บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การศึกษาสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ใน การผลิตเอนไซม์ไลเปส

โดยปกติแบคทีเรียกลุ่มที่มีความสามารถ ในการสร้าง อาหารของตัวเองสูง จะสามารถเจริญพันธุ์ได้ในสภาวะที่มีสารเคมีง่ายๆโดยทั่วๆไปแล้วแร่ธาตุที่สำคัญในการเจริญพันธุ์ของแบคทีเรียจะประกอบไปด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และฟอสฟอรัส โดยแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างอาหารสูงนี้จะสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้และเจริญพันธุ์ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทราบองค์ประกอบทั้งหมด เรียกว่าอาหารประเภท synthetic หรือ defined medium ซึ่งโดยทั่วๆไปแล้วจะประกอบด้วย กลูโคส , NH_4Cl , Na_2SO_4,K_2HPO_4, $MgSO_4$และ $FeSO_4$ ในขณะที่สารเคมีจำเป็นอื่นๆในการเจริญพันธุ์ของแบคทีเรีย เช่น ไอออนของ Mn, Ca,Co, Mo,Cu และ Zn อาจจะมีความต้องการน้อยมาก และจะมีอยู่ในลักษณะที่เป็นสารปนเปื้อน (อมเรศ ภูมิรัตน, 2536) ความสามารถของแบคทีเรียในการใช้คาร์บอนในรูปของสารอินทรีย์จะถูกย่อยสลายโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) และ เพื่อให้ได้มาซึ่งพลังงาน และ intermediates ที่จำเป็นในการสร้างส่วนประกอบย่อยของเซลล์ ขบวนการที่ย่อยสลายมักจะเป็น Glycolytic pathway และ Tricarboxylic acid cycle (อมเรศ ภูมิรัตน์,2536)

ในการทดลองนี้ได้ทำการคัดเลือกสูตรอาหาร โดยคัดเลือกจากสูตรอาหารพื้นฐานสองสูตร ซึ่งมีความแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ ซึ่งสูตรอาหารพื้นฐานทั้งสูตรที่ 1 และ 2 ที่ใช้ในการทดลองนี้มีรายงานว่าเชื้อ *Bacillus spp.*สามารถเจริญเติบโตได้ดี (MG Halpern ,1981; Sadanobu และคณะ,1975) โดยในการทดลองนี้ทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ในปริมาณที่สูง จึงได้ปรับสูตรอาหารให้ปริมาณโปรตีนต่ำลงคือลดปริมาณจากเดิมโดยมีสารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 2.0% เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับเป็นใช้สารสกัดจากยีสต์ 0.5% เนื่องจาก(Lawrence ,1967) ได้รายงานไว้ว่าสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณที่สูงมากเกินไปจะมีผลต่อการเจริญ และการสร้างเอนไซม์ไลเปส และเปลี่ยนจากการใช้น้ำตากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน มาเติมน้ำมันมะกอก0.33% แทน จากรายงานของ Halpern, (1981) น้ำมันมะกอกเป็นสารอาหารประเภทคาร์บอน ที่นิยมใช้กระตุ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิต เอนไซม์ไลเปส ซึ่งชนิดและปริมาณที่เหมาะสมของทั้งแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนจได้ทดลองต่อไป

เลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปส ซึ่งชนิดและปริมาณที่เหมาะสมของทั้งแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอน จะได้ทดลองต่อไป

จากผลการทดลองภาพที่ 4 จะเห็นว่าสูตรอาหารพื้นฐานทั้งสูตรที่ 1 และ 2 เชื้อจะเริ่มเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 18 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ โดยเชื้อจะเจริญในอาหารสูตรที่ 2 ได้ดีกว่า เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 20 จะมีการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนถึงชั่วโมงที่ 24 และการเจริญจะคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 27.5 การเจริญจะลดลงช้า ๆ ในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างสูงหรือที่เรียกว่า การเจริญช่วง Logarithmic phase นั้น พบการสร้างเอนไซม์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4.5 จนถึงชั่วโมงที่ 10.5 โดยพบเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 6 และลดลงเล็กน้อยในชั่วโมงที่ 7.5 ดังนั้นการสร้างเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* จะเกิดในช่วงกลางของการเจริญระยะ Logarithmic phase ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Lessuise(1993) ที่รายงานไว้ว่าพบเอนไซม์ไลเปสของ *Bacillus subtilis* strain BCL 1051 ในชั่วโมงที่ 4 และพบเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 7 หลังจากชั่วโมงที่ 8 แล้วปริมาณเอนไซม์เริ่มลดลง แม้ว่าจะเลี้ยงในอาหารที่ต่างกัน

การเปลี่ยนแปลง pH ระหว่างการเลี้ยงเชื้อที่เหมือนกันคือ pH จะเริ่มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อจนถึงชั่วโมงที่6 และค่อย ๆเพิ่มขึ้นจน pH เท่า pH ตั้งต้นในชั่วโมงที่ 9 และเพิ่มขึ้นจนกระทั่ง pH มากกว่า pH เริ่มต้นประมาณ 1 หน่วย ซึ่งปกติการเลี้ยงเชื้อแบบใช้ขวดเขย่าจะมีการเปลี่ยนแปลง pH มากในระหว่างการเลี้ยง และมีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อโดยที่การเปลี่ยนแปลง pH จะลดลงในระยะที่มีการเจริญสูง ในภาวะที่การเลี้ยงเชื้อไม่มีการควบคุม pH หรือไม่สามารถควบคุมได้ก็จะทำให้ pH เริ่มต้นและเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงแตกต่างกันมาก การเปลี่ยนแปลงของ pH ในช่วงแรกนั้นเป็นผลจากการที่เชื้อจุลินทรีย์นำน้ำมันมะกอกซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวได้ถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานในขบวนการเมทาบอลิซึมของน้ำมันมะกอกซึ่งจะให้ผลิตภัณฑ์คือกรดโอเลอิก ดังนั้นเมื่อมีกรดไขมันซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มปริมาณสูงขึ้นทำให้ pH ลดต่ำลงจนกระทั่งเกิดการเปลี่ยนแปลงของ pH ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อลดลงตั้งแต่ชั่วโมงแรกของการเลี้ยง หลังจากนั้นมีการควบคุม pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ในสูตรอาหารเพื่อให้ระดับ pH เกิดสูงขึ้นช่วงหลังของการเจริญของเชื้อ

ส่วนประกอบของอาหารสูตรพื้นฐานทั้งสองสูตรมีความแตกต่างกันในชนิดและปริมาณของสารประกอบโดยอาหารสูตรที่ 2 มีส่วนประกอบไอออนโลหะที่มีส่วนช่วยในการเจริญของเชื้อ *Bacillus spp.* ด้วยคือแมงกานีส เหล็กและสังกะสี (สุพจน์,2530) ซึ่งผลปรากฏว่าการใช้อาหารสูตรที่ 2 ทำให้เชื้อเจริญดีขึ้นจริงแต่ลดการผลิตเอนไซม์ไลเปสลงดังนั้นจึงเลือกอาหารสูตรที่ 1 เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เพราะมีราคาถูกและให้ Total activity สูงกว่า

5.2 การหาสภาวะการเขย่าให้อากาศที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis*

การศึกษาผลของการเขย่าให้อากาศที่ความเร็วรอบต่าง ๆต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารพื้นฐานสูตรที่ 1 มีส่วนประกอบตามวิธีการทดลองในข้อ 3.1.2 เลี้ยงเชื้อที่ 30°ซ มีความขุ่นตั้งต้นเท่ากับ 0.1 และ pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8 และทำการแปรผันจำนวนรอบของการเขย่าให้อากาศเป็น 150, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที ดังรายละเอียดการทดลองในข้อ 3.4 ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 5 จะเห็นว่าที่ความเร็วรอบการเขย่าเท่ากับ 150 รอบต่อนาทีจะเริ่มพบแอคติวิตีของเอนไซม์ในชั่วโมงที่ 6 โดยจะพบแอคติวิตีสูงสุดในชั่วโมงที่ 7.5 และมียูนิตแอคติวิตีต่อน้ำเลี้ยงเชื้อต่ำกว่าเมื่อเขย่าให้อากาศที่ความเร็วรอบ 200 และ 250 รอบต่อนาที ทั้งนี้เป็นเพราะในขบวนการย่อยสลายแหล่งอาหารหรือแหล่งพลังงานจะถูกย่อยสลายโดยปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆภายในเซลล์จนกระทั่งถึงขบวนการสุดท้ายที่มีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลกตรอนตัวสุดท้าย(Doelle,1985) อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนโดยการเขย่าให้อากาศที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาทีมีการเจริญสูงขึ้นในระยะ 10.5ชั่วโมงแรกแต่ไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์เลย ผลการทดลองนี้ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าปริมาณออกซิเจนที่มากเกินไปจะมีผลต่อความสามารถในการหลั่งเอนไซม์ไลเปสอย่างไร

สำหรับการเปลี่ยนแปลง pH มีความคล้ายคลึงกันในการเขย่าให้อากาศ 200 และ 250 รอบต่อนาที แต่การเขย่าให้อากาศเท่ากับ 150 รอบต่อนาที อัตราการลดของ pH จะเป็นไปอย่างช้า ๆ และในปริมาณของหน่วย pH ที่น้อยกว่าทั้งนี้เป็นเพราะอัตราการเจริญและการสร้างแอคติวิตีของเอนไซม์น้อยนั่นเอง สำหรับการเปลี่ยนแปลง pH เมื่อเขย่าให้อากาศที่ความเร็วการให้อากาศ 300 รอบต่อนาที การเปลี่ยนแปลง pH จะมีการลดลงและเพิ่มขึ้นในช่วงเวลาที่สั้นกว่าเมื่อเขย่าให้อากาศ 200 และ 250 รอบต่อนาที แสดงว่าผลิตภัณฑ์กรดไขมันจากปฏิกิริยาการย่อยสลาย น้ำมันมะกอกของไลเปสไม่เกิดเมื่อทำการเขย่าให้อากาศที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที

5.3 การหาปริมาณความขุ่นของเซลล์ตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis*

การหาปริมาณความขุ่นของเซลล์ตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรที่ 1 มีส่วนประกอบตามวิธีการทดลองในข้อ 3.1.2 เลี้ยงเชื้อที่ 30°C ให้ pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8 และทำการแปรผันปริมาณความขุ่นเริ่มต้นเป็น 0.05,0.1,0.15, และ 0.2 ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 6ก จะเห็นว่าการให้ความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 และ 0.15 พบแอคติวิตีของเอนไซม์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4.5 ถึงชั่วโมงที่ 10.5 โดยในชั่วโมงที่ 6 พบแอคติวิตีของเอนไซม์สูงที่สุดแต่ถ้าลดความขุ่นตั้งต้นเป็น 0.05 จะเริ่มพบแอคติวิตีของเอนไซม์ในชั่วโมงที่ 6 จนถึง 10.5 โดยในชั่วโมงที่ 7.5 แอคติวิตีของเอนไซม์สูงที่สุด และมียูนิตแอคติวิตีต่อน้ำเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.9 ยูนิต ซึ่งน้อยกว่าเมื่อให้ความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 และ 0.15 เนื่องจากการแบ่งตัวของเซลล์แบคทีเรียในระยะ Logarithmic phase จะแบ่งตัวแต่ละครั้งด้วยอัตราคงที่ แบคทีเรียจะมี generation time สำหรับการเจริญพันธุ์ในสิ่งแวดล้อมหนึ่งคงที่เสมอและอัตราการแบ่งตัว

คงที่ตลอดระยะโดยที่ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ต่อปริมาณความเข้มข้นของสับเสตรทจะมีผลต่อการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรียสูงเมื่ออัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์ต่อปริมาณสับเสตรทมีมากการเจริญจะลดต่ำลง แต่ถ้าอัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์ต่อความเข้มข้นของสับเสตรทไม่สูงจะไม่มีผลต่อการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย (อรษา สุดเธียรกุลและ พิมพันธุ์ เลียงพิบูล) ดังนั้นเมื่อให้ความขุ่นตั้งต้นของเซลล์ต่ำลง (0.05) อัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์ต่อน้ำเลี้ยงเชื้อต่ำลงโดยที่อัตราการแบ่งตัวของแบคทีเรียยังคงที่ดังนั้นเนื่องจากมีปริมาณเซลล์ในน้ำเลี้ยงเชื้อต่ำลงจึงทำให้การพบแอคติวิตีของเอนไซม์จึงช้าลงและน้อยลงด้วย แต่เมื่อเพิ่มความขุ่นตั้งต้นเป็น 0.2 กลับตรวจไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์เลย ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อปริมาณความขุ่นตั้งต้นสูง (0.2) การแบ่งตัวของเซลล์ในระยะแรกสูงทำให้จำนวนเซลล์ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อสูงจึงเกิดการแย่งอาหารดังนั้นจึงอาจจะเกิดภาวะแบคทีเรียสร้างสปอร์ซึ่งเป็นการหยุดการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆภายในเซลล์ทำให้ตรวจไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส

5.4 <u>การหา pH ตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis*</u>

การหา pH ตั้งต้นที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ความขุ่นตั้งต้นเท่ากับ 0.1 และความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที จะเห็นได้ว่าเมื่อให้ pH 6.5,6.8,7.0 และ 7.5 การเจริญของเชื้อจะใกล้เคียงกันโดยที่ pH ตั้งต้น 7.5 จะมีการเจริญต่ำกว่าที่ pH ตั้งต้น 5.5 ส่วนที่ pH ตั้งต้น 4.5 เชื้อจะไม่มีการเจริญเลย ทั้งนี้เนื่องจาก Terry และคณะ (1985) พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เมื่อเลี้ยงเชื้อที่ pH 4.5 ไม่พบการเจริญของเชื้อเลยเนื่องจากเชื้อตัวนี้ต้องการสภาวะเป็นกลางในการเจริญเดิบโตที่pH เริ่มต้น 7.5 ไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์นั้นเนื่องมาจากเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ทำงานได้น้อยมากที่ pH 7.5 (ผลการทดลองภาพที่7)

5.5. <u>การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtills*</u>

การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารพื้นฐานสูตรที่ 1 ให้ pH ตั้งต้นเท่ากับ 6.8 ความเร็วในการเขย่าให้อากาศ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นเท่ากับ 0.1 นำมาเลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าปรับอุณหภูมิได้ 30° ซ และ 37 °ซ เมื่อเปรียบเทียบการเจริญ พบว่าเชื้อจะเจริญได้ดีกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อที่ 37°ซ แต่เมื่อนำมาตรวจวัดหาแอคติวิตีของเอนไซม์กลับไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์เลย ในขณะที่ถ้าเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ พบแอคติวิตีของเอนไซม์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4.5 จนถึงชั่วโมงที่ 10.5 และพบแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 6 การที่ผลเป็นเช่นนี้เนื่องจากขบวนการหลั่งเอนไซม์ไลเปสในเชื้อชนิดนี้อาจถูกควบคุมโดยอุณหภูมิที่ 30°ซจึงไม่สามารถตรวจพบการทำงานของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ

5.6 การตรวจหาภาวะเหมาะสมในการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส ของเชื้อ *Bacillus subtilis*

โดยปกติแล้วไม่สามารถหาการทำงานของเอนไซม์ไลเปสโดยการคำนวณทาง kinetic เนื่องจากซับเสตรทอยู่ในภาวะที่ไม่ละลายน้ำทำให้เกิดการประยุกต์ใช้ parameter อื่นๆเช่นการคำนวณอัตราเร็วเริ่มต้นจากจำนวนโมเลกุลของเอนไซม์ไลเปสที่ถูกดูดซึมที่พื้นผิวสัมผัสระหว่าง น้ำและน้ำมัน ดังนั้นอัตราเร็วเริ่มต้นจึงขึ้นกับพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำและน้ำมัน และค่า K_m เป็นค่าของปริมาณพื้นที่ผิวสัมผัสที่ถูกแบ่งโดยสาร emulsion และถ้านำ parameter ไปเขียนกราฟก็จะได้ Lineweaver Burk กราฟเส้นตรง (Mukataka,1985)

จากการทดลองศึกษาหาภาวะเหมาะสมในการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* กำหนดให้อัตราเร็วในการปั่นสารที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 7 นาทีตลอดการทดลอง ดังนั้นพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างซับเสตรทและเอนไซม์จะคงที่ จึงได้ทำการทดลองหาการทำงานของเอนไซม์โดยการคำนวณทาง kinetic ได้

5.6.1 การวัดความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา

การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารพื้นฐานสูตรที่ 1 ให้ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.8 ความเร็วในการเขย่าให้อากาศ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นเท่ากับ 0.1 นำมาเลี้ยงเชื้อในเครื่องปรับอุณหภูมิได้ที่ 30°ซ เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.8 ได้ผลการทดลองดังภาพที่9 ในช่วงเริ่มต้นการเพิ่มปริมาณกรดไขมันเป็นปฏิภาคโดยตรงกับการเพิ่มเวลา ช่วงที่กราฟเป็นเส้นตรงเนื่องจากความเร็วของการเกิดกรดไขมันต่อหน่วยเวลาเป็นไปอย่างสม่ำเสมอ แต่ระยะหลังกราฟจะคงที่เนื่องจากความเร็วในการเกิดกรดไขมันค่อยๆลดต่ำลงจากตอนต้น ดังนั้นช่วง 30 นาทีแรก จึงเป็นเวลาที่เหมาะสมนำมาวัดความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา ซึ่งได้เท่ากับ 2.2/30 ซึ่งเท่ากับ 0.073 μmol/min และในการตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์จึงกำหนดให้วัดการทำงานในเวลา 30 นาที ซึ่งเป็นช่วง first-order kinetic ของอัตราการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับซับเสตรทซึ่งมีแนวโน้มเป็นเส้นตรง เป็นเวลาที่เหมาะสมในการวัดหาแอคติวิตีของเอนไซม์

5.6.2 ศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส

ทำการศึกษาโดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรพื้นฐานสูตรที่ 1 ที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.8 อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศ 200 รอบต่อนาที ให้ความขุ่นเริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.1 เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีความขุ่นเท่ากับ 0.8 นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ออกนำส่วนใสมาศึกษาหาปริมาณของเอนไซม์ที่เหมาะสม ทำการศึกษาหาความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสโดย นำน้ำเลี้ยงเชื้อ ปริมาณ 0.3,0.4,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5และ 3.0 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7.0 ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 10 จะเห็นว่าเริ่มตรวจพบแอคติวิตีของ

เอนไซมเมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์0.3 มล. เริ่มตรวจพบแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.5 มล. เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์สูงกว่านี้จะไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเลยแสดงว่าปริมาณเอนไซม์ 0.5 มล.มีปริมาณที่พอเหมาะกับจำนวนซับเสตรทที่อยู่ในปฏิกิริยาอย่างเหมาะสมได้แอคติวิตีสูงสุด แต่เมื่อปริมาณเอนไซม์มากกว่า 0.5 มล. จะทำให้มีปริมาณเอนไซม์มากเกินพอกับจำนวนซับเสตรทที่มีอยู่อย่างจำกัด ดังนั้นกราฟแอคติวิตีของเอนไซม์จะเริ่มคงที่เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์มากกว่า 0.5มล.

5.6.3 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส

ทำการศึกษาโดยเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารสูตรที่ 1 ให้ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8 ความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมงจนมีความขุ่นเท่ากับ 0.8 นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ออกแล้วนำส่วนใสที่ได้มาทำการวิเคราะห์หาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสโดยนำเอนไซม์ปริมาณ 0.5 มล. เติมลงในซับเสตรทคือ emulsion ของน้ำมันมะกอก 1% ใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 มาบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆคือ 30°ซ, 37 °ซ, 45 °ซ, 60 °ซ และ 80 °ซ ผลการทดลองเป็นดังภาพที่ 11 จะเห็นว่าเมื่อ อุณหภูมิสูงขึ้นแอคติวิตีของเอนไซม์เพิ่มขึ้นและเอนไซม์ทำงานได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 45°ซและแอคติวิตีลดลงเล็กน้อยที่อุณหภูมิ 60 °ซ แต่ไม่สามารถพบแอคติวิตีของเอนไซม์เลยเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 80°ซ ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อเพิ่มอุณหภูมิแล้วความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นเนื่องจากโมเลกุลของซับเสตรทและโมเลกุลของเอนไซม์มีโอกาสชนกันและทำปฏิกิริยากันมากขึ้น ถ้าเพิ่มอุณหภูมิมากๆแล้วความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาจะลดลงเนื่องจากเอนไซม์เสียสภาพเดิมทางธรรมชาติ ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คือ 45°ซ

5.6.4 ศึกษาผลของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Bacillus subtilis*

ทำการศึกษาโดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 ให้ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.8 ความขุ่นเริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.1 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ โดยให้ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมงจนมีความขุ่นเท่ากับ 0.8 นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ออก นำส่วนใสมาศึกษาหา pH ที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อโดยการเติมเอนไซม์ปริมาณ 0.5 มล. ลงในซับเสตรทได้แก่ emulsion ของน้ำมันมะกอก 1% และเติม บัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆต่อไปนี้คือ อะซิเตทบัฟเฟอร์ ที่ pH 3.7 และ 4.8 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7.0 และคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ที่ pH 9.5 และ 10.5 ผลการทดลองเป็นดังรูปที่ 10 เอนไซม์ไลเปสสามารถทำงานได้ในช่วงตั้งแต่ pH 3.7-7.0 โดย pH ที่เหมาะสมที่สุดในการทำงานของเอนไซม์คือ pH 4.8 เนื่องจากว่าในช่วง pH 4.8 มีการเติม H^+ เข้าไปที่ active site ของเอนไซม์ทำให้บริเวณเร่งของเอนไซม์

สามารถจับกับซับเสตรทได้พอเหมาะทำให้เกิดปฏิกิริยาได้ดีในขณะที่ช่วง pH อื่นๆบริเวณแร่งของเอนไซม์ไม่สามารถเข้าจับกับซับเสตรทได้พอดี

5.6.5 ศึกษาผลของซับเสตรทต่อแอคติวิตีของเอนไซม์

ทำการศึกษาโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 ให้ pH เริ่มต้นเป็น 6.8 ความขุ่นเริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.1 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ โดยให้ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมงจนมีความขุ่นเท่ากับ 0.8 นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นแยกเซลล์ออก นำส่วนใสมาศึกษาหาปริมาณของ

ซับสเตรทที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อโดยการเติมเอนไซม์ 0.5 มล. ลงในซับเสตรทที่มีความเข้มข้นเป็น % ของน้ำมันมะกอกที่เติมลงใน gum arabic ต่างๆ แล้วบ่มเอนไซม์ที่ อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัดปริมาณกรดไขมันที่เกิดขึ้นได้ผลดังภาพที่ 13 ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นว่ากราฟจะค่อยๆเพิ่มขึ้นในรูป hyperbolar และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นจนถึง 1% ของน้ำมันมะกอกแล้วกรดไขมันซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จะค่อนข้างคงที่ ดังนั้นค่า Vmax เท่ากับเมื่อใช้น้ำมันมะกอกเป็นซับสเตรทคือที่ 1% emulsion และ K_m เท่ากับ 0.5 สำหรับ TWEEN 80ปฏิบัติเช่นเดียวกับน้ำมันมะกอก ปรากฏผลดังภาพที่ 13 จะเห็นได้ว่า Vmax ของน้ำมันมะกอกไม่สามารถเปรียบเทียบVmax ของ TWEEN 80 ได้เนื่องจาก TWEEN80 เป็นซับสเตรทที่มีสมบัติละลายน้ำได้ซึ่งพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำและโมเลกุลของ TWEEN80 จะต้องมากกว่าพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำและ emulsion ของน้ำมันมะกอกแต่อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองพอจะกล่าวได้ว่าเอนไซม์ไลเปสนี้มีความสามารถในการไฮโดรไลส์ซับเสตรทที่เป็น TWEEN80 ซึ่งมีสมบัติในการละลายน้ำแต่อย่างไรก็ตามการหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสมักจะใช้น้ำมันมะกอกซึ่งมีส่วนประกอบของกรดโอเลอิคเป็นซับเสตรทเนื่องจาก TWEEN 80 มีสมบัติในการละลายเอนไซม์เอสเทอเรสบางชนิดสามารถให้แอคติวิตีได้จึงไม่เป็นซับเสตรทที่เหมาะสำหรับการหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส (Macrae,1983)
ดังนั้นจึงใช้น้ำมันมะกอกเป็นสับสเตรทที่เหมาะสมสำหรับการหาแอคติวิตีของเอนไซม์ตลอดการ

5.6.5 ศึกษาชนิดของสารยับยั้งที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์

