ภาวะเหมาะสมเพื่อการผลิตไลเปส โดย *Bacillus spp.*

นส. ทวีพร เกตุอร่าม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-635-000-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17032155

OPTIMAL CONDITIONS FOR LIPASE PRODUCTION BY *Bacillus spp.*

Miss Taweeporn Gedarram

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Sciences

Program Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1996

ISBN 974-635-000-5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ภาวะเหมาะสมเพื่อการผลิตไลเปสโดย Bacillus spp.
โดย	นส. ทวีพร เกตุอร่าม
สาขาวิชา	หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์นี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร สิทธิประณีต)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตรจารย์ ดร.วิไล อโนมะศิริ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ทวีพร เกตุอร่าม : ภาวะเหมาะสมสำหรับการผลิตไลเปสโดยเชื้อ *Bacillus spp.*
(OPTIMAL CONDITIONS FOR LIPASE PRODUCTION BY *Bacillus spp.*)
อ. ที่ปรึกษา : ผศ. นภา ศิวรังสรรค์ , อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์,
105 หน้า. ISBN 974-635-000-5

การผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยการคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมในการใช้เป็นสูตรอาหารที่ดีที่สุดของการเลี้ยงเชื้อ ผลการทดลองพบว่า สูตรอาหารที่ ประกอบด้วยสูตรพื้นฐานที่ 1 , สารสกัดจากยีสต์0.5%(w/v) , แอมโมเนียมไนเตรท 0.2%(w/v) และน้ำมันละหุ่ง 0.33% (v/v) เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมและให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด โดยกำหนดให้ภาวะการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารดังกล่าวคือ ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศ 200 รอบต่อนาที , เชื้อเริ่มต้นมีความขุ่นเมื่อวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 0.1, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8 , อุณหภูมิ 30°ซ และเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 6 ชั่วโมง เมื่อทำการติดตามการทำงานของไลเปสที่หลั่งออกมาจากเชื้อ *Bacillus subtilis* พบว่า เวลาในการบ่ม 30 นาที , ปริมาณเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร , อุณหภูมิ 45 °ซ , อะซิเตทบัฟเฟอร์ที่ pH 4.8 , และใช้อิมัลชันของน้ำมันมะกอก 1% เป็นซับสเตรท เป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการติดตามการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสยังถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์โดย EDTA และ $HgCl_2$ และถูกยับยั้งบางส่วนด้วย $NiCl_2$ และ $FeCl_3$ได้ทำการทดลองเพื่อใช้วัตถุดิบที่มีในประเทศไทยทดแทนแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อโดยพบว่ากลูโคสหรือฟรุคโตส 1% (w/v) เพียงอย่างเดียวสามารถทดแทนน้ำมันละหุ่ง 0.33%(v/v) ได้ นอกจากนี้กากถั่วเหลือง ที่มีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนทั้งหมด 0.3% สามารถใช้ทดแทนสารสกัดจากยีสต์ 0.5%(w/v) ที่มีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนทั้งหมด 0.18% ได้ หลังจากนั้นทำการตกตะกอนน้ำใสจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยสูตรอาหารที่ดีที่สุดของการเลี้ยงเชื้อด้วยเอธานอลความเข้มข้น 80%(v/v) และอบแห้งที่อุณหภูมิห้อง(25°ซ) เป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง จะได้เอนไซม์ในสภาพผงที่มีแอคติวิตี 6.5 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ในการนำผงเอนไซม์ไปทดสอบการเก็บรักษาที่อุณหภูมิระหว่าง - 20°ซ ถึง 60° ซ พบว่าที่อุณหภูมิ 20°ซ ถึง 30°ซ สามารถเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ได้อย่างน้อย 28 วัน โดยไม่สูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์เลย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา – ลายมือชื่อนิสิต ทวีพร เกตุอร่าม

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา น. ศิวรังสรรค์

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์

ปกอนุมัติวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C626956 MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: LIPASE / *Bacillus spp.*
TAWEEPORN GEDARRAM : OPTIMUM CONDITIONS FOR LIPASE PRODUCTION BY *Bacillus spp.* THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. NAPA SIWARUNGSON, THESIS CO-ADVISOR : ASSIST . PROF. SIRIRAT RENGPIPAT, Ph.D,
105 pp. ISBN 974-635-000-5

The best cultivation medium for production of lipase from *Bacillus subtilis* was performed by selection the optimum medium formulation. The results showed that this formulation for the highest activity were composed of basic formular 1 , 0.5%(w/v) yeast extract , 0.2% (w/v) ammonium nitrate and 0.33%(v/v) castor oil. The optimum conditions for cultivation of *Bacillus subtilis* were at agitation speed 200 rpm , OD 600 nm equal to 0.1, pH at the beginning of cultivation equal to 6.8 , temperature 30°C ,cultivation time 6 hours. The optimum conditions for detection the extracellular lipase activity from *Bacillus subtilis* were found at incubation time 30 minutes, volume of enzyme 0.5 ml , temperature 45°C , acetate buffer pH 4.8 , and 1%olive oil in emulsion as a substrate. The lipase was inhibited completely by EDTA and $HgCl_2$ and partially inhibited by $FeCl_3$ and $NiCl_2$. The experiment was aimed to use raw materials in Thailand instead of carbon sources and nitrogen sources for cultivation. The result showed that only 1%glucose or fructose could replaced 0.33% castor oil (v/v) for carbon source. In addition , soybean meal with total 0.3 %N could replace 0.5 %(w/v) yeast extract with total 0.18%N for nitrogen source. After culture in the best medium, the enzyme was precipitated from the broth as a powder with 80% (v/v) ethanol and dried at room temperature (25°C) for 8-12 hours with 6.5 unit / mg protein . The enzyme powders were stored between -20°C to 60°C for at least 28 days. It was found that storage temperatures between -20°C to 30°C were not lost the activity.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา - ลายมือชื่อนิสิต ทวีพร เดชอร่าม

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2536 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาคอยให้คำแนะนำและความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนศึกษาอยู่

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมและได้อนุญาตให้นำเชื้อ *bacillus subtilis* ซึ่ง นส. เปรมสุดา สมาน เป็นผู้คัดแยกจาก อ. ระโนด จ.สงขลามาทำการศึกษาต่อได้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร สิทธิประณีต

และผู้ช่วยศาสตรจารย์ ดร.วิไล อโนมะศิริ ที่กรุณาให้คำแนะนำต่อผู้เขียน รวมทั้งการเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนอุดหนุนการวิจัย

ขอขอบคุณ สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ สำหรับทุนอุดหนุนการวิจัย

ขอขอบคุณ คุณแกล้วกล้า แก้วไทย และคุณ กนกพร สมพรไพลิน ที่ช่วยเหลือในการจัดทำสไลด์ประกอบการเสนอวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณนิสิตหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิตในภาควิชาชีวเคมี และเทคโนโลยีทางชีวภาพที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจ

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และขอขอบคุณ ญาติพี่น้องที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจแก่ผู้เขียนจนสำเร็จการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

..... หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญภาพ ..... ฑ

คำย่อ ..... ฒ

บทที่

1 บทนำ 1

2 ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์

2.1 ครุภัณฑ์ 14

2.2 เคมีภัณฑ์ 16

2.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง 17

2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง 18

3 วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมสารละลาย 19

3.2 การเก็บรักษาแบคทีเรียในการทดลอง 22

3.3 การเลี้ยงเชื้อและการเตรียม crude engyme 22

3.4 การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ 22

3.5 การหาความเร็วรอบในการให้อากาศที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ 23

3.6 การหาปริมาณเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสม 23

3.7 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 23

3.8 การศึกษา pH ที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 23

3.9 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส 24

3.10 การศึกษาสมบัติของเอมไซม์ไลเปส 24

3.11 การหาแหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสมจะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ 25

3.12 การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี kjedahl (leonard , 1987) 26

3.13 การหาแหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสมจะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยงเชื้อ ... 26

3.14 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด 27

3.15 การเตรียมเอนไซม์ให้เข้มข้นขึ้น 27
3.16 การทดสอบความสามารถในการเก็บเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ 28
4 ผลการทดลอง
4.1 การหาภาวะเหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *bacillus subtilis* 29
4.2 การหาภาวะเหมาะสมในการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส 45
4.3 การคัดเลือกวัตถุดิบที่เหมาะสมจะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ 51
4.4 การหาแหล่งวัตุดิบที่เหมาะสมจะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยงเชื้อ 65
4.5 การเตรียมเอนไซม์ไลเปสในรูปผงและการเก็บรักษาเอนไซม์ที่สภาวะ
อุณหภูมิต่าง ๆ 70
4.6 การเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่อุณหภูมิต่าง ๆ 70
5 สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 78
เอกสารอ้างอิง 92
ภาคผนวก 98
ประวัติผู้เขียน 104

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 แสดงการนำไลเปสจากจุลินทรีย์ไปใช้ในอุตสาหกรรม 2

2 แสดงสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตไลเปสจากจุลินทรีย์หลายชนิด 9

3 เชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่ต้องการไตรกลีเซอไรด์ในการผลิตไลเปส 10

4 แสดงถึงสภาพความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์บางชนิดที่นำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมบางประเภท 13

5 ผลการจำแนกชนิดของเชื้อ *Bacillus subtilis* 18

6 แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 และอาหารสูตรพื้นฐานที่ 2 โดยให้ pH ตั้งต้นสำหรับการเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้น เท่ากับ 0.1 และอุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30°ซ ทำการติดตาม Total activity ในน้ำใสจากการเลี้ยงเชื้อ 250 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6 เมื่อให้ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 1.0 31

7 แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 ที่อุณหภูมิ 30°ซ โดยให้ pH ตั้งต้นสำหรับการเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 6.8 แปรผันความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเป็น 150, 200, 250, และ 300 รอบต่อนาที Total activity ในน้ำใสจากการเลี้ยงเชื้อ 250 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6 เมื่อให้ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 1.0 34

8 แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 โดยให้ pH ตั้งต้น สำหรับการเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศ เท่ากับ 200 รอบต่อนาที แปรผันความขุ่นตั้งต้น ที่ OD 600 nm เป็น 0.05, 0.1, 0.15, และ 0.2 และอุณหภูมิ 30 °ซ ทำการติดตาม Total activity ในน้ำใสจากการเลี้ยงเชื้อ 250 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6 เมื่อให้ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 0.1 31

ตารางที่ หน้า

9 แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 อุณหภูมิ 30 °ซ ความขุ่นตั้งต้น ที่ OD 600 nm เท่ากับ 0.1 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที แปรผัน pH ตั้งต้น ในการเลี้ยงเชื้อเป็น 4.5, 5.5, 6.5, 6.8, 7.0 และ 7.5 ทำการติดตาม Total activity ในน้ำใสจากการเลี้ยงเชื้อ 250 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6 40

10 แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 1.0 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที pH ตั้งต้น เท่ากับ 6.8 เปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ และ 37 °ซ ทำการติดตาม Total activity ในน้ำใสจากการเลี้ยงเชื้อ 250 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6 เมื่อให้ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm. เท่ากับ 1.0 43

11 ศึกษาชนิดของสารยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์ 50

12 แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 1.0 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที pH ตั้งต้น เท่ากับ 6.8 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ และมีน้ำมันพืชชนิดต่างๆ 0.33 % (v/v) ทำการติดตาม Total activity ในน้ำใสจากการเลี้ยงเชื้อ 250 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6 เมื่อให้ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm. เท่ากับ 1.0 53

13 แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 1.0 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที pH ตั้งต้น เท่ากับ 6.8 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ และมีน้ำตาลชนิดต่างๆ 1%(w/v) เป็นแหล่งต้นคอร์บอนแทนน้ำมันมะกอก 0.33 % (v/v) ทำการติดตาม Total activity ในน้ำใสจากการเลี้ยงเชื้อ 250 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6 เมื่อให้

ตารางที่ หน้า

ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 1.0..... 57
14 แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 1.0 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที pH ตั้งต้น เท่ากับ 6.8 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ โดยใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตสในปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนแทนน้ำมันมะกอก 0.33%(v/v) ทำการติดตาม Total activity ในน้ำใสจากการเลี้ยงเชื้อ 250 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6 เมื่อให้ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm. เท่ากับ 1.0 59
15 แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 1.0 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที pH ตั้งต้น เท่ากับ 6.8 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้แป้งมันสำปะหลัง ในปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนแทนน้ำมันมะกอก 0.33 % (v/v) ทำการติดตาม Total activity ในน้ำใสจากการเลี้ยงเชื้อ 250 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6 เมื่อให้ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm. เท่ากับ 1.0 62
16 แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 1.0 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที pH ตั้งต้น เท่ากับ 6.8 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เมื่อมีน้ำมันละหุ่ง 0.33% (v/v) เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนอีกชนิดหนึ่งแทนน้ำมันมะกอก 0.33% (v/v) ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้แป้งมันสำปะหลัง 1% ทำการติดตาม Total activity ในน้ำใสจากการเลี้ยงเชื้อ 250 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6 เมื่อให้ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm. เท่ากับ 1.0 และน้ำตาลกลูโคสผลการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนรวมของวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน..... 64
17 ผลการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนรวมของวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน.. 65
18 แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 1.0 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที pH ตั้งต้น เท่ากับ 6.8 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สาร

ตารางที่ หน้า

19 แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 1.0 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที pH ตั้งต้น เท่ากับ 6.8 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารสกัดจากยีสต์ในปริมาณต่าง ๆ เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ปริมาณ 0.2% (w/v) โดยมีน้ำมันละหุ่ง 0.33% (v/V) เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน ทำการติดตาม Total activity ในน้ำใสจากการเลี้ยงเชื้อ250 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6 เมื่อให้ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm. เท่ากับ 1.0 และน้ำตาลกลูโคสผลการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนรวมของวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน 71

20 แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 1.0 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที pH ตั้งต้น เท่ากับ 6.8 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ โดยใช้กากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวันที่มีไนโตรเจน 0.18%(v/v) และแอมโมเนียมไนเตรต 0.2%(w/v) โดยมีน้ำมันละหุ่ง 0.33% (v/v) ทำการติดตาม Total activity ในน้ำใสจากการเลี้ยงเชื้อ 250 มล.ที่ชั่วโมงที่ 6 เมื่อให้ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm. เท่ากับ 1.0 และน้ำตาลกลูโคส ผลการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนรวมของวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน..... 73

21 แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm เท่ากับ 1.0 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที pH ตั้งต้น เท่ากับ 6.8 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ โดยใช้กากถั่วเหลือง ที่มีไนโตรเจน ... 0.05%(v/v), 0.1%(v/v 0.18%(v/v),0.3%(v/v) และ 0.4%(v/v) และ..... แอมโมเนียมไนเตรต 0.2%(w/v) โดยมีน้ำมันละหุ่ง 0.33% (v/v) ทำการติด.. ตาม Total activity ในน้ำใสจากการเลี้ยงเชื้อ 250 มล.ที่ชั่วโมงที่ 6 เมื่อให้ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น600 nm. เท่ากับ 1.0 และน้ำตาลกลูโคส ผลการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนรวมของวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน 75

22 การเตรียมเอนไซม์ไลเปสในรูปผงโดยวิธีต่าง ๆ 76

ตารางที่ หน้า

23 ผลการเก็บรักษาเอนไซม์ไลเปสผง ซึ่งเตรียมโดยวิธีตกตะกอนด้วย
เอธานอล 80 เปอร์เซ็นต์ 77
24 ชนิดของกรดไขมันของน้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ 85

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงชนิดของไลเปสตามความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์	4
2	แสดงความสามารถในการทำงานของไลเปส.	6
3	แสดงลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของเอนไซม์ไลเปส	7
4	เปรียบเทียบการเจริญ แอคติวิตีของเอนไซม์ และ pH ของเชื้อ *Bacillus subtilis*เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรเพื่นฐานที่1และอาหารสูตรพื้นฐานที่2โดยให้ pH ตั้งต้นสำหรับการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นเท่ากับ 0.1 และอุณหภูมิสำหรับเลี้ยงเชื้อ 30°ซ	30
5	เปรียบเทียบการเจริญ แอคติวิตีของเอนไซม์ และ pH ของเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อเลี้ยงเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 โดยให้ pH ตั้งต้นเท่ากับ 6.8 ความขุ่นตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อ 0.1 และ อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ 30 °ซ แปรผันความเร็วรอบ ในการเขย่าให้อากาศเป็น 150,200,250 และ 300รอบต่อนาที	33
6	เปรียบเทียบการเจริญ แอคติวิตของเอนไซม์ และ pH ของ *Bacillus subtilis* เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรที่ 1 ที่อุณหภูมิ 30°ซ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศ 200 รอบต่อนาที แปรผันความขุ่นตั้งต้นเป็น 0.05, 0.1 ,0.15 และ 0.2	36
7	เปรียบเทียบการเจริญ แอคติวิตของเอนไซม์ และ pH ของเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่แปรผัน pH ตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อเป็น 4.5, 5.5 , 6.5 , 6.8 ,7.0และ 7.5 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1ที่อุณหภูมิ 30°ซ ความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศ 200รอบต่อนาที	39
8	เปรียบเทียบการเจริญ แอคติวิตของเอนไซม์ และ pH ของ *Bacillus subtilis* เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน	

ภาพที่		หน้า
	สูตรที่ 1 โดยเปรียบเทียบอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อระหว่าง 30 °ซและ 37°ซให้ pHตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8 ความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศ 200 รอบต่อนาที.....	39
9	การเจริญ , แอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสและการเปลี่ยนแปลง pH เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานสูตรที่ 1เลี้ยงเชื้อที่ 30°ซ โดยให้ pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 6.8 ความขุ่นเริ่มต้นที่ OD 600nm.เท่ากับ 0.1 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศ 200 รอบต่อนาทีทำการติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสโดยใช้ emulsion ของน้ำมันมะกอก 1% เป็นซับเสตรท เติมเอนไซม์ 0.5 มล.อะซิเตทบัฟเฟอร์ที่ pH 4.8 อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์ 45oซ เป็นเวลา 30 นาที.....	44
10	แสดงผลของช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อ ต่อการวัดหาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ เมื่อใช้ emulsionของน้ำมันมะกอก 1% เป็นซับเสตรท ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 7.0 อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์ 37 °ซ ปริมาตรเอนไซม์ 0.5 มล.ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร มาตรฐานที่ 1ในภาวะเหมาะสม เก็บเอนไซม์ที่ชั่วโมงที่6 ของการเจริญซึ่งมีความขุ่นเท่ากับ 0.8.....	45
11.	แสดงผลของปริมาณเอนไซม์ ที่มีผลต่อการหาแอคติวิตของเอนไซม์ เมื่อใช้mmulsion ของน้ำมันมะกอก 1% เป็นซับสเตรท ฟอสเฟตบัฟเฟอร ที่ pH 7.0 อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์ 37 °ซ เอนไซม์ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรมาตรฐาน 1 ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งมีความขุ่นเท่ากับ 0.8.....	46
12	แสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อใช้ emulsion ของน้ำมันมะกอก 1% เป็นสับสเตรท ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7.0 บ่มเป็นเวลา	

ภาพที่ หน้า

1 ชั่วโมง ปริมาตรเอนไซม์ 0.5 มล. ซึ่งได้จากการ
เลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 ทำการ เลี้ยงเชื้อ
เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งมีความขุ่น เท่า กับ 0.8..... 47

13 แสดงผลของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส
จากเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อใช้ emulsion ของ
น้ำมันมะกอก 1% เป็นสับสเตรท ปมเอนไซม์ที่
37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปริมาตรของเอนไซม์
0.5 มล. ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร
พื้นฐานที่ 1 ทำการเลี้ยงเชื้อ ในภาวะที่เหมาะสม
เป็น เวลา 6 ชั่วโมงซึ่งมีความขุ่นเท่ากับ 0.8..... 48

14 แสดงผลของ ซับเสตรทต่อแอคติวิตีของเอนไซม์
โดยแปรผันชนิดและปริมาณของสับเสตรท โดยบ่ม
เอนไซม์ที่ 37 °ซเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ฟอสเฟต
บัฟเฟอร์ที่ pH 7.0 ปริมาตรของ เอนไซม์ 0.5
มล.ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1
ทำการเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลา 6 ชั่วโมง
ซึ่งมีความขุ่นเท่ากับ 0.8.....49

15. เปรียบเทียบการเจริญเติบโต แอคติวิตีของเอนไซม์ และ
pHของเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร
เลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันน้ำมันพืชชนิดต่าง ๆเป็นแหล่งต้นตอ
คาร์บอน.....52

16 เปรียบเทียบการเจริญ แอคติวิตีของเอนไซม์ และ pH
ของเอนไซมไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis*, เมื่อเลี้ยง
ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลชนิดต่าง ๆเป็นแหล่ง
ต้นตอคาร์บอน 56

17 เปรียบเทียบการเจริญแอคติวิตีของเอนไซม์ และ pH
ของเอนไซมไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อ
เลี้ยงเชื้อ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสและ
น้ำตาลฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณต่าง ๆ..... 58

18 การเจริญ และแอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส เมื่อเลี้ยงเชื้อ
Bacillus subtilis ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานสูตรที่ 1

ภาพที่ หน้า

ให้ความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 pH เริ่มต้น 6.8 ความเร็ว
รอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที
อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ30 °ซ..... 60
19 เปรียบเทียบการเจริญแอคติวิตีของเอนไซม์ และ pH
ของเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ
ที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในปริมาณต่าง ๆ.....61
20 เปรียบเทียบการเจริญ แอคติวิตีของเอนไซม์
และpH ของเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อเลี้ยงเชื้อใน
อาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่คัด
เลือกไว้ในปริมาณที่เหมาะสมกับน้ำมันละหุ่งที่คัดเลือก
เป็นสารต้นตอคาร์บอน.....63
21 เปรียบเทียบการเจริญ แอคติวิตีของเอนไซม์ และ pH
ของเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อเลี้ยงเชื้อลงใน
อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่ง
ต้นตอไนโตรเจนในปริมาณต่าง ๆ..... 66
22 การเจริญ แอคติวิตีของเอนไซม์ และ pH ของเชื้อ
Bacillus subtilis เมื่อเติมสารประกอบไนโตรเจน
ชนิดต่าง ๆ อย่างละ 0.2%ลงไปในอาหารสูตรพื้นฐาน
สูตรที่ 1 ที่มีน้ำมันละหุ่ง 0.33% เป็นแหล่งคาร์บอน
และสารสกัดจากยีสต์ 0.5 % เป็นแหล่งไนโตรเจน..... 70
23 เปรียบเทียบการเจริญ แอคติวิตีของเอนไซม์ และ pH
ของเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อใช้สารสกัดจากยีสต์
ที่มีไนโตรเจนรวม 0.18%กากเมล็ดถั่วเหลืองที่มี
ไนโตรเจน 0.18% กาก เมล็ดทานตะวัน 0.18%
และกากเมล็ดถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันด้วย
อัตราส่วน 1:1 ที่มีไนโตรเจน 0.18% เป็นแหล่งต้นตอ
ไนโตรเจนเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 มี
น้ำมันละหุ่ง 0.33% เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน และ
แอมโมเนียมไนเตรทปริมาณ 0.2 % เป็นแหล่ง
ต้นตอไนโตรเจนอีกชนิดหนึ่ง.....72

ภาพที่ หน้า

24 เปรียบเทียบการเจริญ แอคติวิตีของเอนไซม์ และ pH ของเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อทดลองใช้ กากถั่วเหลือง ที่มีไนโตรเจน 0.05%,0.1%,0.18%,0.3%และ 0.4% เป็นแหล่งไนโตรเจนแทนสารสกัดจากยีสต์ในอาหารพื้นฐาน สูตรที่ 1 โดยมีน้ำมันละหุ่ง 0.33% เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน และแอมโมเนียมไนเตรท 0.2% เป็นแหล่งต้นตอ ไนโตรเจนอีกชนิดหนึ่ง.....74

25 แสดงความสามารถในการนำน้ำตาลฟรุคโตสและน้ำตาล กลูโคส มาใช้ในวงจรการ metabolism ของกลีเซอรอล ของอะซิติคแอซิดแบคทีเรีย..... 85

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

มก. = มิลลิกรัม

มล. = มิลลิลิตร

°ซ = องศาเซลเซียส

Enz.Act. = Enzyme Activity

ml. = millilter

mM = millimolar

µg = microgram

$Eu.ml^{-1}$ = Enzyme unit per millilite

rpm = revolution per minute

U/g = Units/gram

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย