บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1. การคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมในการสร้างไลเปสจากเชื้อ *Bacillus subtilis*

จากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อให้สร้างไลเปสนั้นการเลี้ยงเชื้อ มีปัจจัยต่างๆ มากมายที่เกี่ยวข้องและปัจจัยที่สำคัญ เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีส่วนประกอบที่สำคัญ คือ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ชนิดของไตรกลีเซอไรด์ แคลเซียมไอออน ไอออนของโลหะ ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ และ อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น และในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อให้สร้างไลเปสนั้นจำเป็นจะต้องมีการเติมน้ำมันเพื่อเป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส เชื้อจะสามารถใช้น้ำมันได้ก็จำเป็นต้องมีการสร้างไลเปส และในการทดลองนี้ได้เลือกใช้ น้ำมันมะกอกเป็นตัวกระตุ้น ดังนั้นเชื้อจะสัมผัสกับน้ำมันได้เท่าใดเชื้อก็จะสร้างไลเปสได้เป็นสัดส่วนตามกันเท่านั้น และในการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้สร้างไลเปสได้สูงขึ้นนั้น ได้มีแนวความคิดที่ว่าถ้าเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำมันมะกอกกับเชื้อ *Bacillus subtilis* ซึ่งจะอยู่ในวัฏภาคของน้ำ ก็น่าจะทำให้เชื้อสร้างไลเปสได้สูงขึ้น ซึ่งในการทำให้น้ำมันแขวนลอยเป็นอนุภาคเล็กๆ อยู่ในน้ำโดยคงตัวได้ ซึ่งทำให้อยู่ในรูปของอิมัลชั่น และผลจากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 ที่มี 0.1% น้ำมันมะกอก พบว่า เชื้อ *Bacillus subtilis* มีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะ 12 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นการเจริญจะเริ่มคงที่จนถึง 24 ชั่วโมง และการเจริญเริ่มลดลงเล็กน้อยหลังจากเลี้ยงเชื้อผ่านไป 24 ชั่วโมง โดยติดตามการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* จากการเปรียบเทียบค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ โดยจะมีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยจะเริ่มสูงขึ้นตามการเจริญของเชื้อในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ (Logarithmic phase) และมีปริมาณโปรตีนคงที่เมื่อเชื้อ *Bacillus subtilis* เจริญถึงช่วงการเจริญแบบคงที่ (stationary phase) โปรตีนที่เชื้อ *Bacillus subtilis* สร้างนั้นติดตามโดยวิธีไบยูเร็ตและเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตราฐาน (Bovine serum albumin Standard Solution) ที่ OD ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และติดตามการสร้างไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยใช้ 0.1 % น้ำมันมะกอกเพื่อเป็นตัวกระตุ้นการสร้างไลเปส และเมื่อทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* นั้นพบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* สามารถสร้างไลเปสได้สัมพันธ์กับการเจริญในช่วงการ

เจริญแบบทวีคูณ (logarithmic phase) เชื้อ *Bacillus subtilis* สร้างไลเปสได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ 1% อิมัลชั่นของน้ำมันมะกอกเป็นซับสเตรท ถูกย่อยด้วยไลเปสจากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ที่ pH 4.8 บ่มเป็นเวลา 30 นาที ที่ 45°ซ หยุดปฏิกิริยาด้วย 95% เอธานอล ไตเตรทกรดไขมันอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาด้วยสารละลายมาตราฐาน โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.025 นอร์มอล โดยใช้ฟีนอล์พทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ และคำนวณปฏิกิริยาของของเอนไซม์เป็นหน่วยของเอนไซม์ โดยเทียบกับสารอิมัลชั่นของกรดโอลิอิกมาตราฐานกำหนดให้หนึ่งหน่วยของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถไฮโดรไลส์ไขมันแล้วได้กรดอิสระ 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 30 นาที ที่ 45°ซ pH 4.8 และแสดงประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เป็นหน่วยต่อ มิลลิลิตรของสารละลายเอนไซม์ โดยได้ทดลองเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน ซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 2 ชนิด คือชนิดแรกจะมี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนชนิดที่สองจะมี $NaNH_4HPO_4.H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* แล้วทำการติดตามการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* รวมทั้งติดตามวัดแอคติวิตีในอาหารแต่ละชนิด โดยได้ทำการทดลองในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแรกที่มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.1% และ เลซิติน 0.1% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส เพื่อเปรียบเทียบการเจริญ, ปริมาณโปรตีน และการสร้างไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 °C พบว่าจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะ 16 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นการเจริญจะเริ่มคงที่จนถึง 24 ชั่วโมง และจะเริ่มลดลงหลังจากนั้น , เชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 และไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น มีน้ำมันมะกอก 0.1% ให้ปริมาณโปรตีนสูงขึ้นตามลำดับและเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 16 มีปริมาณโปรตีน 7.53 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งเลซิติน 0.1% มีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะ 16 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นการเจริญจะเริ่มคงที่จนถึง 24 ชั่วโมง และจะเริ่มลดลงหลังจากนั้น, มีปริมาณโปรตีน 6.88 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการสร้างไลเปสนั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 และไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น มีน้ำมันมะกอก 0.1% มีไลปสแอคติวิตี 5.55 ยูนิตต่อมิลลิลิตร(แอคติวิตีรวมเป็น 1,665 ยูนิต) ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งเลซิติน 0.1% มีไลปสแอคติวิตี 5.79 ยูนิตต่อมิลลิลิตร(แอคติวิตีรวมเป็น 1,737 ยูนิต) ซึ่งเชื้อ *Bacillus subtilis* สามารถเจริญและสร้างไลเปสได้ไม่แตกต่างกันมากทั้งในน้ำมันมะกอก 0.1% และเลซิติน 0.1 %

แต่เมื่อได้ทำการปรับอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในรูปอิมัลชั่นแล้ว ผลการเจริญ, ปริมาณโปรตีน และไลเปสแอคติวิตี พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 และปรับเป็นอิมัลชั่น มีน้ำมันมะกอก 0.075% และ เลซิติน 0.025% มีไลปสแอคติวิตี 8.86 ยูนิตต่อมิลลิลิตร(แอคติวิตีรวมเป็น 2,658 ยูนิต) ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบผลการเจริญพบว่าไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนพบว่าสามารถสร้างโปรตีนได้มากกว่าถึง 2 เท่า ของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.1% และ เลซิติน 0.1% คือ มีปริมาณโปรตีน12.43 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและสร้างไลเปส ก็พบว่าสร้างได้สูงกว่าอาหารชนิดที่ไม่ได้ทำให้เป็นอิมัลชั่นถึง 60 % และเมื่อได้ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นชนิดที่มี $NaNH_4HPO_4.H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจน เนื่องจาก yeast extract นั้นมีอัตราส่วนที่ไม่แน่นอนและยังมีต้นทุนที่สูงกว่า ดังนั้นเพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตจึงได้เลือกใช้ $NaNH_4HPO_4.H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจน จากผลการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี $NaNH_4HPO_4.H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.1% และ เลซิติน 0.1% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส เพื่อเปรียบเทียบการเจริญ, ปริมาณโปรตีน และการสร้างไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C พบว่าจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะ 16 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นการเจริญจะเริ่มคงที่จนถึง 24 ชั่วโมง และจะเริ่มลดลงหลังจากนั้น , เชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 และไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น มีน้ำมันมะกอก 0.1% ให้ปริมาณโปรตีนสูงขึ้นตามลำดับและเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 16 มีปริมาณโปรตีน 4.79 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งเลซิติน 0.1% มีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะ 14 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นการเจริญจะเริ่มคงที่จนถึง 24 ชั่วโมง และจะเริ่มลดลงหลังจากนั้น ,มีปริมาณโปรตีน 4.84 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการสร้างไลเปสนั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น มีน้ำมันมะกอก 0.1% มีไลปสแอคติวิตี 5.89 ยูนิตต่อมิลลิลิตร(แอคติวิตีรวมเป็น 1,767 ยูนิต) ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งเลซิติน 0.1% มีไลปสแอคติวิตี 6.93 ยูนิตต่อมิลลิลิตร(แอคติวิตีรวมเป็น 2,079 ยูนิต) ซึ่งเชื้อ *Bacillus subtilis* สามารถเจริญและสร้างไลเปสได้ไม่แตกต่างกันมากทั้งในน้ำมันมะกอก 0.1% และเลซิติน 0.1 % แต่เมื่อได้ทำการปรับอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในรูปอิมัลชั่นแล้ว ผลการเจริญ, ปริมาณโปรตีน และไลเปสแอคติวิตี พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 และปรับเป็นอิมัลชั่น มีน้ำมันมะกอก

0.05% และ เลซิติน 0.05% มีไลปสแอคติวิตี 7.51 ยูนิตต่อมิลลิลิตร(แอคติวิตีรวมเป็น 2,253 ยูนิต) ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบผลการเจริญพบว่าไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนพบว่าสามารถสร้างโปรตีนได้มากกว่าถึง 2 เท่า ของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.1% และ เลซิติน 0.1% คือ มีปริมาณโปรตีน 8.98 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และผลการสร้างไลเปส ก็พบว่าสร้างได้สูงกว่าอาหารชนิดที่ไม่ได้ทำให้เป็นอิมัลชั่น 9 % ซึ่งอาจจะเนื่องมาจาก $NaNH_4HPO_4$. H_2O เป็นแหล่งอาหารที่ไม่เหมาะสมสำหรับการใช้ในการเจริญ และเมื่อเชื้อ *Bacillus subtilis* เจริญได้น้อยก็มีการผลิตไลเปสได้น้อยตามสัดส่วนของเชื้อไปด้วย และจากผลการทดลองปรับอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในรูปของอิมัลชั่นสามารถผลิตไลเปสได้สูงกว่า แบบที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่นถึง 60 % ซึ่งเป็นไปตามแนวคิดที่ข้างต้น คือ การเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำมันมะกอกกับเชื้อ *Bacillus subtilis* ซึ่งจะอยู่ในวัฏภาคของน้ำ จะทำให้เชื้อสร้างไลเปสได้สูงขึ้น ซึ่งในการทำให้น้ำมันแขวนลอยเป็นอนุภาคเล็กๆ อยู่ในน้ำโดยคงตัวได้ซึ่งทำให้อยู่ในรูปของอิมัลชั่น ได้มีการทดลองของ Khan และคณะ (1966) เลี้ยงเชื้อ *Achromobacter lipolytica* เพื่อผลิตไลเปส โดยได้เลี้ยงเชื้อ ที่ 21 ^{o}C นาน 36 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อเคซิโตนเหลว (casitone broth medium) ที่ pH 7.0 โดยรายงานว่าการเพิ่มการสร้างไลเปสนั้น ถ้ามีการเขย่าจะมีไลเปสเพิ่มมากขึ้นกว่าเดิมถึง 3 เท่าจากการเลี้ยงเชื้อแบบที่ไม่เขย่า และจากผลการทดลองนี้ Khan และคณะ สรุปว่าไลเปสที่เพิ่มขึ้นนั้น เกิดจากการเขย่าทำให้เชื้อสามารถสัมผัสกับน้ำมันต่างๆ ที่ใช้เติมลงไปเพื่อกระตุ้นการสร้างไลเปส และยังมีการทดลองที่ให้ผลสอดคล้องกัน โดย Kunio และคณะ (1994) ได้เลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* เพื่อผลิตไลเปส ซึ่งได้รายงานว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของแข็งจะให้ไลเปสเพียงเล็กน้อย (0.05-0.8 ยูนิต/ กรัม) แต่เมื่อทำการเลี้ยงในอาหาร (modified GYP medium) ชนิดที่เป็นของเหลว เติมน้ำมันถั่วเหลือง 3 % และเขย่าในระหว่างการเลี้ยง ให้ผลการสร้างไลเปสเพิ่มขึ้น (0.78 ยูนิต/ มิลลิลิตร) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองครั้งนี้ คือ การเพิ่มผิวสัมผัสระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อกับเชื้อนั้นมีผลต่อการเพิ่มการสร้างไลเปสจริง แต่ในการเพิ่มผิวสัมผัสโดยการเขย่านั้นเป็นเพียงการเพิ่มแบบชั่วคราว และไม่เสถียร ดังนั้นถ้ามีการปรับอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในรูปอิมัลชั่นจะมีความเสถียรมากกว่า และทำให้อนุภาคของน้ำมันกระจายตัวเป็นอนุภาคเล็กๆ ได้มากกว่าด้วย ในการทดลองนี้ยังทำให้ลดปริมาณของน้ำมันที่ใช้ในการสร้างไลปสแต่ยังให้ผลการสร้างไลเปสเพิ่มขึ้นอีก ซึ่งเป็นการลดต้นทุนในการผลิต

5.2. การทำไลเปสให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้วิธี aqueous two phase system โพลิเมอร์ กับ เกลือ (PEG กับ แอมโมเนียมซัลเฟต)

ในการทดลองตกตะกอนโปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยใช้วิธี aqueous two phase system และเลือกใช้แบบ โพลิเมอร์ กับเกลือ คือ PEG กับ แอมโมเนียมซัลเฟต ในอัตราส่วนต่าง ๆ จึงได้ทำการทดลองเพื่อเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมในการแยกน้ำเลี้ยงเชื้อออกออกเป็นสองวัฏภาค อัตราส่วนระหว่าง PEG ในปริมาณ 0-45 % กับสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต 5-25 % เมื่อทำการทดลองพบว่าเมื่อเติม PEG ในปริมาณที่สูง ก็จะต้องเติมแอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณที่ต่ำ และในทางตรงกันข้ามถ้าเติม PEG ในปริมาณที่ต่ำ ก็จะต้องเติมแอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณที่สูง จึงจะเกิดเป็น สองวัฏภาคได้ เมื่อทำการทดลองแล้วจึงได้เลือกอัตราส่วนระหว่าง PEG กับ สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต ในอัตราส่วนดังนี้ PEG : $(NH_4)_2SO_4$: น้ำเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 35.00 : 6.00 : 59.00 สามารถตกตะกอนไลเปสได้แอคติวิตีเท่ากับ 13.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (แอคติวิตีทั้งหมด 926 ยูนิต) เพิ่ม specific activity 28 เท่า ,ในอัตราส่วน PEG : $(NH_4)_2SO_4$: น้ำเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 20.81 : 8.40 : 70.79 สามารถตกตะกอนไลเปสได้ แอคติวิตีเท่ากับ 9.6 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (แอคติวิตี ทั้งหมด 676 ยูนิต) เพิ่ม specific activity 20 เท่า และในอัตราส่วน PEG : $(NH_4)_2SO_4$: น้ำเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 6.01: 12.78 : 81.21 สามารถตกตะกอนไลเปสได้แอคติวิตีเท่ากับ 9.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (แอคติวิตีทั้งหมด 662 ยูนิต) เพิ่ม specific activity 18 เท่า จากผลการทดลองข้างต้นนี้ พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมในการใช้ตกตะกอน ไลเปสนั้นควรจะเป็น อัตราส่วนที่ PEG : $(NH_4)_2SO_4$: น้ำเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 35.00 : 6.00 : 59.00 ซึ่งจากผลการทดลองนี้ก็เป็นไปตามทฤษฎีที่ว่า เมื่อเติม PEG ลงไปในปริมาณที่มากกว่าก็จะทำให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีนในชั้นของ PEG ซึ่งเป็นไปตาม Hustedt (1985) เนื่องจากโปรตีนเป็น hydrophobic จึงถูกสกัดอยู่ในชั้นของ PEG ซึ่งในทางตรงกันข้ามถ้าเติมเกลือลงไปในปริมาณมากจะทำให้เกิดการกลับของวัฏภาค ทำให้โปรตีนตกลงไปอยู่ในวัฏภาคของเกลือมากขึ้น ในการศึกษาส่วนมากใช้ PEG / dextran systems ในขณะที่การผลิตขนาดใหญ่ใช้ PEG / salt system และพบว่ามีประโยชน์ในการแยกเอนไซม์ออกจากเซลล์ (Hustedt และคณะ, 1985) เมื่อเร็ว ๆ นี้มีการพัฒนาและนำมาปรับปรุงเพื่อแยกไลเปส (Menge and Schmid, 1989) โดยแยกไลเปสจาก *Mucor miehei* โดยใช้ PEG และ phosphate โดยมีตัวแปร 3 ชนิด คือ น้ำหนักโมเลกุลของ PEG , ความเข้มข้นของ phosphate และ PEG (มีผลคือความยาวที่แตกต่างกันของ tie-line) , pH PEG ที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำ และมีรูปแบบ tie line ที่ยาวกว่า จะแยกไลเปสจาก *Mucor miehei* อยู่ในวัฏภาคส่วนบนจากโปรตีนทั้งหมดและสามารถแยกบริสุทธิ์ไลเปสได้ 69 % และได้ผลผลิตมาก

กว่า 80 % ภายในเวลา 1 ชั่วโมง Queiroz และคณะ (1991) ใช้ aqueous two phase polymer เลือก PEG กับโปแตสเซียมฟอสเฟต เพื่อทำบริสุทธิ์บางส่วนของไลเปสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *Chromobacterium viscosum* พบไลเปสทั้งสองชนิด คือ lipase A และ lipase B โดยมีมวลโมเลกุล 120,000 และ 30,000 ตามลำดับ มีค่า pI 3.7 และ 7.3 ตามลำดับ ไลเปสทั้งสองชนิดถูกแยกอยู่ในส่วน PEG (low density phase) เนื่องจากเกิดพันธะไฮโดรโฟบิก กับกลุ่มเอทธิลลีนของโพลีเมอร์ ผลของน้ำหนักโมเลกุลของ PEG, pH, ionic strength และ ชนิดของเกลือที่เติมไปในระบบ ทำให้เกิดผลต่อปริมาณโปรตีนที่ได้จากการสกัด น้ำหนักโมเลกุลของ PEG ที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ได้โปรตีนลดลง รวมทั้งแอคติวิตี และ purification factor ส่วนอิทธิพลของ pH จะให้ purification factor จาก 1.9 เป็น 2.4 เมื่อเพิ่ม pH จาก 6.3 เป็น 8.5 ที่ pH 8.5 ทำให้ไลเปสทั้งสองชนิดเป็นขั้ว ลบ จึงทำให้ละลายเพิ่มขึ้นในชั้น PEG จากการทดลองในครั้งนี้ พบว่าแยกบริสุทธิ์ไลเปสได้ 2.8 เท่า และได้ 50 % จากโปรตีนทั้งหมดโดยเติม NaCl 0.5 M ต่อมา Queiroz และคณะ (1995) ได้ทำการค้นคว้าต่อไปโดยทดลองใช้ PEG ที่หลากหลาย และพบว่าสภาวะที่ดีที่สุด ในการทดลองนี้ คือ ใช้ PEG 400 ที่ pH 8.5 และ NaCl 0.25 M จะทำให้เพิ่ม specific activity ได้ 3 เท่า และวัด lipolytic activity เท่ากับ 146 % เมื่อทำการหาน้ำหนักโมเลกุลของไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* ได้ คือ 79 กิโลดาลตัน โดยเทียบกับสารมาตราฐาน (BIO-RAD) วิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

ความต้องการไลเปสในปัจจุบันมีเพิ่มมากขึ้นทางภาคอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ในอุตสาหกรรมทางอาหารใช้บ่มเนยแข็ง, หมักแตงกวา, กะหล่ำปลี และผักต่างๆ, การถนอมอาหารประเภทเนื้อ, ใช้ย่อยไขมันส่วนเกินออกจากอาหารประเภทปลา, ปรับปรุงกลิ่นและรสชาติของอาหารให้มีลักษณะเฉพาะตัวเพื่อเป็นที่นิยมของผู้บริโภคมากขึ้น, เพิ่มอายุของเครื่องดื่มทำให้สามารถเก็บไว้ได้นานขึ้นทำให้มีประโยชน์ต่อสินค้าประเภทอาหารที่ส่งออกต่างประเทศ, ในอาหารสุขภาพที่เป็นที่นิยมอยู่ในขณะนี้จะมีการนำไลเปสมาใช้ในกระบวนการทรานเอสเทอริฟิเคชั่นเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ตัวใหม่ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพมากขึ้น, ไลเปสยังช่วยแยกไขมันออกจากอาหารประเภทเนื้อสัตว์ต่างๆ ทำให้มีคุณภาพที่ดีขึ้น, ในกระบวนการทางเคมียังมีการใช้ไลเปสเพื่อสังเคราะห์สารเคมีต่างๆ . ในอุตสาหกรรมทางเวชภัณฑ์และเครื่องสำอาง ใช้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์สสารต่างที่ใช้ในการทำครีมและอิมัลซิฟายเออร์ต่างๆ ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการทำเครื่องสำอาง เป็นยาช่วยย่อยและผลิตไขมันที่จำเพาะบางชนิด, ได้มีการเติมไลเปสลงในน้ำยาดัดผมเพื่อให้ผมดัดคงอยู่ได้นานถาวรยิ่งขึ้น และเติมลงในยาทาเฉพาะที่สำหรับบาดแผล โดยผสมร่วมกับไฮยาลูโรนิเดส และไธโอมิวเคส และยังเป็นส่วนผสมในอุตสาหกรรมอื่น เช่น อุตสาหกรรมกระดาษ เครื่องหนัง

และผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด และยังเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในอุตสาหกรรมการบำบัดน้ำเสีย ซึ่งเป็นปัญหากับสิ่งแวดล้อมที่ทั่วโลกต้องเผชิญอยู่ และจากผลการทดลองเพื่อสร้างไลเปสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยใช้น้ำมันมะกอกเป็นตัวกระตุ้นการสร้างไลเปส และ ใช้เลซิตินเป็นสารลดแรงตึงผิว เนื่องจากเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติและยังมีราคาถูก (ชนิดมีความบริสุทธิ์ต่ำ) ซึ่งเมื่อเชื้อสัมผัสกับน้ำมันได้มากขึ้น ก็ผลิตไลเปสได้มากขึ้นเช่นกัน และจากผลการทดลองนี้เองได้ทำให้พบว่าไม่จำเป็นต่องมีการเติมน้ำมันมะกอกซึ่งเป็นตัวกระตุ้นการสร้างไลเปสให้มากเกินไป เพียงแต่เพิ่มผิวสัมผัสของน้ำมันกับเชื้อ *Bacillus subtilis* ก็สามารถทำให้ผลิตไลเปสได้มากขึ้นได้ ซึ่งเป็นการลดต้นทุนในการผลิต ส่วนในขั้นตอนการทำไลเปสให้บริสุทธิ์บางส่วนนั้น ได้เลือกใช้วิธี aqueous two phase systems เนื่องจากวิธีในการทำไลเปสให้บริสุทธิ์มีหลายวิธี แต่มีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน ซึ่งวิธี aqueous two phase systems นั้นจะแยกไลเปสให้บริสุทธิ์บางส่วนเท่านั้น แต่ก็สามารถแยกได้ดีในระดับหนึ่ง จึงเป็นวิธีที่นิยมใช้แยกเอนไซม์ชนิดต่างๆ มีขั้นตอนการทำที่สะดวกและไม่ซับซ้อน ไม่ต้องใช้เครื่องมือหรืออุปกรณ์ที่เฉพาะ และที่สำคัญมีราคาต้นทุนที่ต่ำ , และยังสามารถแยกสารมาทำปฏิกิริยาได้ใหม่อีก จึงเหมาะในการใช้ผลิตไลเปสเพื่อนำเข้าสู่อุตสาหกรรมต่างๆ ที่ไม่ต้องการความบริสุทธิ์ของไลเปสสูงๆ แต่มีความต้องการไลเปสเพื่อใช้ในงานอุตสาหกรรม เช่น ในอุตสาหกรรมผลิตผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด อุตสาหกรรมการบำบัดน้ำเสีย ซึ่งไลเปสที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* สามารถทำงานได้ดีใน pH 4.8 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถใช้ได้กับอุตสาหกรรมการบำบัดน้ำเสียได้ดี โดยไม่ต้องปรับสภาวะให้เหมาะสมอีกครั้ง สามารถช่วยลดต้นทุนในอุตสาหกรรมต่างๆ เหล่านี้ได้ เชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติและถ้าหากมีการนำมาปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อทำให้สร้างไลเปสได้มากขึ้น และยังอาจจะสามารถสร้างเอนไซม์ตัวอื่นได้อีกที่มีความสำคัญทางเทคโนโลยี ดังนั้นเชื้อ *Bacillus subtilis* จึงเป็นเชื้อ แบคทีเรียที่มีความน่าสนใจที่จะนำมาพัฒนาต่อไป