จากผลการศึกษาชนิดของสารยับยั้งในการทดลองข้อ 4.2.6 ปรากฏ ว่า EDTA สามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้สมบูรณ์เพราะเอนไซม์ไลเปสต้องการ Divalent cation เป็น cofactor ของการทำงานของเอนไซม์ ซึ่ง EDTA จะไป chelate cofactor เหล่านี้ทำให้เอนไซม์ไม่มี cofactor มาช่วยในการทำงาน ในขณะที่ $HgCl_2$ สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้สมบูรณ์และ $NiCl_2$ และ$FeCl_3$ สามารถยับยั้งเอนไซม์ได้บางส่วนเนื่องจากไอออนของ Hg^{2+} ,Ni^{2+}และ Fe^{3+} จะเข้าไปรบกวนตำแหน่งที่เข้าทำงานของเอนไซม์ (Lesuisse, 1993)ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Muderhwa(1985)

5.7 การเลือกวัตถุดิบที่เหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งต้นคอคาร์บอน

เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรที่ 1 ที่มีสารสกัดจากยีสต์ 0.5%(w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน และน้ำมันพืชชนิดต่างๆที่ผลิตในประเทศเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ โดยแทนที่น้ำมันมะกอกด้วยน้ำมันพืชชนิดต่างๆคือ น้ำมันละหุ่ง น้ำมันงา น้ำมันปาล์ม น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันรำข้าว น้ำมันข้าวโพด และน้ำมันดอกคำฝอย ปริมาณ 0.33 %เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซให้ความขุ่นของเซลล์ดั้งต้นเท่ากับ 0.1 pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8 ให้ความเร็วรอบในการให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที จะเห็นว่าเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งต้นคอคาร์บอนเป็นน้ำมันพืชชนิดต่างๆจะมีความสามารถในการเจริญใกล้เคียงกันมาก แต่เมื่อพิจารณาแอคติวิตีของเอนไซม์ในผลการทดลองดังภาพที่ 15ข จะเห็นว่าน้ำมันละหุ่งสามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ได้ดีที่สุด คือ 10.5 ยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ในขณะที่น้ำมันมะกอกให้ยูนิตแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 8.3 ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำมันรำข้าว ส่วนน้ำมันดอกคำฝอยและน้ำมันข้าวโพดให้ยูนิตแอคติวิตี 4.2 และ 2.8 ในขณะที่น้ำมันถั่วเหลืองไม่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์เลยทั้งนี้อาจเนื่องมาจากน้ำมันถั่วเหลืองไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เชื้อ *Bacillus subtilis* สร้างเอนไซม์ได้ เนื่องจากกรดไขมันในน้ำมันถั่วเหลืองไม่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์และจากการที่เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* สามารถไฮโดรไลส์น้ำมันพืชชนิดต่างๆได้ต่างกันโดยสามารถไฮโดรไลส์น้ำมันละหุ่งได้ดีที่สุด อาจเนื่องมาจากส่วนประกอบของน้ำมันชนิดต่างๆมีความแตกต่างกัน(ตารางที่24)ชนิดของกรดไขมันแตกต่างกันทำให้สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ได้ต่างกัน (Macrae,1983)

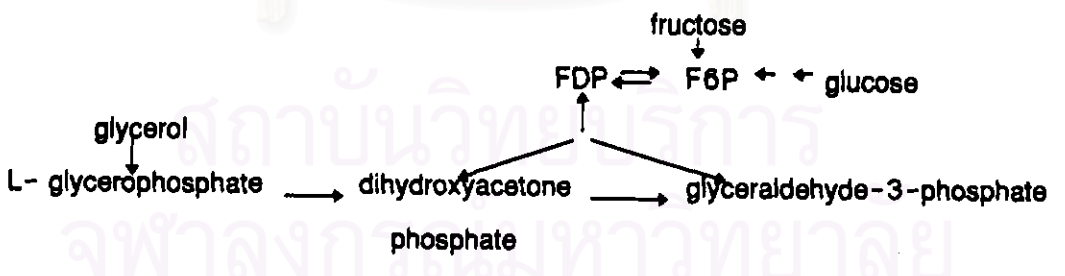
ตารางที่24 แสดงชนิดของกรดไขมันของน้ำมันพืชชนิดต่างๆ

oil	8:0	10:0	12:0	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	20;1+ 22:1	other
corn	0	0	0	1	14	2	30	50	2	0	1
olive	0	0	0	trace	12	2	72	11	1	0	2
Palm	0	0	trace	1	42	4	43	8	trace	0	2
Suffl ower (high oleic)	0	0	0	0	5	2	73	17	1	0	2

ที่มา :Gurr and Harwood,1991

จากตารางไม่ได้แสดงองค์ประกอบของน้ำมันละหุ่งและน้ำมันถั่วเหลืองไว้ อย่างไรก็ตามการใช้น้ำมันพืชต่างชนิดกันมีผลต่อการให้เอนไซม์ต่างกันซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Omar(1986)

ดังนั้นน้ำมันละหุ่งจึงเป็นน้ำมันพืชที่เหมาะสมในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไลเปส แต่อย่างไรก็ตาม การใช้น้ำมันเป็นตัวกระตุ้นเอนไซม์มีข้อเสียคือน้ำมันและน้ำไม่ละลายเป็นเนื้อเดียวกันทำให้มีผลเสียต่อการนำเอนไซม์ไปหาแอคติวิตีเนื่องจากน้ำมันเป็นซับเสตรทของเอนไซม์ด้วยนอกจากนี้ถ้าใช้น้ำมันในปริมาณที่เข้มข้นเกินไปจะมีเซลล์ของแบคทีเรียบางส่วนลอยไปอยู่ที่ผิวทำให้การหาค่าความขุ่นของเอนไซม์ผิดพลาดไปจากค่าที่ถูกต้องซึ่งปัญหานี้แก้โดยใช้น้ำมันเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเป็นตัวกระตุ้นทั้งนี้เป็นปริมาณที่พอเพียงสำหรับการทำงานของเอนไซม์เนื่องจาก ยังมีส่วนของน้ำมันหลงเหลืออยู่หลังจากสิ้นสุดการทดลอง แต่อย่างไรก็ดีเพื่อเป็นความพยายามที่จะกำจัดปัญหาเหล่านี้จึงทดลองใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อแทนน้ำมันได้ผลการทดลองดังภาพที่ 13 จะเห็นว่าเมื่อใช้น้ำตาลฟรุคโตส กลูโคส ฟรุคโตส กาแลคโตส และน้ำตาลซูโครส ปริมาณ 1% เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำมันมะกอกปรากฏว่าน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโตส 1% สามารถทำให้หลั่งเอนไซม์ไลเปสได้ โดยได้ยูนิตแอคติวิตีของเอนไซม์ดังภาพที่ 13 ซึ่งการที่แบคทีเรียสามารถนำน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดไปใช้ในการเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสอาจจะเกิดจากผลิตภัณฑ์ของไลเปสคือ glycerol จะถูกนำมาสลายเป็นแหล่งพลังงานผ่านวิถีไกลโคไลซิส ดังนั้นถ้ามีน้ำตาลฟรุคโตสหรือน้ำตาลกลูโคสจะช่วยเพิ่ม intermediates ในไกลโคไลซิสให้มากขึ้นเพื่อช่วยในการสลาย glycerol เป็นแหล่งพลังงานมากขึ้นแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจึงสูงขึ้นเมื่อใช้น้ำตาลเหล่านี้ (ในภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 แสดงความสามารถในการนำน้ำตาลฟรุคโตสและน้ำตาลกลูโคสมาใช้ในวงจรการ metabolism ของกลีเซอรอลของอะซิติคแอซิดแบคทีเรีย

ที่มา: Doell,1975

อย่างไรก็ตามน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโตส 1% มีราคาแพงเมื่อเทียบกับการใช้น้ำมันละหุ่งและเมื่อทดลองใช้แป้งมันสำปะหลัง ปรากฏว่าการใช้แป้งมันสำปะหลัง 1% สามารถให้แอคติวิตีของเอนไซม์ได้ไม่สูงมาก คือ 5.0 ยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตรเนื่องจากมีเอนไซม์อะไมเลสคอยทำหน้าที่ย่อยแป้งในชั่วโมงที่ 6 และ 7.5 แต่อย่างไรก็ตามปริมาณเอนไซม์ได้

จากการทดลองใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนน้อยเมื่อเทียบกับการใช้น้ำมันละหุ่ง และยังมีข้อเสียคือพบเอนไซม์ในช่วงระยะเวลาที่สั้นและการเก็บเอนไซม์ยังถูกรบกวนจากแป้งที่ยังเหลืออยู่จากการไฮโดรไลส์ของเอนไซม์อะไมเลส และเมื่อทดลองนำน้ำตาลกลูโคส 1% น้ำตาลฟรุคโตส 1% และแป้งมันสำปะหลัง 1% มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมร่วมกับ น้ำมันละหุ่ง 0.33 % ปรากฏว่าเมื่อใช้น้ำตาลฟรุคโตส 1%และน้ำมันละหุ่ง 0.33 % เป็นแหล่งคาร์บอนไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์เลย แต่เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส1%และน้ำมันละหุ่ง 0.33 % และแป้งมันสำปะหลัง 1% และน้ำมันละหุ่ง 0.33 % เชื้อจะสามารถผลิตเอนไซม์ได้แต่ได้ในปริมาณที่น้อยมาก คือ 3.8 และ 5.0 ยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิตร ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากการใช้สาร 2 ชนิดเป็นแหล่งอาหารของเชื้อสารอาหารทั้ง 2 ชนิดที่เติมลงไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์ของไลเปสเนื่องมาจากการกดดันการผลิตเอนไซม์ด้วยน้ำตาลหรือแป้งเมื่อมีน้ำมันละหุ่งอยู่ด้วย

ดังนั้นจึงเลือกนั้นจึงเลือกน้ำมันละหุ่งปริมาณ 0.33% เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปส

5.8 <u>การเลือกวัตถุดิบที่เหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน</u>

ทำการทดลองโดยใช้น้ำมันมะกอก 0.33% เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเลี้ยงเชื้อ และแปรผันสารสกัดจากยีสต์ เป็น 0.01,0.1,0.3,0.4,0.5 และ 2.0 % ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 21 จะเห็นว่าในภาพที่21ก เชื้อ *Bacillus subtilis* มีการเจริญที่ใกล้เคียงกันเมื่อเลี้ยงในสารอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์ 0.3-1.0% โดยการเลี้ยงเชื้อในสารอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์ 0.01และ 0.1% เชื้อไม่เจริญเลย และตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อใช้สารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้น 0.4,0.5 และ 1.0% โดยที่ 0.5 และ 1.0% ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดใกล้เคียงกันคือ 8.0 ยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Lawrence et al.,1967 ที่กล่าวว่าสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณที่ไม่สูงเกินไปจะมีผลให้แบคทีเรียนำแหล่งไนโตรเจนที่ไปผลิตเอนไซม์ไลเปสได้เพราะแหล่งไนโตรเจนที่สูงมากไปมีผลกดดันการสร้างเอนไซม์ อย่างไรก็ตามจากการทดลองถ้าเก็บเชื้อ *Bacillus subtilis* ในสารอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์สูง2.0% เป็นเวลานานจะมีผลทำให้แบคทีเรียหยุดสร้างเอนไซม์ไลเปสได้ดังนั้นในการทดลองจึงควรทำการกระตุ้นและเก็บเซลล์แบคทีเรียในอาหารที่มีน้ำมันเป็นสับเสตรทและมีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนในปริมาณต่ำ คือ 0.5g%

เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณแอคติวิตีของเอนไซม์จึงทดลองใช้สารไนโตรเจนชนิดอื่นๆ มาเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ ทริปโตน โซเดียมไนเตรท ยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรท เปปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณ 0.2% โดยมีน้ำมันละหุ่ง 0.33% เป็นแหล่งคาร์บอนได้ผลดังการทดลองในภาพที่ 22 จะเห็นว่าแอมโมเนียมไนเตรทสามารถเพิ่มความสามารถในการผลิต ไลเปสได้คือเท่ากับ12.8 ยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มล.เมื่อเทียบกับการเลี้ยงเชื้อโดยมีน้ำมันละหุ่ง 0.33% เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนและ มีสารสกัดจากยีสต์ 0.5%(w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียวได้แอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 9.8 ยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1มล. ส่วนสารประกอบไนโตรเจนชนิดอื่นไม่มีผลต่อการ

ผลิตเอนไซม์ไลเปสให้สูงขึ้น แสดงว่าการเพิ่มปริมาณแอมโมเนียมไนเตรทในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงขึ้น เพราะแอมโมเนียมไนเตรทเป็นสารอนินทรีย์ที่เซลล์สามารถนำไปใช้ในการสร้างกรดอะมิโนได้โดยตรงซึ่งต่างกับองค์ประกอบไนโตรเจนในสารสกัดจากยีสต์ เป็นสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลใหญ่ต้องผ่านกระบวนการย่อยสลายเป็นหน่วยย่อยก่อนนำไปสร้างเอนไซม์ไลเปส เมื่อใช้ยูเรียแล้วแอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเนื่องจากในยูเรียมีส่วนประกอบของ $2(NH_4)^+$ ซึ่งมากเกินไปจึงกดดันการผลิตเอนไซม์ไลเปสอย่างไรก็ดีในการทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อลดต้นทุนการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* จึงได้ทดลองหากากอาหารที่เหลือจากการนำไปผลิตเป็นอาหารสัตว์ ได้แก่กากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวัน มาใช้แทนสารสกัดจากยีสต์เพื่อลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ไลเปสลง จึงได้ทดลองนำสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสม (0.5%w/v) ไปหาปริมาณไนโตรเจนรวมซึ่งได้เท่ากับ 0.18% และ กากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวัน มีเปอร์เซนต์ไนโตรเจนรวมเท่ากับ 0.55และ 0.57 จึงทำการเจือจาง กากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวันที่ผ่านการไฮโดรไลส์ด้วยกรดแล้วมาทำการเจือจางให้ปริมาณของไนโตรเจนโดยรวมเท่ากับ 0.18% และทดลองผสมกากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวันในอัตราส่วน 1: 1 ซึ่งเมื่อนำมาหาปริมาณไนโตรเจนรวมเท่ากับ 0.56 มาทำการเจือจางให้ได้ 0.18เช่นกัน นำส่วนของของเหลวที่ได้คือกากเมล็ดทานตะวัน ปริมาณ 0.18% กากเมล็ดถั่วเหลือง 0.18% และกากเมล็ดทานตะวันผสมกับกากเมล็ดถั่วเหลืองในอัตราส่วน 1:1 , 0.18% มาใช้เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนแทนสารสกัดจากยีสต์ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 20 จะเห็นว่าเมื่อใช้กากถั่วเหลือง กากเมล็ดทานตะวันและกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในอัตราส่วน 1:1 ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยกรดที่มีเปอร์เซนต์ไนโตรเจน 0.18% เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนแทนสารสกัดจากยีสต์โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อมีแอมโมเนียมไนเตรท 0.2% เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนอีกชนิดหนึ่ง และ น้ำมันละหุ่ง 0.33% เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนปรากฏว่าเชื้อมีการเจริญได้ดีใกล้เคียงกันแต่เชื้อจะให้เอนไซม์แอคติวิตีเมื่อใช้กากถั่วเหลืองที่ย่อยสลายด้วยกรดเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนได้น้อยกว่าการใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน โดยได้แอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 6.5 ในขณะที่ถ้าใช้กากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนจะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ต่ำกว่าใช้กากเมล็ดถั่วเหลือง ในขณะที่การใช้วัตถุดิบผสมจะไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์เลย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่มีอยู่ในกากถั่วเหลืองเหมาะสมกว่าชนิดและปริมาณของ กรดอะมิโนที่อยู่ในกากเมล็ดทานตะวัน และการที่ใช้วัตถุดิบผสมสองชนิดทำให้แบคทีเรียไม่ผลิตเอนไซม์เลยอาจเนื่องมาจากปริมาณและชนิดของกรดอะมิโนที่มากเกินไปทำให้เกิดการยับยั้งการผลิตของเอนไซม์ไลเปส หรือสารบางอย่างในกากเมล็ดทานตะวันมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไลเปสดังนั้นจึงทดลองนำกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยกรดแล้วไปแปรผันในการเลี้ยงตามปริมาณ % ไนโตรเจน คือ 0.05,0.1,0.18,0.3,และ 0.4% ปรากฏว่าเมื่อใช้กากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยกรดแล้วปริมาณความเข้มข้น 0.3% ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดคือ 8.2 ยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ซึ่งจากการทดลองการนำกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยกรดปริมาณไนโตรเจนรวม 0.3% มาแทนสารสกัดจากยีสต์จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ใกล้เคียงกับเมื่อใช้สารสกัด

จากยีสต์ 0.5% เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน และมีแอมโมเนียมไนเตรท 0.2% เป็นแหล่งไนโตรเจนอีกชนิดหนึ่ง โดยมีน้ำมันละหุ่ง 0.33% เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน ให้แอคติวิตีของเอนไซม์9.8 ยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตรโดยถ้าใช้กากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยกรดที่มีความเข้มข้นของไนโตรเจนรวม 0.3% เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนแทนสารสกัดจากยีสต์ในภาวะเดียวกันจะให้แอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 8.2 ยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื่อ 1 มิลลิลิตร ดังนั้น สารสกัดจากยีสต์จึงเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนที่เหมาะสมนำมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis*ซึ่งสอดคล้องกับที่ Rehm และคณะ (1987)ได้รายงานไว้ว่ากากถั่วเหลืองสามารถให้ปริมาณแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสได้สูงกว่าการใช้สารประกอบไนโตรเจนจากกากอาหารชนิดอื่น

5.9 <u>การเตรียมเอนไซม์ไลเปสในรูปผงและการเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่อุณหภูมิต่างๆ</u>

การเตรียมเอนไซม์ไลเปสในรูปผงทำโดยการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมซัลเฟต และเอธานอลที่ความเข้มข้นดังในวิธีการทดลอง แล้วจึงนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 °ซเปรียบเทียบกับการทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธีการนำไปกรองด้วยอัลตรา-ฟิวเตรชั่น แล้วจึงทำให้แห้งโดยวิธี ไลโอฟิไลเซชัน ซึ่งจากผลการทดลองตารางที่22จะเห็นว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ผงที่ได้จากการตกตะกอนด้วยเอธานอล 80 %มีค่าสูงสุดคือ 6.5 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อดูจากค่าปริมาณโปรตีนและยูนิตเอนไซม์ทั้งหมดแล้วจะเห็นว่าสามารถตกตะกอนโปรตีนส่วนที่เป็นเอนไซม์ได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตหรือ โซเดียมซัลเฟตการตกตะกอนด้วยเอธานอลนี้มีข้อดีกว่าการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตหรือโซเดียมซัลเฟตเนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีความบริสุทธิ์สูงกว่าการตกตะกอนด้วยเกลือทำให้แอคติวิตีสูง กว่าการแยกและการทำให้แห้งใช้เวลาสั้น (Anustrup,1979) และการตกตะกอนด้วยเอธานอลนี้ยังเหมาะที่จะตกตะกอนโปรตีนที่มีสภาพเป็นกรดเนื่องจากทำให้ตกตะกอนง่ายกว่า (Kaufman,1971) นอกจากนี้การทำเอนไซม์ในรูปผงโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและโซเดียมซัลเฟตยังมีข้อเสียคือเอนไซม์ที่ได้มีเกลือที่ใช้ตกตะกอนปนอยู่ด้วย ซึ่งเมื่อจะนำเอนไซม์รูปผงที่เก็บไว้มาใช้ยังต้องทำการแยกเกลือที่ปนอยู่ออก สำหรับวิธีการทำให้เข้มข้นด้วยอัลตรา - ฟิวเตรชั่น และไลโอฟิไลเซชันมีข้อเสียคือเนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อมีน้ำมันละหุ่งเป็นสับเสตรทดังนั้นเอนไซม์ผงที่ได้จึงมีลักษณะค่อนข้างเหนียวและชื้นไม่เป็นเนื้อเดียวกัน นอกจากนี้การทำให้แห้งโดยวิธีไลโอ ฟิไลเซัน ยังมีราคาแพงมากอีกด้วย (Anustrup,1979)

การเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่เตรียมได้ในสภาวะที่อุณหภูมิต่างๆกันเป็นเวลา 28 วัน (ตารางที่23) ปรากฏว่าที่อุณหภูมิ -20°ซ ถึง 30°ซสามารถเก็บเอนไซม์ไว้ได้โดยไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีเลย ขณะที่อุณหภูมิ 45°ซ จะเสียแอคติวิตีในวันที่ 21 และถ้าเก็บไว้ที่ 60 °ซ จะเสียแอคติวิตีในวันที่ 14 ดังนั้นในการเก็บรักษาเอนไซม์ในรูปผงที่เตรียมได้นี้ถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 °ซ) ก็เพียงพอที่จะเก็บเอนไซม์ไว้ได้ประมาณ 1 เดือนโดยไม่เสียแอคติวิตีเลย

<u>สรุปผลการทดลอง</u>

1. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยมีน้ำมันมะกอด 0.33% เป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัดจากยีสต์ 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมประกอบด้วย K_2HPO_4 0.09 เปอร์เซนต์ KH_2PO_4 0.06% $MgSO_4.7H_2O$ 0.02 % โดยpH เริ่มต้นเท่ากับ 6.8

2. ภาวะเหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 1 คือ ที่ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นเท่ากับ 0.1 pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8 และเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ

3. ภาวะที่เหมาะสมในการหาแอคติวิตีของเอนไซม์คือ เวลาในการบ่มเอนไซม์ 30 นาที ปริมาณเอนไซม์ 0.5 มิลลิลิตร ที่ pH 4.8 และน้ำมันมะกอกที่ทำเป็นอีมัลชั่นด้วย gum arabic ปริมาณน้ำมันมะกอก 1%

4. การใช้น้ำมันพืชที่ผลิตได้ในประเทศ ได้แก่ น้ำมันละหุ่ง น้ำมันงา น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม น้ำมันรำข้าว น้ำมันข้าวโพด น้ำมันดอกคำฝอย เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนแทนน้ำมันมะกอก พบว่าน้ำมันละหุ่งเป็นน้ำมันที่เหมาะสมเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนแทนน้ำมันมะกอก เนื่องจากให้ผลผลิตเอนไซม์ที่สูงกว่าน้ำมันมะกอก

5. การพยายามหาแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ได้แก่น้ำมันชนิดต่างๆ และแป้งมันสำปะหลังมาแทนน้ำมันปรากฏว่าการใช้น้ำตาลฟรุคโตส 1% หรือน้ำตาลกลูโคส 1%จะให้ผลผลิตใกล้เคียงกับเมื่อใช้น้ำมันมะกอกเป็นแหล่งคาร์บอนแต่เนื่องจากราคาต้นทุนของน้ำตาลทั้งสองชนิดสูงกว่าการใช้น้ำมันละหุ่งเป็นแหล่งคาร์บอนจึงเลือกใช้น้ำมันละหุ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis*

6. การหาปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปส พบว่าปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมคือ ใช้สารสกัดจากยีสต์ 0.5%

7. การหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ได้แก่ ทริปโตน, โซเดียมไนเตรท ยูเรีย $(NH_4)_2HPO_4$ $NH_4(NO)_3$ เปปโตน $(NH_4)_2SO_4$ ผลปรากฏว่า $NH_4(NO)_3$ ปริมาณ 0.2 % เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการเติมลงไปในอาหารเพื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis*
เพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปส

8. หาแหล่งวัตถุดิบที่มาใช้เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนแทนสารสกัดจากยีสต์ ได้แก่กากถั่วเหลือง กากเมล็ดทานตะวัน และผสมปริมาณกากเมล็ดถั่วเหลืองที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3% และกากเมล็ดทานตะวันในอัตราส่วน 1:1 ปรากฏว่ากากถั่วเหลืองสามารถนำมาแทนการใช้สารสกัดจากยีสต์ได้โดยเมื่อมี $NH_4(NO)_3$ 0.2% เป็นส่วนผสมแล้วจะทำให้ปริมาณแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับเมื่อใช้สารจากยีสต์เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนเพียงแหล่งเดียวในการผลิต

เอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* และถ้าใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนร่วมกับ NH_4NO_3 แอคติวิตตีของเอนไซม์จะสูงถึง 12.8 ยูนิต

9. การเตรียมเอนไซม์ไลเปสในรูปผงของเชื้อ *Bacillus subtilis* พบว่าวิธีการตกตะกอนด้วยเอธานอล 80% เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นที่ใช้ในการวิจัยนี้

10. เอนไซม์ผงที่เตรียมได้สามารถที่จะเก็บรักษาไว้ได้ที่อุณหภูมิห้อง หรือ ต่ำกว่าในระยะเวลาประมาณ 1 เดือนโดยไม่สูญแอคติวิตีของเอนไซม์เลย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย