การผลิตและทำไลเปสให้บริสุทธิ์บางส่วนจาก *Bacillus subtilis* ที่เลี้ยงในน้ำมันพืช

นางสาวเขมาภรณ์ บุญบำรุง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974 – 332 – 436 - 4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION AND PARTIAL PURIFICATION OF LIPASE FROM *Baciilus subtilis* IN VEGETABLE OIL AS CARBON SOURCE

Miss Khaemaporn Boonbumrung

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of Master of Science in Biotechnology

Program of Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 1998

ISBN 974 – 332 – 436 - 4

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตและทำไลเปสให้บริสุทธิ์บางส่วนจาก *Bacillus subtilis* ที่เลี้ยงในน้ำมันพืช
โดย	นางสาวเขมาภรณ์ บุญบำรุง
หลักสูตร	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. โสภณ เรืองสำราญ
อาจารย์ร่วมปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยพร ณ นคร

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อุดม ก๊กผล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. โสภณ เรืองสำราญ)

.....อาจารย์ร่วมปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยพร ณ นคร)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิฑัฒน์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิชัย เชิดชีวศาสตร์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

เขมาภรณ์ บุญบำรุง : การผลิตและทำไลเปสให้บริสุทธิ์บางส่วนจาก *Bacillus subtilis* ที่เลี้ยงในน้ำมันพืช (PRODUCTION AND PARTIAL PURIFICATION OF LIPASE FROM IN VEGETABLE OIL AS CARBON SOURCE) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. โสภณ เรืองสำราญ, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร. ปิยพร ณ นคร : 138 หน้า. ISBN 974 – 332 – 436 – 4.

ทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อผลิตไลเปสและทดสอบสูตรอาหารที่คาดว่าเหมาะสมสำหรับการผลิตไลเปส โดยสูตรอาหารประกอบด้วย แหล่งคาร์บอนซึ่งใช้น้ำมันมะกอก 0.075% ที่ทำให้เป็นวัฏภาคเดียวโดยใช้ เลซิตินเป็นอิมัลซิฟายเออร์ และ มี yeast extract หรือ inorganic salt เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมีสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศ 200 รอบต่อนาที, ใช้เชื้อเริ่มต้นที่ความขุ่นเมื่อวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาว คลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8, อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ และเวลาเลี้ยงเชื้อ 6 ชั่วโมง ผลการทดสอบไลเปสที่ได้ในหลังเลี้ยงเชื้อโดยการวัดปริมาณกรดไขมันที่ถูกย่อยจากซับสเตรทด้วยการไตเตรทกับ 0.025 โมล โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์สูตรอาหารดังกล่าวได้ไลเปส 8.86 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ ค่าแอคติวิตีรวม 2,685 ยูนิต ไลเปสที่ได้เมื่อนำมาตกตะกอนหลังแยกด้วยด้วยวิธี aqueous two-phase systems โดยปรับสัดส่วนของ PEG กับแอมโมเนียมซัลเฟต พบสัดส่วนของ aqueous two-phase systems ที่เหมาะสม คือ มีอัตราส่วนของ PEG : แอมโมเนียมซัลเฟต : น้ำเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 35.00 : 6.00 : 59.00 เมื่อตกตะกอนแล้วนำไปหาแอคติวิตีจากน้ำเลี้ยงเชื้อ 300 มิลลิลิตรได้ไลเปสมีแอคติวิตี 13.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มีความบริสุทธิ์ 28.31 เท่า และได้ผลผลิต 34.8 เปอร์เซ็นต์ ไลเปสที่ได้เมื่อนำไปหาน้ำหนักโมเลกุลเปรียบเทียบด้วยวิธีเอสดีเอส-โพลีอะไครลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟรีซิสจะได้น้ำหนักโมเลกุล 79 กิโลดาลตัน.

ภาควิชา .....เทคโนโลยีทางชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต .....เขมาภรณ์ บุญบำรุง.....

สาขาวิชา .....เทคโนโลยีทางชีวภาพ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา .....2541..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

...พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว...

3970183323 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: LIPASE / *Bacillus subtilis*

KHAEMAPORN BOONBUMRUNG : PRODUCTION AND PARTIAL PURIFICATION OF LIPASE FROM IN VEGETABLE OIL AS CARBON SOURCE. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. SOPHON ROENGSUMRAN, Ph.D. , THESIS CO-ADVISOR : ASSIST. PROF. BYAPORN NA NAGARA, Ph.D. , 138 pp.
ISBN 974 – 332 – 436 – 4.

The culture of *Bacillus subtilis* ,which produced extracellular lipase,was tested for suitable medium for the production of lipase. The one phase medium which composed of 0.075 % olive oil as carbon source , 0.025 % lecithin as emulsifier , and yeast extract or inorganic salt as nitrogen source. The optimum conditions found for cultivation of *Bacillus subtilis* were agitation at 200 rpm, inoculation with bacteria concentration OD 0.1 at 600 nm, medium pH 6.8, and incubation at 30^{0}C for 6 hours before harvested. The result showed lipase activity as determination of fatty acids liberated by titration with 0.025 M KOH. After precipittation by $(NH_4)_2SO_4$ from each phase of the two-aqueous phase; the suitable ratio of the three components in the two-aqueous phase total lipase activity was found to be 35.00 : 6.00 : 59.00 for PEG 6000 : $(NH_4)_2SO_4$: culture filtrate. The lipase was purified up to 28.6 fold with and overall recovery of 34.8%. SDS-PAGE showed the major band with relative molecular weight (M_r) of 79 kDa.

ภาควิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. โสภณ เริงสำราญ อาจารย์ที่ปรึกษา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยพร ณ นคร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในการวิจัย และตรวจวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อุดม ก๊กผล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่ได้อนุญาตให้นำเชื้อ *Bacillus subtilis* ซึ่ง นางสาวเปรมสุดา สมาน เป็นผู้คัดแยกจาก อำเภอ ระโนด จังหวัด สงขลา มาทำการศึกษาต่อได้ และ รองศาสตราจารย์ ดร. วิชัย เชิดชีวศาสตร์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และคณาจารย์ในหลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ ที่ได้ให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่าง ๆ ในการวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี กราบขอบพระคุณคณาอาจารย์และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่คณะสหเวชศาสตร์ ที่ได้ให้ความสะดวกและความช่วยเหลือทางด้านสารเคมี เครื่องมือ อุปกรณ์การทดลอง ตลอดจนสถานที่การทำวิจัย ขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนอุดหนุนการวิจัย ขอบคุณเพื่อน พี่ และน้องในหลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ และในคณะสหเวชศาสตร์ สำหรับกำลังใจความช่วยเหลือและคำแนะนำต่าง ๆ ในการวิจัย

ท้ายสุดขอกราบขอบพระคุณ คุเนย่า บิดา มารดา พี่สาว พี่ชาย และน้องสาว ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำต่าง ๆ และ เป็นกำลังใจแก่ผู้เขียนจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญตาราง.....ฌ

สารบัญภาพ.....ฎ

บทที่

1 บทนำ.....1

2 ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์

2.1. ครุภัณฑ์.....26

2.2. เคมีภัณฑ์.....27

2.3. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง.....28

3. วิธีการทดลอง

3.1. การเก็บรักษาเชื้อ*Bacillus subtilis*.....29

3.2. การทำเชื้อตั้งต้น (start inoculum).....29

3.3. การเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis*.....30

3.4. การเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อสร้างไลเปส.....31

3.5. การวิเคราะห์หาประสิทธิภาพการทำงานของไลเปส.....33

3.6. การวัดปริมาณโปรตีน.....35

3.7. การหาน้ำหนักโมเลกุลของไลเปสโดยวิธีเอสดีเอส-
โพลีอะไครลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟลิซิส.....36

3.8. การทำให้ไลเปสบริสุทธิ์ขึ้นในบางส่วน.....39

4. ผลการทดลอง

4.1. ผลการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* ,ปริมาณโปรตีน
และไลเปสแอคติวิตี.....40

4.2. ผลการทดลองปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อให้ สร้างไลเปสได้สูงสุด.....44
4.3. ผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ที่ให้การสร้างไลเปสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ได้สูง.....46
4.4. ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำไลเปสให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยใช้ aqueous – two phase systems.....100
4.5. ผลการทดลองศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการตกตะกอนไลเปส.....101
4.6. ผลการหาน้ำหนักโมเลกุลไลเปสของ *Bacillus subtilis*.....104
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....105
เอกสารอ้างอิง.....112
ภาคผนวก.....116
ประวัติผู้เขียน.....122

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงการนำไลเปสจากจุลินทรีย์ไปใช้ในอุตสาหกรรม.....2
2. แสดง polymer systems ที่สามารถทำให้เกิดการแยกชั้นของสารละลายได้.....21
3. แสดงไลเปสแอคติวีตี และ total activity จากส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาณ 300 มิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 โดยเติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และเลซิติน 0.1% และไม่ปรับเป็น อิมัลชั่น เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะ 30 ^{0}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที.....54
4. แสดงไลเปสแอคติวีตี และ total activity จากส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาณ 300 มิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 โดยเติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และเลซิติน 0.1% และไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น และที่ปรับเป็นอิมัลชั่นมีน้ำมันมะกอก 0.075 % และ เลซิติน 0.025 % เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะ 30 ^{0}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที.....63
5. แสดงไลเปสแอคติวีตี และ total activity จากส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาณ 300 มิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 ที่ปรับเป็นอิมัลชั่นมีน้ำมันมะกอก 0.075 % และเลซิติน 0.025 % , มีน้ำมันมะกอก 0.05 % และ เลซิติน 0.05 % และ มีน้ำมันมะกอก 0.025 % และ เลซิติน 0.075 % เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะ 30 ^{0}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที.....72
6. แสดงไลเปสแอคติวีตี และ total activity จากส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาณ 300 มิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 โดยเติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และเลซิติน 0.1%

และไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที.....81

7. แสดงไลเปสแอคติวีตี และ total activity จากส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาณ 300 มิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 โดยเติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และเลซิติน 0.1% และไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น และที่ปรับเป็นอิมัลชั่นมีน้ำมันมะกอก 0.05 % และเลซิติน 0.05 % เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที.....90

8 แสดงไลเปสแอคติวีตี และ total activity จากส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาณ 300 มิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 ที่ปรับเป็นอิมัลชั่นมีน้ำมันมะกอก 0.075 % และเลซิติน 0.025 % , มีน้ำมันมะกอก 0.05 % และ เลซิติน 0.05 % และ มีน้ำมันมะกอก 0.025 % และ เลซิติน 0.075 % เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที.....99

9. แสดงการแยกไลเปสให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธี Aqueous- two vphase systems ระหว่าง PEG, $(NH_4)_2SO_4$ และน้ำเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* 103

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ หน้า

1. แสดงไลเปสชนิดที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งบนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์.....4
2. แสดงไลเปสชนิดที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง 1 และ 3 บนโมเลกุลไตรกลีเซอไรด์.....5
3. แสดงความสามารถในการทำงานของไลเปส.....7
4. แสดงลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของไลเปส.....9
5. โครงสร้างโดยทั่วไปของสารลดแรงตึงผิว (surfactant).....13
6. โครงสร้างของ phosphatidylcholine (lecithin).....14
7. แสดงถึงโครงสร้างของน้ำที่มีผลกระทบต่อวัฏภาคทั้งสอง.....19
8. เปรียบเทียบการเจริญ, ปริมาณโปรตีน และแอคติวิตีของไลเปส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 โดยเติมน้ำมันมะกอก 0.1 % เลี้ยงเชื้อในสภาวะ 30 ^{0}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที 42
9. แสดงเชื้อ *Bacillus subtilis*.....43
10. แสดงเลซิตินและน้ำมันมะกอกที่ใช้เป็นตัวกระตุ้นให้เชื้อ *Bacillus subtilis* สร้างไลเปส.....45
11. แสดงการเจริญ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 โดยเติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และเลซิติน 0.1% และไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น และที่ปรับเป็นอิมัลชั่นมีน้ำมันมะกอก 0.075 % และ เลซิติน 0.025 % เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะ 30 ^{0}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที โดยวัดการเจริญจาก OD_{600}.....47
12. แสดงปริมาณโปรตีน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 โดยเติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และเลซิติน 0.1% และไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น และที่ปรับเป็นอิมัลชั่นมีน้ำมันมะกอก 0.075 % และ เลซิติน 0.025 % เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะ 30 ^{0}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น

เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที วัด
ปริมาณโปรตีน โดยวิธีไบยูเร็ต เทียบค่า OD_{540}.....49
13. แสดงแอคติวิตีของไลเปส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ
สูตรพื้นฐานที่ 1 โดยเติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และเลซิติน 0.1% และไม่ปรับเป็น
อิมัลชั่น และที่ปรับเป็นอิมัลชั่นมีน้ำมันมะกอก 0.075 % และ เลซิติน 0.025 %
เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น
เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที วัดแอคติวิตี
ของไลเปสโดยไตเตรทกรดไขมัน.....51
14. แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน
ที่ไม่ปรับเป็น อิมัลชั่น.....52
15. แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ใน
อาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็น
อิมัลชั่น ในสภาวะ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น
เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที.....53
16. แสดงการเจริญ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร
พื้นฐานที่ 1 โดยเติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และเลซิติน 0.1% และไม่ปรับเป็น
อิมัลชั่น และที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.025% และน้ำมันมะกอก
0.075 % เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,
pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที
โดยวัดการเจริญจาก OD_{600}.....56
17. แสดงปริมาณโปรตีน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ
สูตรพื้นฐานที่ 1 โดยเติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และเลซิติน 0.1% และไม่ปรับ
เป็นอิมัลชั่น และที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.025% และน้ำมันมะกอก
0.075 % เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,
pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที
วัดปริมาณโปรตีน โดยวิธีไบยูเร็ต เทียบค่า OD_{540} 58
18. แสดงแอคติตีของไลเปส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ
สูตรพื้นฐานที่ 1 โดยเติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และเลซิติน 0.1% และไม่ปรับเป็น
อิมัลชั่น และที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.025% และน้ำมันมะกอก 0.075 %

เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาทีวัดปริมาณโปรตีนวัดแอคติวิตีของไลเปสโดยไตเตรทกรดไขมัน.....60

19. แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น และปรับเป็นอิมัลชั่นซึ่งมีเลซิติน 0.025% และน้ำมันมะกอก 0.075 %.....61

20. แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่นและปรับเป็นอิมัลชั่น ในสภาวะ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} ท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที.....62

21. แสดงการเจริญ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.025% และน้ำมันมะกอก 0.075 %, มีเลซิติน 0.05% และน้ำมันมะกอก 0.05 % และมีเลซิติน 0.075% และน้ำมันมะกอก 0.025 % เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาทีโดยวัดการเจริญจาก OD_{600}.....65

22. แสดงปริมาณโปรตีน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.025% และน้ำมันมะกอก 0.075 %, มีเลซิติน 0.05% และน้ำมันมะกอก 0.05 % และมีเลซิติน 0.075% และน้ำมันมะกอก 0.025 % เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาทีโดยวิธีไบยูเร็ต เทียบค่า OD_{540}.....67

23. แสดงแอคติวิตี เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.025% และน้ำมันมะกอก 0.075 %, มีเลซิติน 0.05% และน้ำมันมะกอก 0.05 % และมีเลซิติน 0.075% และน้ำมันมะกอก 0.025 % เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่า

ให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที วัดแอคติวิตีของไลเปสโดยไตเตรทกรดไขมัน.....69
24. แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปรับเป็นอิมัลชั่น.....70
25. แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ในสภาวะ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้นเป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที.....71
26. แสดงการเจริญ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 โดยเติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และเลซิติน 0.1% และไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น และที่ปรับเป็นอิมัลชั่นมีน้ำมันมะกอก 0.075 % และ เลซิติน 0.025 % เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที โดยวัดการเจริญจาก OD_{600}.....74
27. แสดงปริมาณโปรตีน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 โดยเติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และเลซิติน 0.1% และไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น และที่ปรับเป็น อิมัลชั่นมีน้ำมันมะกอก 0.075 % และ เลซิติน 0.025 % เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที วัดปริมาณโปรตีน โดยวิธีไบยูเร็ต เทียบค่า OD_{540}.....76
28. แสดงแอคติวิตีของไลเปส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 โดยเติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และเลซิติน 0.1% และไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น และที่ปรับเป็นอิมัลชั่นมีน้ำมันมะกอก 0.075 % และ เลซิติน 0.025 % เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที วัดแอคติวิตีของไลเปสโดยไตเตรทกรดไขมัน.....78
29. แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น.....79

30. แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ใน อาหารสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ ปรับเป็นอิมัลชั่น ในสภาวะ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที.....80

31. แสดงการเจริญ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร พื้นฐานที่ 2 โดยเติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และเลซิติน 0.1% และไม่ปรับ ป็นอิมัลชั่น และที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.05 % และน้ำมันมะกอก 0.05 % เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบ ต่อนาทีโดยวัดการเจริญจาก OD_{600}.....83

32. แสดงปริมาณโปรตีน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ สูตรพื้นฐานที่ 2 โดยเติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และเลซิติน 0.1% และไม่ ปรับเป็นอิมัลชั่น และที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.05 % และน้ำมัน มะกอก 0.05 % เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาทีวัดปริมาณโปรตีน โดยวิธีไบยูเร็ต เทียบค่า OD_{540}.....85

33. แสดงแอคติตีของไลเปส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ สูตรพื้นฐานที่ 2 โดยเติมน้ำมันมะกอก 0.1 % และเลซิติน 0.1% และไม่ปรับ เป็นอิมัลชั่น และที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.05 % และน้ำมันมะกอก 0.05 % เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อ นาทีวัดปริมาณโปรตีนวัดแอคติวิตีของไลเปสโดยไตเตรทกรดไขมัน.....87

34. แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น และปรับเป็นอิมัลชั่นซึ่งมีเลซิติน 0.05% และน้ำมัน มะกอก 0.05 %.....88

35. แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในอาหาร สูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ปรับเป็นอิมัลชั่น และปรับเป็นอิมัลชั่น ในสภาวะ 30 ^{o}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที.....89

36. แสดงการเจริญ เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.025% และน้ำมันมะกอก 0.075 %, มีเลซิติน 0.05% และน้ำมันมะกอก 0.05 % และมีเลซิติน 0.075% และน้ำมันมะกอก 0.025 % เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะ 30 ^{0}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาทีโดยวัดการเจริญจาก OD_{600}.....92

37. แสดงปริมาณโปรตีน เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.025% และน้ำมันมะกอก 0.075 %, มีเลซิติน 0.05% และน้ำมันมะกอก 0.05 % และมีเลซิติน 0.075% และน้ำมันมะกอก 0.025 % เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะ 30 ^{0}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาทีโดยวิธีไบยูเร็ต เทียบค่า OD_{540}.....94

38. แสดงแอคติวิตี เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 ที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ซึ่งมีเลซิติน 0.025% และน้ำมันมะกอก 0.075 % , มีเลซิติน 0.05% และน้ำมันมะกอก 0.05 % และมีเลซิติน 0.075% และน้ำมันมะกอก 0.025 % เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะ 30 ^{0}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที วัดแอคติวิตีของไลเปสโดยไตเตรทกรดไขมัน.....96

39. แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปรับเป็นอิมัลชั่น.....97

40. แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 2 มี $NaNH_4HPO_4.4H_2O$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ปรับเป็นอิมัลชั่น ในสภาวะ 30 ^{0}C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD_{600} เท่ากับ 0.1 ,pH ตั้งต้น เป็น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที.....98

41. แสดงการเกิด aqueous – two phase systems ระหว่าง PEG, $(NH_4)_2SO_4$ และน้ำเลี้ยงเชื้อ.....102

42. แสดงผลการแยกไลเปสเพื่อหาน้ำหนักโมเลกุล โดยวิธี SDS-polyacrylamide gel electrophoresis เมื่อเทียบกับสารมาตราฐาน.....104

คำย่อ

มก. = มิลลิกรัม

มล. = มิลลิลิตร

^{o}ซ = องศาเซลเซียส

mN/m = มิลลินิวตันต่อเมตร

PEG = polyethylene glycol

-ve = negative

+ve = positive

w/v = weight per volume

M = mole

OD_{600} = optical density ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

OD_{540} = optical density ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร