บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1. ผลการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ,ปริมาณโปรตีน และ ไลเปสแอคติวิตี

4.1.1. การเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis*

จากผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *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

4.1.2. ปริมาณโปรตีนของเชื้อ *Bacillus subtilis*

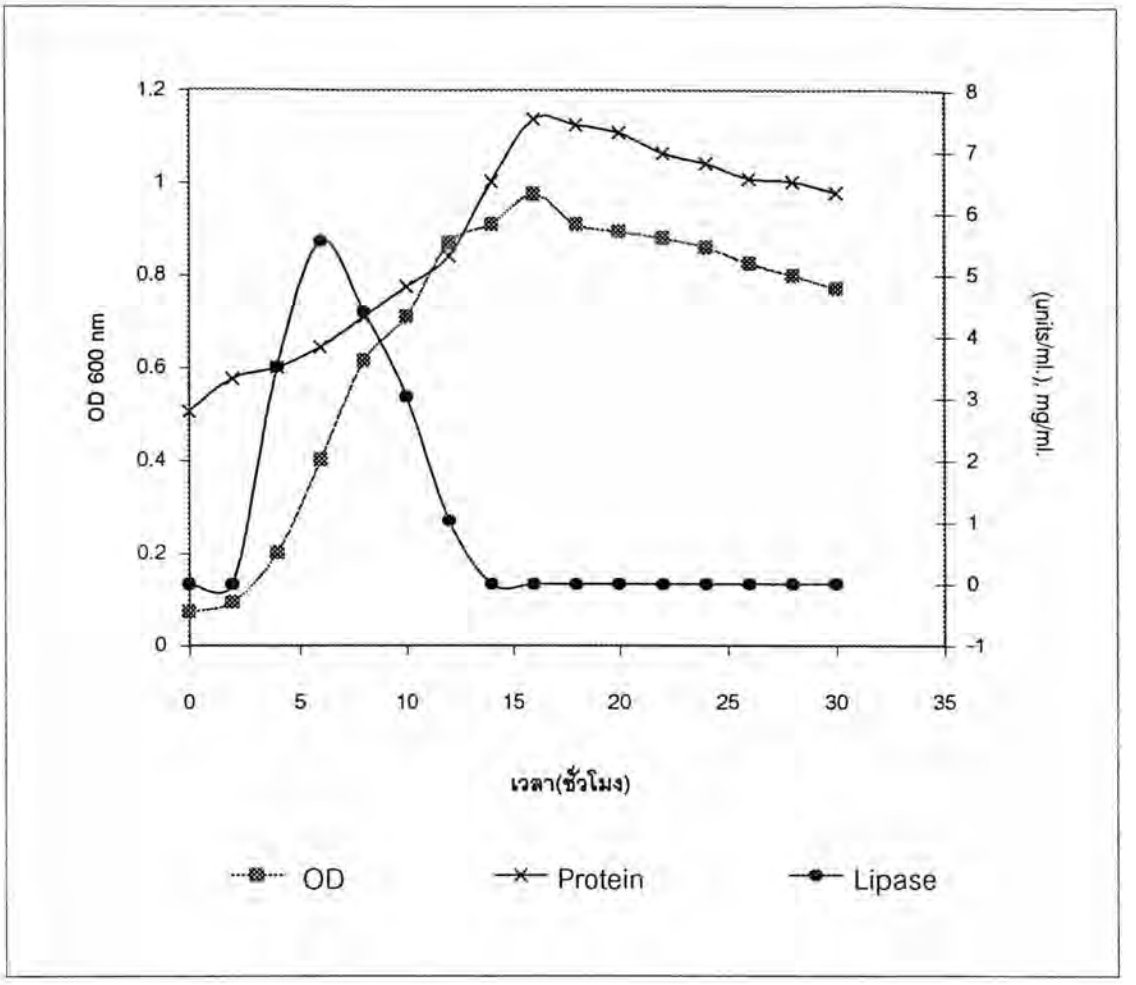
จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* และเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ โดยจะเริ่มสูงขึ้นตามการเจริญของเชื้อในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ (Logarithmic phase) และเริ่มมีปริมาณโปรตีนคงที่เมื่อเชื้อ *Bacillus subtilis* เจริญถึงช่วงการเจริญแบบคงที่ (stationary phase) โปรตีนที่เชื้อ *Bacillus subtilis* สร้างนั้นติดตามโดยวิธี ไบยูเร็ต และเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตราฐาน (Bovine serum albumin Standard Solution) ที่ OD ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

4.1.3. ไลเปสแอคติวิตีจากเชื้อ *Bacillus subtilis*

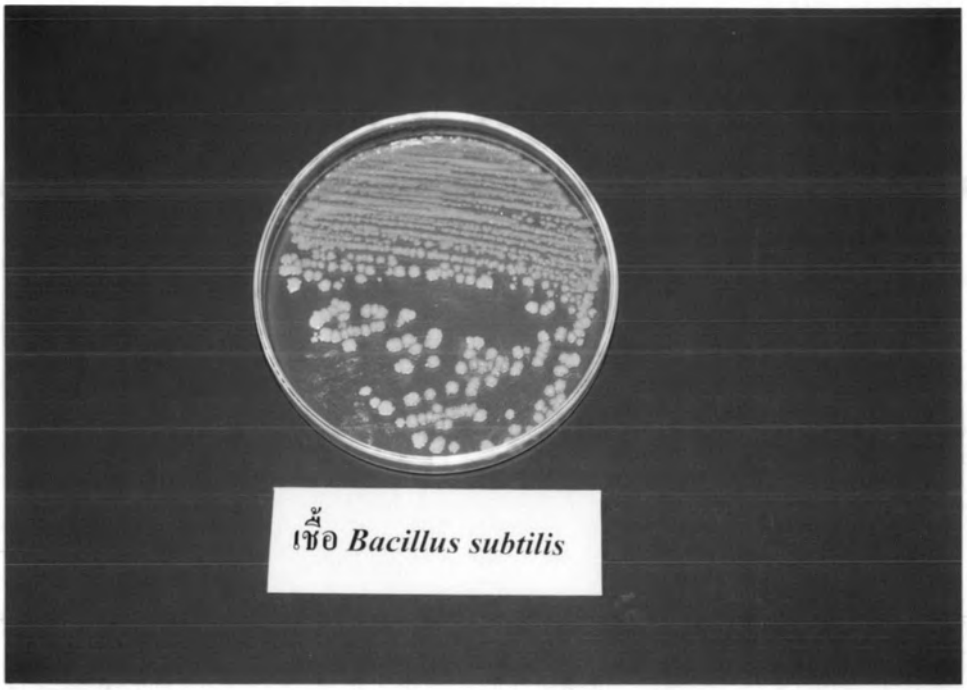
ในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อให้เชื้อมีการสร้างไลเปส จะต้องใช้ 0.1 % น้ำมันมะกอกเพื่อเป็นตัวกระตุ้นการสร้างไลเปส และเมื่อทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* นั้นพบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* สามารถสร้างไลเปสได้สัมพันธ์กับการเจริญในช่วงการเจริญแบบทวีคูณ (logarithmic phase) เชื้อ *Bacillus subtilis* สร้างไลเปสได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยใช้ 1% อิมัลชั่นของน้ำมันมะกอกเป็นซับสเตรท ถูกย่อยด้วยไลเปสจากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ที่ pH 4.8 บ่มเป็นเวลา 30 นาที ที่ 45^{o}ซ หยุดปฏิกิริยาด้วย 95% เอธานอล ไตเตรทกรดไขมันอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาด้วย สารละลายมาตราฐาน โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.025 นอร์มอล โดยใช้ฟีนอล์พทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ และคำนวณปฏิกิริยาของ เอนไซม์เป็นหน่วยของเอนไซม์ โดยเทียบกับสารอิมัลชั่นของกรดโอลิอิก

มาตราฐานกำหนดให้หนึ่งหน่วยของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถไฮโดรไลส์ไขมันแล้วได้กรดอิสระ 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 30 นาที ที่ 45°ซ pH 4.8 และแสดงประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เป็นหน่วยต่อ มิลลิลิตรของสารละลายเอนไซม์

ได้แสดงผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้น และไลเปสแอคติวิตีที่สร้างขึ้น ในภาพที่ 8



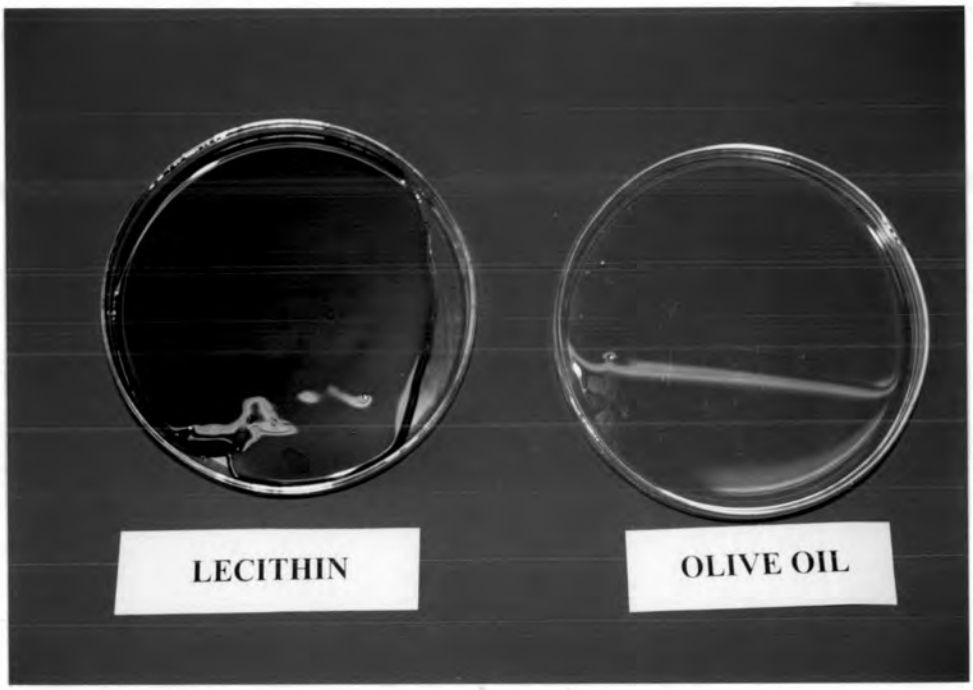
ภาพที่ 8 เปรียบเทียบการเจริญ ,ปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของไลเปส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 โดย เติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C



ภาพที่ 9 แสดงเชื้อ *Bacillus subtilis*

4.2. ผลการทดลองปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อให้สร้างไลเปสได้สูงสุด

ในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อให้สร้างไลเปสนั้นมีปัจจัยต่างๆ มากมายที่เกี่ยวข้องและปัจจัยที่สำคัญ เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีส่วนประกอบที่สำคัญ คือ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ชนิดของไตรกลีเซอไรด์ แคลเซียมไอออน ไอออนของโลหะ ความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ และ อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น และในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อให้สร้างไลเปสนั้นจำเป็นจะต้องมีการเติมน้ำมันเพื่อเป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส เชื้อจะสามารถใช้น้ำมันได้ก็จำเป็นต้องมีการสร้างไลเปส และในการทดลองนี้ได้เลือกใช้ น้ำมันมะกอกเป็นตัวกระตุ้น ดังนั้นเชื้อจะสัมผัสกับน้ำมันได้เท่าใดเชื้อก็จะสร้างไลเปสได้เป็นสัดส่วนตามกันเท่านั้น และในการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้สร้างไลเปสได้สูงขึ้นนั้น ได้มีแนวความคิดที่ว่า ถ้าเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำมันมะกอกกับเชื้อ *Bacillus subtilis* ซึ่งจะอยู่ในวัฏภาคของน้ำ ก็น่าจะทำให้เชื้อสร้างไลเปสได้สูงขึ้น ซึ่งในการทำให้น้ำมันแขวนลอยเป็นอนุภาคเล็กๆ อยู่ในน้ำโดยคงตัวได้ ซึ่งทำให้อยู่ในรูปของอิมัลชั่น แต่ถ้าต้องการให้อนุภาคมีขนาดเล็กมากๆ จนเป็นเนื้อเดียวกันและมีความคงตัวสูงก็จะอยู่ในรูปของไมโครอิมัลชั่น และในการทดลองนี้ได้ทดลองปรับอาหารเลี้ยงเชื้อ และใช้น้ำมันมะกอกเป็นตัวกระตุ้นให้เชื้อสร้างไลเปส โดยได้ ทดลองใช้ nonyl phenol 9, nonyl phenol 13, nonyl phenol 15, nonyl phenol 40, tween 80 และ triton x-100 เป็นสารลดแรงตึงผิว แต่จากผลการทดลองนี้พบว่าไม่สามารถปรับอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในสภาพที่เป็นไมโครอิมัลชั่นได้ ดังนั้นจึงได้ปรับอาหารเลี้ยงให้อยู่ในรูปของอิมัลชั่นแทน และได้เลือกใช้เลซิตินเป็นสารลดแรงตึงผิว ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ได้จากธรรมชาติ ในการทดลองนี้สามารถปรับให้อยู่ในรูปของอิมัลชั่นได้ จึงได้ทำการทดลองเพื่อหาสัดส่วนที่เหมาะสมของเลซิตินและน้ำมันมะกอกในการปรับอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้สร้างไลเปสได้สูงสุด



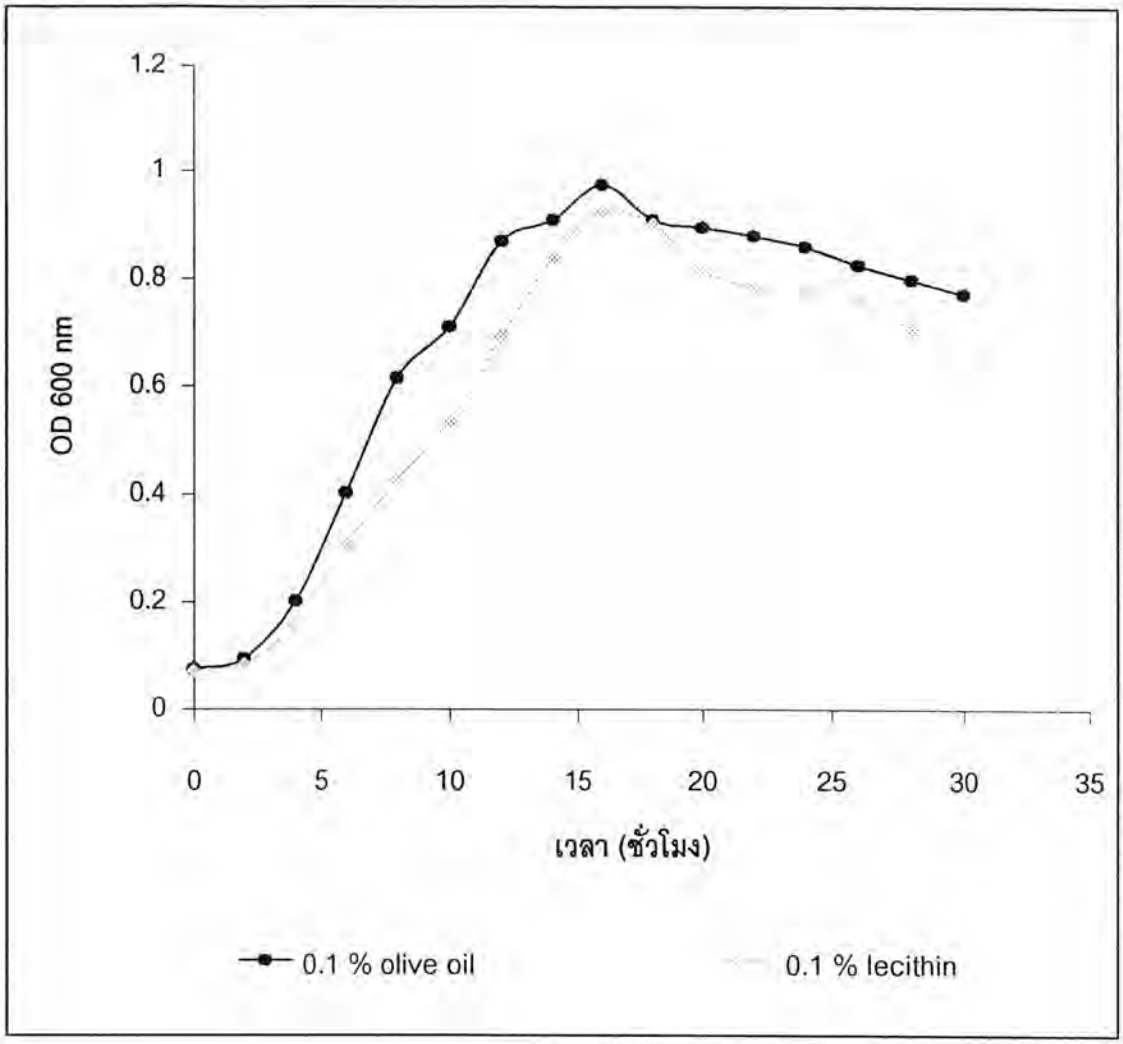
ภาพที่ 10 แสดงเลซิตินและน้ำมันมะกอกที่ใช้เป็นตัวกระตุ้นให้เชื้อ *Bacillus subtilis* สร้างไลเปส

4.3. ผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ที่ให้การสร้างไลเปสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ได้สูงสุด

4.3.1. ผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

4.3.1.1. ผลเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

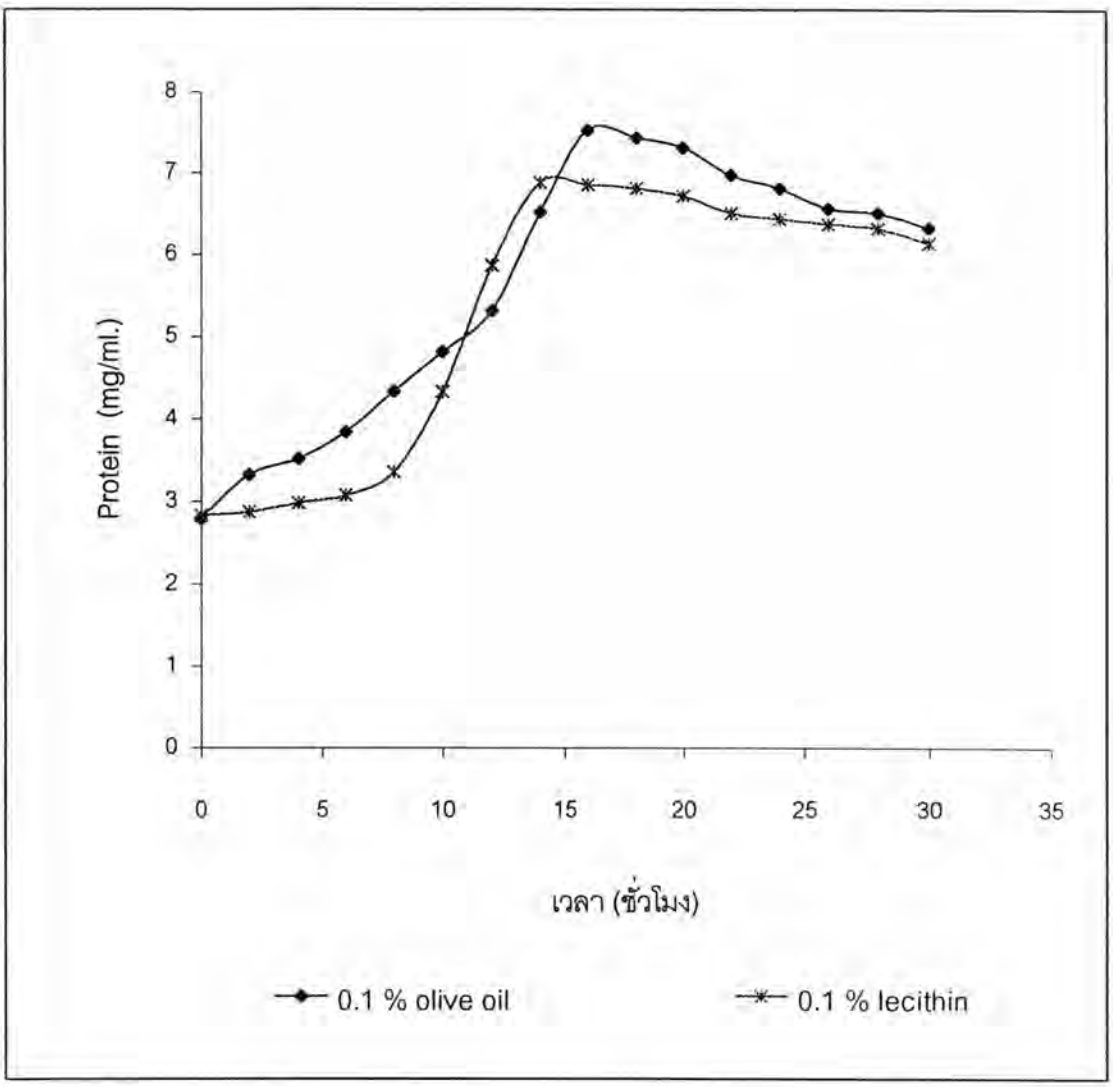
ในการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.1% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{0}C พบว่าจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะ 16 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นการเจริญจะเริ่มคงที่จนถึง 24 ชั่วโมง และจะเริ่มลดลงหลังจากนั้น โดยวัดการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* จาก OD_{600} ส่วนผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.1% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{0}C พบว่าจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะ 16 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นการเจริญจะเริ่มคงที่จนถึง 24 ชั่วโมง และจะเริ่มลดลงหลังจากนั้น โดยวัดการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* จาก OD_{600} เชื้อ *Bacillus subtilis* สามารถเจริญได้เหมือนกันในทั้งน้ำมันมะกอก 0.1% และเลซิติน 0.1 % ดังภาพที่ 11



ภาพที่ 11 แสดงการเจริญ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 โดย เติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และเลซิติน 0.1 % ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่นให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C โดยวัดการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* จาก OD_{600}

4.3.1.2. ผลปริมาณโปรตีนของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

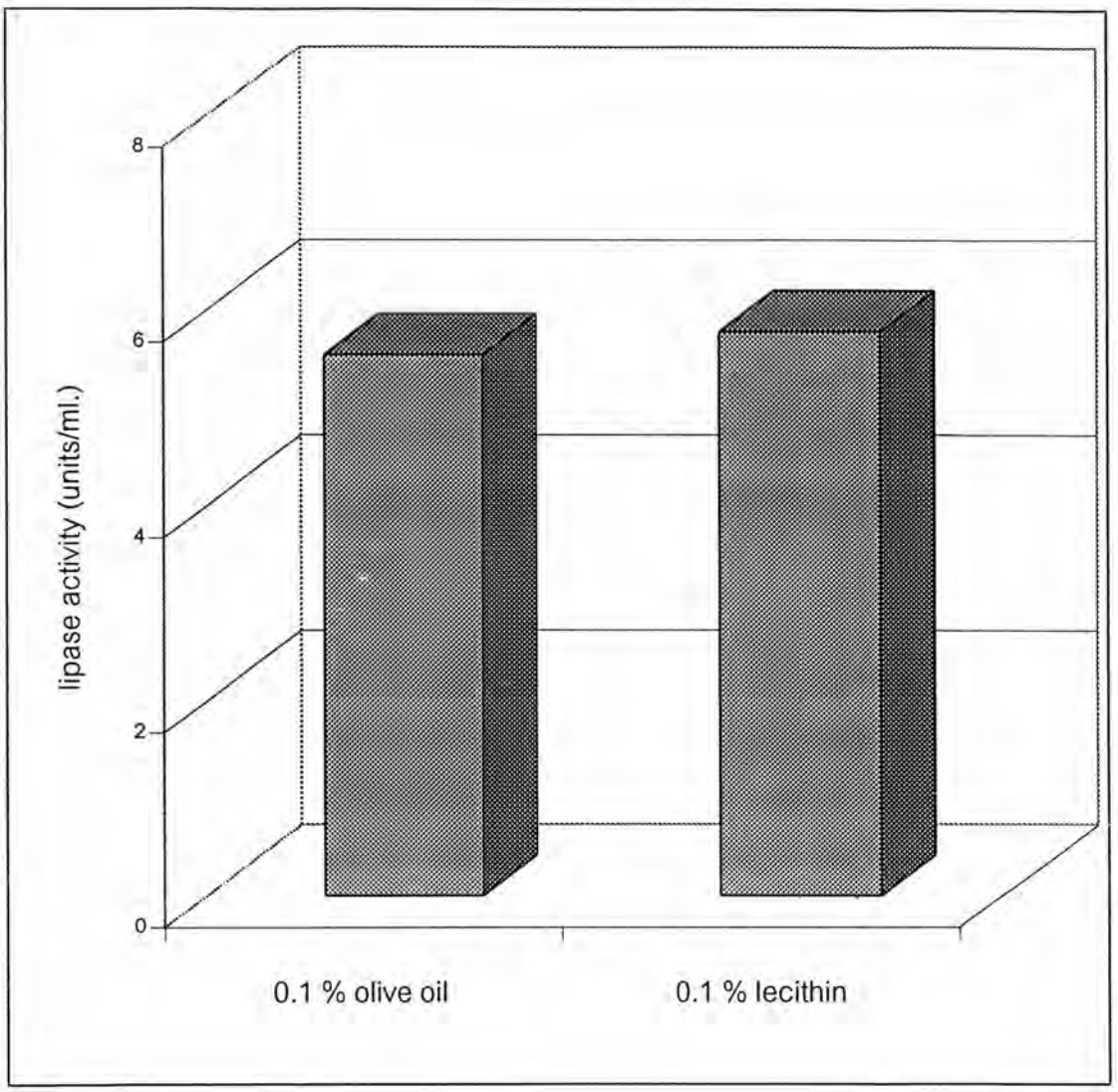
จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.1% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นตามลำดับและเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 16 มีปริมาณโปรตีน 7.53 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไบยูเร็ต มี bovine serum albumin ที่รู้ความเข้มข้นเป็นสารมาตราฐาน เทียบค่า OD_{540} ส่วนผลการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งเลซิติน 0.1% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นตามลำดับและเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 14 มีปริมาณโปรตีน 6.88 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไบยูเร็ต มี bovine serum albumin ที่รู้ความเข้มข้นเป็นสารมาตราฐาน เทียบค่า OD_{540} ดังภาพที่ 12



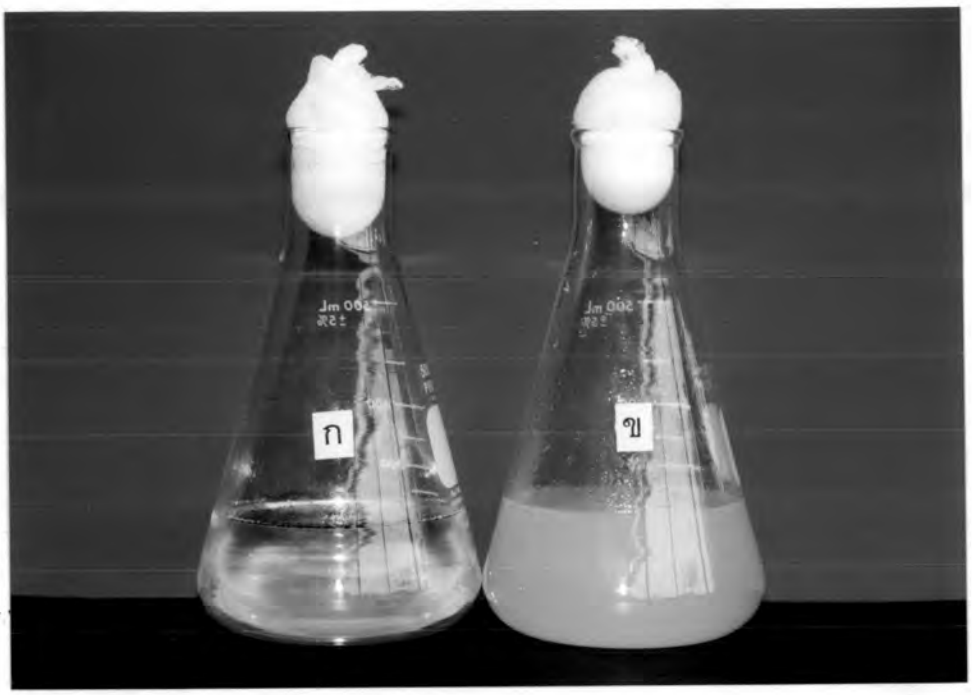
ภาพที่ 12 แสดง ปริมาณโปรตีน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 โดย เติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และ เลซิติน 0.1% ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่นให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{0}C วัดปริมาณโปรตีน โดยวิธีไบยูเร็ต มี bovine serum albumin ที่รู้ความเข้มข้นเป็นสารมาตราฐาน เทียบค่า OD_{540}

4.3.1.3. ผลการสร้างไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.1% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะเริ่มพบไลเปสตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 และพบเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 6 วัดไลเปสแอคติวิตี 5.55 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปส ด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และคำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับสารมาตราฐานโอลิอิก ได้ค่า total activity ได้เท่ากับ 1,665 ยูนิต ส่วนในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.1% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะเริ่มพบไลเปสตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 และพบเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 6 วัดไลเปส แอคติวิตี 5.79 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปส ด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และคำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับ สารมาตราฐานโอลิอิก ได้ค่า total activity ได้เท่ากับ 1,737 ยูนิต จะเห็นได้ว่าสูตรอาหารทั้งสองที่มีแหล่งน้ำมันแตกต่างกันจะให้ผลการสร้างไลเปสแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังภาพที่ 13 และตารางที่ 3



ภาพที่ 13 แสดงแอคติวิตีของไลเปส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 โดย เติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และ เลซิติน 0.1% ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่นให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C วัดแอคติวิตีของไลเปสโดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปส ด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และคำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับสารมาตราฐานโอลิอิก



ภาพที่ 14 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ก.) มีน้ำมันมะกอก 0.1 % ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ข.) มีเลซิติน 0.1 % ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ภาพที่ 15 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่นให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C

ก.) มีน้ำมันมะกอก 0.1 % ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ข.) มีเลซิติน 0.1 % ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

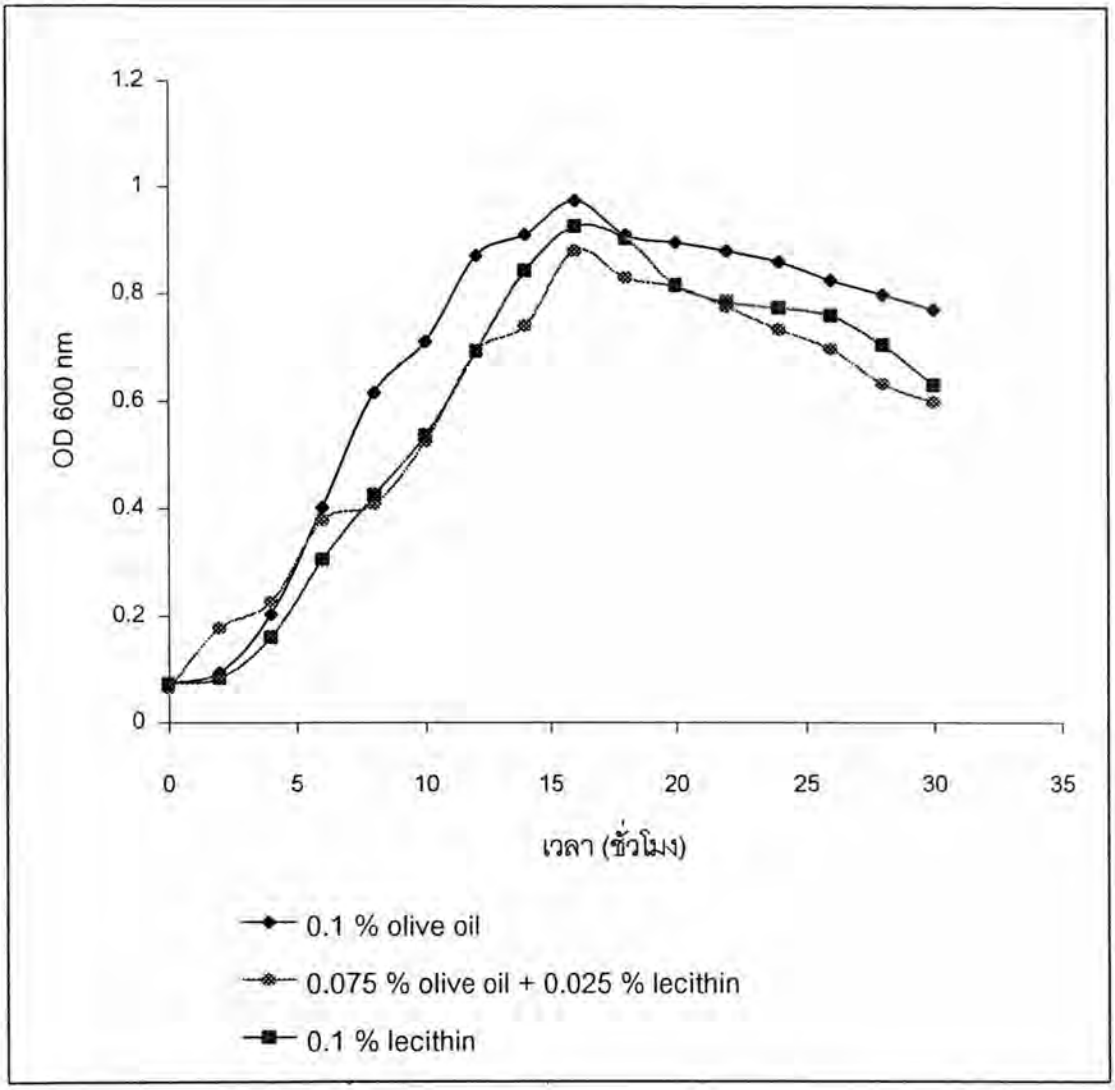
ตารางที่ 3 แสดงไลเปสแอคติวิตี และ Total activity ของไลเปส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 โดย เติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และ เลซิติน 0.1% และไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* อุณหภูมิ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 , pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที วัดไลเปสแอคติวิตี โดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปส ด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ คำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับสารมาตราฐานโอลิอิก และคิดค่า total activity จากส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาณ 300 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6

อาหารเลี้ยงเชื้อ	Lipase activity (units/ml.)	Total Activitity (units)
อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 ที่มีน้ำมันมะกอก 0.1 % ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น	5.55	1,665
อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 ที่มีเลซิติน 0.1 % ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น	5.79	1,737

4.3.2. ผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่นและปรับเป็นอิมัลชั่น

4.3.2.1. ผลเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่นและปรับเป็นอิมัลชั่น

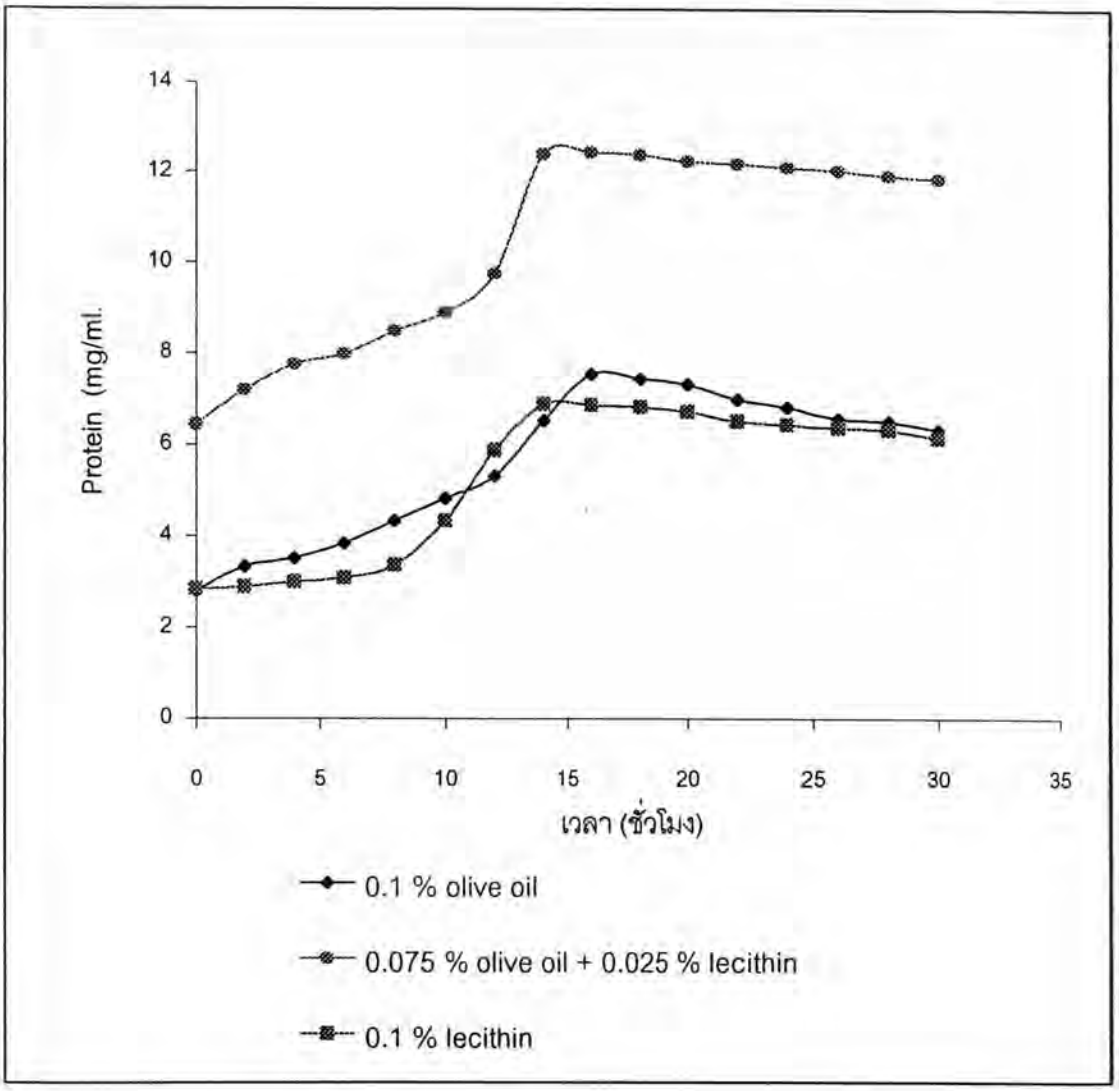
ในการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.1% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{0}C พบว่าจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะ 16 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นการเจริญจะเริ่มคงที่จนถึง 24 ชั่วโมง และจะเริ่มลดลงหลังจากนั้น โดยวัดการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* จาก OD_{600} ส่วนผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.1% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้าง ไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{0}C พบว่าจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะ 16 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นการเจริญจะเริ่มคงที่จนถึง 24 ชั่วโมง และจะเริ่มลดลงหลังจากนั้น โดยวัดการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* จาก OD_{600} และผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.025 % และ น้ำมันมะกอก 0.075 % เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{0}C พบว่าจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะ 16 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นการเจริญจะเริ่มคงที่จนถึง 24 ชั่วโมง และจะเริ่มลดลงหลังจากนั้น โดยวัดการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* จาก OD_{600} ดังภาพที่ 16



ภาพที่ 16 แสดงการเจริญ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 โดย เติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และเลซิติน 0.1 % ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น และ ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.025 % และ น้ำมันมะกอก 0.075 % ให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C โดยวัดการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* จาก OD_{600}

4.3.2.2. ผลปริมาณโปรตีนของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่นและปรับเป็นอิมัลชั่น

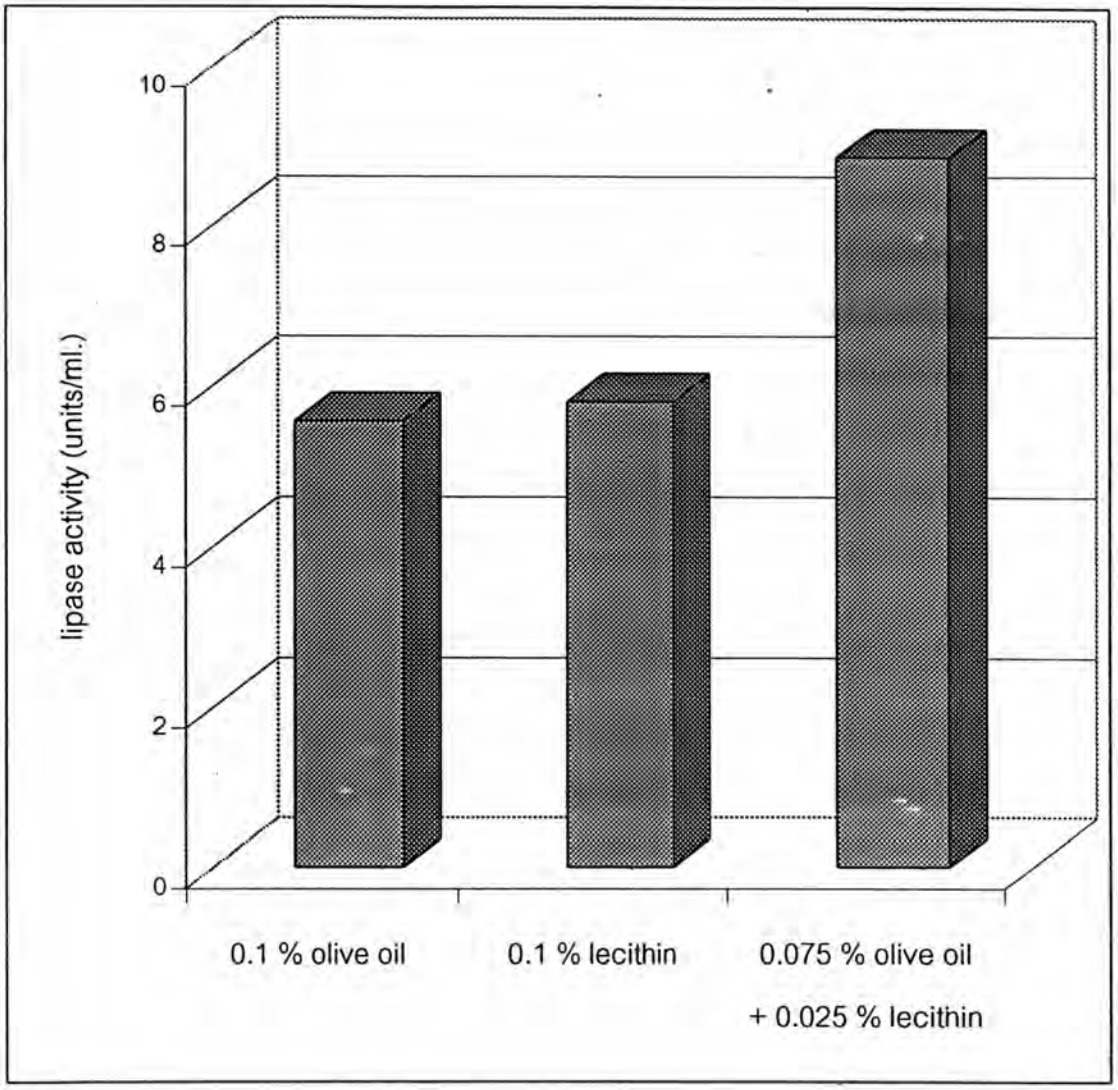
จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.1% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นตามลำดับและเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 16 มีปริมาณโปรตีน 7.53 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไบยูเร็ต มี bovine serum albumin ที่รู้ความเข้มข้นเป็นสารมาตราฐานเทียบค่า OD_{540} ส่วนผลการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งเลซิติน 0.1% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นตามลำดับและเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 14 มีปริมาณโปรตีน 6.88 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไบยูเร็ต มี bovine serum albumin ที่รู้ความเข้มข้นเป็นสารมาตราฐานเทียบค่า OD_{540} และผลการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งเลซิติน 0.025% และน้ำมันมะกอก 0.075% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นตามลำดับและเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 16 มีปริมาณโปรตีน 12.43 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไบยูเร็ต มี bovine serum albumin ที่รู้ความเข้มข้นเป็นสารมาตราฐานเทียบค่า OD_{540} ดังภาพที่ 17



ภาพที่ 17 แสดงปริมาณโปรตีน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 โดย เติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และเลซิติน 0.1 % ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น และที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.025 % และ น้ำมันมะกอก 0.075 % ให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C วัดปริมาณโปรตีน โดยวิธีไบยูเร็ต มี bovine serum albumin ที่รู้ความเข้มข้นเป็นสารมาตราฐาน เทียบค่า OD_{540}

4.3.2.3. ผลการสร้างไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่นและปรับเป็นอิมัลชั่น

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.1% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะเริ่มพบไลเปสตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 และพบเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 6 วัดไลเปสแอคติวิตี 5.55 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปส ด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และคำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับสารมาตราฐานโอลิอิก ได้ค่า total activity ได้เท่ากับ 1,665 ยูนิต ส่วนในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.1% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะเริ่มพบไลเปสตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 และพบเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 6 วัดไลเปสแอคติวิตี 5.79 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปส ด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และคำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับสารมาตราฐานโอลิอิก ได้ค่า total activity ได้เท่ากับ 1,737 ยูนิต และในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.025% และน้ำมันมะกอก0.075% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะเริ่มพบไลเปสตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 และพบเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 6 วัดไลเปสแอคติวิตี 8.86 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปส ด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และคำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับสารมาตราฐานโอลิอิก ได้ค่า total activity ได้เท่ากับ 2,658 ยูนิต ดังภาพที่ 18 และตารางที่ 4



ภาพที่ 18 แสดงแอคติวิตีของไลเปส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 โดย เติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และ เลซิติน 0.1% ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่นและที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.025 % และ น้ำมันมะกอก 0.075 % ให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C วัดแอคติวิตีของไลเปสโดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปส ด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และคำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับสารมาตราฐานโอลิอิก

ภาพที่ 19 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่นและที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.025 % และ น้ำมันมะกอก 0.075 %

ก.) มีน้ำมันมะกอก 0.1 % ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ข.) มีเลซิติน 0.1 % ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ค.) มีเลซิติน 0.025 % และ น้ำมันมะกอก 0.075 % ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ภาพที่ 20 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่นให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C

ก.) มีน้ำมันมะกอก 0.1 % ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ข.) มีเลซิติน 0.1 % ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ค.) มีเลซิติน 0.025 % และ น้ำมันมะกอก 0.075 % ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น

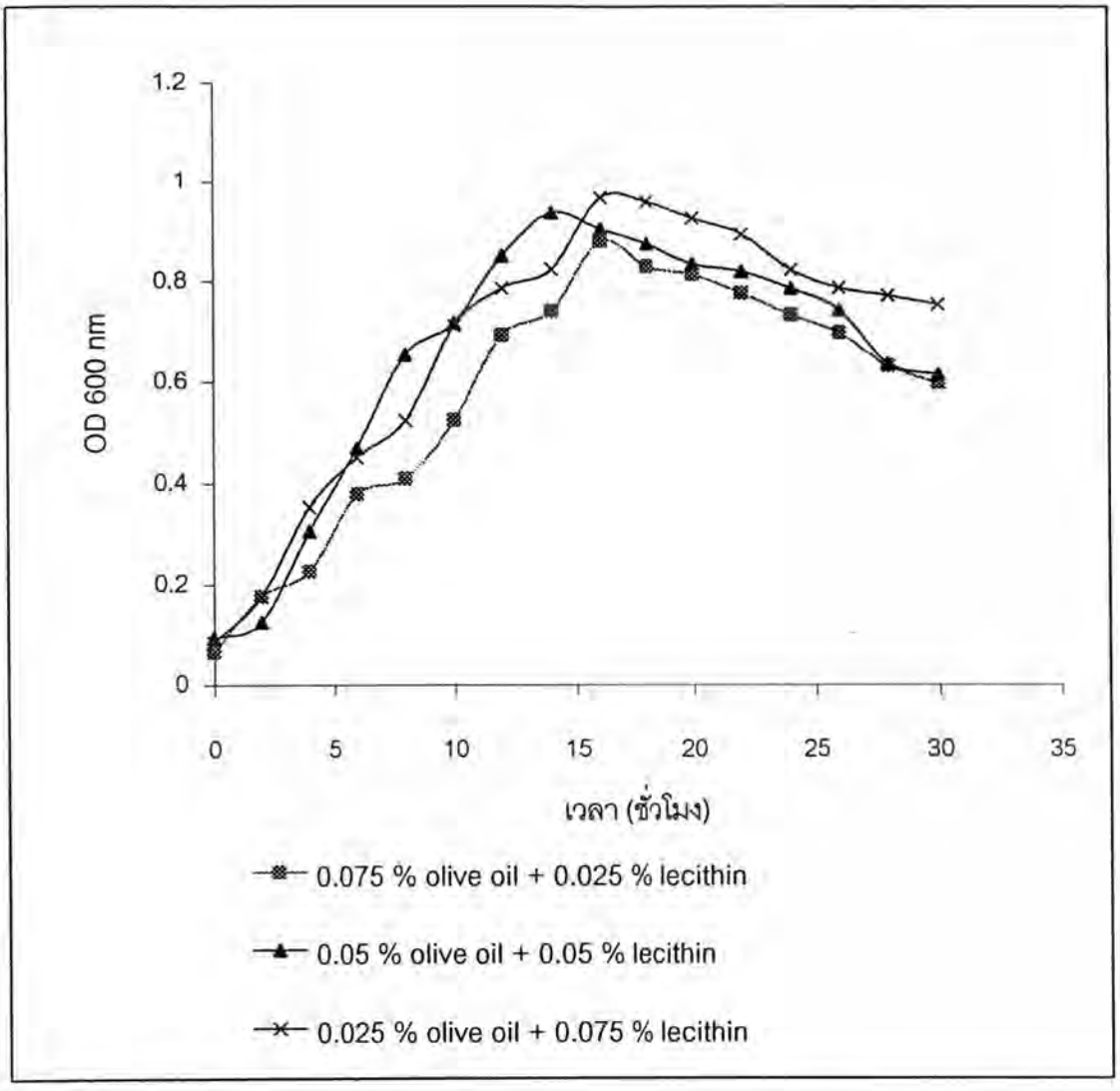
ตารางที่ 4 แสดงไลเปสแอคติวิตี และ Total activity ของไลเปส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 โดย เติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และ เลซิติน 0.1% ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น และที่ปรับเป็นอิมัลชั่นมีเลซิติน 0.025 % และ น้ำมันมะกอก 0.075 % เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* อุณหภูมิ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 , pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที วัดไลเปสแอคติวิตี โดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปส ด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ คำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับสารมาตราฐานโอลิอิก และ คิดค่า total activity จากส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาณ 300 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6

อาหารเลี้ยงเชื้อ	Lipase activity (units/ml.)	Total Activitity (units)
อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 ที่มีน้ำมันมะกอก 0.1 % ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น	5.55	1,665
อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 ที่มีเลซิติน 0.1 % ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น	5.79	1,737
อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 ที่มีน้ำมันมะกอก 0.075 % และ เลซิติน 0.025 % ปรับเป็นอิมัลชั่น	8.86	2,658

4.3.3. ผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น

4.3.3.1. ผลเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น

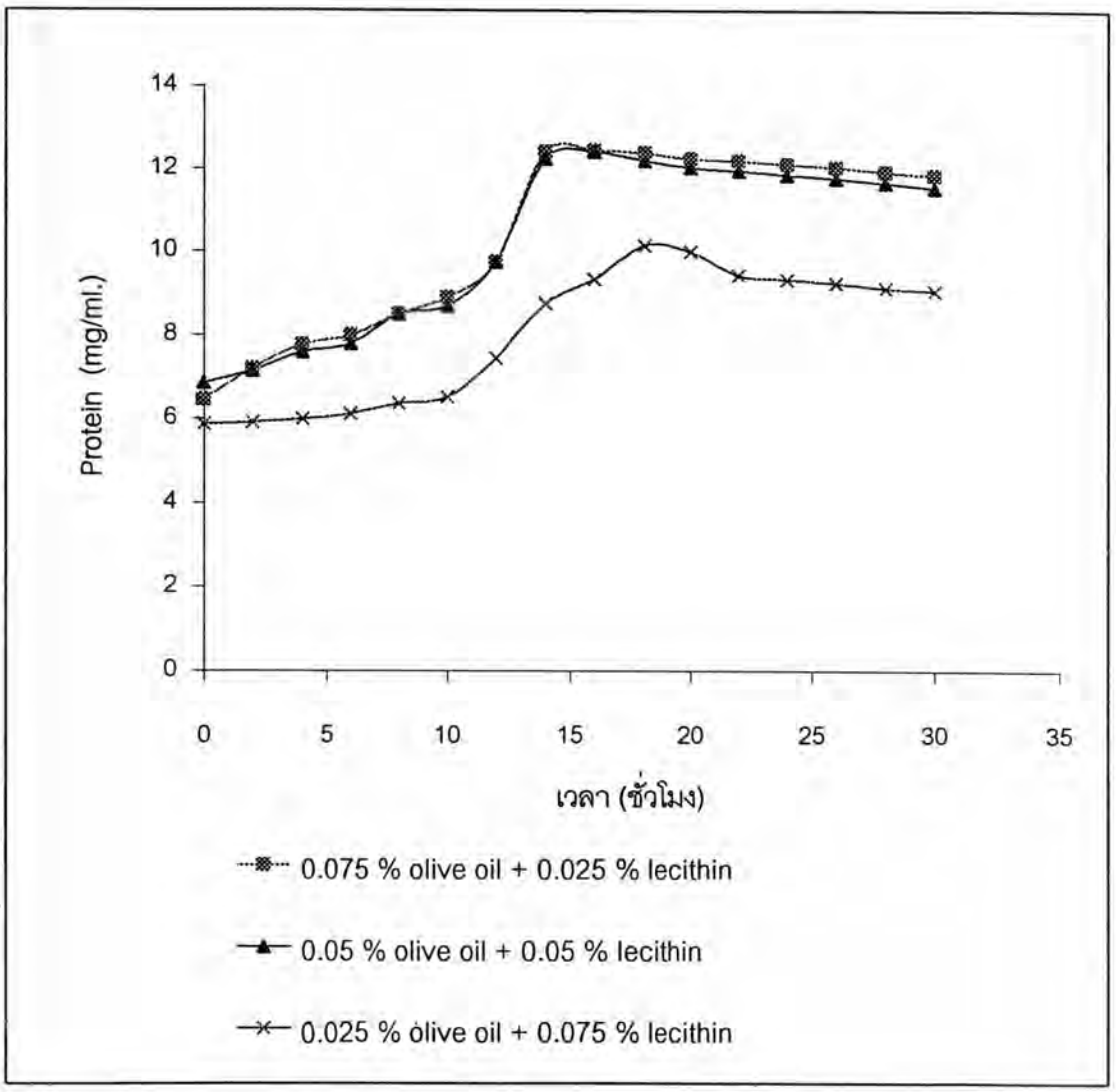
ในการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.075% เลซิติน 0.025 % เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C พบว่าจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะ 16 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นการเจริญจะเริ่มคงที่จนถึง 24 ชั่วโมง และจะเริ่มลดลงหลังจากนั้น โดยวัดการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* จาก OD_{600} ส่วนผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.05% และ เลซิติน 0.05% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C พบว่าจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะ 14 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นการเจริญจะเริ่มคงที่จนถึง 24 ชั่วโมง และจะเริ่มลดลงหลังจากนั้น โดยวัดการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* จาก OD_{600} ในและผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.025% และ เลซิติน 0.075% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C พบว่าจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะ 16 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นการเจริญจะเริ่มคงที่จนถึง 24 ชั่วโมง และจะเริ่มลดลงหลังจากนั้น โดยวัดการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* จาก OD_{600} ดังภาพที่ 21



ภาพที่ 21 แสดงการเจริญ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 ที่ปรับเป็นอิมัลชั่นโดย เติมน้ำมันมะกอก 0.075 % และเลซิติน 0.025 % ,เติมน้ำมันมะกอก 0.05 % และเลซิติน 0.05 % , เติมน้ำมันมะกอก 0.025 % และเลซิติน 0.075 % และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C โดยวัดการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* จาก OD_{600}

4.3.3.2. ผลปริมาณโปรตีนของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น

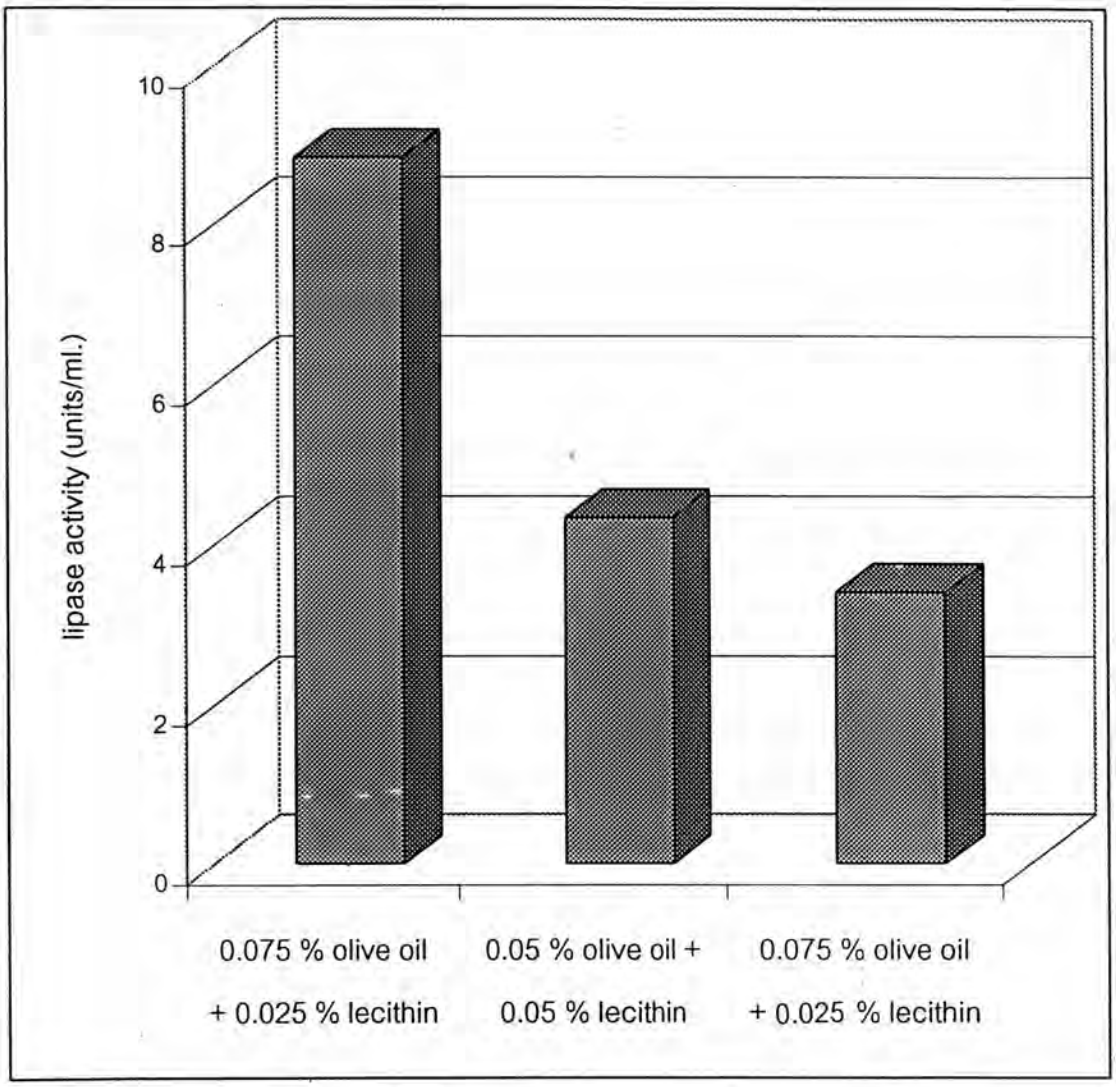
จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.075% และ เลซิติน 0.025% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นตามลำดับและเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 16 มีปริมาณโปรตีน 12.43 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไบยูเร็ต มี bovine serum albumin ที่รู้ความเข้มข้นเป็นสารมาตราฐานเทียบค่า OD_{540} ส่วนผลการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.05% และ เลซิติน 0.05% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นตามลำดับและเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 16 มีปริมาณโปรตีน 12.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไบยูเร็ต มี bovine serum albumin ที่รู้ความเข้มข้นเป็นสารมาตราฐานเทียบค่า OD_{540} และผลการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.025% และ เลซิติน 0.075% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นตามลำดับและเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 18 มีปริมาณโปรตีน 10.14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไบยูเร็ต มี bovine serum albumin ที่รู้ความเข้มข้นเป็นสารมาตราฐานเทียบค่า OD_{540} ดังภาพที่ 22



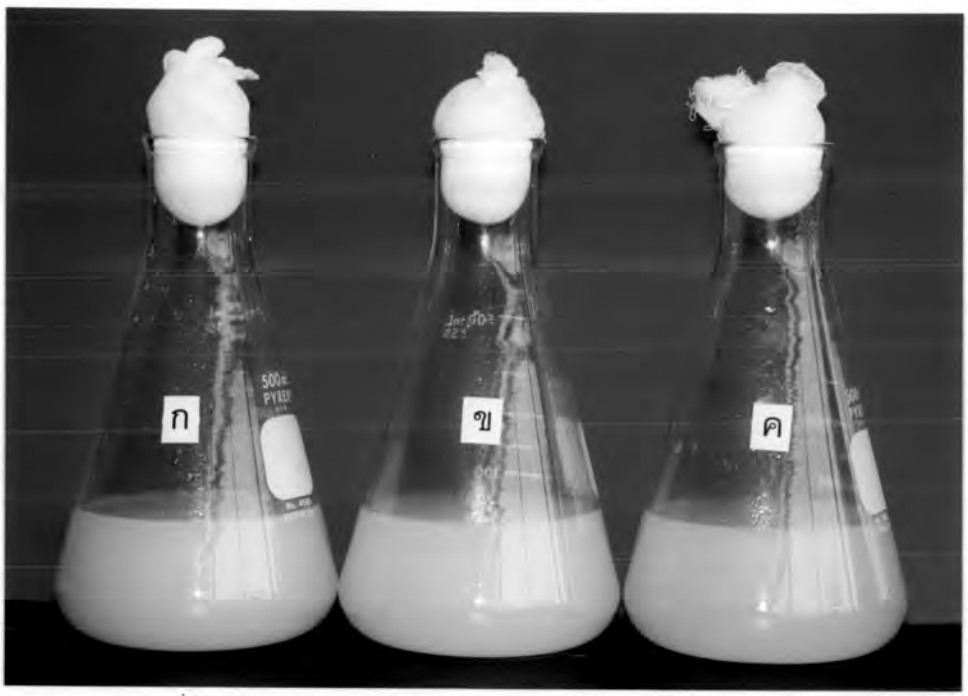
ภาพที่ 22 แสดงปริมาณโปรตีน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 ที่ปรับเป็นอิมัลชั่นโดย เติมน้ำมันมะกอก 0.075 % และเลซิติน 0.025 % ,เติมน้ำมันมะกอก 0.05 % และเลซิติน 0.05 % ,เติมน้ำมันมะกอก 0.025 % และเลซิติน 0.075 % และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C วัดปริมาณโปรตีน โดยวิธีไบยูเร็ต มี bovine serum albumin ที่รู้ความเข้มข้นเป็นสารมาตราฐาน เทียบค่า OD_{540}

4.3.3.3. ผลการสร้างไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.075% และ เลซิติน 0.025% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะเริ่มพบไลเปสตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 และพบเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 6 วัดไลเปสแอคติวิตี 8.86 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปส ด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และคำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับสารมาตราฐานโอลิอิก ได้ค่า total activity เท่ากับ 2,658 ยูนิต ส่วนในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมี น้ำมันมะกอก 0.05% และ เลซิติน 0.05 % เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะเริ่มพบไลเปสตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 และพบเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 6 วัดไลเปสแอคติวิตี 4.34 ยูนิตต่อมิลลิลิตรโดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปส ด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และคำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับสารมาตราฐานโอลิอิก ได้ค่า total activity ได้เท่ากับ 1,302 ยูนิต ส่วนในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมี น้ำมันมะกอก 0.025% และ เลซิติน 0.075 % เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะเริ่มพบไลเปสตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 และพบเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 6 วัดไลเปสแอคติวิตี 3.41 ยูนิตต่อมิลลิลิตรโดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปส ด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และคำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับสารมาตราฐานโอลิอิก ได้ค่า total activity ได้เท่ากับ 1,023 ยูนิต ดังภาพที่ 23 และตารางที่ 5



ภาพที่ 23 แสดงแอคติวิตีของไลเปส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 ที่ปรับเป็นอิมัลชั่นโดย เติมน้ำมันมะกอก 0.075 % และ เลซิติน 0.025% , เติมน้ำมันมะกอก 0.05 % และ เลซิติน 0.05% , เติมน้ำมันมะกอก 0.025 % และ เลซิติน 0.075% และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C วัดแอคติวิตีของไลเปสโดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปส ด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และคำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับสารมาตราฐานโอลิอิก



ภาพที่ 24 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ก.) เติมน้ำมันมะกอก 0.075 % และ เลซิติน 0.025% ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ข.) เติมน้ำมันมะกอก 0.05 % และ เลซิติน 0.05% ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ค.) เติมน้ำมันมะกอก 0.025 % และ เลซิติน 0.075% ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ภาพที่ 25 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่นให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C

ก.) เติมน้ำมันมะกอก 0.075 % และ เลซิติน 0.025% ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ข.) เติมน้ำมันมะกอก 0.05 % และ เลซิติน 0.05% ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ค.) เติมน้ำมันมะกอก 0.025 % และ เลซิติน 0.075% ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น

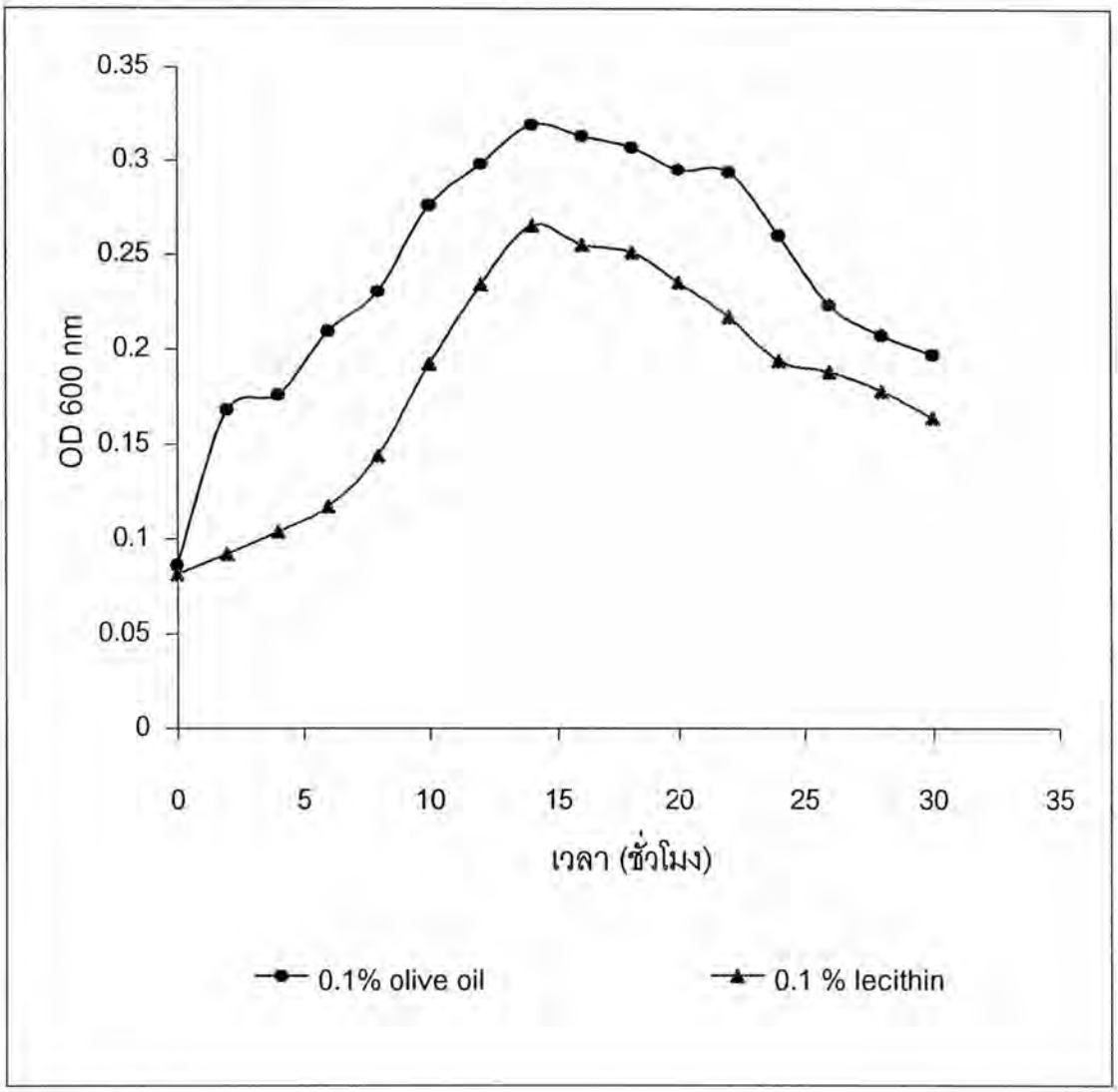
ตารางที่ 5 แสดงไลเปสแอคติวิตี เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 ที่ปรับเป็นอิมัลชั่นโดยเติมน้ำมันมะกอก 0.075 % และ เลซิติน 0.025% , เติมน้ำมันมะกอก 0.05 % และ เลซิติน 0.05% , เติมน้ำมันมะกอก 0.025 % และ เลซิติน 0.075% มีค่าไลเปสแอคติวิตี , Total activity ของไลเปส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* อุณหภูมิ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 , pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที วัดไลเปสแอคติวิตี โดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปสด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ คำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับสารมาตราฐานโอลิอิก และ คิดค่า total activity จากส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาณ 300 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6

อาหารเลี้ยงเชื้อ	Lipase activity (units/ml.)	Total Activitity (units)
อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 ที่มีน้ำมันมะกอก 0.075 % และ เลซิติน 0.025 % ปรับเป็นอิมัลชั่น	8.86	2,658
อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 ที่มีน้ำมันมะกอก 0.05 % และ เลซิติน 0.05 % ปรับเป็นอิมัลชั่น	4.34	1,302
อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 ที่น้ำมันมะกอก 0.025 % และ เลซิติน 0.075 % ปรับเป็นอิมัลชั่น	3.41	1,023

4.3.4. ผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

4.3.4.1. ผลเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

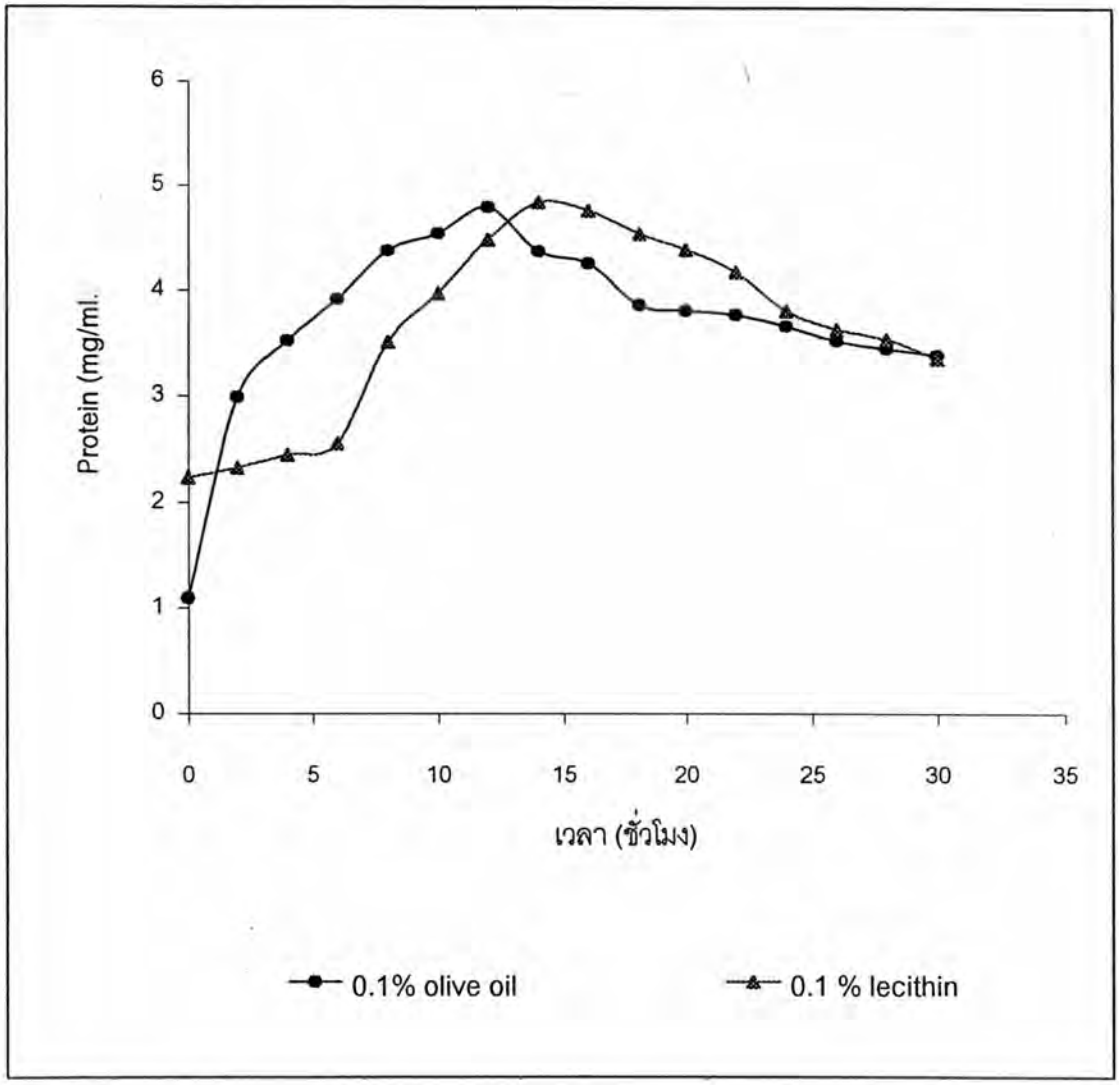
ในการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.1% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C พบว่าจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะ 14 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นการเจริญจะเริ่มคงที่จนถึง 24 ชั่วโมง และจะเริ่มลดลงหลังจากนั้น โดยวัดการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* จาก OD_{600} ส่วนผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.1% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C พบว่าจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะ 14 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นการเจริญจะเริ่มคงที่จนถึง 24 ชั่วโมง และจะเริ่มลดลงหลังจากนั้น โดยวัดการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* จาก OD_{600}เชื้อ *Bacillus subtilis* สามารถเจริญได้เหมือนกันในทั้งน้ำมันมะกอก 0.1% และเลซิติน 0.1 % ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ ดังภาพที่ 26



ภาพที่ 26 แสดงการเจริญ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 โดย เติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และเลซิติน 0.1 % และไม่ปรับเป็นอิมัลชั่นให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C โดยวัดการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* จาก OD_{600}

4.3.4.2. ผลปริมาณโปรตีนของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

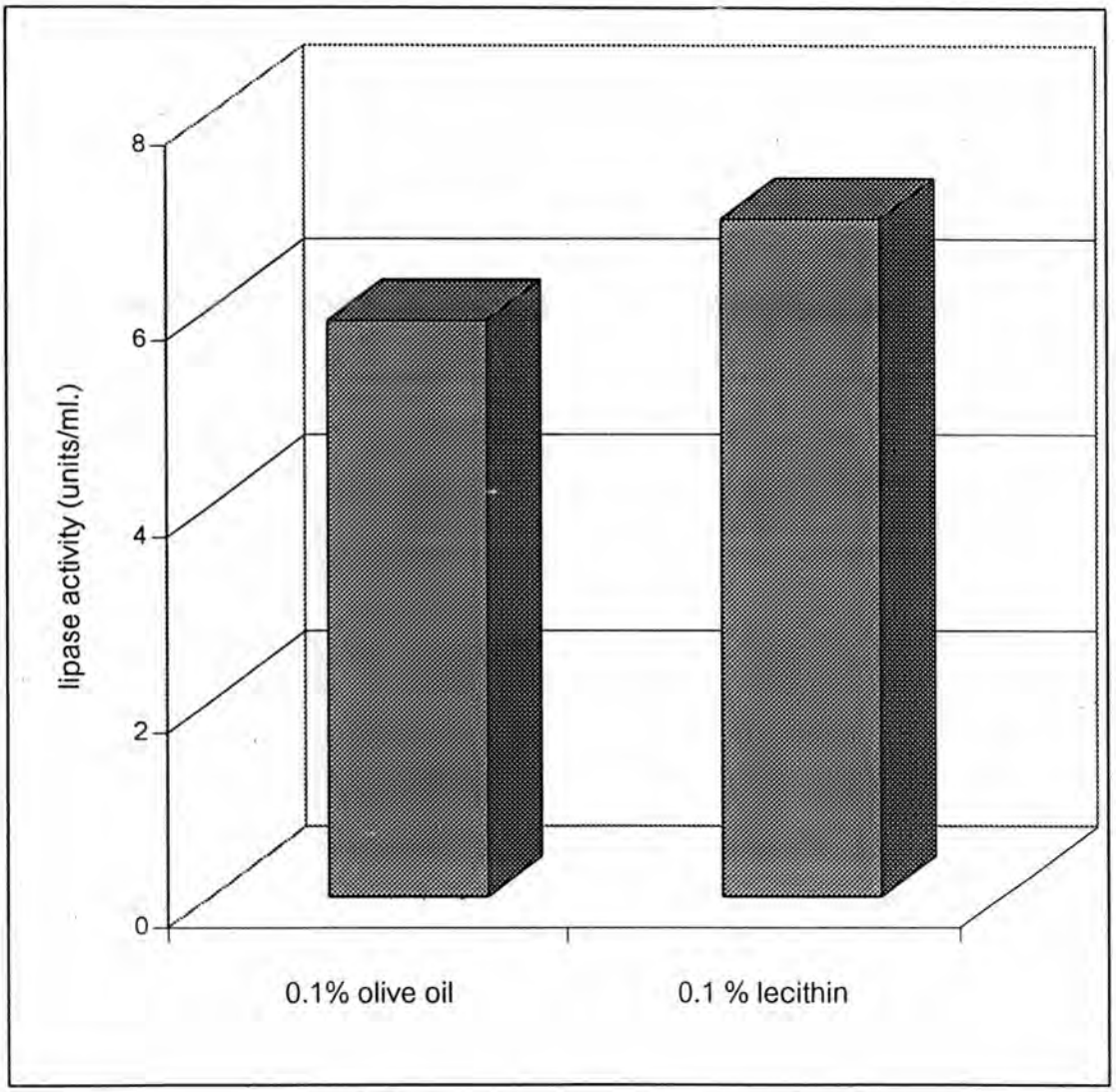
จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.1% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นตามลำดับและเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 12 มีปริมาณโปรตีน 4.79 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไบยูเร็ต มี bovine serum albumin ที่รู้ความเข้มข้นเป็นสารมาตราฐาน เทียบค่า OD_{540} ส่วนผลการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งเลซิติน 0.1% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นตามลำดับและเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 14 มีปริมาณโปรตีน 4.84 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไบยูเร็ต มี bovine serum albumin ที่รู้ความเข้มข้นเป็นสารมาตราฐาน เทียบค่า OD_{540} ดังภาพที่ 27



ภาพที่ 27 แสดง ปริมาณโปรตีน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 โดย เติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และ เลซิติน 0.1% และไม่ปรับเป็นอิมัลชั่นให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C วัดปริมาณโปรตีน โดยวิธีไบยูเร็ต มี bovine serum albumin ที่รู้ความเข้มข้นเป็นสารมาตราฐาน เทียบค่า OD_{540}

4.3.4.3. ผลการสร้างไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.1% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะเริ่มพบไลเปสตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 และพบเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 6 วัดไลเปสแอคติวิตี 5.89 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปส ด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และคำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับสารมาตราฐานโอลิอิก ได้ค่า total activity ได้เท่ากับ 1,767 ยูนิต ส่วนในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.1% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะเริ่มพบไลเปสตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 และพบเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 6 วัดไลเปส แอคติวิตี 6.93 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปส ด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และคำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับ สารมาตราฐานโอลิอิก ได้ค่า total activity ได้เท่ากับ 2,079 ยูนิต จะเห็นได้ว่าสูตรอาหารทั้งสองที่มีแหล่งน้ำมันแตกต่างกันจะให้ผลการสร้างไลเปสแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังภาพที่ 28 และตารางที่ 6



ภาพที่ 28 แสดงแอคติวิตีของไลเปส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 โดย เติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และ เลซิติน 0.1% และไม่ปรับเป็นอิมัลชั่นให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C วัดแอคติวิตีของไลเปสโดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปส ด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และคำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับสารมาตราฐานโอลิอิก

ภาพที่ 29 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ก.) มีน้ำมันมะกอก 0.1 % ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ข.) มีเลซิติน 0.1 % ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ภาพที่ 30 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่นให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C

ก.) มีน้ำมันมะกอก 0.1 % ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ข.) มีเลซิติน 0.1 % ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

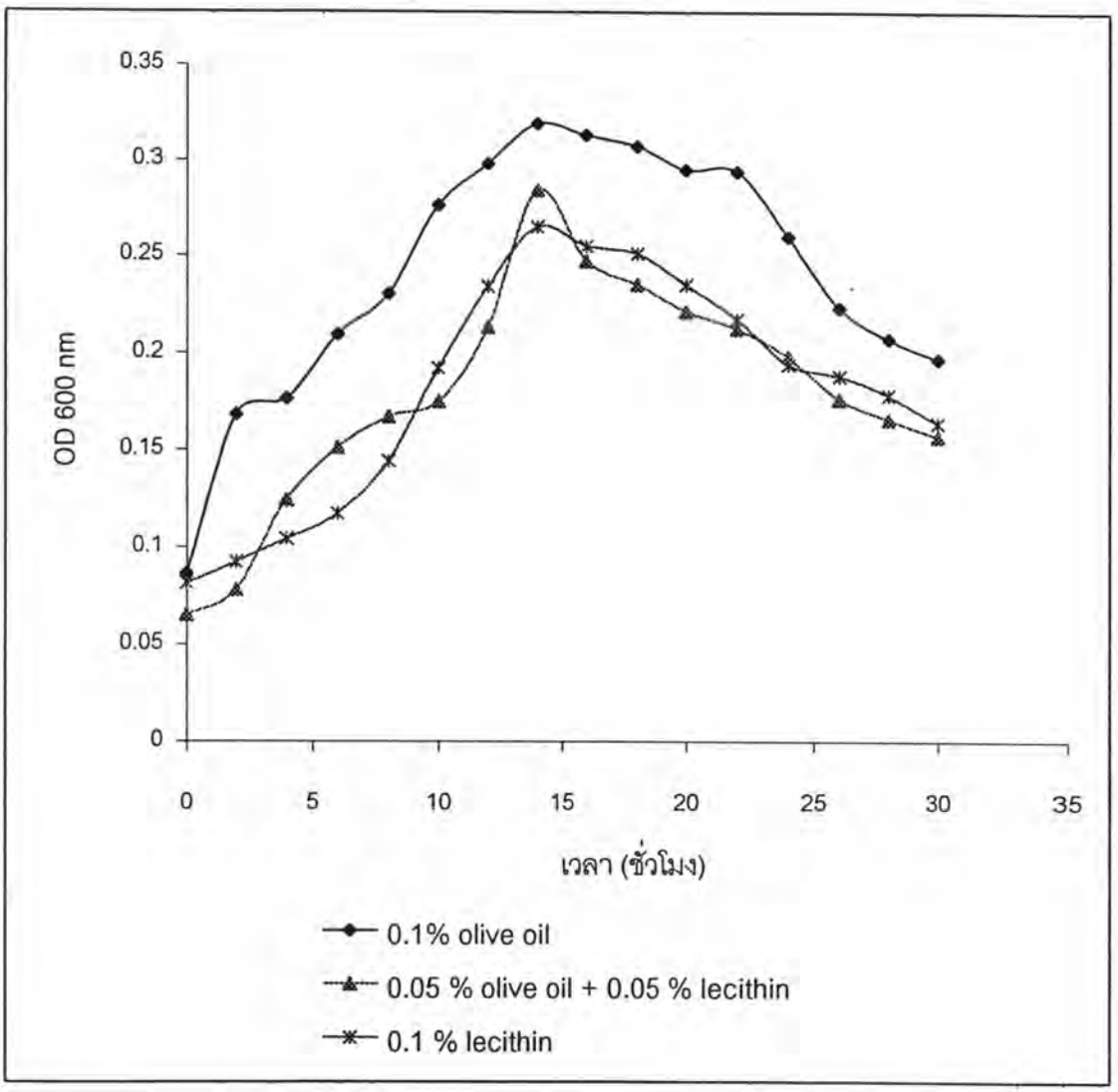
ตารางที่ 6 แสดงไลเปสแอคติวิตี และ Total activity ของไลเปส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 โดย เติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และ เลซิติน 0.1% และไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* อุณหภูมิ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 , pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที วัดไลเปสแอคติวิตี โดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปส ด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ คำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับสารมาตราฐานโอลิอิก และคิดค่า total activity จากส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาณ 300 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6

อาหารเลี้ยงเชื้อ	Lipase activity (units/ml.)	Total Activitity (units)
อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 ที่มีน้ำมันมะกอก 0.1 % ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น	6.89	1,767
อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 ที่มีเลซิติน 0.1 % ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น	6.93	2,079

4.3.5. ผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่นและปรับเป็นอิมัลชั่น

4.3.5.1. ผลเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่นและไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

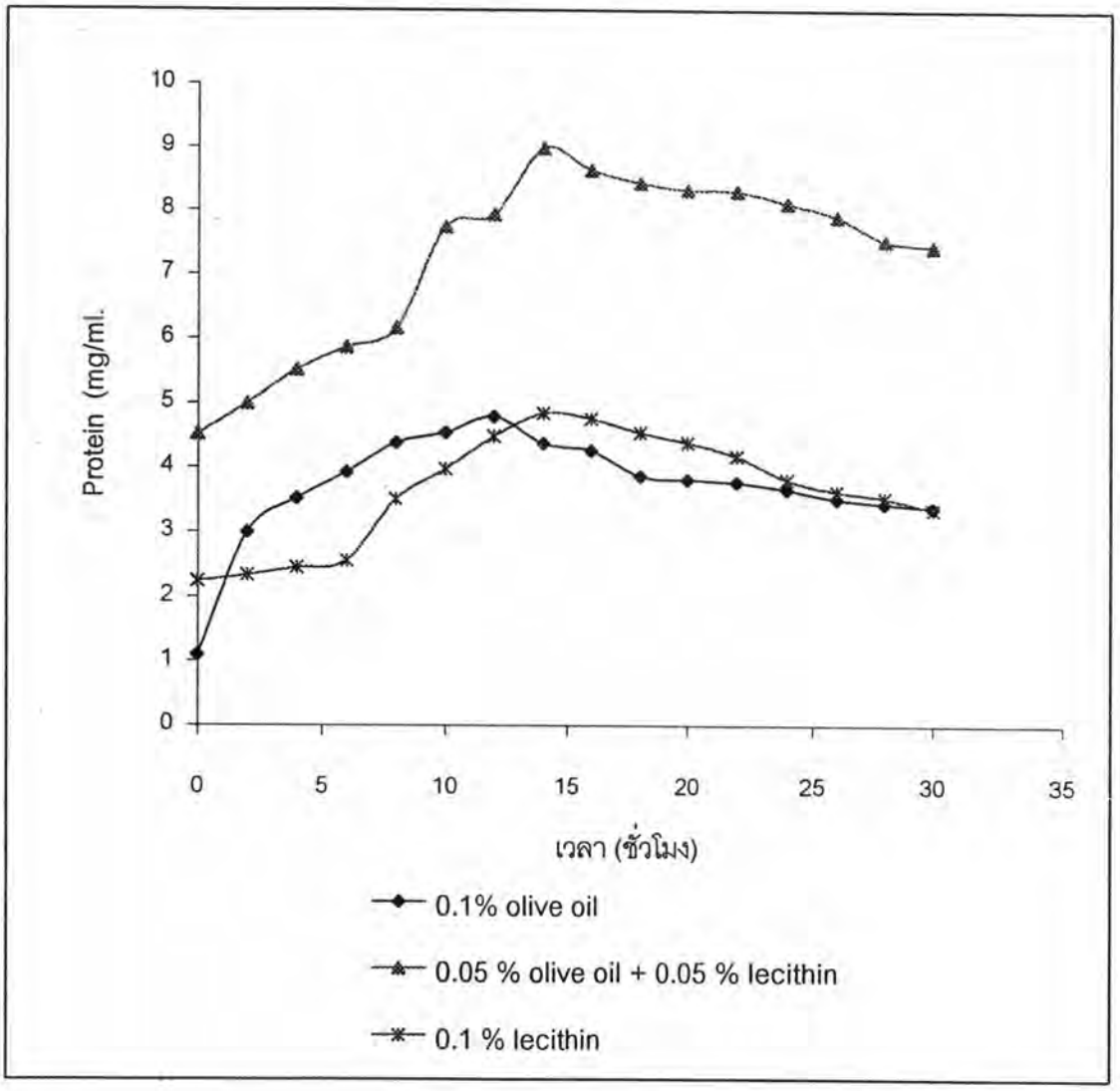
ในการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.1% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C พบว่าจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะ 14 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นการเจริญจะเริ่มคงที่จนถึง 24 ชั่วโมง และจะเริ่มลดลงหลังจากนั้น โดยวัดการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* จาก OD_{600} ส่วนผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.1% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C พบว่าจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะ 14 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นการเจริญจะเริ่มคงที่จนถึง 24 ชั่วโมง และจะเริ่มลดลงหลังจากนั้น โดยวัดการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* จาก OD_{600}และผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.05 % และ น้ำมันมะกอก 0.05 % เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C พบว่าจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะ 14 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นการเจริญจะเริ่มคงที่จนถึง 24 ชั่วโมง และจะเริ่มลดลงหลังจากนั้น โดยวัดการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* จาก OD_{600} ดังภาพที่ 31



ภาพที่ 31 แสดงการเจริญ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 โดย เติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และเลซิติน 0.1 % ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น และ ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.05 % และ น้ำมันมะกอก 0.05 % ให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C โดยวัดการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* จาก OD_{600}

4.3.5.2. ผลปริมาณโปรตีนของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่นและปรับเป็นอิมัลชั่น

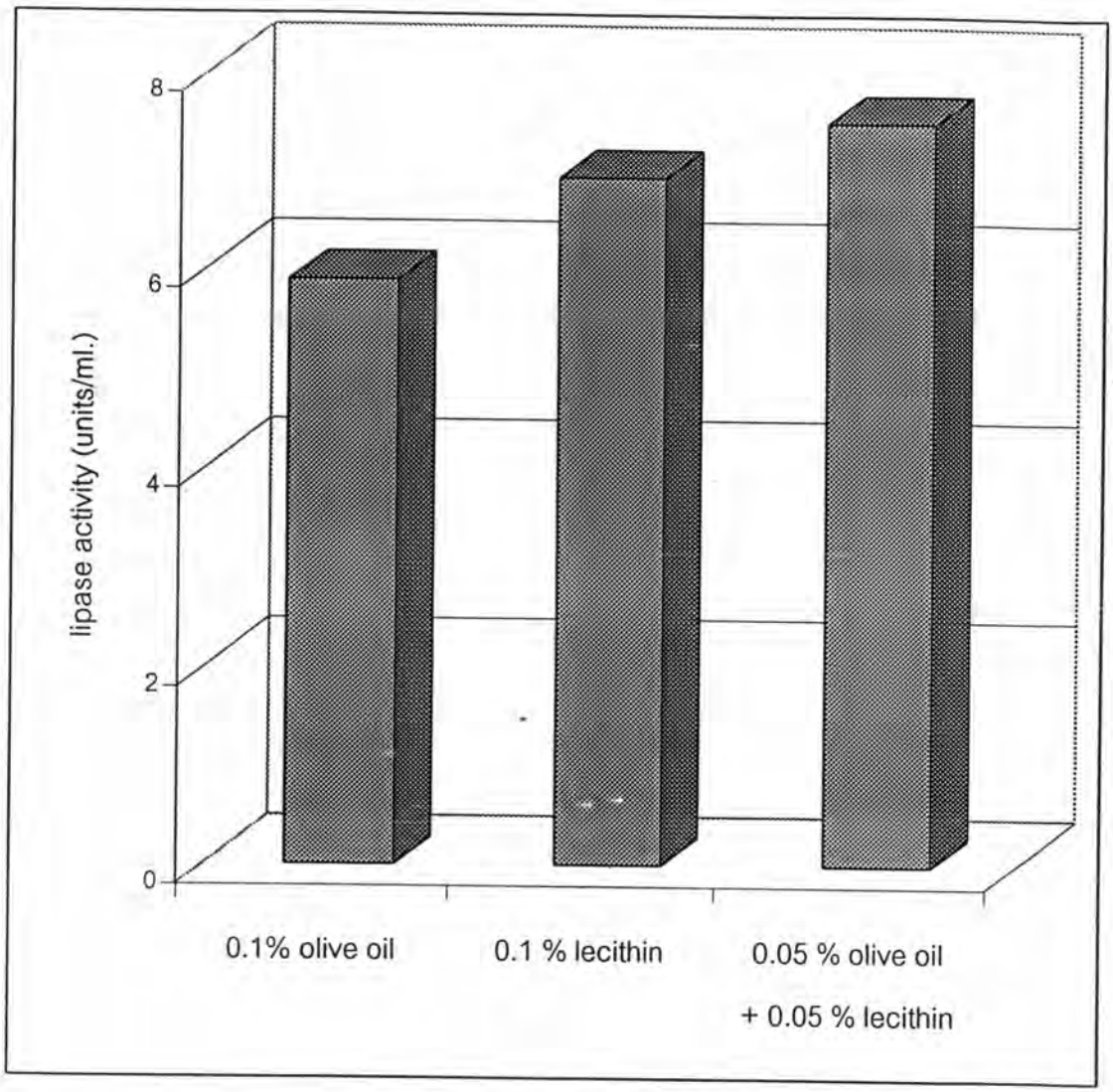
จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.1% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นตามลำดับและเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 12 มีปริมาณโปรตีน 4.79 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไบยูเร็ต มี bovine serum albumin ที่รู้ความเข้มข้นเป็นสารมาตราฐานเทียบค่า OD_{540} ส่วนผลการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งเลซิติน 0.1% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นตามลำดับและเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 14 มีปริมาณโปรตีน 4.84 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไบยูเร็ต มี bovine serum albumin ที่รู้ความเข้มข้นเป็นสารมาตราฐานเทียบค่า OD_{540} และผลการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งเลซิติน 0.05% และน้ำมันมะกอก 0.05% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นตามลำดับและเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 14 มีปริมาณโปรตีน 8.98 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไบยูเร็ต มี bovine serum albumin ที่รู้ความเข้มข้นเป็นสารมาตราฐานเทียบค่า OD_{540} ดังภาพที่ 32



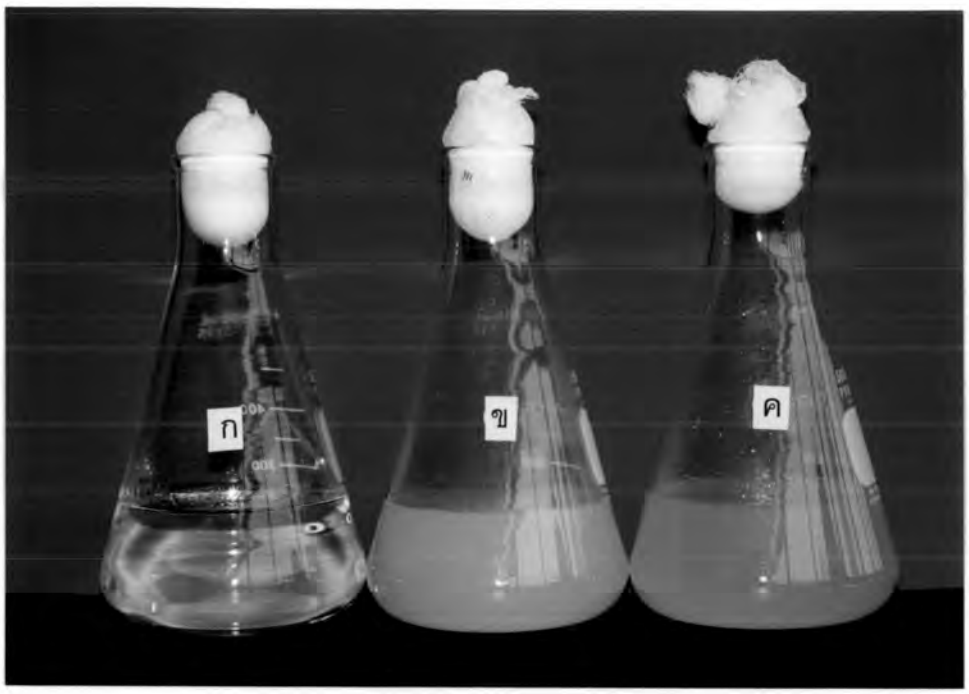
ภาพที่ 32 แสดงปริมาณโปรตีน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 โดย เติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และเลซิติน 0.1 % ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น และที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.05 % และ น้ำมันมะกอก 0.05 % ให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C วัดปริมาณโปรตีน โดยวิธีไบยูเร็ต มี bovine serum albumin ที่รู้ความเข้มข้นเป็นสารมาตราฐาน เทียบค่า OD_{540}

4.3.5.3. ผลการสร้างไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่นและปรับเป็นอิมัลชั่น

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.1% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะเริ่มพบไลเปสตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 และพบเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 6 วัดไลเปสแอคติวิตี 5.89 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปส ด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และคำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับสารมาตราฐานโอลิอิก ได้ค่า total activity ได้เท่ากับ 1,767 ยูนิต ส่วนในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.1% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะเริ่มพบไลเปสตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 และพบเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 6 วัดไลเปส แอคติวิตี 6.93 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปส ด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และคำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับสารมาตราฐานโอลิอิก ได้ค่า total activity ได้เท่ากับ 2,079 ยูนิตจะเห็นได้ว่าสูตรอาหารทั้งสองที่มีแหล่งน้ำมันแตกต่างกันจะให้ผลการสร้างไลเปสแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.05% และน้ำมันมะกอก0.05% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะเริ่มพบไลเปสตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 และพบเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 6 วัดไลเปสแอคติวิตี 7.51 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปส ด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และคำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับสารมาตราฐานโอลิอิก ได้ค่า total activity ได้เท่ากับ 2,253 ยูนิต ดังภาพที่ 33 และตารางที่ 7



ภาพที่ 33 แสดงแอคติวิตีของไลเปส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 โดย เติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และ เลซิติน 0.1% ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่นและที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.05 % และ น้ำมันมะกอก 0.05 % ให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C วัดแอคติวิตีของไลเปสโดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปส ด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และคำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับสารมาตราฐานโอลิอิก

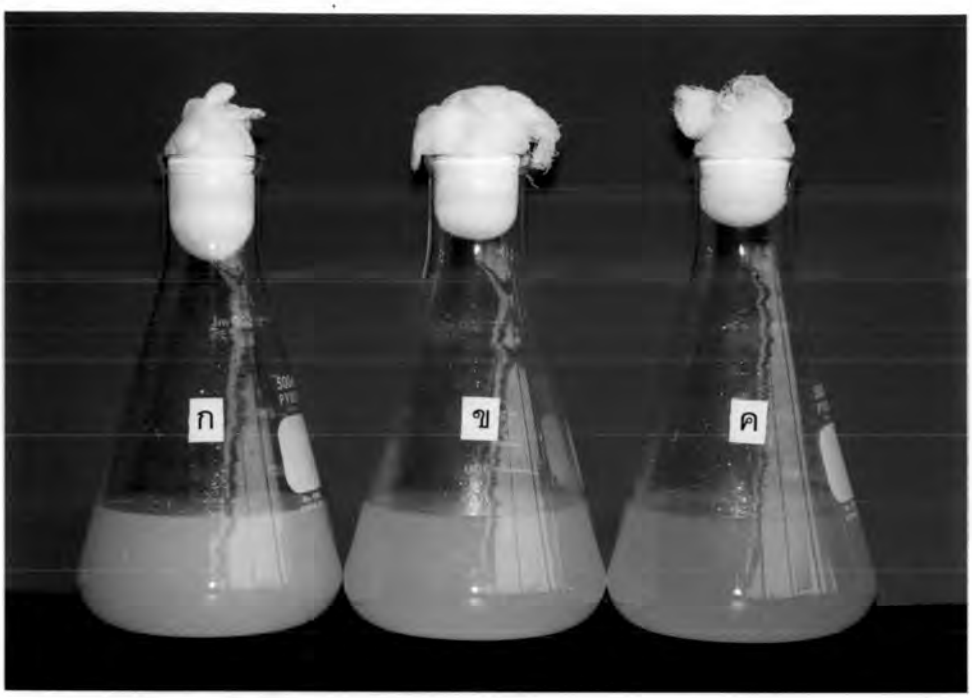


ภาพที่ 34 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่นและที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.05 % และ น้ำมันมะกอก 0.05 %

ก.) มีน้ำมันมะกอก 0.1 % ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ข.) มีเลซิติน 0.1 % ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ค.) มีเลซิติน 0.05 % และ น้ำมันมะกอก 0.05 % ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น



ภาพที่ 35 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่นให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C

ก.) มีน้ำมันมะกอก 0.1 % ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ข.) มีเลซิติน 0.1 % ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ค.) มีเลซิติน 0.05 % และ น้ำมันมะกอก 0.05 % ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น

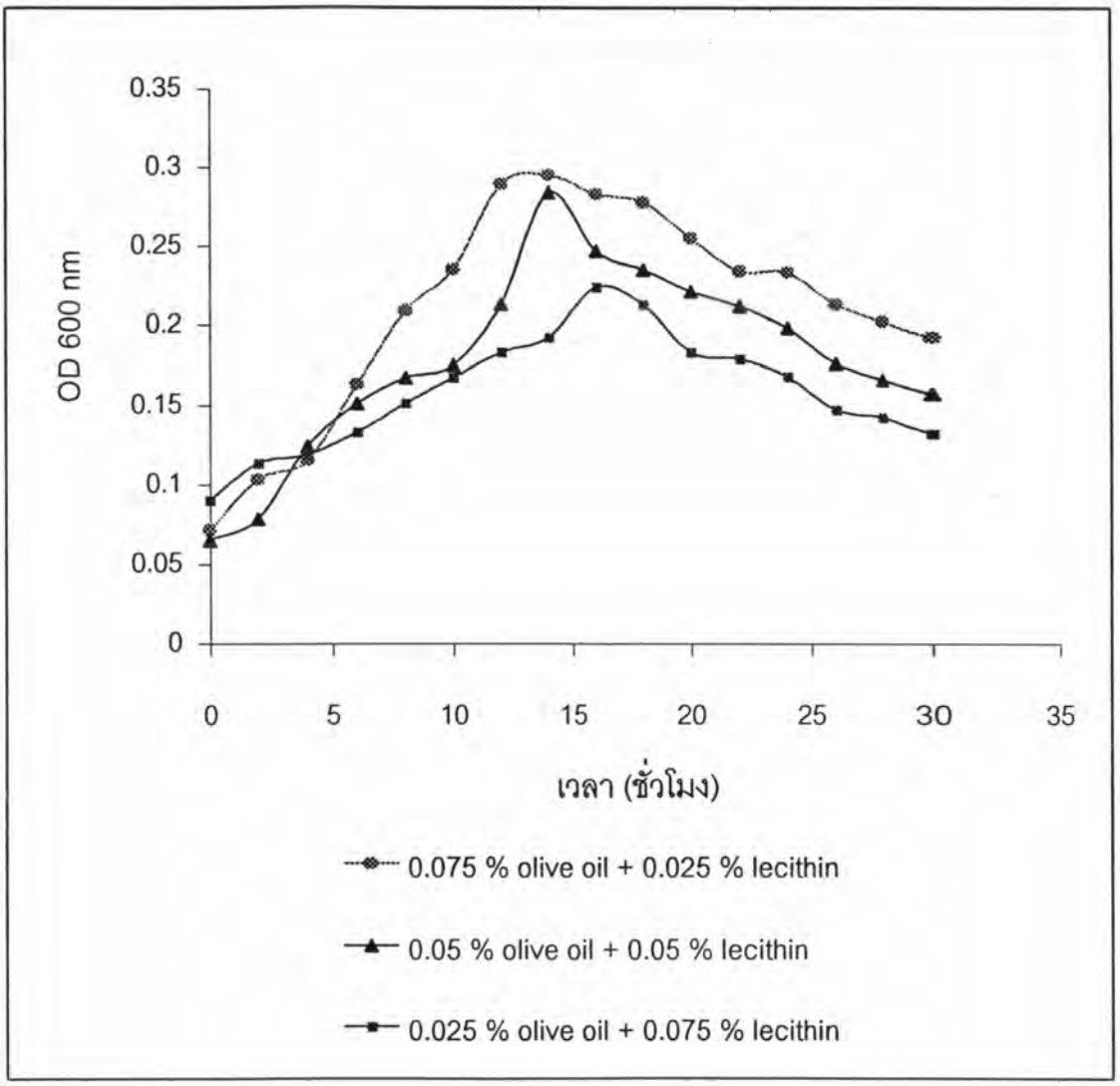
ตารางที่ 7 แสดงไลเปสแอคติวิตี และ Total activity ของไลเปส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 โดย เติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และ เลซิติน 0.1% ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น และที่ปรับเป็นอิมัลชั่นมีเลซิติน 0.05 % และ น้ำมันมะกอก 0.05 % เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* อุณหภูมิ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 , pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที วัดไลเปสแอคติวิตี โดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปส ด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ คำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับสารมาตราฐานโอลิอิก และ คิดค่า total activity จากส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาณ 300 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6

อาหารเลี้ยงเชื้อ	Lipase activity (units/ml.)	Total Activitity (units)
อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 ที่มีน้ำมันมะกอก 0.1 % ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น	5.89	1,767
อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 ที่มีเลซิติน 0.1 % ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น	6.93	2,079
อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 ที่มีเลซิติน 0.05 % และ น้ำมันมะกอก 0.05 % ปรับเป็นอิมัลชั่น	7.51	2,253

4.3.6. ผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น

4.3.6.1. ผลเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปรับเป็นอิมัลชั่น

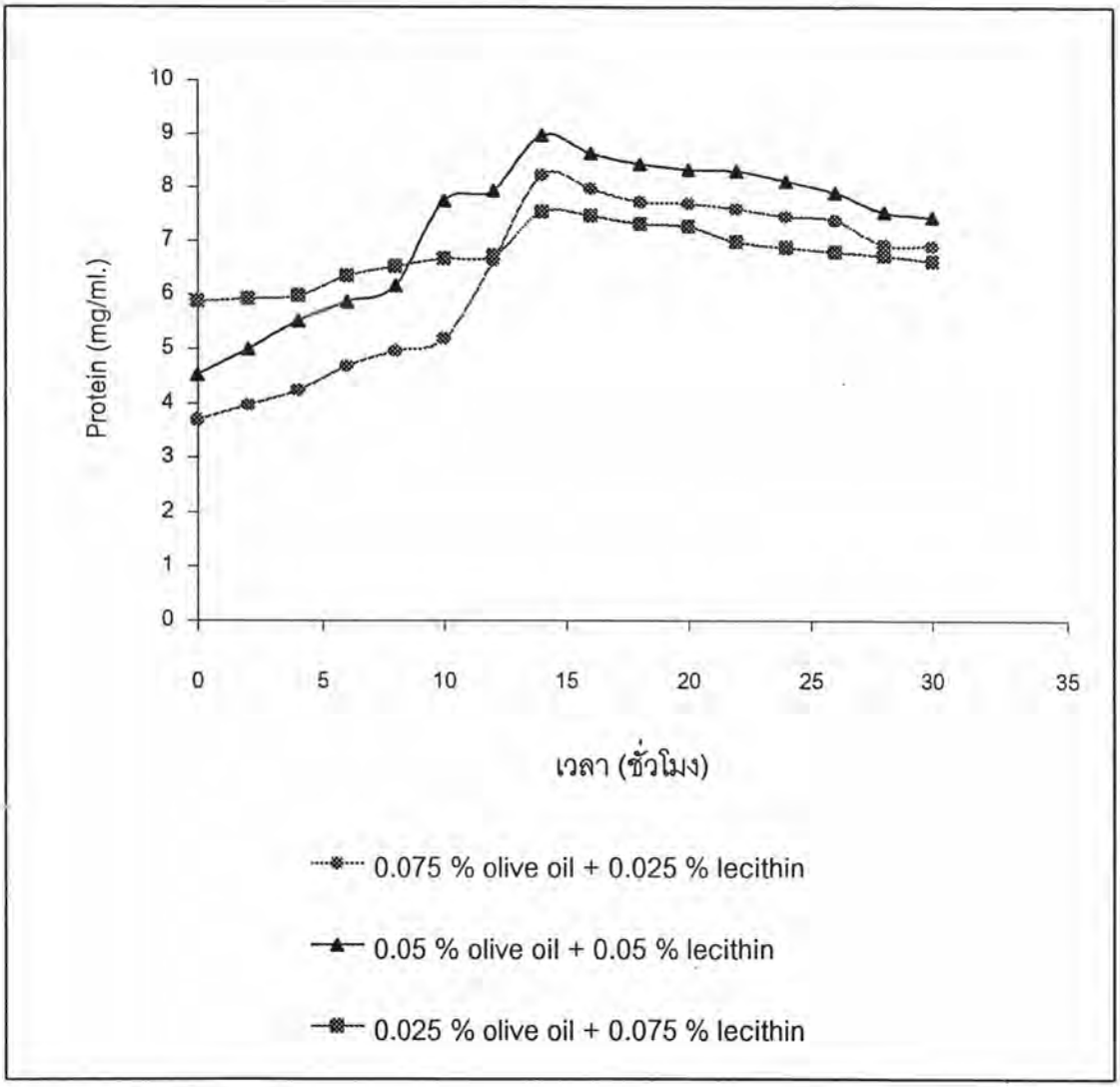
ในการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.075% เลซิติน 0.025 % เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C พบว่าจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะ 14 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นการเจริญจะเริ่มคงที่จนถึง 24 ชั่วโมง และจะเริ่มลดลงหลังจากนั้น โดยวัดการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* จาก OD_{600} ส่วนผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.05% และ เลซิติน 0.05% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C พบว่าจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะ 14 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นการเจริญจะเริ่มคงที่จนถึง 24 ชั่วโมง และจะเริ่มลดลงหลังจากนั้น โดยวัดการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* จาก OD_{600} ในและผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.025% และ เลซิติน 0.075% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C พบว่าจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะ 16 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นการเจริญจะเริ่มคงที่จนถึง 24 ชั่วโมง และจะเริ่มลดลงหลังจากนั้น โดยวัดการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* จาก OD_{600} ดังภาพที่ 36



ภาพที่ 36 แสดงการเจริญ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 ที่ปรับเป็นอิมัลชั่นโดย เติมน้ำมันมะกอก 0.075 % และเลซิติน 0.025 % ,เติมน้ำมันมะกอก 0.05 % และเลซิติน 0.05 % และเติมน้ำมันมะกอก 0.025 % และเลซิติน 0.075 % และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C โดยวัดการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* จาก OD_{600}

4.3.6.2. ผลปริมาณโปรตีนของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น

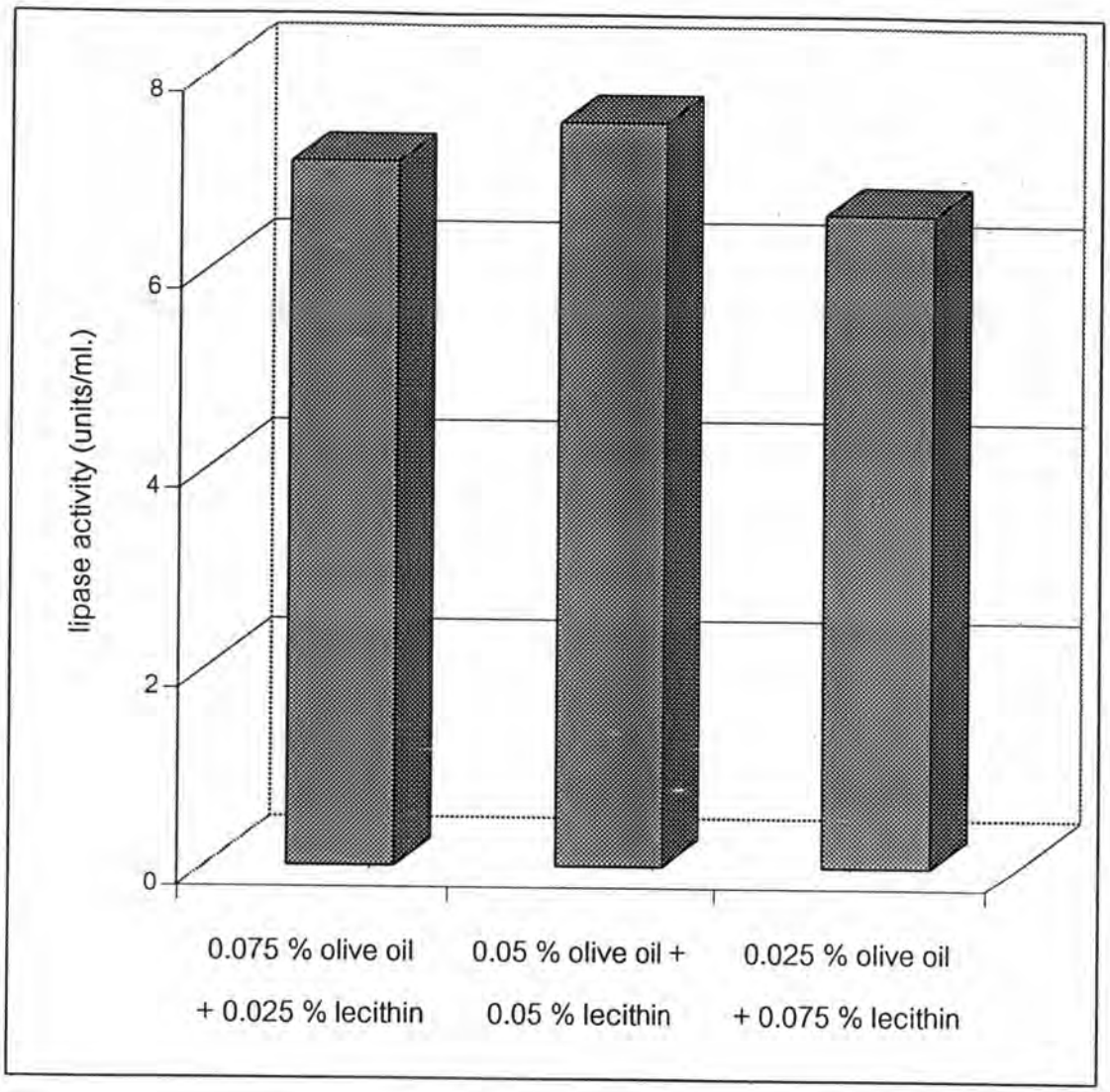
จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.075% และ เลซิติน 0.025% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นตามลำดับและเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 14 มีปริมาณโปรตีน 8.21 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไบยูเร็ต มี bovine serum albumin ที่รู้ความเข้มข้นเป็นสารมาตราฐานเทียบค่า OD_{540} ส่วนผลการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.05% และ เลซิติน 0.05% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นตามลำดับและเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 14 มีปริมาณโปรตีน 8.98 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไบยูเร็ต มี bovine serum albumin ที่รู้ความเข้มข้นเป็นสารมาตราฐานเทียบค่า OD_{540} และผลการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.025% และ เลซิติน 0.075% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นตามลำดับและเริ่มคงที่ในชั่วโมงที่ 14 มีปริมาณโปรตีน 7.53 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธีไบยูเร็ต มี bovine serum albumin ที่รู้ความเข้มข้นเป็นสารมาตราฐานเทียบค่า OD_{540} ดังภาพที่ 37



ภาพที่ 37 แสดงปริมาณโปรตีน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 ที่ปรับเป็นอิมัลชั่นโดย เติมน้ำมันมะกอก 0.075 % และเลซิติน 0.025 % ,เติมน้ำมันมะกอก 0.05 % และเลซิติน 0.05 % ,เติมน้ำมันมะกอก 0.025 % และเลซิติน 0.075 % และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C วัดปริมาณโปรตีน โดยวิธีไบยูเร็ต มี bovine serum albumin ที่รู้ความเข้มข้นเป็นสารมาตราฐาน เทียบค่า OD_{540}

4.3.6.3. ผลการสร้างไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปรับเป็นอิมัลชั่น

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีน้ำมันมะกอก 0.075% และ เลซิติน 0.025% เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะเริ่มพบไลเปสตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 และพบเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 6 วัดไลเปสแอคติวิตี 7.10 ยูนิตต่อมิลลิลิตรโดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปส ด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และคำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับสารมาตราฐานโอลิอิก ได้ค่า total activity เท่ากับ 2,130 ยูนิต ส่วนในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมี น้ำมันมะกอก 0.05% และ เลซิติน 0.05 % เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะเริ่มพบไลเปสตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 และพบเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 6 วัดไลเปสแอคติวิตี 7.51 ยูนิตต่อมิลลิลิตรโดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปส ด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และคำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับสารมาตราฐานโอลิอิก ได้ค่า total activity ได้เท่ากับ 2,253 ยูนิต และในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมี น้ำมันมะกอก 0.025% และ เลซิติน 0.075 % เป็นตัวกระตุ้นในการสร้างไลเปส และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 จะเริ่มพบไลเปสตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 และพบเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 6 วัดไลเปสแอคติวิตี 6.58 ยูนิตต่อมิลลิลิตรโดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปส ด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และคำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับสารมาตราฐานโอลิอิก ได้ค่า total activity ได้เท่ากับ 1,974 ยูนิต ดังภาพที่ 38 และตารางที่ 8



ภาพที่ 38 แสดงแอคติวิตีของไลเปส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 ที่ปรับเป็นอิมัลชั่นโดย เติมน้ำมันมะกอก 0.075 % และ เลซิติน 0.025% , เติมน้ำมันมะกอก 0.05 % และ เลซิติน 0.05%, เติมน้ำมันมะกอก 0.025 % และ เลซิติน 0.075% และให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C วัดแอคติวิตีของไลเปสโดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปส ด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ และคำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับสารมาตราฐานโอลิอิก

ภาพที่ 39 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ก.) เติมน้ำมันมะกอก 0.075 % และ เลซิติน 0.025% ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ข.) เติมน้ำมันมะกอก 0.05 % และ เลซิติน 0.05% ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ค.) เติมน้ำมันมะกอก 0.025 % และ เลซิติน 0.075% ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ภาพที่ 40 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่นให้ pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และให้อุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 ^{o}C

ก.) เติมน้ำมันมะกอก 0.075 % และ เลซิติน 0.025% ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ข.) เติมน้ำมันมะกอก 0.05 % และ เลซิติน 0.05% ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ค.) เติมน้ำมันมะกอก 0.025 % และ เลซิติน 0.075% ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น

ตารางที่ 8 แสดงไลเปสแอคติวิตี เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 ที่ปรับเป็นอิมัลชั่นโดยเติมน้ำมันมะกอก 0.075 % และ เลซิติน 0.025% , เติมน้ำมันมะกอก 0.05 % และ เลซิติน 0.05% , เติมน้ำมันมะกอก 0.025 % และ เลซิติน 0.075% มีค่าไลเปสแอคติวิวิตี , Total activity ของไลเปส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* อุณหภูมิ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600}เท่ากับ 0.1 , pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที วัดไลเปสแอคติวิตี โดยวิธีไตเตรทกรดไขมันที่ได้จากการทำงานของไลเปสด้วย 0.025 โมลาร์ โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ คำนวณไลเปสแอคติวิตีเป็นหน่วยยูนิตโดยเทียบกับสารมาตราฐานโอลิอิก และ คิดค่า total activity จากส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาณ 300 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6

อาหารเลี้ยงเชื้อ	Lipase activity (units/ml.)	Total Activitity (units)
อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 ที่มีน้ำมันมะกอก 0.075 % และ เลซิติน 0.025 % ปรับเป็นอิมัลชั่น	7.10	2,130
อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 ที่มีน้ำมันมะกอก 0.05 % และ เลซิติน 0.05 % ปรับเป็นอิมัลชั่น	7.51	2,253
อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 ที่น้ำมันมะกอก 0.025 % และ เลซิติน 0.075 % ปรับเป็นอิมัลชั่น	6.58	1,974

4.4. ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำไลเปสให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้ aqueous - two phase systems หาอัตราส่วนระหว่าง PEG กับ $(NH_4)_2SO_4$

เมื่อได้ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นเวลา 6 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C, pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 และทำการแยกตัวเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยปั่นที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C และนำส่วนใสมาทำการแยกไลเปสให้บริสุทธิ์บางส่วนใช้ PEG กับ $(NH_4)_2SO_4$ เพื่อให้เกิดเป็น aqueous-two phase systems โดยทดลองเบื้องต้นเพื่อตรวจสอบว่าที่ PEG , $(NH_4)_2SO_4$ และน้ำเลี้ยงเชื้อที่สัดส่วนเท่าใดจึงจะเกิด aqueous - two phase systems ได้ ผลการทดลองที่พบว่า aqueous-two phase systems จะสามารถเกิดขึ้นได้ เมื่อใช้ PEG ที่มีความเข้มข้นในช่วง 1 – 35 % (W/W) และ $(NH_4)_2SO_4$ ที่มีความเข้มข้นในช่วง 5 – 15 % (W/W) จึงได้ทำการเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมเพื่อไปใช้ตกตะกอนไลเปสต่อไป

4.5. ผลการทดลองศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการตกตะกอนไลเปส

ได้ทำการศึกษาเพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการตกตะกอนไลเปส ซึ่งได้เลือกอัตราส่วนที่มีความแตกต่างของความเข้มข้นของ PEG กับ $(NH_4)_2SO_4$ และ น้ำเลี้ยงเชื้อ เมื่อแยกน้ำเลี้ยงเชื้อให้ได้เป็น 2 วัฏภาคแล้ว นำวัฏภาคส่วนบนไปทำการตกตะกอนโปรตีน โดยปรับ pH ให้ได้ประมาณ 4.8 แยกตะกอนมาทำการวัดแอคติวิตี โดยใช้ 1% อิมัลชั่นของน้ำมันมะกอกเป็นซับสเตรทถูกย่อยด้วย ไลเปสจากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในสารละลายอะซิเตทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ที่ pH 4.8 บ่มเป็นเวลา 30 นาที ที่ 45°ซ หยุดปฏิกิริยาด้วย 95% เอธานอล ไตเตรทกรดไขมันอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาด้วย สารละลายมาตราฐาน โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ 0.025 นอร์มอล โดยใช้ฟีนอล์พทาลีน เป็นอินดิเคเตอร์ และคำนวณปฏิกิริยาของของเอนไซม์เป็นหน่วยของเอนไซม์ โดยเทียบกับสารอิมัลชั่นของกรดโอลีอิกมาตราฐานกำหนดให้หนึ่งหน่วยของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถไฮโดรไลส์ไขมันแล้วได้กรดอิสระ 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 30 นาที ที่ 45°ซ pH 4.8 และแสดงประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เป็นหน่วยต่อ มิลลิลิตรของสารละลายเอนไซม์ และผลการวัดแอคติวิตีของไลเปสได้ดังนี้ เมื่อใช้ สัดส่วนของ PEG : $(NH_4)_2SO_4$: Filtrate เป็น 35.00 : 6.00 : 59.00 พบว่าได้ ไลเปสแอคติวิตี 13.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนค่า total activity ได้ 925 ยูนิต , สัดส่วนของ PEG : $(NH_4)_2SO_4$: Filtrate เป็น 20.81 : 8.40 : 70.79 พบว่าได้ ไลเปสแอคติวิตี 9.7 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนค่า total activity ได้ 580 ยูนิต และ สัดส่วนของ PEG : $(NH_4)_2SO_4$: Filtrate เป็น 6.01 : 12.78 : 81.21 พบว่าได้ไลเปสแอคติวิตี 9.5ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนค่า total activity ได้ 208 ในสัดส่วนที่ PEG : $(NH_4)_2SO_4$: Filtrate เป็น 35.00 : 6.00 : 59.00 พบว่าสามารถตกตะกอนไลเปสได้ดีที่สุดจากสัดส่วนทั้งสาม

ภาพที่ 41 แสดง การเกิด aqueous - two phase systems ระหว่าง PEG , $(NH_4)_2SO_4$ และน้ำเลี้ยงเชื้อ

ก. อัตราส่วน PEG : $(NH_4)_2SO_4$: น้ำเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 35.00 : 6.00 : 59.00

ข. อัตราส่วน PEG : $(NH_4)_2SO_4$: น้ำเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 20.81 : 8.40 : 70.79

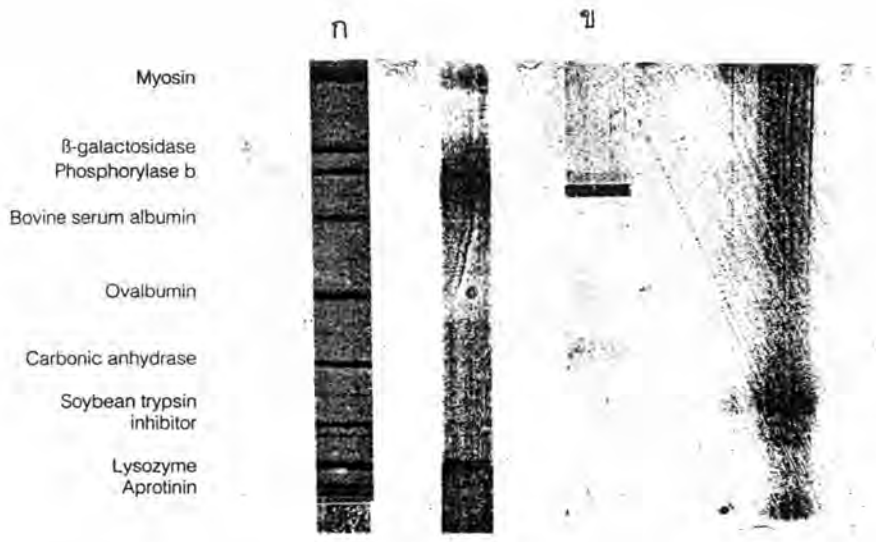
ค. อัตราส่วน PEG : $(NH_4)_2SO_4$: น้ำเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 6.01 : 12.78 : 81.21

ตารางที่ 9 แสดงการแยกไลเปสให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธี aqueous – two phase systems ระหว่าง PEG , $(NH_4)_2SO_4$ และน้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis*

	โปรตีนรวม (มิลลิกรัม)	แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)	แอคติวิตีรวม (ยูนิต)	เปอร์เซ็นต์ผลผลิต	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
Crude lipase	12.43	0.71	2,658	100	1
Aqueous – two phase systems PEG , $(NH_4)_2SO_4$ และน้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis*					
35.00 : 6.00 : 59.00	0.65	20.31	926	34.8	28.61
20.81 : 8.40 : 70.79	0.68	14.12	676	25.4	19.89
6.01 : 12.78 : 81.21	0.72	13.06	662	24.9	18.40

4.6. ผลการหาน้ำหนักโมเลกุลไลเปสของ *Bacillus subtilis*

ผลจากการนำน้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* มาตกตะกอนโปรตีนโดยวิธี aqueous two phase system แล้วนำโปรตีนดังกล่าวมาทดสอบ แอคติวิตีของไลเปสแล้ว ได้นำโปรตีนดังกล่าวมาหาน้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลได้เท่ากับ 79,000 ดาลตัน เมื่อเทียบกับสารมาตราฐาน (ภาพที่ 42)



ภาพที่ 42 แสดงผลการแยกไลเปสเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุล โดยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis เมื่อเทียบกับสารมาตราฐาน

ก. สารมาตราฐาน

ข. ไลเปสจาก *Bacillus subtilis* ที่บริสุทธิ์บางส่วน โดยวิธี aqueous two phase system อัตราส่วน PEG : $(NH_4)_2SO_4$: น้ำเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 35.00 : 6.00 : 59.00