง โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ผสมให้เข้ากัน อบที่อุณหภูมิ 65-70°C เป็นระยะเวลา 48 ชม. และบันทึกน้ำหนักหลังอบ จากนั้นวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีตามวิธีของ AOAC (2005) และวิเคราะห์เยื่อใย ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน โดยวิธีของ Van Soest (1963) นำตัวอย่างปัสสาวะที่แช่แข็งของแต่ละช่วงที่เก็บตัวอย่างมาละลายน้ำแข็ง โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง และผสมให้เข้ากัน เพื่อวิเคราะห์โปรตีน แคลเซียมและฟอสฟอรัส โดยวิธีของ AOAC (2005) วิเคราะห์ปริมาณไททาเนียมออกไซด์ในอาหารและมูลตามวิธีของ Myers et al. (2004)

ประเมินสุขภาพและการเกิดท้องเสียของลูกสุกรวันละ 2 ครั้ง เวลา 6:00 น. และ 18:00 น. โดยสังเกตลักษณะทางกายภาพและสีของมูลเพื่อประเมินอาการท้องเสียของลูกสุกร บันทึกสุขภาพของลูกสุกร ลักษณะขน และลักษณะสีของทวาร ตามวิธีของ Lynch et al. (2009) ทำการสุ่มตัวอย่างมูลลูกสุกรของแต่ละกลุ่มมาเพาะแยกเชื้อและวัดปริมาณจุลินทรีย์

การวัดค่าทางเคมีและปริมาณจุลินทรีย์ วัดปริมาณแลคเตต (lactate) และกรดไขมันระเหยง่าย (volatile fatty acids) โดยใช้เทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟีตามวิธีของ Jensen et al. (1995) วัดปริมาณจุลินทรีย์โดยใช้เทคนิค Spread plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ ได้แก่ Oxoid (Basingstoke, England), Reinforced Clostridial Medium, เสริมด้วย hemin 0.001% สำหรับ

เชื้อทั้งหมด (สภาวะที่ไร้ออกซิเจน, 48 ชม.), Rogosa agar สำหรับเชื้อในกลุ่ม *Lactobacilli*, Slanetz & Bartley medium สำหรับเชื้อในกลุ่ม *Streptococci* และ Eosin Methylene Blue agar (เฉพาะโคโลนีที่มีสี greenish ถึง brown) สำหรับเชื้อ *E. coli* ตามวิธีของ Dierick *et al.* (2010)

การผลิตเอนไซม์ไลเปส

การเตรียมเอนไซม์ เลี้ยงเชื้ออาศัยที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดจากการเลือกโดยใช้วิธีอาหารแข็ง HM ที่เสริมด้วยน้ำมันมะพร้าว โดยใช้ห้วงเชื้อและเชื้อจากจานอาหาร HM แข็งเต็มห้วง (1 loopful) ลงในอาหารเหลว HOM ปริมาตร 5 มล. นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นระยะเวลา 15 นาที และเก็บส่วนใส (เอนไซม์โดยรวม) ในตู้เย็นจนกระทั่งวัดกิจกรรมของเอนไซม์

3.7.1 การเตรียมต้นเชื้อ เลี้ยงเชื้ออาศัยที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุด จากข้อ 3.4 ในอาหารเหลว HOM โดยใช้ห้วงเชื้อและเชื้อใช้งานจากอาหารวันเอียงซึ่งเก็บที่ อุณหภูมิ 5°ซ เต็มห้วง (loopful) ลงในอาหารเหลว HOM ปริมาตร 5 มล. แยกเอนไซม์และวัดกิจกรรมของเชื้อใช้งานตามวิธีในข้อ 3.4

3.7.2 การผลิตเอนไซม์ กำหนดสภาวะเริ่มต้นต่างๆ สำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ ได้แก่ ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร อาหารเลี้ยงเชื้อ HOM ซึ่งปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 37°ซ และระยะเวลาการเลี้ยง 7 วัน ศึกษารูปแบบการเจริญเติบโตโดยวัดปริมาณเชื้ออาศัยโดยเทคนิค Spread plate และการผลิตเอนไซม์โดยวัดกิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อใช้งานตามวิธีในข้อ 3.4

3.7.3 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสม คัดเลือกองค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน (น้ำมันมะพร้าวและน้ำมันเมล็ดในปาล์ม) แหล่งไนโตรเจน (Yeast extract, Peptone, Meat extract, Malt extract, Urea, Ammonium nitrate และ Ammonium sulfate) โดยใช้แผนการทดลองแบบ Plackett–Burman design จากนั้นคัดเลือกองค์ประกอบที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ เพื่อศึกษาระดับที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์โดยใช้วิธี Response surface methodology ตามวิธีของ (Akolkar *et al.*, 2009)

การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์

3.8.1 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ นำเอนไซม์โดยรวมที่ได้จากข้อ 3.7 ทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคทางโครมาโตกราฟี (chromatography) ต่างๆ เช่น ion-exchange chromatography และ gel filtration chromatography โดยตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ในแต่ละขั้นตอนโดยวัดกิจกรรมของ เอนไซม์ และปริมาณโปรตีนในทุก fraction ที่แยกได้ จากนั้นเก็บและรวม fraction ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ จนได้เอนไซม์บริสุทธิ์

3.8.2 การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ โดยศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ได้แก่ น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ pH และอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์ ความจำเพาะของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น ผลของ divalent ion ชนิดต่างๆ ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ผลของสารยับยั้งต่างๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์ และความคงตัวของเอนไซม์

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสเพื่อย่อยไขมันในสภาวะจำลองของกระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก 3 ชั่วโมง (หลอด) แต่ละหลอดวัดปริมาณกรดไขมัน 2 ชั่วโมง (ครั้ง) ประเมินฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยใช้เทคนิคการวัดในหลอดทดลอง 3 ชั่วโมง (หลอด) แต่ละหลอดวัดปริมาณแลคเตต กรดไขมันระเหยง่าย และปริมาณจุลินทรีย์ 2 ชั่วโมง (ครั้ง) คำนวณค่าเฉลี่ยของปริมาณจุลินทรีย์อยู่ในหน่วย $\log_{10}\text{CFU}$ ต่อ ก. วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS 19 (SPSS, USA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test

ผลการทดลอง

การคัดเลือกและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของอาศัยชอบเค็มสูงที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

จากการแยกเชื้อจากตัวอย่างปุ๋ยเค็มที่เก็บจากจังหวัดสมุทรสาคร ตัวอย่างน้ำปลาที่เก็บจากโรงงานในจังหวัดสมุทรสงครามและจังหวัดสิงห์บุรี ดินนาเกลือจังหวัดสมุทรสงคราม ทั้งหมด 15 ตัวอย่าง ได้เชื้อชอบเค็มทั้งหมด 78 ไอโซเลต (Table 1) จากนั้นพบว่ามีเพียง 5 สายพันธุ์เท่านั้น ได้แก่ HSB1-2 HM709 HM738 SQ1-4 และ SQ1-22 ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสที่จำเพาะกับการย่อยไขมันที่มีกรดไขมันสายยาวปานกลางเป็นองค์ประกอบ เมื่อทดสอบการย่อยโดยใช้อาหารแข็ง HM ที่เสริมด้วยน้ำมันมะพร้าว พบว่ามีเพียง 5 สายพันธุ์เท่านั้น (Figure 1) โดยสายพันธุ์ HSB1-2 มีความสามารถในการย่อยได้สูงสุด เมื่อคิดเป็นความกว้างของวงใสได้เท่ากับ 40 มม. (Table 3)

นอกจากนี้ เชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ทั้งหมด 154 ไอโซเลตแสดงใน Table 2 แบ่งตามแหล่งที่มาได้ดังนี้ ตลาดต้นลำไย 31 ไอโซเลต (มะพร้าวเน่า 11 ไอโซเลต ท่อน้ำทิ้ง 12 ไอโซเลต และ กากมะพร้าว 8 ไอโซเลต) ตลาดเมืองใหม่ 31 ไอโซเลต (เปลือกมะพร้าว 10 ไอโซเลต) ตลาดรวมโชค 23 ไอโซเลต (มะพร้าวเน่า 4 ไอโซเลต ท่อน้ำทิ้ง 13 ไอโซเลต กากมะพร้าว 2 ไอโซเลต และ มะพร้าวแห้ง 4 ไอโซเลต) จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 13 ไอโซเลต (ผลปาล์มเน่า 43 ไอโซเลต และ ผลปาล์มแห้ง 5 ไอโซเลต) กากมะพร้าวซึ่งบ่มที่คณะเกษตรศาสตร์ 17 ไอโซเลต ไร้แม่เหียะ 17 ไอโซเลต (ขุยไผ่ 11 ไอโซเลต และ ดินใต้ต้นไผ่ 9 ไอโซเลต) ถั่วเหลืองหมัก 5 ไอโซเลต และเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้น้ำพุร้อน 81 ไอโซเลต ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงและวัดความสามารถในการย่อยน้ำมันมะพร้าวโดยวัดขนาดความกว้างของวงใส พบว่ามีเพียง 5 สายพันธุ์เท่านั้น (Figure 2) โดยสายพันธุ์ MHS-4 มีความสามารถในการย่อยได้สูงสุด เมื่อคิดเป็นความกว้างของวงใสได้เท่ากับ 40 มม. (Table 3)

Table 1 Summary of extremely halophilic archaea isolation

Sample	Amount	Source	Code	Amount
Salted crab	1	Samut Sakhon	SC1-1 SC1-2	2
Salted crab	1		SC2-1 SC2-2	2
Salted fish	1		SPR1-1 SPR1-2	2
Salted fish	1		SPR2-1 SPR2-2	2
Fish sauce/ 1 month	1	Squid band/ Samut Songkhram	SQ1-1 - SQ1-6	6
Fish sauce/ 3 rd month	1		SQ1-7 - SQ1-12	6
Fish sauce/ 5 th month	1		SQ1-13 - SQ1-18	6
Fish sauce/ 9 th month	1		SQ1-19 - SQ1-24	6
Fish sauce/ 3 rd month	1	Rung Aroon / Sing Buri	HSB1-1 HSB1-2	2
Salt soil/ 7 th month Hole	1	Suwan Factory Samut Songkhram	HM701 - HM709	9
Fish sauce/ 7 month, #1			HM711 - HM713	3
Fish sauce/ 7 month, #2	1		HM721 - HM723	3
Fish sauce/ 7 month, #3	1		HM731 - HM738	8
Salt farm soil #1	1	Samut Songkhram	HSF101 - HSF107	7
Salt farm soil #1	1		HSF201 – HSF208	8
Salt farm soil #1	1		HSF301 – HSF306	6

Table 2 Summary of lipase producing isolates from different locations

Location	Sample	Number of isolate
Tonlamyai market (LY)	Spoiled coconut (SC)	11
	Drain water (DW)	12
	Coconut flake (CF)	8
Mueangmai market (MM)	Coconut shell (CS)	10
Ruam-Chok market (RC)	Spoiled coconut (SC)	4
	Coconut flake (CF)	2
	Drain water (DW)	13
	Dried coconut (DC)	4
Prachuap Khiri Khan (PJ)	Rotten palm (RP)	43
	Dried palm (DP)	5
Faculty of Agriculture (FA)	Coconut flake (CF)	17
Mae Hia Agricultural	Bamboo seed (BS)	11
Research, Demonstrative	Soil (S)	9
and Training Center (MH)		
Soybean (SB)	Fermentation (FE)	5
Hot spring (H)	Soil (S)	81

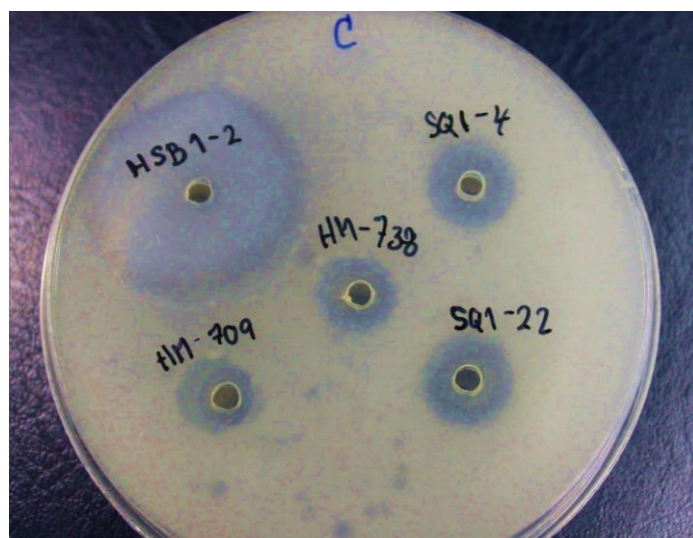


Figure 1 Degrading abilities on medium chain fatty acid containing fat of halophilic archaea strain HSB1-2 HM709 HM738 SQ1-4 and SQ1-22 using halophilic medium with coconut oil

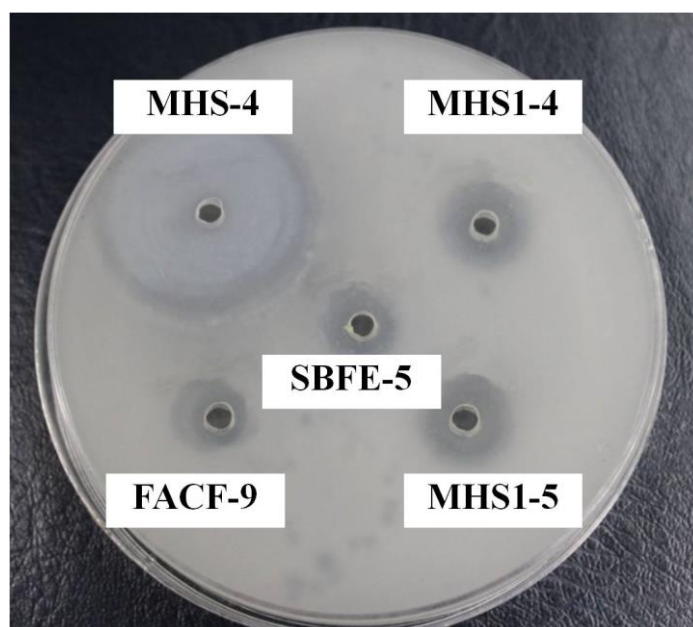


Figure 2 Degrading abilities on medium chain fatty acid containing fat of bacterial strain FACF-9 MHS1-4 MHS1-5 MHS4 and SBFE-5 using medium with coconut oil.

Table 3 Clear zone indicating degrading abilities on medium chain fatty acid containing fat of selected strains

Strain	Clear zone (mm.)
Halophilic archaea	
HSB1-2	40.0
HM709	5.1
HM738	5.2
SQ1-4	5.5
SQ1-22	5.2
Bacteria	
FACF-9	41.0
MHS1-4	5.3
MHS1-5	5.1
MHS4	5.6
SBFE-5	5.3

เมื่อทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของอาเคียที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส พบว่าสายพันธุ์ HSB1-2 จัดอยู่ในกลุ่ม *Halobacterium* (Figure 2) ส่วนสายพันธุ์ SQ1-22 ที่เลือกจัดอยู่ในกลุ่มอาเคียที่ชอบเกลือสูง (extremely halophilic archaea) ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างน้ำปลา สายพันธุ์ SQ1-22 สามารถเจริญได้ที่ช่วงอุณหภูมิ 20-60°C และต้องการเกลืออย่างน้อยที่ความเข้มข้น 2.1 M (ระดับที่เหมาะสมเท่ากับ 2.6-3.4 M) อีกทั้งยังเจริญได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.5 - 8.5 (ระดับที่เหมาะสมเท่ากับ 6.5-7.0) เซลล์แตกที่ความเข้มข้นของเกลือน้อยกว่า 2.1 M (Table 2) จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของอาเคียที่ชอบเกลือสายพันธุ์ SQ1-22 เปรียบเทียบกับอาเคียสายพันธุ์อื่นๆ ที่มีความคล้ายคลึงมากที่สุดในจีนัส *Natrinema* (Figure 3) จากการศึกษาความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA แสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ SQ1-22 มีความคล้ายคลึงร้อยละ 98.3 98.1 97.7 97.4 97.4 และ 95.7 กับ *Natrinema gari* BCC 24370^T *Natrinema pallidum* JCM 8980^T *Natrinema pellirubrum* JCM 10476^T *Natrinema altunense* JCM 12890^T *Natrinema versiforme* JCM 10478^T และ *Natrinema ejinorensis* JCM 13890^T ตามลำดับ

Table 4 Major differential properties between strain HSB1-2 and *Halobacterium* species

Taxa: 1, strain HSB1-2; 2, *H. salinarum* HCC8978^T 3, *H. jilantaiense* JCM13558^T (Data from Yang et al. (2006)) ;4, *H. noricense* DSM 3754^T (Data from Gruber et al. (2004)).
+, Positive; -, negative; +/-, doubtful; s, strong; w, weak; ND, not determined

Characteristics	1	2	3	4
Cell morphology	Rod	Rod	Rod	Irregular rods
Motility	+	+	+	+
Pigmentation	Red	Red	Red	Light red
NaCl [M] required to prevent cell lysis	> 1.7	> 1.7	> 2.1	> 2.1
NaCl optimum [M]	3.4-4.3	3.4-4.3	3.4-4.3	2.5-3.0
MgCl ₂ optimum [M]	0.5-0.6	0.5-0.6	0.5-0.6	0.6-0.9
NaCl minimum requirement [M]	≥2.6	≥2.6	≥2.6	≥2.6
Temperature optimum (°C)	37-40	37-45	40-45	45
pH ranges for growth	5.0-8.0	4.5-8.5	5.0-8.5	5.2-7.0
pH optimum	7.0-7.5	7.0-7.5	7.0-7.5	-
Anaerobic growth with nitrate	+	+	+	ND
Nitrate reduction	-	-	-	ND
Gas formation from nitrate	-	-	-	ND
Catalase activity	w	w	w	ND
Oxidase activity	+	+	w	-
Indole formation	-	-	-	-
Hydrolysis of:				
Starch	-	-	-	-
Gelatin	+	w	+	-
Tween 80	+	-	-	-
Anaerobic growth with DMSO	+	+	+	-
Acid from:				
Arabinose	-	-	-	
Fructose	-	-	-	
Galactose	-	-	-	
Glucose	-	-	-	

Table 4 Continue

Characteristics	1	2	3	4
Mannose	-	-	-	
Rhamnose	-	-	-	
Ribose	-	-	-	-
Xylose	-	w	-	-
Cellobiose	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-
Glycerol	+	+	-	-
Mannitol	-	-	-	-
Utilization of :				
Arabinose	-	-	-	
Fructose	-	-	-	
Galactose	-	-	-	-
Glucose	-	-	-	-
Mannose	-	-	w	
Rhaffinose	-	-	-	
Rhamnose	-	-	-	
Ribose	-	-	-	
Xylose	-	+	-	-
Cellobiose	-	-	-	
Lactose	w	-	-	
Maltose	-	w	-	-
Melibiose	-	-	-	
Melizitose	w	-	-	
Sucrose	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	
Glycerol	+	+	+	slow

Table 4 Continue

Characteristics	1	2	3	4
Inositol	-	-	-	
Inulin	-	+	w	
Mannitol	-	-	-	
Salicin	-	-	-	
Sorbitol	-	-	-	
Starch	-	-	-	slow
Acetate	-	-	-	
Citrate	w	w	-	
Lactate	-	-	-	
Glycine	-	-	-	
Alanine	-	-	-	
Arginine	-	-	-	
Aspartate	-	-	-	
Glutamate	-	-	-	
Lysine	-	-	+	
Sensitivity to				
Bacitracin [10 units]	+	+	+	-
Novobiocin [30 ug]	+	+	+	-
DNA G+C content (mol%)	65.6	67.1-71.2	64.2	54.5

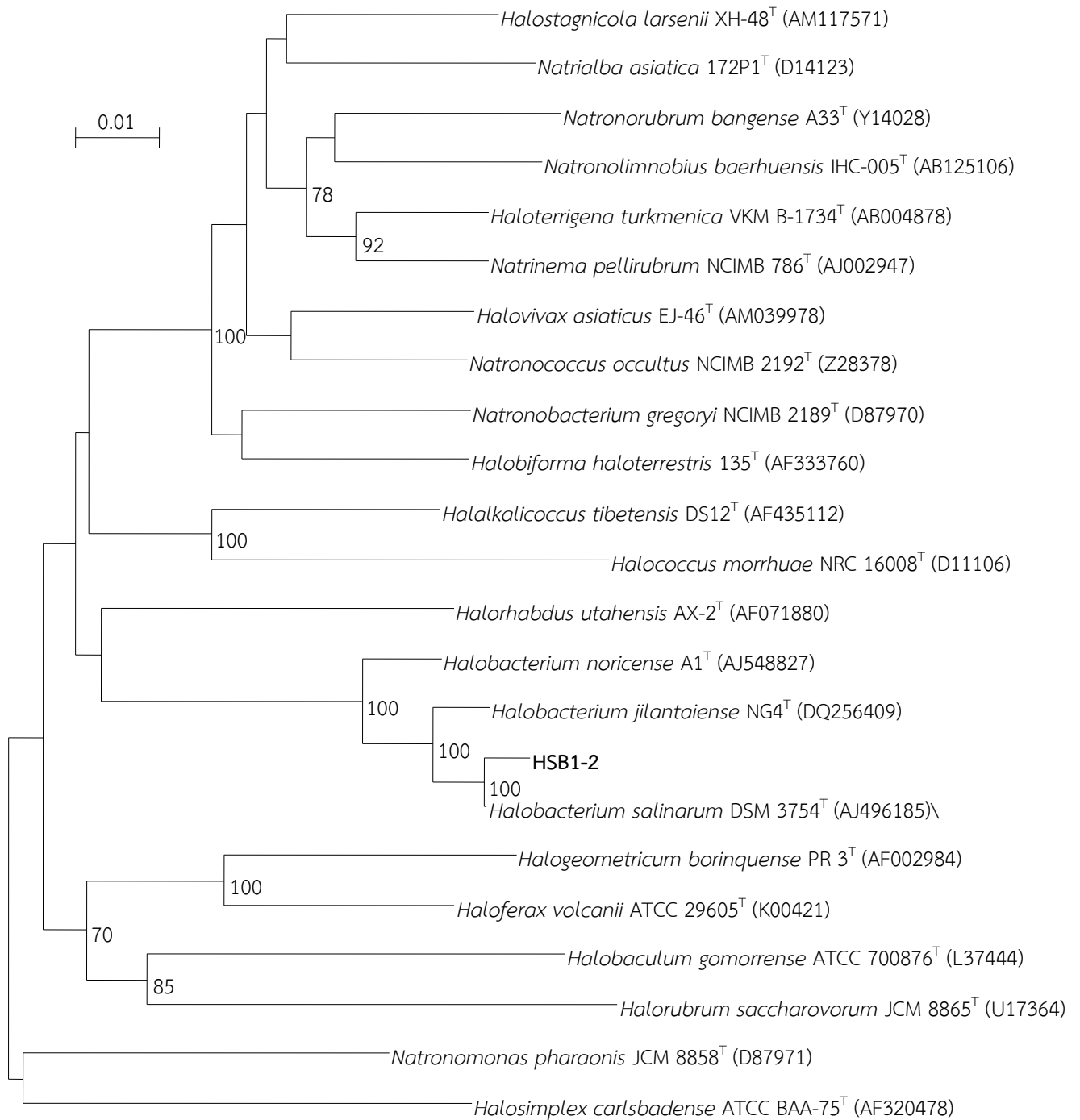


Figure 3 Phylogenetic trees showing the relationships between strain HSB1-2T and related bacterial species based on 16S rRNA gene sequences. The branching pattern was generated by neighbour-joining method. Bootstrap percentages above 70%, based on 1000 replications are shown at the nodes. Bar, 0.01 substitutions per 100 nucleotide positions.

Table 5 Major differential properties between strain SQ-22^T and *Natrinema* species

Taxa: 1, strain HSB1-2^T; 2, *N. gari* BCC 24370^T; 3, *N. pallidum* JCM 8980^T; 4, *N. pellirubrum* JCM 10476^T; 5, *N. altunense* JCM 12890^T; 6, *N. versiforme* JCM 10478^T (Data from Xin *et al.*, (2000)); 7, *N. ejinorensis* JCM 13890^T (Data from Castillo *et al.*, (2006)). +, Positive; -, negative; +/-, doubtful; s, strong; w, weak; ND, not determined

Characteristics	1	2	3	4	5	6	7
Cell morphology	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Pleomorphic shape	Pleomorphic shape
Motility	+	+	+	+	+	-	-
Pigmentation	Pale orange	Pale orange, colorless	Pale orange	Pale orange	Pale orange	Light-red,	Light red, pale red
NaCl [M] required to prevent cell lysis	> 2.1 M	> 1.7 M	> 1.7 M	> 1.7 M	> 2.1 M	> 1.0 M	> 1.5 M
NaCl optimum [M]	2.6-3.4 M	2.6-3.4 M	3.4-4.3 M	2.6-3.4 M	2.6-3.4 M	3.4-4.3 M	3.4 M
MgCl ₂ optimum [M]	0.1-0.2 M	0.1-0.2 M	0.1-0.2 M	0.1-0.2 M	0.1-0.2 M	0.15 M	not required for growth
NaCl minimum requirement [M]	≥2.1 M	≥1.7 M	≥1.7 M	≥1.7 M	≥2.1 M	≥1.5 M	≥1.8 M
Temperature optimum (°C)	37-40°C	37-40°C	30-37°C	30-37°C	37-40°C	37-46°C	37°C

Table 5 Continue

Characteristics	1	2	3	4	5	6	7
pH ranges for growth	5.5-8.5	5.5-8.5	5.5-8.5	5.5-8.5	6.0-8.5	6.0-8.0	6.0-8.5
pH optimum	6.5-7.0	6.0-6.5	7.0-7.5	7.0-7.5	6.5-7.0	6.5-7.0	7.0
Anaerobic growth with nitrate	-	-	+	+	+	+	-
Nitrate reduction	-	-	+	+	+	+	-
Gas formation from nitrate	-	-	-	-	-	+	+
Catalase activity	w	w	s	w	w	+	+
Oxidase activity	-	+	w	-	-	+	+
Indole formation	-	-	-	-	-	+	-
Hydrolysis of:							
Starch	-	-	-	-	-	+/-	+
Gelatin	-	+	w	-	+	-	+
Tween 80	-	-	+	-	+	w	+
Anaerobic growth with DMSO	+	+	+	+	+	-	ND
Acid from:							
Arabinose	-	w	+	-	-	ND	-
Fructose	-	-	+	w	-	s	-
Galactose	-	-	+	-	-	w	-

Table 5 Continue

Characteristics	1	2	3	4	5	6	7
Galactose	-	-	+	-	-	w	-
Glucose	-	-	+	-	w	s	-
Mannose	-	-	+	-	-	+	-
Rhamnose	-	-	+	-	-	ND	ND
Ribose	-	-	+	-	-	+	ND
Xylose	-	-	+	-	-	w	-
Cellobiose	-	-	+	-	-	ND	ND
Lactose	-	-	+	-	-	-	-
Maltose	-	-	w	-	-	w	-
Melibiose	-	-	+	-	-	ND	ND
Sucrose	-	-	+	-	-	+	-
Glycerol	+	+	w	-	+	s	-
Mannitol	-	-	+	-	w	ND	ND
Utilization of :						ND	ND
Arabinose	-	+	+	-	-	-	-
Fructose	+	-	+	+	+	ND	+
Galactose	-	-	+	+	-	ND	-

Table 5 Continue

Characteristics	1	2	3	4	5	6	7
Glucose	+	+	+	-	+	ND	+
Mannose	-	-	+	-	-	ND	-
Rhaffinose	-	-	+	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	+	-	-	-	
Ribose	-	-	+	-	-	+	-
Xylose	-	-	+	-	-	ND	-
Cellobiose	+	-	+	-	-	ND	ND
Lactose	-	-	+	-	-	-	-
Maltose	-	-	+	-	+	ND	+
Melibiose	-	-	+	-	-	ND	ND
Melizitose	+	-	+	-	-	ND	ND
Sucrose	-	-	+	-	-	ND	+
Trehalose	-	-	-	-	-	ND	+
Glycerol	+	-	+	-	+	ND	+
Inulin	-	-	+	-	-	ND	ND
Mannitol	-	-	+	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	+	-	-	-	-

Table 5 Continue

Characteristics	1	2	3	4	5	6	7
Sorbitol	-	-	+	-	-	-	-
Starch	-	-	-	-	-	ND	+
Acetate	+	-	+	+	+	ND	+
Citrate	-	-	+	-	-	ND	ND
Lactate	-	-	+	+	-	ND	ND
Alanine	+	-	+	-	+	ND	ND
Glutamate	+	-	+	-	-	ND	-
Lysine	-	-	-	-	-	ND	+
Sensitivity to rifampicin [30 µg]	+	+	+	+	+	[50 mg/L] +	-
DNA G+C content (mol%)	65.6 mol%	65.4 mol%	63.9 mol%	62.9 mol%	65.6 mol%	64.2 mol%	64.7 mol%

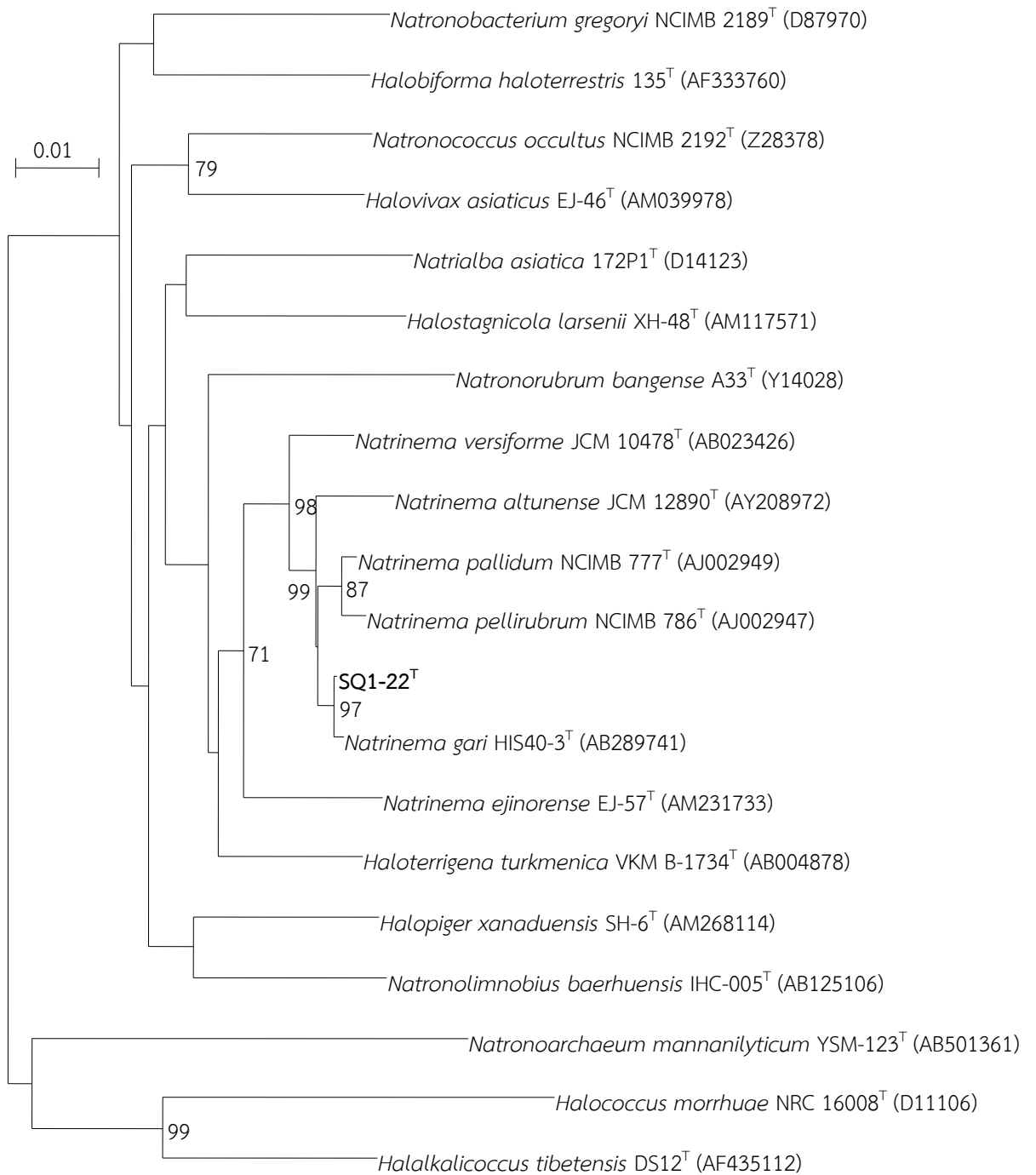


Figure 4 Phylogenetic trees showing the relationships between strain SQ1-22^T and related bacterial species based on 16S rRNA gene sequences. The branching pattern was generated by neighbor-joining method. Bootstrap percentages above 70%, based on 1000 replications are shown at the nodes. Bar, 0.01 substitutions per 100 nucleotide positions

ผลของการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ แสดงให้เห็นว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของไอโซเลตที่ MHS-4 ที่แยกได้จากดินขุ่ยไผ่มีขนาด 1,542 นิวคลีโอไทด์ และเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ GenBank พบว่า ไอโซเลต MHS-4 มีความใกล้เคียงกับเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacillus* sp. (ตารางที่ 9) จากการศึกษาความคล้ายคลึงระหว่างกลุ่มของสายดีเอ็นเอหรือโปรตีนตั้งแต่ 2 สายขึ้นไป (multiple sequence alignment) กับเชื้อ *Bacillus* sp. ที่เลือก 26 สายพันธุ์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Clustal X พบว่า ไอโซเลตที่ MHS-4 อยู่ในกลุ่มเดียวกับ *B. atrophaeus* ATCC49337^T (AB021181), *B. licheniformis* S86^T (AY017347), *B. sonorensis* L87-10^T (AF302118) และ *B. malacitensis* CR-95^T (DQ993673) โดยมีค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA เท่ากับร้อยละ 97.7, 99.8, 98.2, 97.5 และ 97.9 ตามลำดับ

การวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปสโดยรวม

เอนไซม์ไลเปสโดยรวมจากเชื้อ Halophilic archaea และ Bacteria ที่คัดเลือกได้ สามารถย่อย pNP-laurate ได้มากที่สุด รองลงมาได้แก่ pNP-myristate pNP-caprylate และ pNP-caprylate ตามลำดับ (Table 6) เชื้อ HSB1-2 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด รองลงมาได้แก่ SQ1-4 SQ1-22 HM709 และ HM738 ตามลำดับ ส่วนในกลุ่ม Bacteria เชื้อ MHS-4 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสสูงสุด รองลงมาได้แก่ MHS1-4 MHS1-5 และ SBFE-5 ส่วน FACF-9 มีกิจกรรมต่ำที่สุด

การทดสอบความเป็นพิษหรือการสร้างสารพิษของเอนไซม์ไลเปสโดยรวม

ไอโซเลตแยกได้ทั้งหมดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อในทางเดินอาหารหนู (rat intestine epithelial, IEC6) และเซลล์กล้ามเนื้อของหนู (mouse fibroblast, L929) โดยเซลล์สามารถอยู่รอดได้มากกว่าร้อยละ 90 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Table 7)

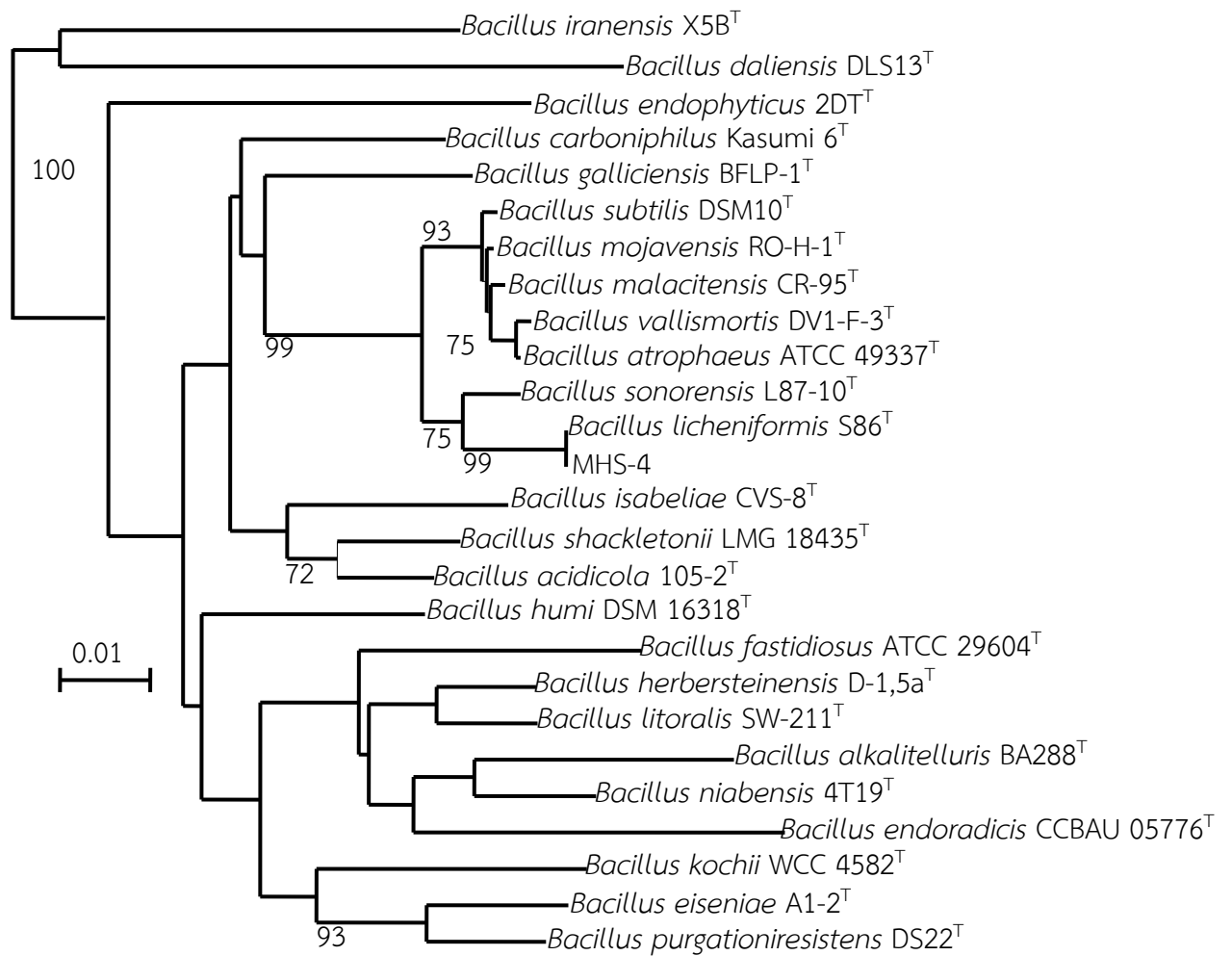


Figure 5 Phylogenetic trees showing the relationships between strain MHS-4 and related bacterial species based on 16S rRNA gene sequences. The branching pattern was generated by neighbor-joining method. Bootstrap percentages above 70%, based on 1000 replications are shown at the nodes. Bar, 0.01 substitutions per 100 nucleotide positions

Table 6 The lipase activity of crude lipase from various lipase producing strains (n=12)

Strain	Enzymatic activity (Unit/mL)			
	pNP-caprylate	pNP-caprylate	pNP-laurate	pNP-myristate
Halophilic archaea				
HSB1-2	102.96 ^a	144.41 ^a	205.47 ^a	164.47 ^a
HM709	15.17 ^c	21.07 ^c	30.06 ^c	24.29 ^c
HM738	17.79 ^c	24.55 ^c	35.29 ^c	28.18 ^c
SQ1-4	20.21 ^b	28.37 ^b	40.22 ^b	32.34 ^b
SQ1-22	22.76 ^b	31.52 ^b	45.33 ^b	36.31 ^b
Bacteria				
FACF-9	1.84 ^c	4.10 ^c	5.62 ^c	3.74 ^c
MHS1-4	76.43 ^b	203.67 ^b	255.25 ^b	178.18 ^b
MHS1-5	71.96 ^b	191.93 ^b	240.43 ^b	168.63 ^b
MHS-4	189.49 ^a	505.10 ^a	631.10 ^a	442.13 ^a
SBFE-5	74.46 ^b	198.63 ^b	247.52 ^b	174.02 ^b

* One unit (U) of enzyme was defined as the amount of enzyme that releases 1 nmol *p*-nitrophenyl/ mL/ min under the assay conditions (pH 6.8, 39.5°C).

Lipase activity was assayed using *p*-nitrophenyl caprylate (pNP-caprylate), nitrophenyl caprylate (pNP-caprylate), nitrophenyl laurate (pNP-laurate), and nitrophenyl laurate (pNP-myristate).

^{a, b, c} Mean values within a row with different superscript letters indicate significantly different; P<0.05.

Table 7 Cytotoxicity effects of crude lipase from various lipase producing strain on rat intestine epithelial (IEC6) and mouse connective tissue cell line (L929) cell line (n=6)

Item	Crude lipase concentration (µg/ml)			
	25	50	100	200
Rat intestine epithelial cell (IEC6)*				
HSB1-2	97.6±0.3	96.5±0.3	95.7±0.1	95.6±0.3
HM709	98.6±0.3	94.6±0.5	94.6±0.2	96.5±0.5
HM738	97.6±0.1	96.5±0.4	96.6±0.2	975.6±0.4
SQ1-4	95.3±0.3	95.5±0.5	97.6±0.2	95.6±0.3
SQ1-22	96.3±0.2	96.4±0.3	93.9±0.1	96.6±0.3
FACF-9	99.6±0.3	97.5±0.3	96.7±0.1	95.6±0.3
SBFE-5	99.6±0.2	97.6±0.5	96.6±0.2	95.5±0.5
MHS-4	99.6±0.3	97.5±0.4	96.6±0.2	95.6±0.4
MHS1-4	99.3±0.3	97.5±0.5	96.6±0.2	95.6±0.3
MHS1-5	99.3±0.3	97.4±0.3	96.9±0.1	95.6±0.3
Mouse connective tissue cell (L929)*				
HSB1-2	96.3±0.3	93.5±0.5	98.6±0.2	95.6±0.3
HM709	97.3±0.2	98.4±0.3	94.9±0.1	97.6±0.3
HM738	98.6±0.3	97.5±0.3	96.7±0.1	96.6±0.3
SQ1-4	97.6±0.2	98.6±0.5	98.6±0.2	93.5±0.5
SQ1-22	96.3±0.3	96.5±0.5	97.6±0.2	97.6±0.3
FACF-9	98.6±0.3	98.2±0.2	96.7±0.3	94.8±0.1
SBFE-5	98.4±0.5	97.7±0.1	96.6±0.4	95.3±0.2
MHS-4	98.4±0.7	97.8±0.1	96.7±0.2	95.4±0.2
MHS1-4	98.4±0.1	97.8±0.1	96.4±0.2	95.0±0.2
MHS1-5	98.2±0.3	98.7±0.2	96.5±0.3	94.2±0.1

* Cell cytotoxicity was represented as the percent of survival cells compared to control.

กิจกรรมของเอนไซม์อื่นที่เกี่ยวข้องกับการผลิตสัตว์ของเอนไซม์ไลเปสโดยรวม

กิจกรรมของเอนไซม์ amylase, cellulase, endo-glucanase, β -glucanase, xylanase, และ protease จากเชื้อ halophilic archaea ที่ศึกษาแสดงใน Table 8 ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ทุกชนิดที่ pH 3.0 กิจกรรมของเอนไซม์ amylase ของเชื้อ HSB1-2 สูงสุดที่ pH 6.8 กิจกรรมของเอนไซม์ β -glucanase ของเชื้อ SQ1-4 สูงสุดที่ pH 6.8 กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ของเชื้อ HM709 HM738 SQ1-4 SQ1-22 ที่ pH 6.8 มีค่าใกล้เคียงกัน กิจกรรมของเอนไซม์ endo-glucanase ของเชื้อ HSB1-2 สูงสุด ที่ 6.8 กิจกรรมของเอนไซม์ xylanase ของเชื้อ HSB1-2 สูงสุดที่ pH 6.8 กิจกรรมของเอนไซม์ protease ของเชื้อ HSB1-2 สูงสุดที่ pH 6.8

กิจกรรมของเอนไซม์ amylase, cellulase, endo-glucanase, β -glucanase, xylanase, และ protease จากเชื้อ bacteria ที่คัดเลือกแสดงใน Table 9 กิจกรรมของเอนไซม์ amylase ของเชื้อ MHS-4 สูงสุดที่ pH 6.8 กิจกรรมของเอนไซม์ β -glucanase ของเชื้อ MHS1-4 สูงสุดที่ pH 3.0 และ 6.8, ตามลำดับ กิจกรรมของเอนไซม์ cellulase ของเชื้อ MHS-4 และ SBFE-5 สูงสุดที่ pH 3.0 และ 6.8 ตามลำดับ กิจกรรมของเอนไซม์ endo-glucanase ของเชื้อ SBFE-5 และ MHS-4 สูงสุด ที่ pH 3.0 and 6.8, ตามลำดับ กิจกรรมของเอนไซม์ xylanase ของเชื้อ MHS-4 MHS1-4 และ MHS1-5 สูงสุดที่ pH 3.0 เช่นเดียวกับ เชื้อ SBFE-5 และ MHS1-5 มีกิจกรรมของเอนไซม์ xylanase สูงสุดที่ pH 6.8 กิจกรรมของเอนไซม์ protease ของเชื้อ MHS-4 สูงสุดที่ pH 3.0 และ เชื้อ MHS1-4 และ MHS1-5 มีกิจกรรมของเอนไซม์ protease activity สูงสุดที่ pH 6.8

คุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสโดยรวมต่อสภาวะในการทดสอบทางอาหารสัตว์

ไอโซเลต HSB1-2 HM709 HM738 SQ1-4 และ SQ1-22 สามารถทนต่อการย่อยของเอนไซม์ทริปซินได้ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสคงเหลือร้อยละ 85.43 87.88 89.51 88.05 และ 88.06 ตามลำดับ ไอโซเลต HSB1-2 HM709 HM738 SQ1-4 และ SQ1-22 สามารถทนต่อการย่อยของกรดได้น้อย โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสคงเหลือร้อยละ 85.44 82.51 87.28 85.61 และ 82.97 ตามลำดับ ไอโซเลต HSB1-2 HM709 HM738 SQ1-4 และ SQ1-22 สามารถทนต่อการย่อยของเกลือน้ำดีได้สูง โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสคงเหลือคิดเป็นร้อยละ 85.45 87.56 88.33 87.44 และ 88.22 ตามลำดับ ไอโซเลต SEFE-5 MHS-4 MHS1-4 และ MHS1-5 สามารถทนต่ออุณหภูมิที่ใช้ในการอัดเม็ดของอาหารได้สูง โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสคงเหลือคิดเป็นร้อยละ 88.09 88.68 85.51 84.45 และ 86.26 ตามลำดับ

Table 8 Enzyme activities of crude lipase from various lipase producing halophilic archaea (n=12)

Items	Amylase (U/ml) [†]		β-glucanase (U/ml) [†]	
	pH 3.0	pH 6.8	pH 3.0	pH 6.8
HSB1-2	nd	310.12 ± 12.67 ^a	nd	nd
HM709	nd	nd	nd	nd
HM738	nd	129.04 ± 12.00 ^b	nd	16.74 ± 1.51 ^b
SQ1-4	Nd	62.04 ± 8.80 ^d	nd	38.04 ± 9.20 ^a
SQ1-22	nd	72.01 ± 17.20 ^c	nd	nd
Items	Endoglucanase (U/ml) [†]		Cellulase(U/ml) [†]	
	pH 3.0	pH 6.8	pH 3.0	pH 6.8
HSB1-2	nd	130.81 ± 2.23 ^a	nd	nd
HM709	nd	26.46 ± 1.30 ^c	Nd	18.32 ± 2.21 ^a
HM738	nd	40.21 ± 1.83 ^b	nd	17.26 ± 3.11 ^a
SQ1-4	nd	3.89 ± 0.80 ^e	Nd	16.49 ± 2.33 ^a
SQ1-22	nd	12.05 ± 3.72 ^d	nd	18.33 ± 3.43 ^a
Items	Xylanase (U/ml) [‡]		Protease (U/ml) [*]	
	pH 3.0	pH 6.8	pH 3.0	pH 6.8
HSB1-2	nd	85.51 ± 0.02 ^a	nd	108.20 ± 10.02 ^a
HM709	nd	40.60 ± 7.20 ^c	nd	34.19 ± 5.61 ^c
HM738	nd	40.25 ± 5.20 ^c	nd	28.47 ± 4.81 ^c
SQ1-4	nd	62.84 ± 7.40 ^b	nd	77.38 ± 3.08 ^b
SQ1-22	nd	23.71 ± 5.30 ^d	nd	75.30 ± 2.23 ^b

[†] One unit (U) of enzyme was defined as the amount of enzyme that releases 1 nmol glucose/min under the assay conditions.

[‡] One unit (U) of enzyme was defined as the amount of enzyme that releases 1 μmol xylose/min under the assay conditions.

^{*} One unit (U) of enzyme was defined as the amount of enzyme that releases 1 nmol tyrosine/min under the assay conditions.

^{a, b, c, d, e} Mean values within the same parameters with different superscript letters are significantly different P<0.01.

nd= not detect.

Table 9 Enzyme activities of crude lipase from various lipase producing bacteria strains (n=12)

Items	Amylase (U/ml) [†]		β-glucanase (U/ml) [†]	
	pH 3.0	pH 6.8	pH 3.0	pH 6.8
FACF-9	nd	117.10 ^b ±11.63	nd	nd
SBFE-5	nd	nd	244.98 ^b ±11.85	4.46 ^b ±0.01
MHS-4	nd	329.04 ^a ±12.00	26.24±0.30 ^c	nd
MHS1-4	nd	65.09 ^c ±1.90	301.82 ^a ±19.10	34.08 ^a ±8.30
MHS1-5	nd	112.01 ^b ±11.60	25.09 ^c ±1.19	nd
Items	Endoglucanase (U/ml) [†]		Cellulase (U/ml) [†]	
	pH 3.0	pH 6.8	pH 3.0	pH 6.8
FACF-9	nd	nd	nd	nd
SBFE-5	10.98 ^a ±0.60	6.46±0.30	1.36 ^a ±0.15	5.52 ^a ±0.01
MHS-4	6.39 ^b ±0.53	30.41 ^a ±1.03	10.68 ^b ±0.34	3.36 ^b ±0.01
MHS1-4	nd	3.19 ^d ±0.80	nd	3.39 ^b ±0.03
MHS1-5	nd	12.05 ^b ±0.71	nd	2.23 ^c ±0.03
Items	Xylanase(U/ml) [‡]		Protease (U/ml) [*]	
	pH 3.0	pH 6.8	pH 3.0	pH 6.8
FACF-9	26.55 ^b ±8.77	5.51 ^c ±0.02	15.16 ^e ±1.12	4.10 ^d ±0.02
SBFE-5	nd	540.80 ^a ±28.30	39.75 ^c ±2.48	34.29 ^b ±2.61
MHS-4	1,929.06 ^a ±32.30	240.15 ^b ±25.40	75.29 ^a ±4.93	24.97 ^c ±2.81
MHS1-4	1,979.82 ^a ±42.10	262.94 ^b ±27.30	44.72 ^b ±1.12	72.18 ^a ±1.08
MHS1-5	1,927.53 ^a ±51.70	523.91 ^a ±22.30	30.81 ^d ±0.94	71.40 ^a ±1.23

[†] One unit (U) of enzyme was defined as the amount of enzyme that releases 1 nmol glucose/min under the assay conditions.

[‡] One unit (U) of enzyme was defined as the amount of enzyme that releases 1 μmol xylose/min under the assay conditions.

^{*} One unit (U) of enzyme was defined as the amount of enzyme that releases 1 nmol tyrosine/min under the assay conditions.

a, b, c, d, e Mean values within the same parameters with different superscript letters are significantly different P<0.01.

nd= not detect.

ไอโซเลต SEFE-5 MHS-4 MHS1-4 และ MHS1-5 สามารถทนต่อการย่อยของเอนไซม์ทริปซินได้ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสคงเหลือร้อยละ 97.88 99.51 98.05 และ 98.06 ตามลำดับ ($P<0.05$) ส่วนไอโซเลต FACF-9 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสคงเหลือน้อยที่สุด คิดเป็นร้อยละ 39.43 ไอโซเลต FACF-9 SEFE-5 MHS1-4 และ MHS1-5 สามารถทนต่อการย่อยของกรดได้น้อย โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสคงเหลือร้อยละ 5.44 48.51 30.61 และ 57.97 ตามลำดับ แต่พบว่า ไอโซเลตที่ MHS-4 สามารถทนต่อการย่อยของกรดได้สูงที่สุด มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสคงเหลือสูงสุด โดยคงเหลือร้อยละ 97.88 ($P<0.05$) ไอโซเลต SEFE-5, MHS-4, MHS1-4 และ MHS1-5 สามารถทนต่อการย่อยของเกลือน้ำดีได้สูง โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสคงเหลือคิดเป็นร้อยละ 97.66 99.33 97.64 และ 98.32 ตามลำดับ ส่วนไอโซเลตที่ FACF-9 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสคงเหลือน้อยที่สุด คิดเป็นร้อยละ 35.45 ไอโซเลต SEFE-5 MHS-4 MHS1-4 และ MHS1-5 สามารถทนต่ออุณหภูมิที่ใช้ในการอัดเม็ดของอาหารได้สูง โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสคงเหลือคิดเป็นร้อยละ 98.68 98.51 98.45 และ 98.26 ตามลำดับ ($P<0.05$) ส่วนไอโซเลตที่ FACF-9 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสคงเหลือน้อยที่สุดคิดเป็นร้อยละ 39.09

Table 10 The trypsin, bile salt, acid and pelleting temperature stability of crude lipase from various lipase producing strains (n=12)

Items	Trypsin	Acid	Bile salt	Pelleting temperature
Halophilic archaea				
HSB1-2	85.43 ^a ±0.25	85.44 ^a ±0.26	85.45 ^a ±0.25	88.09 ^a ±0.29
HM709	87.88 ^a ±0.54	82.51 ^a ±0.23	87.56 ^a ±0.84	88.68 ^a ±0.34
HM738	89.51 ^a ±0.68	87.28 ^a ±0.49	88.33 ^a ±0.43	85.51 ^a ±0.28
SQ1-4	88.05 ^a ±0.24	85.61 ^a ±0.11	87.44 ^a ±0.38	84.45 ^a ±0.44
SQ1-22	88.06 ^a ±0.34	82.97 ^a ±0.16	88.22 ^a ±0.42	86.26 ^a ±0.64
Bacteria				
FACF-9	39.43 ^b ±0.85	5.44 ^e ±0.26	35.45 ^b ±0.35	39.09 ^b ±0.39
SBFE-5	97.88 ^a ±0.54	48.51 ^c ±0.13	97.66 ^a ±0.84	98.68 ^a ±0.24
MHS-4	99.51 ^a ±0.68	97.88 ^a ±0.29	98.33 ^a ±0.53	98.51 ^a ±0.18
MHS1-4	98.05 ^a ±0.24	30.61 ^d ±0.51	97.64 ^a ±0.28	98.45 ^a ±0.24
MHS1-5	98.06 ^a ±0.34	57.97 ^b ±0.26	98.32 ^a ±0.52	98.26 ^a ±0.54

ประสิทธิภาพของเอนไซม์ไลเปสเพื่อย่อยไขมันในสภาวะจำลองของทางเดินอาหารสัตว์กระเพาะเดียว

การใช้ส่วนผสมของอิมัลชันน้ำมันมะพร้าวและเอนไซม์ไลเปสรวมจากเชื้อ *B. licheniformis* MHS-4 ลดการเจริญเติบโตของเชื้อ *E.coli*, *Streptococci*, และ total anaerobic เมื่อเทียบกับกลุ่มอาหารควบคุม โดยผลดังกล่าวมีความสอดคล้องกัน เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง (Table 11) ในระหว่างการบ่มทั้งในสภาวะจำลองของลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ ปริมาณกรดแลคติกและกรดไขมันระเหยได้ชนิดอื่นลดลงโดยการเติมส่วนผสมของอิมัลชันน้ำมันมะพร้าวและเอนไซม์ไลเปสรวมจากเชื้อ *B. licheniformis* MHS-4 แสดงให้เห็นว่าการใช้อิมัลชันน้ำมันมะพร้าวและเอนไซม์ไลเปสรวมจากเชื้อ *B. licheniformis* MHS-4 สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อ *E.coli*, *Streptococci*, และ total anaerobic ได้ นอกจากนี้ ส่วนผสมของอิมัลชันน้ำมันมะพร้าวและเอนไซม์ไลเปสรวมจากเชื้อ *B. licheniformis* MHS-4 ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. choleraesuis*, *C. butyricum*, *E. coli*, and *S. aureus* (Figure 6) โดยจะเห็นได้ว่าอิมัลชันน้ำมันมะพร้าวไม่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคที่ศึกษา

ผลต่อค่าการย่อยได้และสมรรถภาพการผลิตของลูกสุกรหย่านม

การเสริมเอนไซม์ไลเปสรวมจากเชื้อ *B. licheniformis* MHS-4 ที่ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 2 เท่าทำให้ค่าการย่อยได้ของวัตถุดิบและพลังงานรวม (Table 12) มากกว่าการเสริมเอนไซม์ไลเปสทางการค้าและเอนไซม์ไลเปสรวมจากเชื้อ *B. licheniformis* MHS-4 ที่ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 0.5 และ 1 เท่า อย่างไรก็ตามการเสริมเอนไซม์ไลเปสทุกชนิดไม่มีผลต่อค่าการย่อยได้ของอินทรีย์วัตถุ ไนโตรเจน เยื่อใย การกักเก็บไนโตรเจน และพลังงานที่ใช้ประโยชน์ได้

การเสริมเอนไซม์ไลเปสรวมจากเชื้อ *B. licheniformis* MHS-4 ที่ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 2 เท่า ปรับปรุงน้ำหนักที่อายุ 56 วัน อัตราการเจริญเติบโตในช่วงอายุ 28-42 และ 28-56 วัน และน้ำหนักตัวเพิ่มต่ออาหารที่กินในช่วงอายุ 28-42 และ 28-56 วัน (Table 13) อย่างไรก็ตามการเสริมเอนไซม์ไลเปสทุกชนิดไม่มีผลปริมาณอาหารที่กิน

Table 11 Effect of coconut oil emulsion with exogenous lipase from *B. licheniformis* MHS-4 on gut microbiota (log10 CFU/ml) and acid concentration (μmol/ml) when simulating small intestinal and caecal conditions (n=6)

	Start	Control	Lipase + Coconut oil
<i>Small intestinal condition</i>			
Microbiota			
<i>E. coli</i>	2.45 ± 0.02 ^b	7.56 ± 0.23 ^a	1.04 ± 0.04 ^c
Streptococci	3.87 ± 0.06 ^b	5.32 ± 0.14 ^a	0.03 ± 0.02 ^c
Lactobacilli	4.22 ± 0.25 ^b	5.02 ± 0.05 ^a	1.32 ± 0.05 ^c
Total anaerobes	4.38 ± 0.33 ^b	6.03 ± 0.42 ^a	2.62 ± 0.35 ^c
Acids			
Acetic acid	2.51 ± 0.15	3.15 ± 0.26	1.17 ± 0.22
Propionic acid	0.86 ± 0.08	1.08 ± 0.12	0.52 ± 0.14
Butyric acid	0.80 ± 0.09	0.99 ± 0.08	0.47 ± 0.12
Lactic acid	0.01 ± 0.01 ^b	8.67 ± 0.16 ^a	0.02 ± 0.07 ^b
Sum of acids	3.80 ± 0.14 ^b	14.06 ± 0.25 ^a	2.15 ± 0.08 ^b
<i>Caecal condition</i>			
Microbiota			
<i>E. coli</i>	3.58± 0.23 ^b	5.58± 0.33 ^a	1.21 ± 0.02 ^c
Streptococci	5.36± 0.04 ^b	6.03± 0.05 ^a	2.12 ± 0.13 ^c
Lactobacilli	7.09± 0.22 ^b	8.13± 0.03 ^a	4.52 ± 0.25 ^c
Total anaerobes	7.12± 0.43 ^b	8.95± 0.05 ^a	4.63 ± 0.52 ^c
Acids			
Acetic acid	3.33± 0.35	3.78± 0.46	2.92 ± 0.20
Propionic acid	1.34± 0.04	1.29± 0.02	1.30± 0.04
Butyric acid	1.24± 0.07	1.19± 0.04	1.18± 0.03
Lactic acid	0.00± 0.02 ^b	10.4± 0.36 ^a	0.02± 0.01 ^b
Sum of acids	5.91± 0.04 ^b	16.86± 0.23 ^a	5.37± 0.06 ^b

^{a, b, c} Mean values within a row with different superscript letters are significantly different P<0.01.

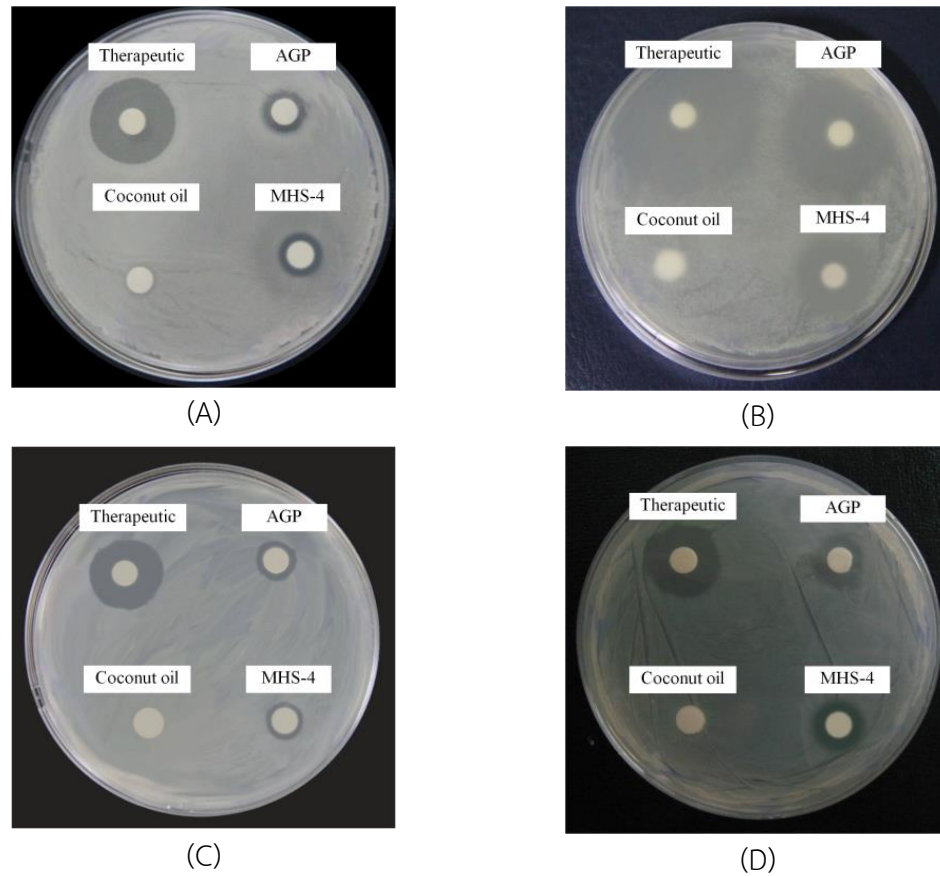


Figure 6 Inhibitory activity of coconut oil emulsion with exogenous lipase from *B. licheniformis* MHS-4 compare to antibiotic against test microorganisms, (A) *S. choleraesuis* (1481); (B) *C. butyricum* (1032); (C) *E. coli*; (D) *S. aureus*. Therapeutic = avilamycin 500 ppm; AGP (antibiotic growth promoter; AGP level) = avilamycin 50 ppm; MHS-4 = exogenous lipase from *B. licheniformis* MHS-4 with coconut oil emulsion.

Table 12 Effect of coconut oil emulsion with exogenous lipase from *B. licheniformis* MHS-4 on total tract digestibility in weaned piglets

	IE1	IE2	IE3	MHS-4 0.5 X	MHS-4 1.0 X	MHS-4 2.0 X
Digestibility (%)						
DM	91.3 ^b	93.0 ^b	92.2 ^b	91.8 ^b	92.2 ^b	93.8 ^a
Organic matter	92.4	93.7	93.2	92.7	93.2	92.8
Nitrogen	89.5	90.2	89.7	89.4	89.5	90.5
Gross energy	90.9 ^b	91.5 ^b	91.5 ^b	91.3 ^b	93.0 ^{bc}	94.3 ^a
Crude fibre	64.3	67.2	66.5	65.7	66.2	65.3
NDF	77.2	81.2	77.7	75.7	77.6	75.8
ADF	65.2	67.4	66.5	66.2	66.5	66.2
Nitrogen retained (%)	79.2	78.5	76.2	76.4	76.2	76.7
Metabolised energy (%)	98.2	98.1	98.2	98.1	98.2	98.8

^{a,b,c} Mean values within a row with different superscript letters are significantly different P<0.01.

Table 13 Effect of coconut oil emulsion with exogenous lipase from *B. licheniformis* MHS-4 on BW, average daily feed intake (ADFI), average daily gain (ADG), and gain : feed (G : F) ratio in weaned piglets

	IE1	IE2	IE3	MHS-4 0.5 X	MHS-4 1.0 X	MHS-4 2.0 X
BW (kg)						
28 days	9.2	9.1	9.2	9.2	9.2	9.1
42 days	12.3	11.9	12	12.1	12.3	13
56 days	20.2 ^b	20.0 ^b	20.1 ^b	20.2 ^b	20.4 ^b	21.5 ^a
ADFI (g/day)						
28 to 42 days	355	360	352	355	354	356
42 to 56 days ³	927	976	952	966	956	964
28 to 56 days	641	648	652	651	655	670
ADG (g/day)						
28 to 42 days	221 ^b	200 ^b	200 ^b	207 ^b	221 ^b	279 ^a
42 to 56 days	564	579	579	579	579	557
28 to 56 days	393 ^b	389 ^b	389 ^b	393 ^b	400 ^{ab}	418 ^a
G : F (g/g)						
28 to 42 days ³	0.62 ^b	0.616 ^b	0.61 ^b	0.58 ^b	0.63 ^b	0.78 ^a
42 to 56 days	0.61	0.59	0.61	0.60	0.61	0.68
28 to 56 days	0.61 ^b	0.58 ^b	0.60 ^b	0.59 ^b	0.61 ^b	0.67 ^a

^{a,b,c} Mean values within a row with different superscript letters are significantly different P<0.01.

การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปส

เมื่อเพาะเลี้ยงสายพันธุ์ HSB1-2 ในอาหาร HM ที่ประกอบด้วยน้ำมันมะพร้าวที่มีความเข้มข้น NaCl เท่ากับ 4.3 M ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อเจริญเติบโตแบบแบคทีเรียในเชิงเส้นในช่วง 120 ชั่วโมงแรกของการเจริญ (Figure 7) จากนั้นการเจริญจึงลดลงในช่วงระหว่างชั่วโมงที่ 120 ถึง 132 แสดงถึงการเจริญเติบโตของเชื้อเข้าสู่ช่วงการเจริญคงที่ (stationary phase) สำหรับความสามารถในการย่อย **p**-NPL มีค่าต่ำในช่วงแรกของการเจริญแต่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจาก 12.7 units/ml ที่ 48 ชั่วโมง เป็น 121.3 units/ml ที่ 96 ชั่วโมง จากนั้นอัตราการเพิ่มของการย่อย **p**-NPL ลดลงและมีค่าสูงสุดเท่ากับ 141.0 units/ml ที่เวลา 132 ชั่วโมง และลดลงอย่างต่อเนื่อง การเพิ่มขึ้นและลดลงของการย่อยสารตั้งต้นดังกล่าวสอดคล้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อคิดเป็นค่าเท่ากับ 30.7 ± 0.8 units per Log CFU ในช่วงเวลา 48 ถึง 120 ชั่วโมง

ผลของความเข้มข้นเกลือต่อความสามารถในการย่อย **p**-NPL ถูกทดสอบที่ช่วงความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 0 -5 (Figure 8) ไลเปสที่อยู่ในเซลล์ (Intracellular lipase) สามารถย่อยได้สูงสุดที่ความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 1.0 M ส่วนไลเปสที่หลั่งออกมานอกเซลล์ (Extracellular lipase) ย่อยได้ดีที่ความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 4.0 M การทดลองชี้ให้เห็นว่าความเข้มข้นของเกลือมีผลอย่างมากต่อการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้ เมื่อทดสอบความสามารถในการทนต่อเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ กลับพบว่าเมื่อปรับไลเปสที่อยู่ในเซลล์ที่ความเข้มข้นเกลือสูงกับทำให้รักษากิจกรรมของเอนไซม์ได้ดีกว่าการปรับที่ความเข้มข้นเกลือน้อย (Figure 9) ส่วนไลเปสที่หลั่งออกมานอกเซลล์นั้นไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเมื่อปรับที่ความเข้มข้นเกลือตลอดทั้งช่วงที่ศึกษา

ผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่อความสามารถในการย่อย **p**-NPL ถูกทดสอบในช่วง 4-9 (Figure 10) ที่ pH 4 - 5 พบกิจกรรมของเอนไซม์เพียงร้อยละ 15 เท่านั้น แต่เมื่อ pH เพิ่มขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วทั้งไลเปสที่อยู่ในเซลล์ และ ไลเปสที่หลั่งออกมานอกเซลล์ โดยไลเปสที่อยู่ในเซลล์มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ pH 7.5 ส่วนไลเปสที่หลั่งออกมานอกเซลล์มีกิจกรรมสูงสุดที่ pH ประมาณ 7.0 จากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือประมาณร้อยละ 80 ที่ pH 9.0 ส่วนความสามารถในการทน pH นั้นไลเปสในเซลล์สามารถทนการเปลี่ยนแปลง pH ได้ดีกว่า (Figure 11) ส่วนไลเปสที่หลั่งออกนอกเซลล์ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH ได้น้อยกว่า ดังจะเห็นจากเมื่อ pH เท่ากับ 3.0 กิจกรรมของเอนไซม์มีเพียงร้อยละ 15 เท่านั้น และที่ pH 9.0 กิจกรรมลดลงเหลือเพียงร้อยละ 40

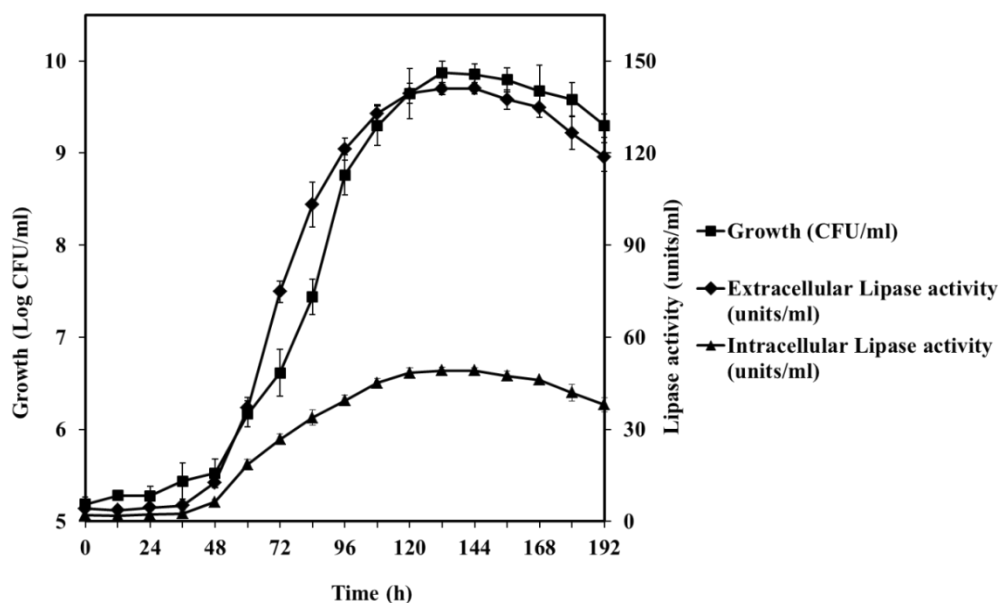


Figure 7 ρ -nitrophenyl-laurate hydrolysis activity of intracellular and extracellular lipase during growth of strain HSB1-2 cultured in the presence of 4.3 M NaCl at 37°C, pH 7.2. Enzyme assays were done at 37°C, pH 7.2 and NaCl 4.3 M under static condition.

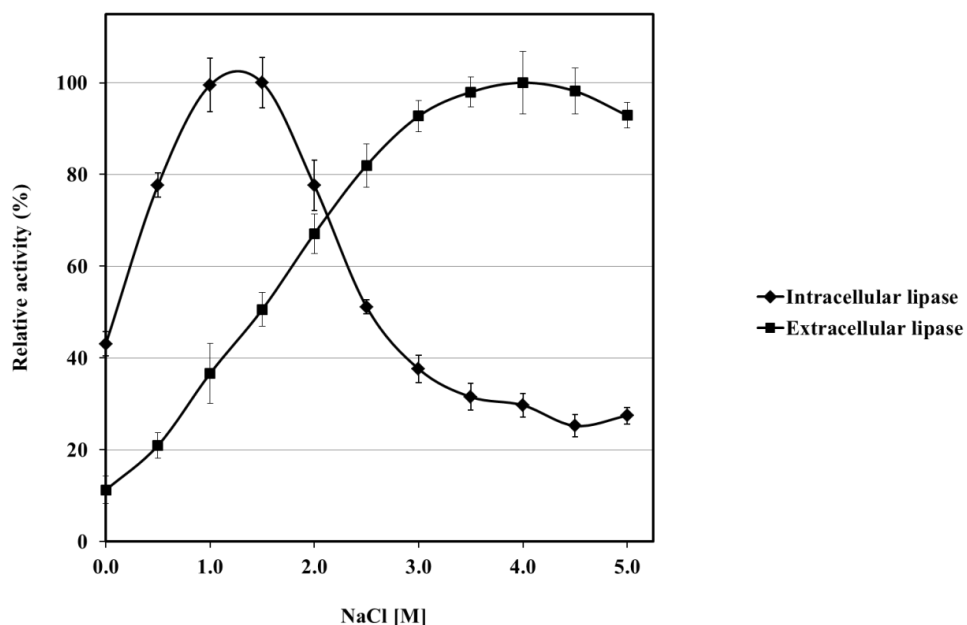


Figure 8. Influence of pH on the hydrolysis of ρ -nitrophenyl-laurate. Assays were done in the presence of 4.3 M NaCl at 37°C under static condition. 100% equivalent to 80.8, and 78.9 units/mg protein for intracellular and extracellular lipase, respectively.

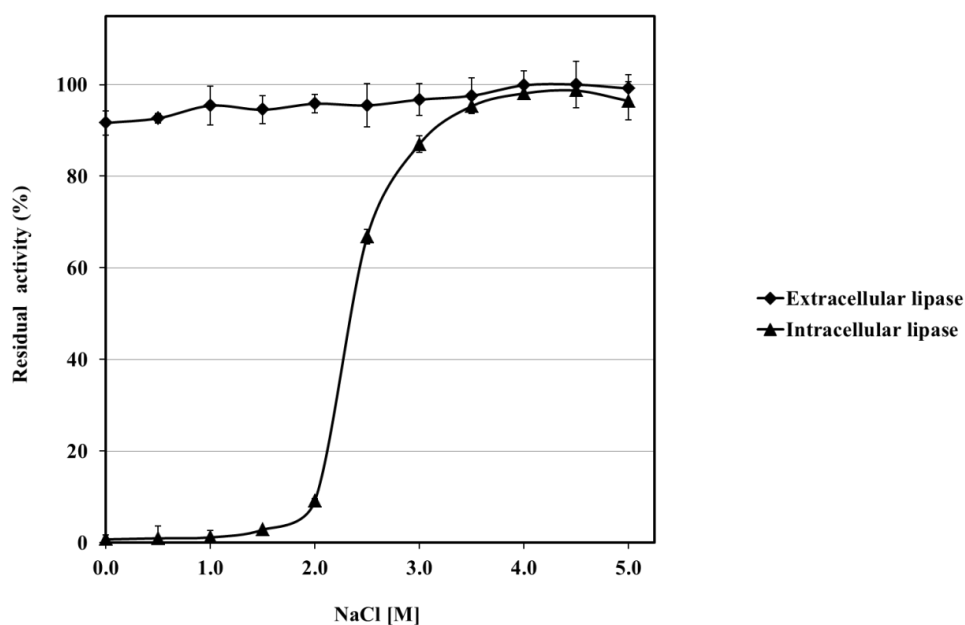


Figure 9. Influence of NaCl concentrations on the hydrolysis of p -nitrophenyl-laurate. Assays were done at 37°C, pH 7.0 under static condition. 100% equivalent 125.8, and 82.9 units/mg protein for intracellular and extracellular lipase, respectively.

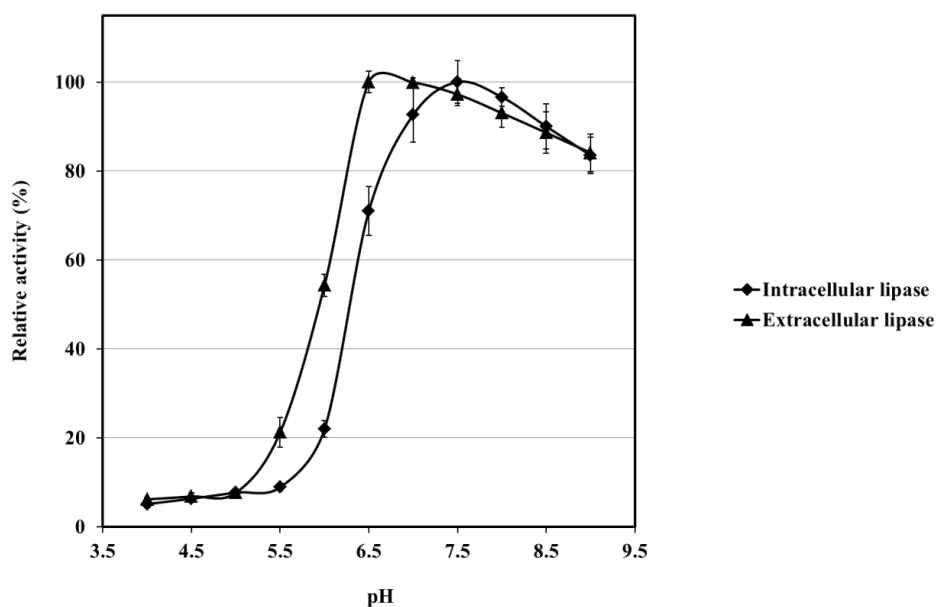


Figure 10 Influence of pH on the hydrolysis of p -nitrophenyl-laurate. Assays were done in the presence of 4.3 M NaCl at 37°C under static condition. 100% equivalent to 85.2, 80.8, and 78.9 units/mg protein for intracellular and extracellular lipase, respectively.

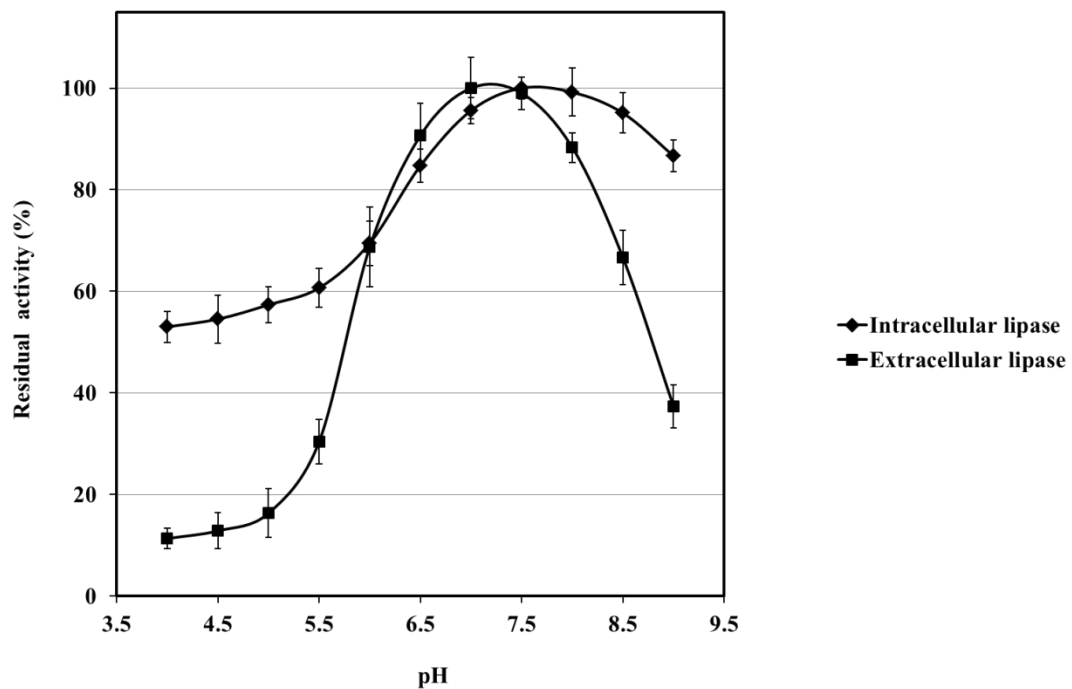


Figure 11 pH stability of intracellular and extracellular lipase on the hydrolysis of p -nitrophenyl-laurate. Assays were done in the presence of 4.3 M NaCl at 37°C, pH 7.0 under static condition. 100% equivalent to 80.1, and 78.8 units/mg protein for intracellular and extracellular lipase, respectively.

Figure 12 แสดงถึงผลของอุณหภูมิต่อความสามารถในการย่อย p -NPL พบว่าการย่อยเกิดสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสทั้งทั้งไลเปสที่อยู่ในเซลล์ และไลเปสที่หลั่งออกมานอกเซลล์ กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างลดลงที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าเอนไซม์มีความคงตัวที่ 75 องศาเซลเซียสได้ดี (**Figure 13**) (กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเหลือประมาณร้อยละ 78.9 และ 83.7 สำหรับไลเปสที่อยู่ในเซลล์ และไลเปสที่หลั่งออกมานอกเซลล์)

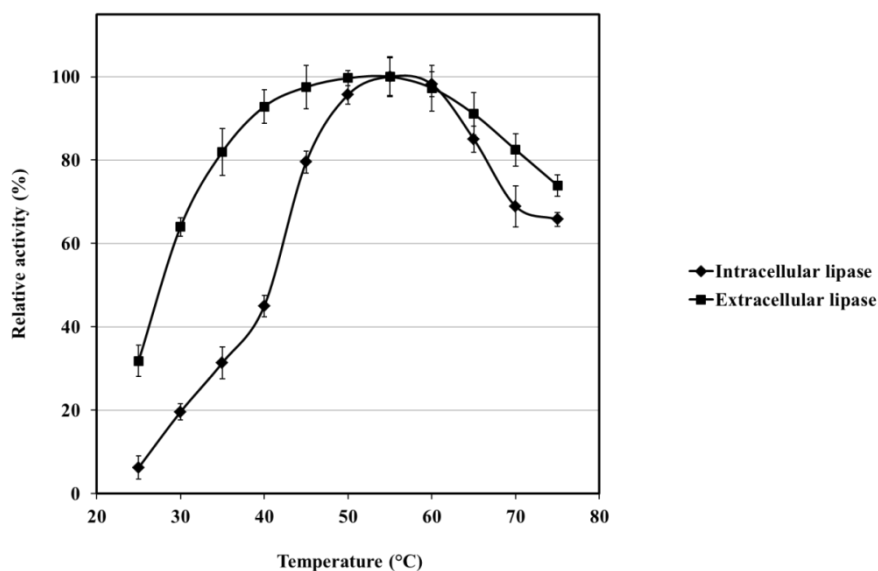


Figure 12 Influence of reaction temperature on the hydrolysis of ρ -nitrophenyl-laurate. Assays were done in the presence of 4.0 M NaCl at pH 7.0 under static condition. 100% equivalent to 117.9, and 124.2 units/mg protein for intracellular and extracellular lipase, respectively.

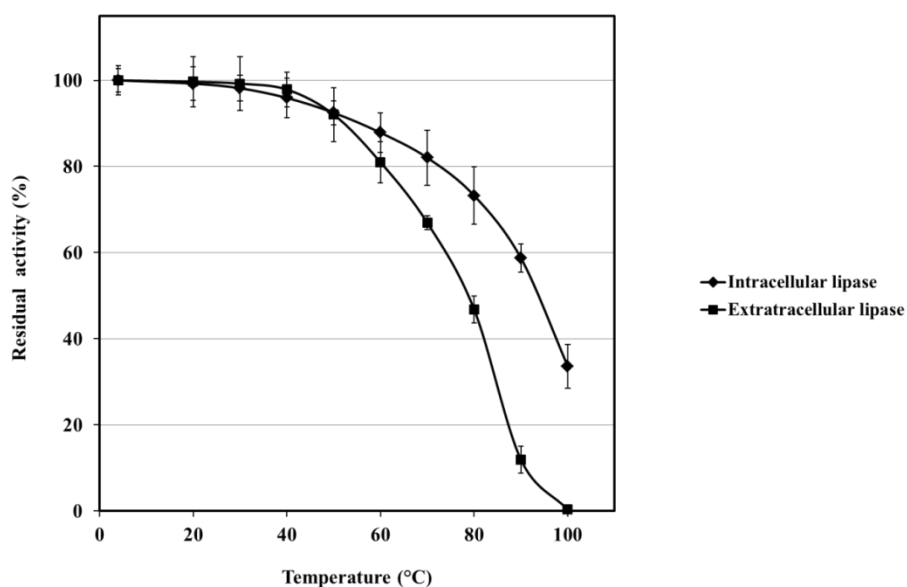


Figure 13 Temperature stability of for intracellular and extracellular lipase on the hydrolysis of ρ -nitrophenyl-laurate. Samples were heated at the designated temperature for 1 h with 4 M NaCl. Assays were done in the presence of 4.0 M NaCl at 55°C, pH 7.0 under static condition. 100% equivalent to 128.4, and 123.4 units/mg protein for intracellular and extracellular lipase, respectively.

สรุปผลการทดลอง

จากการคัดแยกและคัดเลือกเชื้ออาศัยชอบเค็มที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสมต่อการย่อยน้ำมันที่ประกอบด้วยกรดไขมันสายยาวปานกลาง ได้เชื้อกลุ่มอาศัยจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ HSB1-2 HM709 HM738 SQ1-4 และ SQ1-22 เชื้อแบคทีเรียจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ FACF-9 MHS1-4 MHS1-5 MHS-4 และ SBFE-5 เชื้อ HSB1-2 และ MHS-4 มีกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยรวมสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่มเชื้ออาศัย และเชื้อแบคทีเรีย ตามลำดับ จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อ เชื้อ HSB1-2 อยู่ในกลุ่ม *Halobacterium* และเชื้อ MHS-4 อยู่ในกลุ่ม *Bacillus* เอนไซม์ไลเปสโดยรวมจากเชื้อที่คัดเลือกได้จำเพาะกับการย่อย pNP-laurate อีกเชื้อที่คัดเลือกได้ทั้งหมดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อภายในทางเดินอาหารหนู (rat intestine epithelial, IEC6) และเซลล์กล้ามเนื้อของหนู (mouse fibroblast, L929) และทนต่อสภาวะในการทดสอบทางอาหารสัตว์ได้ดี อีกทั้งเมื่อนำไปการใช้ส่วนผสมของอิมัลชันน้ำมันมะพร้าวและเอนไซม์ไลเปสรวมจากเชื้อ *B. licheniformis* MHS-4 สามารถลดการเจริญเติบโตของเชื้อ *E.coli*, *Streptococci*, และ total anaerobic ในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารของสุกรได้ การเสริมเอนไซม์ไลเปสรวมจากเชื้อ *B. licheniformis* MHS-4 ที่ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส 2 เท่า ปรับปรุงทำให้ค่าการย่อยได้ของวัตถุดิบและพลังงานรวม น้ำหนักที่อายุ 56 วัน อัตราการเจริญเติบโตในช่วงอายุ 28-42 และ 28-56 วัน และน้ำหนักตัวเพิ่มต่ออาหารที่กินในช่วงอายุ 28-42 และ 28-56 วัน

ข้อเสนอแนะ

ไม่มี

ภาคผนวก

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Tapingkae, W., Pakdee, S., Yachai, M., and Visessanguan W. 2016. Isolation and characterization of lipase producing bacteria for potential application in piglet feed. Anim. Nutr. Feed Techn. 16: 83-95.

เอกสารอ้างอิง

- Akolkar, A., N. Bharambe, S. Trivedi, and A. Desai. 2009. Statistical optimization of medium components for extracellular protease production by an extreme haloarchaeon, *Halobacterium* sp. SP1(1). Letters in Applied Microbiology 48: 77-83.
- Allen, H. K. 2014. Antibiotic resistance gene discovery in food-producing animals. Current Opinion in Microbiology 19: 25-29.
- Antunes, A. et al. 2008. *Halorhabdus tiamatea* sp. nov., a non-pigmented, extremely halophilic archaeon from a deep-sea, hypersaline anoxic basin of the Red Sea, and emended description of the genus *Halorhabdus*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 58: 215-220.
- AOAC. 2005. Official Method of Analysis (18th Ed.) Official Method of Analysis (18th Ed.). Association of Official Analytical Chemists International, Maryland, USA.
- Arroyo, R., F. Sánchez-Muniz, C. Cuesta, F. Burguillo, and J. Sánchez-Montero. 1996. Hydrolysis of used frying palm olein and sunflower oil catalyzed by porcine pancreatic lipase. Lipids 31: 1133-1139.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
- Cañas-Rodriguez, A., and H. W. Smith. 1966. The identification of the antimicrobial factors of the stomach contents of sucking rabbits. Biochemical Journal 100: 79-82.
- Castillo, A. M. et al. 2006. *Natrinema ejinorensis* sp. nov., isolated from a saline lake in Inner Mongolia, China. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56: 2683-2687.
- Cera, K. R., D. C. Mahan, and G. A. Reinhart. 1989. Postweaning swine performance and serum profile responses to supplemental medium-chain free fatty acids and tallow. Journal of Animal Science 67: 2048-2055.

- Chahinian, H. et al. 2000. Production of extracellular lipases by *Penicillium cyclopium* purification and characterization of a partial acylglycerol lipase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64: 215-222.
- Chakraborty, K., and R. Paul Raj. 2009. Selective enrichment of n-3 polyunsaturated fatty acids with C₁₈-C₂₀ acyl chain length from sardine oil using *Pseudomonas fluorescens* MTCC 2421 lipase. *Food Chemistry* 114: 142-150.
- Chang, Q.-L., C.-H. Lee, and K. L. Parkin. 1999. Comparative selectivities of immobilized lipases from *Pseudomonas cepacia* and *Candida antarctica* (fraction B) for esterification reactions with glycerol and glycerol analogues in organic media. *Enzyme and Microbial Technology* 25: 290-297.
- Cui, H.-L. et al. 2010a. *Halogranum rubrum* gen. nov., sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a marine solar saltern. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 1366-1371.
- Cui, H.-L. et al. 2010b. *Halopelagius inordinatus* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Halobacteriaceae* isolated from a marine solar saltern. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 2089-2093.
- Cui, H.-L. et al. 2010c. *Haladaptatus litoreus* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from a marine solar saltern, and emended description of the genus *Haladaptatus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 1085-1089.
- Dierick, N. A., J. A. Decuypere, K. Molly, E. Van Beek, and E. Vanderbeke. 2002. The combined use of triacylglycerols containing medium-chain fatty acids (MCFAs) and exogenous lipolytic enzymes as an alternative for nutritional antibiotics in piglet nutrition: I. *In vitro* screening of the release of MCFAs from selected fat sources by selected exogenous lipolytic enzymes under simulated pig gastric conditions and their effects on the gut flora of piglets. *Livestock Production Science* 75: 129-142.
- Elibol, M., and D. Ozer. 2000. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. *Process Biochemistry* 36: 325-329.
- Ezaki, T., Y. Hashimoto, and E. Yabuuchi. 1989. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to

- membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *International Journal of Systematic Bacteriology* 39: 224-229.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Frydendahl, K. 2002. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Veterinary Microbiology* 85: 169-182.
- Gomes, J., and W. Steiner. 2004. The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technology and Biotechnology* 42: 223-235.
- Gruber, C. et al. 2004. *Halobacterium noricense* sp. nov., an archaeal isolate from a bore core of an alpine Permian salt deposit, classification of *Halobacterium* sp. NRC-1 as a strain of *H. salinarum* and emended description of *H. salinarum*. *Extremophiles* 8: 431-439.
- Hasan, F., A. A. Shah, and A. Hameed. 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 235-251.
- Kharroub, K. et al. 2008. *Halomicrobium katesii* sp. nov., an extremely halophilic archaeon. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 2354-2358.
- Klein, R. R. et al. 1997. Additive effects of acyl-binding site mutations on the fatty acid selectivity of *Rhizopus deleamar* lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 74: 1401-1407.
- Komagata, K., and K. Suzuki. 1987. Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics. *Methods in Microbiology* 19: 161-207.
- Kordel, M., B. Hofmann, D. Schomburg, and R. D. Schmid. 1991. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data. *Journal of Bacteriology* 173: 4836-4841.
- Kumar, S., M. Nei, J. Dudley, and K. Tamura. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in bioinformatics* 9: 299-306.

- Kwon, D., and J. Rhee. 1986. A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 63: 89-92.
- Larkin, M. A. et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
- Lepine, A. J., R. D. Boyd, J. A. Welch, and K. R. Roneker. 1989. Effect of colostrum or medium-chain triglyceride supplementation on the pattern of plasma glucose, non-esterified fatty acids and survival of neonatal pigs. *Journal of Animal Science* 1989: 4.
- Lin, C. L., S. H. Chiang, and H. F. Lee. 1995. Causes of reduced survival of neonatal pigs by medium-chain triglycerides: blood metabolite and behavioral activity approaches. *Journal of Animal Science* 73: 2019-2025.
- Lopetcharat, K., Y. J. Choi, J. W. Park, and M. A. Daeschel. 2001. Fish sauce products and manufacturing: a review. *Food Reviews International* 17: 65-88.
- Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *Journal of Molecular Biology* 3: 208-215.
- Minnikin, D. E. et al. 1984. An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *Journal of Microbiological Methods* 2: 233-241.
- Monroe, S., and R. Polk. 2000. Antimicrobial use and bacterial resistance. *Current Opinion in Microbiology* 3: 496-501.
- Myers, W. D., P. A. Ludden, V. Nayigihugu, and B. W. Hess. 2004. Technical note: a procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *Journal of Animal Science* 82: 179-183.
- Odle, J. 1998. Medium-chain triglycerides: A unique energy source for neonatal pigs *Pig News and Information* No. 20. p 25-32.
- Odle, J., R. T. Zijlstra, and S. M. Donovan. 1996. Intestinal effects of milkborne growth factors in neonates of agricultural importance. *J. Anim. Sci.* 74: 2509-2522.
- Oren, A., A. Ventosa, and W. D. Grant. 1997. Proposed minimal standards for description of new taxa in the order *Halobacteriales*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 233-238.

- Pugh, D. M. 2002. The EU precautionary bans of animal feed additive antibiotics. *Toxicology Letters* 128: 35-44.
- Rohban, R., M. A. Amoozegar, and A. Ventosa. 2009. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 36: 333-340.
- Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Smith, S. 1980. Mechanism of chain length determination in biosynthesis of milk fatty acids. *Journal of Dairy Science* 63: 337-352.
- Tanasupawat, S., O. Shida, S. Okada, and K. Komagata. 2000. *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1479-1485.
- Tapingkae, W. et al. 2008. *Natrinema gari* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from fish sauce in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 2378-2383.
- Van Soest, P. J. 1963. Use of detergents in the analyses of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* 46: 829-835.
- Vidyasagar, M., S. Prakash, C. Litchfield, and K. Sreeramulu. 2006. Purification and characterization of a thermostable, haloalkaliphilic extracellular serine protease from the extreme halophilic archaeon *Halogeometricum borinquense* strain TSS101. *Archaea* 2: 51-57.
- Xin, H. et al. 2000. *Natrinema versiforme* sp. nov., an extremely halophilic archaeon from Aibi salt lake, Xinjiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 1297-1303.
- Yachai, M. et al. 2008. *Halobacterium piscisalsi* sp. nov., from fermented fish (pla-ra) in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 2136-2140.
- Yang, Y., H.-L. Cui, P.-J. Zhou, and S.-J. Liu. 2006. *Halobacterium jilantaiense* sp. nov., a halophilic archaeon isolated from a saline lake in Inner Mongolia, China.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 56: 2353-2355.