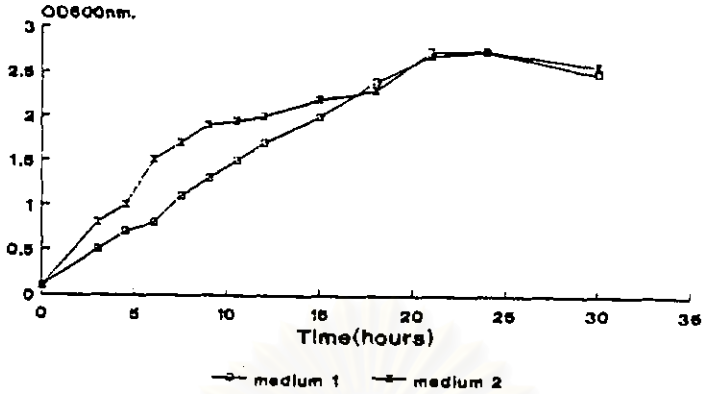
บทที่ 4

ผลการทดลอง

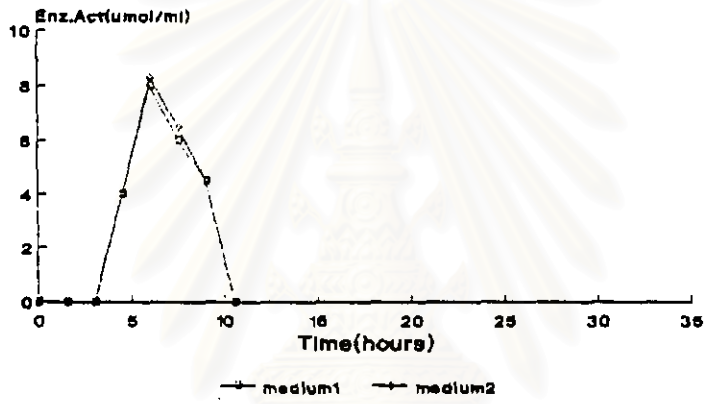
4.1 การหาภาวะเหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ

4.1.1 การหาสูตรอาหารพื้นฐานสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis*

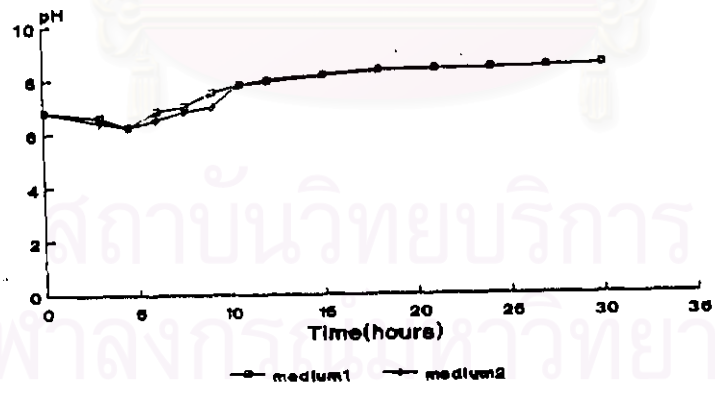
การหาสูตรอาหารพื้นฐานเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปส โดยเปรียบเทียบระหว่างสูตรอาหารสูตรที่ 1 และสูตรที่ 2 มีน้ำมันมะกอก 0.33% เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์และสารสกัดจากยีสต์(yeast extract) 0.5% เป็นแหล่งไนโตรเจน จากรูปที่ 4ก แสดงการเจริญของเชื้อ จะเห็นได้ว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* จะมีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะ 16 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นการเจริญจะเริ่มคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 24 และจะเริ่มลดลงหลังจากนั้นโดยสูตรอาหารทั้งสองชนิดทำให้เชื้อเจริญได้ดีพอๆกัน โดยเชื้อจะเจริญได้ดีกว่าในอาหารพื้นฐานสูตรที่ 2 ในช่วง 16 ชั่วโมงแรกและอัตราการเจริญจะใกล้เคียงกันมากในชั่วโมงที่ 16 สำหรับการสร้างเอนไซม์ในรูปที่ 4ข ทั้งในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 และอาหารสูตรพื้นฐานที่2 จะเห็นว่าจะเริ่มพบเอนไซม์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4.5 และพบเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 6 Total activity ที่วัดได้จากอาหารพื้นฐานสูตรที่ 1 และอาหารพื้นฐานสูตรที่ 2 เท่ากับ 2500 และ1382.5 ยูนิตต่อ OD_{600} เท่ากับ 1 (ตารางที่ 6) เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลง pH ในภาพที่ 4ค ของอาหารทั้งสองสูตรแล้วพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะเดียวกันคือเมื่อเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อ pH เท่ากับ 6.8 จากนั้นจะค่อยๆลดลงและค่อยๆสูงขึ้น จนในชั่วโมงที่ 10.5 โดยค่า pH จะใกล้เคียงกับ pH เริ่มต้น และเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งมี pH มากกว่า pH เริ่มต้นประมาณ 1 หน่วย pH ในชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อจะเห็นได้ว่าสูตรอาหารทั้ง 2 สูตรให้ผลการเจริญของเชื้อ การสร้างเอนไซม์ และรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH คล้ายคลึงกัน แต่เนื่องจากสูตรอาหารที่ 1 ใช้ปริมาณแร่ธาตุใกล้เคียงกับสูตรที่ 2 แต่ใช้ชนิดของแร่ธาตุน้อยกว่าและยูนิตTotal activity เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 1 สูงกว่า ดังนั้นจึงเลือกใช้สูตรอาหารพื้นฐานที่ 1 เป็นสูตรอาหารพื้นฐานในการทดลองต่อไป



ก



ข



ค

ภาพที่ 4. เปรียบเทียบการเจริญ (ก) แอคติวิตีของเอนไซม์ (ข)และรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH (ค) ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1และอาหารสูตรพื้นฐานที่ 2 โดยเติม 0.33% ของน้ำมันมะกอกและให้ pH ตั้งต้นสำหรับการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นเท่ากับ 0.1 และอุณหภูมิสำหรับการเลี้ยงเชื้อ 30 °ซ

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

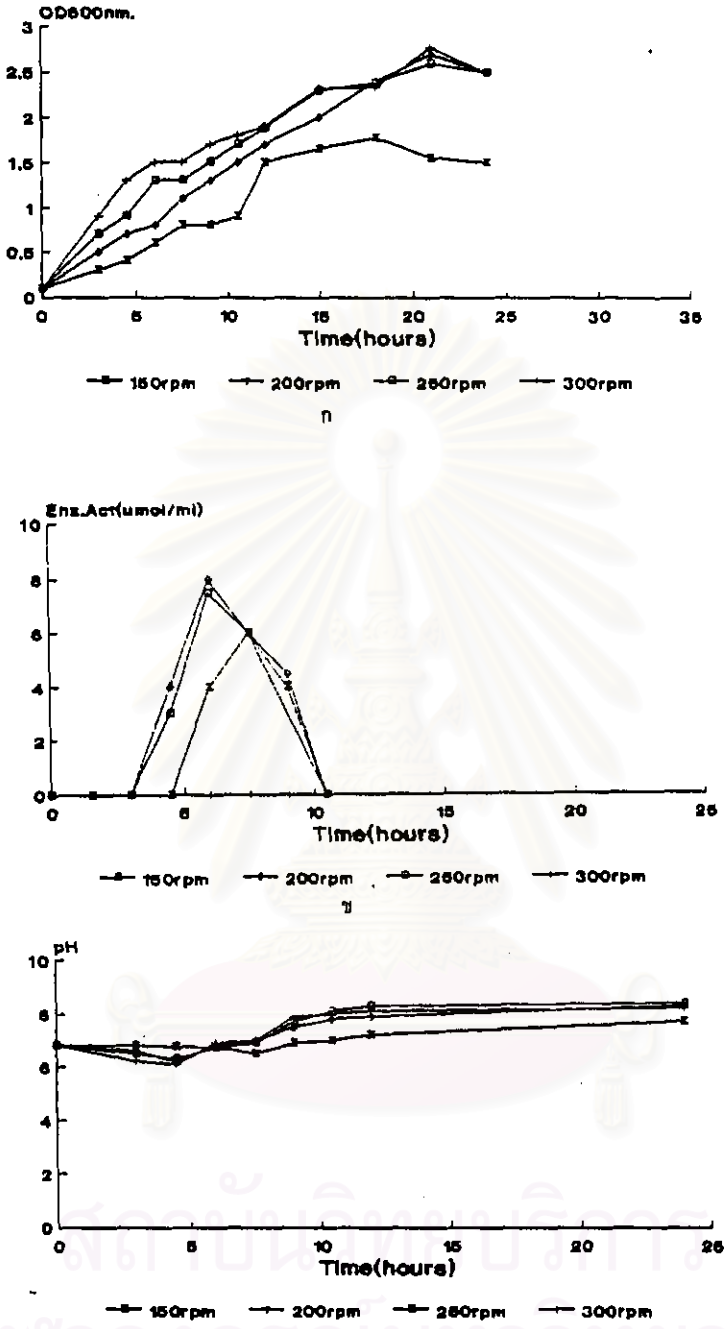
อาหารเลี้ยงเชื้อ	Total activity
อาหารสูตรพื้นฐานที่ 1	2500.0
อาหารสูตรพื้นฐานที่ 2	1382.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.2 การหาสภาวะการเขย่าเพื่อให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

การศึกษาผลของการเขย่าให้อากาศที่ความเร็วรอบต่าง ๆต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารพื้นฐานสูตรที่ 1 มี ส่วนประกอบ ตามวิธีการทดลองในข้อ 3.1.2 เลี้ยงเชื้อที่ 30°ซ ความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 และ pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8 และทำการแปรผันจำนวนรอบของการเขย่าให้อากาศเป็น 150, 200,250,และ 300 รอบต่อนาที (ดังรายละเอียดการทดลองข้อ 3.5) ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 5 จะเห็นว่าที่ความเร็วรอบการเขย่าเท่ากับ 150 รอบต่อนาที แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้จะเริ่มพบในชั่วโมงที่ 6 และแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 7.5 และมียูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยความเร็วรอบ 200 และ 250 รอบต่อนาที โดยยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มล.เมื่อเลี้ยงเชื้อที่ความเร็วรอบ 200 และ 250 รอบต่อนาทีมีค่าเท่ากับ 8.30 และ 8.18 ยูนิตตามลำดับ ในขณะที่เมื่อความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที ไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์เลย (ภาพที่ 5ข) เมื่อเปรียบเทียบกันจะเห็นได้ว่าการเพิ่มความเร็วรอบจาก 150 เป็น 200 รอบต่อนาทีจะได้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงขึ้น และแอคติวิตีของเอนไซม์ระหว่างการเลี้ยงเชื้อด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีจะเพิ่มสูงที่สุดและ เมื่อมีความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาทีแอคติวิตีของเอนไซม์จะค่อย ๆลดลงจนกระทั่งเมื่อเลี้ยงเชื้อที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาทีไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์เลย (ภาพที่5ข) ในขณะที่การเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นเมื่อให้ความเร็วรอบของการเขย่าให้อากาศมากขึ้น (ภาพที่ 5ก) แสดงว่าอัตราการเขย่าให้อากาศมีผลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* และเมื่อเปรียบเทียบ Total enzyme activity (ตารางที่ 8) พบว่าเมื่อเขย่าให้อากาศที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีจะมีค่าสูงที่สุดคือ 2500 ยูนิตต่อ OD_{600} เท่ากับ 1 ส่วนการเปลี่ยนแปลง pH ที่ความเร็วรอบ 200,250 และ 300 รอบต่อนาทีให้ผลไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 5ค) ดังนั้นจึงเลือกความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเป็น 200 รอบต่อนาทีเป็นอัตราการเขย่าให้อากาศที่เหมาะสมเพื่อไปใช้ในการดำเนินการทดลองขั้นต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



<u>ภาพที่ 5.</u> เปรียบเทียบการเจริญ (ก)แอคติวิตีของเอนไซม์ (ข) และรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH (ค) ของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ สูตรที่ 1 ที่อุณหภูมิ 30 °ซ ความขุ่นตั้งต้นที่ OD 600 nm. เท่ากับ 0.1 pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.8 แปรผันความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเป็น 150,200,250 และ 300 รอบต่อนาที

ตารางที่ 7 แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 ที่อุณหภูมิ 30°C ความขุ่นตั้งต้นที่ OD 600nm. เท่ากับ 0.1 pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.8 แปรผันความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเป็น 150, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที ทำการติดตาม Total activity ในน้ำใสจากการเลี้ยงเชื้อ 250 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6 เมื่อให้ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm. เท่ากับ 1.0

ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศ (รอบ / นาที)	Total activity
150	1650
200	2500
250	2075
300	0

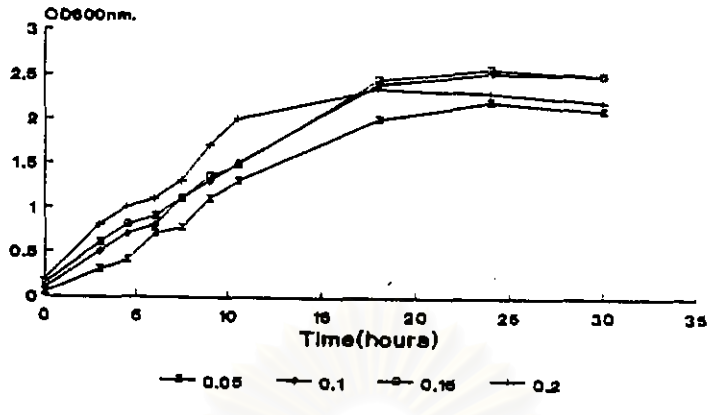
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.3 การหาปริมาณความขุ่นของเซลล์ตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ

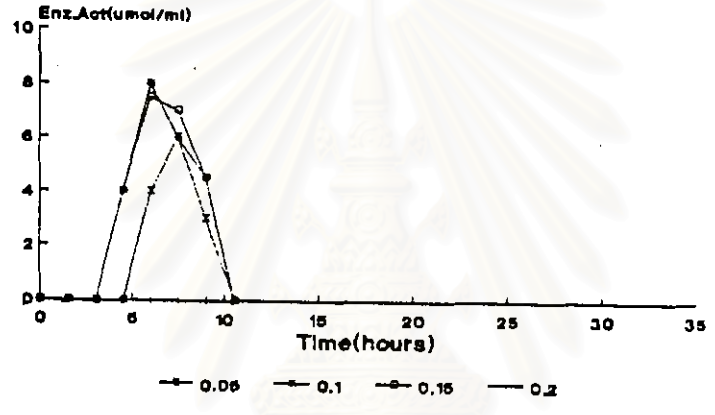
การหาปริมาณความขุ่นของเซลล์ตั้งต้นที่เหมาะสม ต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารพื้นฐานสูตรที่ 1 ซึ่งมีส่วนประกอบตามวิธีการทดลองในข้อ 3.1.2 เลี้ยงเชื้อที่ 30 °ซให้ pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8 และทำการแปรผันความขุ่นเริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 0.05 ,0.1 ,0.15 และ 0.2 ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 6ก จะเห็นได้ว่าการให้ความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 และ 0.15 แอคติวิตีของเอนไซม์จะสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อและมียูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1มล. เท่ากับ 8.3 และ 7.98 ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าที่ไม่แตกต่างกัน แต่ถ้าให้ความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.05 จะเริ่มพบแอคติวิตีของเอนไซม์ช้าไป 1.5 ชั่วโมงและยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1มล. สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 7.5 เท่ากับ 5.9 ยูนิต แต่ถ้าให้ความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.2 จะไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์เลย และเมื่อเปรียบเทียบ Total activity พบว่าเมื่อให้ความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 จะมีค่าเท่ากับ 2500 ยูนิตต่อ OD_{600} เท่ากับ 1ซึ่งมีค่าสูงที่สุด (ตารางที่ 8) สำหรับการเจริญของเชื้อซึ่งแสดงผลการทดลองในภาพที่ 6ก เมื่อให้ความขุ่นของเซลเริ่มต้นเพิ่มขึ้นการเจริญของเชื้อจะเพิ่มขึ้นในช่วงแรกของการเจริญแบบทวีคูณและจะมีการเจริญของเชื้อใกล้เคียงกันในช่วงระยะของการเจริญแบบคงที่ ส่วนการเปลี่ยนแปลง pH นั้นมีลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่ไม่แตกต่างกันมากดังนั้นความขุ่นตั้งต้นที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อคือความขุ่นเท่ากับ 0.1 จึงเลือกความขุ่นตั้งต้นเท่ากับ 0.1 สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

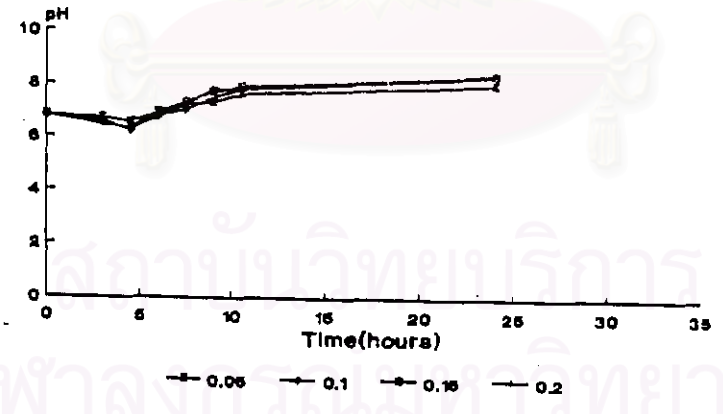
I17032155



ก



ข



ค

ภาพที่ 6. เปรียบเทียบการเจริญ (ก) แอคติวิตีของเอนไซม์ (ข) และรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH (ค) ของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรที่ 1ให้ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเป็น 200 รอบรอบต่อนาทีแปรผันความขุ่นตั้งต้นเป็น 0.05,0.1,0.15และ 0.2

ตารางที่ 8 แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 ที่อุณหภูมิ 30° ซpH เริ่มต้นเท่ากับ 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเป็น 200 รอบต่อนาที แปรผันความขุ่นตั้งต้นที่ OD 600nm.เป็น 0.05, 0.1,0.15และ 0.2 ทำการติดตาม Total activity ในน้ำใสจากการเลี้ยงเชื้อ 250 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6 เมื่อให้ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm. เท่ากับ 1.0

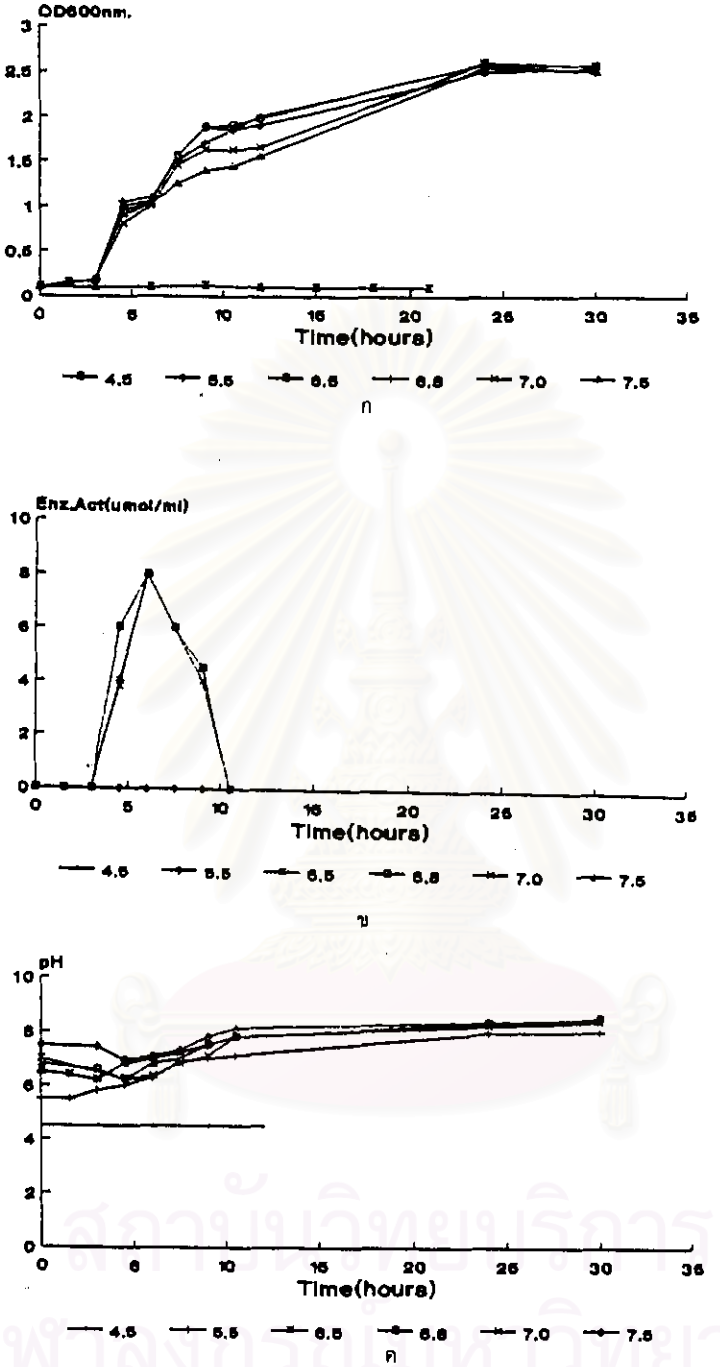
ความขุ่นเริ่มต้นที่ OD_{600}	Total enzyme activity
0.05	680
0.1	2500
0.15	2075
0.2	0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.4 การหา pH ตั้งต้นที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ

การหา pH ตั้งต้นที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อศึกษาโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซให้ปริมาณความขุ่นตั้งต้นเท่ากับ 0.1 และความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที จะเห็นได้ว่า เมื่อให้ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.5,6.8และ 7.0 เชื้อจะมีการเจริญได้ดีใกล้เคียงกันถ้าให้ pH เริ่มต้น 7.5 เชื้อมีการเจริญได้น้อยกว่า แต่ถ้าให้ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 เชื้อไม่มีการเจริญเลย สำหรับการสร้างเอนไซม์ดังในภาพที่ 7ข เมื่อให้ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.5 ,6.8 และ 7.0 จะมีการสร้างเอนไซม์ได้ดีพอๆกัน แต่ถ้าให้ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.5 เชื้อจะไม่สร้างเอนไซม์เลย เมื่อเปรียบเทียบ Total activity พบว่าถ้าให้ pH เริ่มต้น 6.8 และ 7.0 จะมีค่าสูงที่สุดคือ 2500 ยูนิตต่อ OD_{600} เท่ากับ 1เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลง pH จากภาพที่ 7ค แนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงเมื่อเริ่มเลี้ยงเชื้อที่ pH ตั้งต้น 6.5 ,6.8 และ 7.0 pH จะลดลงในช่วง 6 ชั่วโมงแรกและค่อยๆเพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 10.5 pH จะใกล้เคียงกับ pH เริ่มต้น และค่อยๆเพิ่มขึ้นจนสูงกว่า pH ตั้งต้นประมาณ 1 หน่วย pH ในชั่วโมงที่ 24 แต่สำหรับรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH การเลี้ยงเชื้อที่ให้ pH เริ่มต้น 4.5 เนื่องจากเชื้อไม่มีการเจริญเลยดังนั้นจึงไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ pH จากผลการทดลองนี้ pH ที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ผลิตเอนไซม์ไลเปสคือ ที่pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.8, และ 7.0 จึงเลือกทำการเลี้ยงเชื้อให้มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.8 เนื่องจากเป็น pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากที่เตรียมเสร็จยังไม่ได้ปรับด้วยกรดหรือด่างเลย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 7. เปรียบเทียบการเจริญ (ก) แอคติวิตีของเอนไซม์ (ข) และรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH (ค) ของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อแปรผัน pH ตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อเป็น 4.5,5.5,6.5,6.8,7.0และ 7.5 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรที่ 1 ที่อุณหภูมิ 30°ซ ความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศ 200 รอบต่อนาที

ตารางที่ 9 แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 ที่อุณหภูมิ 30°ซ ความขุ่นเริ่มต้น ที่OD600nm เท่ากับ0.1 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเป็น 200 รอบต่อนาที แปรผัน pHตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อเป็น 4.5,5.5 ,6.5,6.8,7.0 และ 7.5 ทำการติดตาม Total activity ในน้ำใสจากการเลี้ยงเชื้อ 250 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6 เมื่อให้ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm. เท่ากับ 1.0

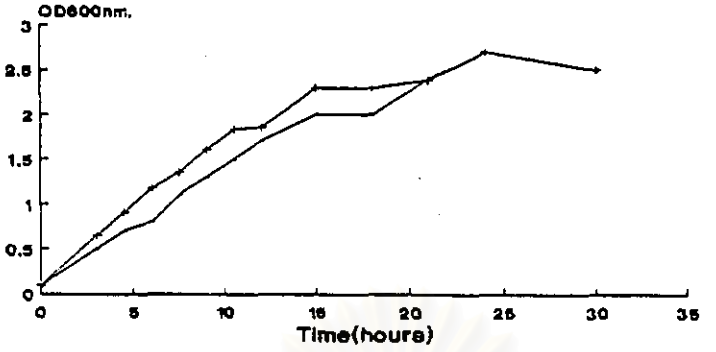
pH ตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อ	Total activity
4.5	0
5.5	0
6.5	1900.0
6.8	2500.0
7.0	2500.0
7.5	0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

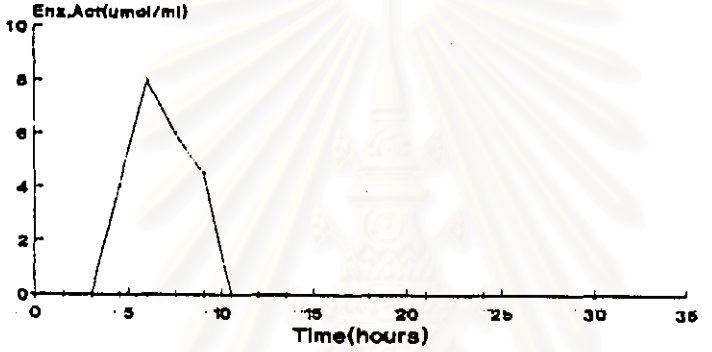
4.1.5 <u>การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ</u>

การหาอุณหภูมิที่เหมาะสม สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารพื้นฐานสูตรที่ 1 ให้ pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 6.8 ความเร็วในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ความขุ่นตั้งต้นเท่ากับ 0.1 นำมาเลี้ยงในเครื่องเขย่าให้อากาศปรับอุณหภูมิได้ที่ 30 °ซและ 37°ซ เมื่อเปรียบเทียบการเจริญ ดังภาพที่ 8ก พบว่าเชื้อเจริญได้ดีกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อที่ 37°ซ แต่เมื่อนำมาตรวจวัดหาแอคติวิตีของเอนไซมนั้นไม่พบเลย ในขณะที่ถ้าเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °ซ จะเริ่มพบเอนไซม์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4.5 และพบสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 8.30 ยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มล. (ภาพที่ 8ข) เมื่อเปรียบเทียบ Total activity พบว่าถ้าให้อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ 30°ซ จะมีค่าเท่ากับ 2500 ยูนิตต่อ OD_{600} เท่ากับ 1 ในขณะที่ ถ้าเลี้ยงที่37°ซ Total enzyme activity เท่ากับ 0 เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลง pH ในภาพที่ 8ค จะเห็นว่าเมื่อเริ่มต้นเลี้ยง pH เท่ากับ 6.8 และลดลงเล็กน้อยในหกชั่วโมงแรกและค่อยๆเพิ่มขึ้น สำหรับการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ แต่รูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH เมื่อเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียสพบว่า pH มีค่าต่ำลงน้อยมากแล้วค่อยๆเพิ่มขึ้น จากผลการทดลองขั้นต้นนี้ทำให้เลือกเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ เพื่อเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis*

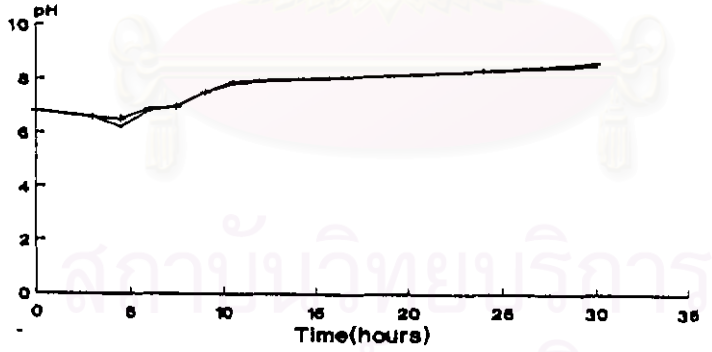
จากการทดลองในข้อ 4.1.1 - 4.1.5 สรุปได้ว่าภาวะเหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อคือ ใช้อาหารสูตรที่ 1 เป็นอาหารสูตรพื้นฐานที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ เขย่าให้อากาศที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ให้ความขุ่นของเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 0.1 และ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8 และเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ ดังแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ , แอคติวิตีของเอนไซม์ และรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH ในภาพที่ 9 ซึ่งจะตรวจพบแอคติวิตีของเอไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Basillus subtilis* ในชั่วโมงที่ 6 และแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 8.30 ยูนิต ต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มล. ซึ่งเป็นช่วงที่อยู่ในระหว่างการเจริญแบบทวีคูณและการเปลี่ยนแปลงของ pH อยู่ในช่วงที่มี pH ต่ำกว่า pH ตั้งต้น



ก



ข



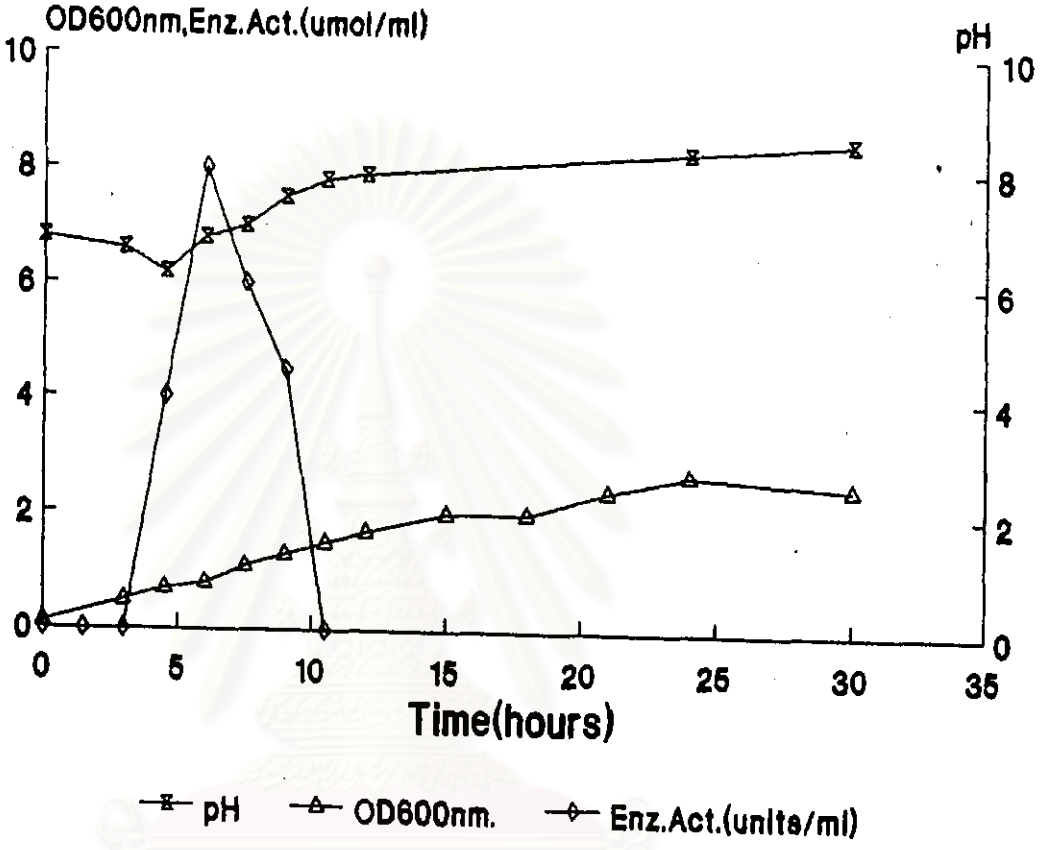
ค

ภาพที่ 8. เปรียบเทียบการเจริญ (ก) แอคติวิตีของเอนไซม์ (ข) และรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH (ค) ของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 โดยเปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซ และ 37°ซ ให้ pH ตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8 ความขุ่นเริ่มต้นที่ OD 600nm. เท่ากับ 0.1 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศ 200 รอบต่อนาที

ตารางที่ 10 แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1ความขุ่นเริ่มต้นที่OD600nm เท่ากับ0.1 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเป็น 200 รอบต่อนาที pHตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อ6.8 เปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซและ 37°ซ ทำการติดตาม Total activity ในน้ำใสจากการเลี้ยงเชื้อ 250 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6 เมื่อให้ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm. เท่ากับ 1.0

อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ (°ซ)	Total activity
30	2500
37	0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

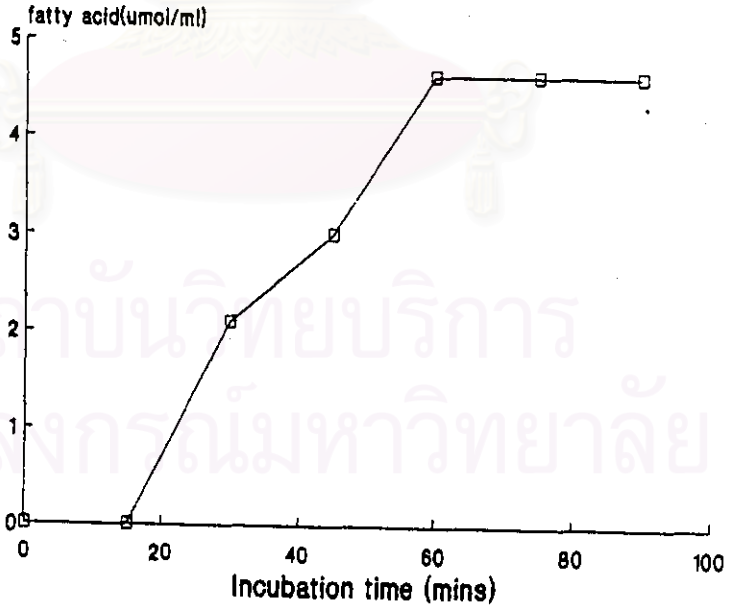


ภาพที่ 9. การเจริญ, แอคติวิตีของเอนไซม์และการเปลี่ยนแปลง pH เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่ 1 เลี้ยงเชื้อที่ 30°ซ โดยให้ pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 6.8 ความขุ่นเริ่มต้นที่ OD600nm. เท่ากับ 0.1 ความเร็วรอบในการเลี้ยงเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ทำการติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสโดยใช้ emulsion ของน้ำมันมะกอก1% เป็นซับเสตรท เติมเอนไซม์ 0.5 มล. อะซิเตทบัฟเฟอร์ pH 4.8 อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์ 45 °ซ เป็นเวลา 30 นาที

4.2 การหาภาวะเหมาะสมในการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส

4.2.1 ศึกษาช่วงเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อที่เหมาะสม (อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา)

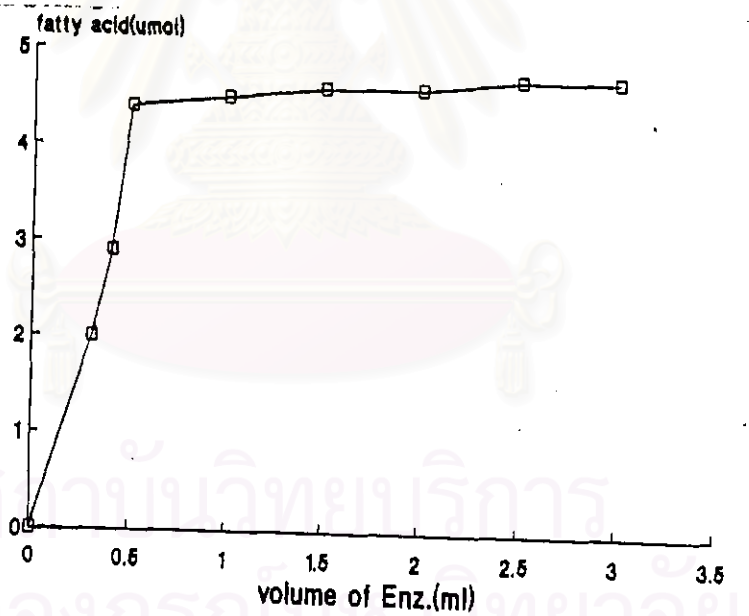
นำเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ 1 มาเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซให้ความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8 ใช้เวลาเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6 ชั่วโมง วัดความขุ่นได้เท่ากับ 0.8 ปั่นแยกเซลล์ออกนำส่วนใสที่ได้มาวัดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นของปฏิกิริยาซึ่งคือกรดไขมันในช่วงเวลาต่างๆ โดยวิธีการดังในข้อ3.9 โดยใช้ emulsion ของน้ำมันมะกอก 1% เป็น ซับเสตรท และบ่มเอนไซม์ ปริมาณ 0.5 มล. ที่อุณหภูมิ 37°ซเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วแปรผันช่วงเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อเป็น 15,30,45,60,75 และ 90 นาที ดังในภาพที่ 10 พบว่าในเวลา 60 นาทีแรกปริมาณผลิตภัณฑ์ค่อยๆเพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอ เมื่อเลย 60 นาทีไปแล้วผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะค่อนข้างคงที่จนถึงนาทีที่ 90 ดังนั้นความเร็วเริ่มต้นของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* จึงเท่ากับ 2.2/30 ซึ่งเท่ากับ 0.073 ไมโครโมลต่อนาทีดังนั้นเวลาที่เหมาะสมในการทดลองหาแอคติวิตีของเอนไซม์คือ 30 นาที



ภาพที่ 10. แสดงผลของช่วงเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อ ต่อการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อใช้ emulsion ของน้ำมันมะกอก 1% เป็นซับเสตรท ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7.0 อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์ 37°ซ ปริมาตรเอนไซม์ 0.5 มล. ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 ในภาวะที่เหมาะสม เก็บเอนไซม์ชั่วโมงที่ 6 ของการเจริญซึ่งมีความขุ่นเท่ากับ 0.8

4.2.2 ศึกษาปริมาณของเอนไซม์เพื่อนำมาใช้ในการตรวจหาแอคติวิตีที่เหมาะสม

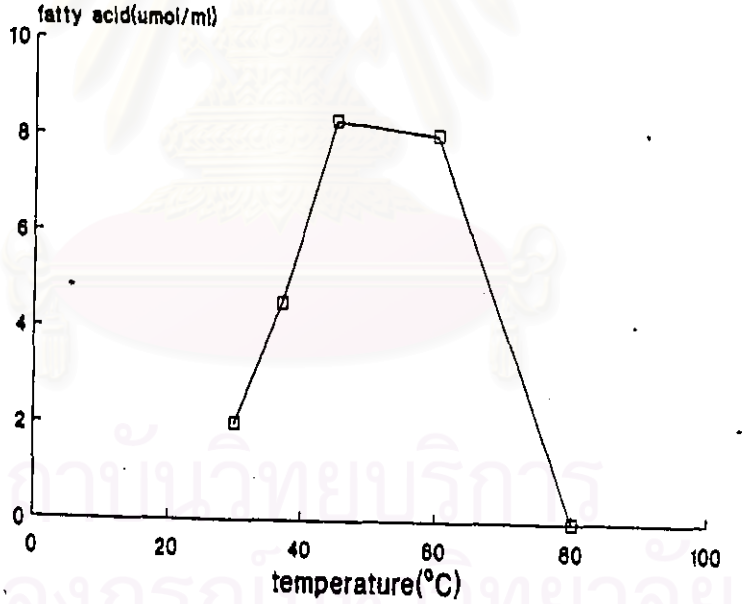
ทำการศึกษาหาปริมาณของเอนไซม์ เพื่อนำมาใช้ในการหาแอคติวิตีของเอนไซม์โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารพื้นฐานสูตรที่ 1 มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.8 ความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 ความเร็วในการเขย่าให้อากาศ 200 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30°ซเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จนมีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.8 แล้วจึงนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาปั่นแยกเซลล์ออก นำส่วนใสมาแปรผันปริมาณที่ใช้ในการตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยใช้ emulsion ของน้ำมันมะกอก 1% เป็น ซับเสตรท เติมเอนไซม์ปริมาณ 0.3,0.4,0.5,1.0,1.5,2.0,2.5 และ 3.0 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ มีฟอสเฟตเป็นบัฟเฟอร์ที่ pH 7.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 11 จะเห็นว่าความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วเริ่มต้นและความเข้มข้นเริ่มต้นของเอนไซม์เป็นเส้นตรง เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.3,0.4 และ 0.5 มล. เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์สูงขึ้นไปอีกปรากฏว่าปริมาณของกรดไขมันซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาคงที่ ดังนั้นปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการใช้สำหรับตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์จึงเท่ากับ 0.5 มล.



ภาพที่ 11. แสดงผลของปริมาณเอนไซม์ ที่มีผลต่อการหาแอคติวิตีของเอนไซม์ เมื่อใช้ emulsion ของน้ำมันมะกอก 1% เป็นซับเสตรท ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7.0 อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์ 37°ซ เอนไซม์ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมงซึ่งมีความขุ่นเท่ากับ 0.8

4.2.3 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหาแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปส

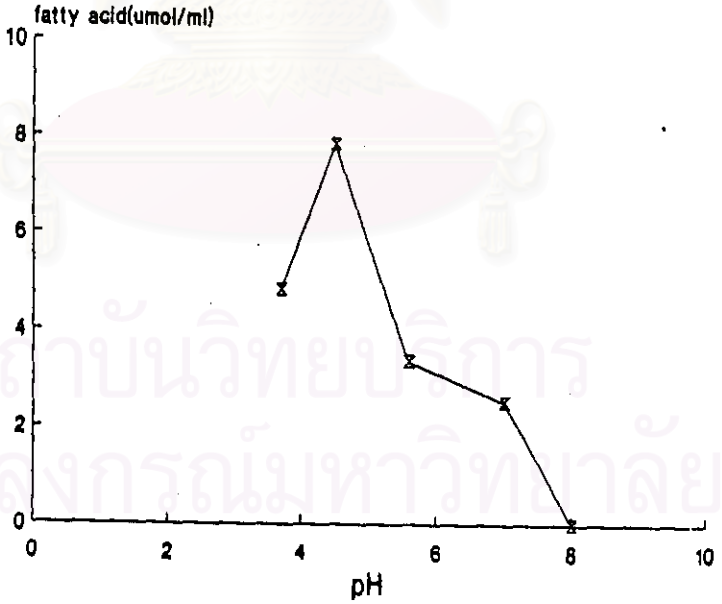
ทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหาแอคติวิตีของเอนไซม์ โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ ให้ความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จนมีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.8 ปั่นแยกเซลล์ออกนำส่วนใสมาศึกษาต่อ โดยการเติมเอนไซม์ปริมาณ 0.5 มล. ลงใน emulsion ของน้ำมันมะกอก 1% ปริมาณของ emulsion เท่ากับ 15 มล. แล้วนำไปปมที่อุณหภูมิ 30 °ซ ,37 °ซ ,45 °ซ 60 °ซ และ 80 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัดปริมาณกรดไขมันที่เกิดขึ้น โดยวิธีการไตเตรทดังวิธีการทดลองในข้อ 3.9 ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 12 จะเห็นว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นปริมาณกรดไขมันที่ได้จะสูงขึ้นด้วยจนถึงอุณหภูมิ 45°ซ ซึ่งเกิดผลิตภัณฑ์คือกรดไขมันในปริมาณสูงที่สุด และผลิตภัณฑ์ลดลงเล็กน้อยเมื่อเพิ่มอุณหภูมิถึง 60°ซ และที่ 80°ซ ไม่พบ กรดไขมันเลย ดังนั้น อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คือที่ 45 °ซ



ภาพที่ 12. แสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อใช้ emulsion ของน้ำมันมะกอก 1% เป็นซับเสตรท ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7.0 บ่มเอนไซม์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ pH 37°ซ ปริมาตรเอนไซม์ 0.5 มล. ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมงมีความขุ่นเท่ากับ 0.8

4.2.4 ศึกษา pH ที่เหมาะสมในการหาแอคติวิตีของเอนไซม์

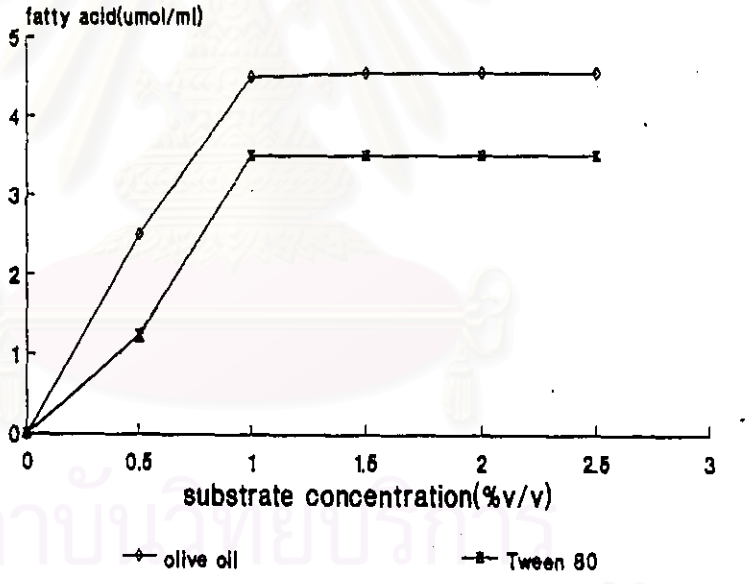
ทำการศึกษาโดยเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารพื้นฐานสูตรที่ 1 โดยให้ความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง วัดความขุ่นได้เท่ากับ 0.8 ปั่นแยกเซลล์ออกนำส่วนใสมาทำการศึกษา pH ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ต่อโดยการเติมเอนไซม์ปริมาณ 0.5 มล. ลงใน emulsion ของน้ำมันมะกอก 1% ที่มีบัฟเฟอร์ pH ต่อไปนี้คือ อะซิเตทบัฟเฟอร์ ที่ pH 3.7,4.8 และ 5.6 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ pH 7.0 และ 8.0 คาร์บอเนตบัฟเฟอร์ที่ pH 9.5 และ 10.5 นำส่วนผสมที่ได้ไปบ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วมาตรวจวัดปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยการไตเตรทกับ 0.025M KOH ที่นำไปปรับมาตรฐานกับ สารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลทดังวิธีการทดลองในข้อ 3.1.4 หาจุดยุติของการไตเตรทโดยใช้ เครื่อง pH meter แล้วนำปริมาณ KOH ที่ใช้ในการไตเตรทจนถึงจุดยุติไปเทียบกับกราฟโอเลอิกมาตรฐาน เพื่อหาปริมาณของกรดไขมันที่ได้ แล้วจึงพลอตกราฟระหว่าง pH และ ปริมาณกรดไขมัน ได้ผลดังภาพที่ 13จะเห็นว่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ไลเปสคือ pH 4.8



ภาพที่ 13. แสดงผลของ pH ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อใช้ emulsion ของน้ำมันมะกอก 1% เป็นซับเสตรทบ่มเอนไซม์ที่ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปริมาตรของเอนไซม์ 0.5 มล. ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 ทำการเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลา 6 ชั่วโมงซึ่งมีความขุ่นเท่ากับ 0.8

4.2.5 การหาสับเสตรทที่เหมาะสมในการตรวจแอคติวิตีของเอนไซม์

ทำการศึกษาโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานสูตรที่ 1 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซให้ความขุ่นเริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.1 ความเร็วในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.8 เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.8 แล้วนำน้ำเลี้ยงไปปั่นแยกเซลล์ออกนำส่วนใสที่ได้มาศึกษาต่อ โดยเติมลงใน emulsion ของน้ำมันมะกอก และ Tween 80 เท่ากับ 0.5% ,1.0%, 1.5%,2.0%และ 2.5 %ปริมาณ 15 มล.นำไปปมที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้ววัดผลิตภัณฑ์คือกรดไขมันที่เกิดขึ้น แสดงผลดังภาพที่ 14ปริมาณกรดไขมันที่เกิดขึ้นสูงสุดในเวลา 60 นาที คือเมื่อใช้ emulsion ของน้ำมันมะกอก 1%



ภาพที่ 14. แสดงผลของชับเสตรทต่อแอคติวิตีของเอนไซม์โดยแปรผันชนิดและปริมาณของชับเสตรทโดยบ่มเอนไซม์ที่ 37°ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตรของเอนไซม์ 0.5 มล. ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 ทำการเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลา 6 ชั่วโมงซึ่งมีความขุ่น 0.8

ดังนั้นภาวะเหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์จากข้อ 4.2.1 - 4.2.5 สรุปได้ว่า ภาวะเหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไลเปสคือ ทำการบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.5 มล. ที่อุณหภูมิ 45°ซ อะซิเตทเป็นบัฟเฟอร์ที่ pH 4.8 และ emulsion ของน้ำมันมะกอก 1% เป็นซับเสตรท จึงกำหนดให้หนึ่งหน่วยของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถไฮโดรไลส์แล้วได้กรดไขมันอิสระ 1 ไมโครโมล ภายใต้ภาวะที่กำหนดข้างต้น และเมื่อนำเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อโดยสูตรอาหารมาตรฐานที่ 1 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30°ซ ความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 และ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.8 จากการเขย่าให้อากาศที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ได้ผลมาทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ได้เท่ากับ 8.3 ยูนิต ซึ่งจะนำเอนไซม์นี้ไปศึกษาผลของสารเคมีที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ต่อไป

4.2.6 ศึกษาชนิดของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เหมาะสม และมีแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 8.3 ยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1มล. มาศึกษาชนิดของสารยับยั้งเอนไซม์ โดยการเติม 0.02M EDTA , 0.02M $HgCl_2$, 0.02M $NICl_2$ และ 0.02M $FeCl_3$ เติมลงใน emulsion ของน้ำมันมะกอก 1% ปริมาณ 1 มล.แล้วจึงเติมเอนไซม์ 0.5 มล(ทำ blankทุกตัวอย่าง) ลงในซับเสตรท แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45°ซเป็นเวลา 30 นาที ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ศึกษาชนิดของสารยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์

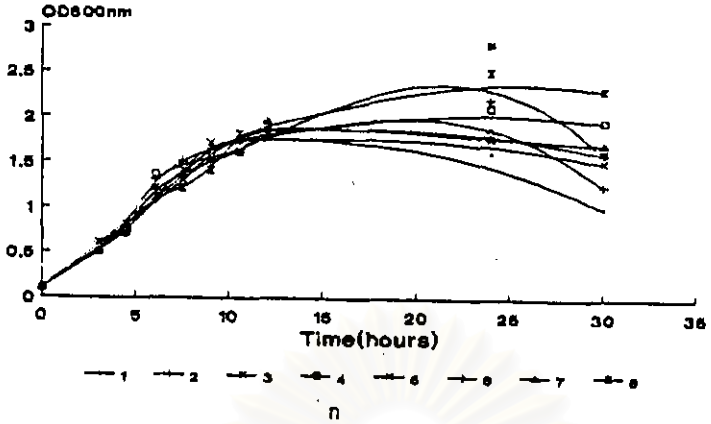
สารที่ทดสอบ	แอคติวิตี (µmol/ml)	relative activity (%)	% inhibition
1) control	8.3	100	0
2) 0.02M EDTA	0	0	100
3) 0.02M $NICl_2$	3.1	37.3	62.7
4) 0.02M $FeCl_3$	4.5	54.2	45.8
5) 0.02M $HgCl_2$	0	0	100

4.3 การคัดเลือกวัตถุดิบที่เหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

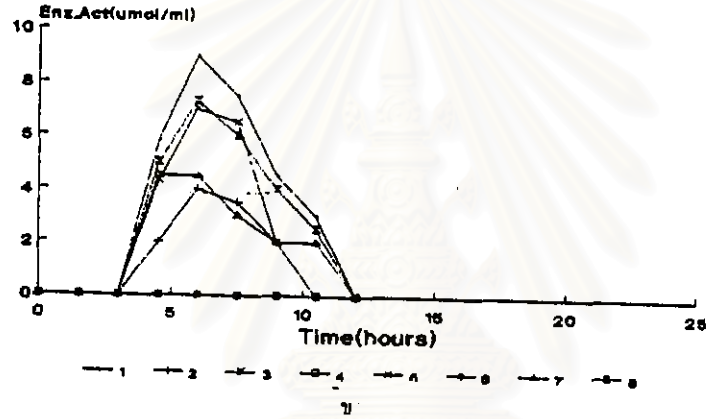
จากภาวะเหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อจากข้อ 4.1 คืออาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 มีน้ำมันมะกอก 0.33%(v/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และ สารสกัดจากยีสต์0.5%(w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ โดยให้ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.8 ความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 เลี้ยงเชื้อโดยการเขย่าให้อากาศที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นำมาศึกษาเพื่อคัดเลือกวัตถุดิบที่เหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนดังต่อไปนี้

4.3.1 ศึกษาการใช้น้ำมันพืชชนิดต่างๆที่เหมาะสมเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

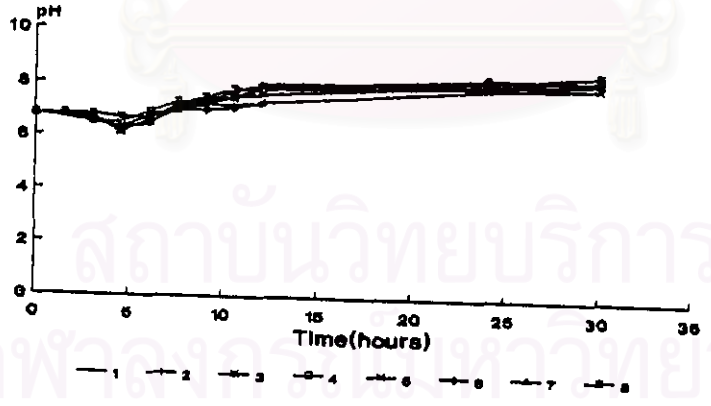
ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 14 พบว่าทั้งน้ำมันละหุ่ง , น้ำมันงา , น้ำมันปาล์ม , น้ำมันถั่วเหลือง , น้ำมันรำข้าว , น้ำมันข้าวโพด , น้ำมันดอกคำฝอยและน้ำมันมะกอก มีผลต่อการเจริญใกล้เคียงกัน แต่น้ำมันละหุ่งกระตุ้นให้ เชื้อ *Bacillus subtilis* ผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดคือ 10.2 ยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มล.และมี Total activity เท่ากับ 2645.0 (ตารางที่ 13) ส่วนน้ำมันมะกอกและน้ำมันรำข้าวให้แอคติวิตีที่ใกล้เคียงกันคือ 8.3 และ 8.0 ยูนิต ต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มล. มี Total activity เท่ากับ 2500.0และ 1342.5 ยูนิตต่อ OD_{600} เท่ากับ 1ตามลำดับ (ตารางที่ 13) และดอกคำฝอยและน้ำมันงาให้ยูนิตแอคติวิตี เท่ากับ 4.2 และ 3.8 ยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มล. มี Total activity เท่ากับ 1500.0 และ 647.5 ยูนิตต่อ OD_{600} เท่ากับ 1ตามลำดับ แต่น้ำมันถั่วเหลือง , น้ำมันปาล์มและน้ำมันข้าวโพด ไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์เลย ดังนั้นจึงเลือกน้ำมันละหุ่ง 0.33 % เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าการใช้น้ำมันเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนจะทำให้มีแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสูงขึ้นแต่การใช้น้ำมันยังมีข้อเสียคือ มีความสามารถในการเป็นซับเสตรทของเอนไซม์ด้วยซึ่งอาจจะทำให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ไปย่อยเกิดกรดไขมันเพิ่มขึ้นและในปริมาณของกรดไขมันที่มากขึ้นทำให้ pH ต่ำลง ซึ่งอาจจะทำให้เกิดปฏิกิริยาย้อนกลับทำให้เอนไซม์หยุดทำงานได้ นอกจากนี้การกระตุ้นด้วยน้ำมันในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณมากทำให้เกิดข้อเสียคือ เมื่อเลี้ยงไปแล้วจะมีเซลล์จำนวนหนึ่งลอยขึ้นไปเกาะที่ผิวหน้าในบริเวณที่มีส่วนของน้ำมันลอยอยู่ดังนั้นในการเลี้ยงเชื้อจึงใช้น้ำมันในปริมาณน้อย คือ 0.33% จากข้อเสียบางประการสำหรับการใช้น้ำมันเป็นแหล่งคาร์บอน จึงได้ทำการทดลองหาแหล่งคาร์บอนอื่นๆเพื่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Bacillus subtils*



ก



ข



ค

1= น้ำมันละหุ่ง 2= น้ำมันงา 3= น้ำมันปาล์ม 4= น้ำมันถั่วเหลือง 5= น้ำมันรำข้าว
6= น้ำมันข้าวโพด 7= น้ำมันดอกคำฝอย 8= น้ำมันมะกอก

<u>ภาพที่ 15</u>. เปรียบเทียบการเจริญ (ก) แอคติวิตีของเอนไซม์ (ข) และรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH (ค) ของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำมันพืชชนิดต่าง ๆ เป็นแหล่งต้นคาร์บอน

ตารางที่ 12. แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1ความขุ่นเริ่มต้นที่OD600nm เท่ากับ0.1 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเป็น 200 รอบต่อนาที pHตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อ6.8 ที่อุณหภูมิ 30°ซ และมีน้ำมันพืชชนิดต่างๆ 0.33% (v/v)เป็นแหล่งต้นคาร์บอนแทนน้ำมันมะกอก 0.33% (v/v) ทำการติดตาม Total activity ในน้ำใสจากการเลี้ยง เชื้อ 250 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6 เมื่อให้ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm. เท่ากับ 1.0

น้ำมัน 0.33% (v/v)	Total activity
ละหุ่ง	2645.0
งา	647.5.0
ปาล์ม	0
ถั่วเหลือง	0
รำข้าว	1342.5
ข้าวโพด	0
ดอกคำฝอย	1500.0
มะกอก	2500.0

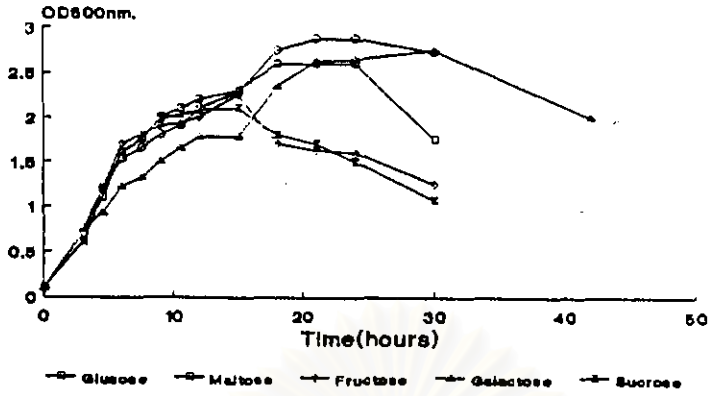
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.2 ศึกษาการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆเป็นแหล่งคาร์บอน

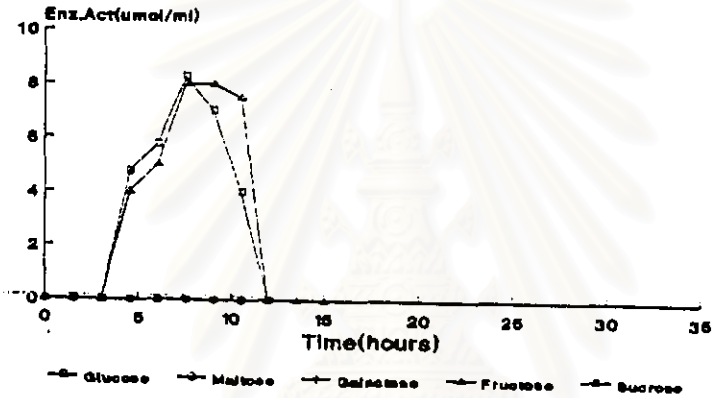
จากการศึกษา ใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆเป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำมันมะกอก ได้แก่น้ำตาลกลูโคส 1% , น้ำตาลมอลโตส 1% , น้ำตาลฟรุคโตส 1% , น้ำตาลกาแลคโตส 1% และน้ำตาลซูโครส 1% เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อปรากฏว่าเชื้อเจริญได้ดีในน้ำตาลชนิดต่าง ๆในช่วงแรกของการเจริญใกล้เคียงกัน และความขุ่นของเชื้อเมื่อใช้น้ำตาลฟรุคโตส และซูโครส จะลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากชั่วโมงที่ 18 ส่วนน้ำตาลมอลโตสและน้ำตาลกาแลคโตส ยังเจริญต่อไปได้อีก อย่างไรก็ตามปรากฏว่ามีน้ำตาล ฟรุคโตสและกลูโคสเท่านั้นที่สามารถให้เอนไซม์ไลเปสได้ ซึ่งได้ปริมาณถึง 8.2และ 8.0 ยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มล. (ภาพที่ 16) โดยมีค่า Total activity เท่ากับ 1100.0 และ 1177.5 ยูนิตต่อ OD600 เท่ากับ 1 ตามลำดับ (ตารางที่ 13)และเมื่อทำการแปรผันปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสม ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส 1%,2% และ 3% น้ำตาลฟรุคโตส 1%,2% และ 3% ผลแสดงในภาพที่ 17 จากภาพที่ 17ข ปริมาณน้ำตาลทั้งกลูโคสและฟรุคโตสที่ทำให้วัดแอคติวิตีของเอนไซม์ได้สูงสุดคือ 1% และที่ปริมาณน้ำตาลเข้มข้นกว่านี้จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แต่อย่างไรก็ตามการทำการทดลองนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อลดต้นทุนการผลิตดังนั้นจึงทดลองใช้แป้งมันสำปะหลังมาเป็นแหล่งคาร์บอนโดยที่จากภาพที่ 18 ได้ทำการตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส พบว่ามีแอคติวิตีในชั่วโมงที่ 6 เป็นต้นไปเนื่องจากการทำไฮโดรไลเสทของแป้งมันสำปะหลังด้วยกรดเป็นวิธีที่ยุ่งยากการที่มีเอนไซม์อะไมเลสในชั่วโมงที่ 6 จึงน่าจะเป็นข้อดีในการประหยัดขั้นตอนการไฮโดรไลส์ด้วยกรด จึงได้ทำการทดลองแปรผันปริมาณแป้งมันสำปะหลัง เป็น 0.1%,1.0% และ 5.0% ได้ผลดังภาพที่ 19 จะเห็นว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดีในช่วง 12 ชั่วโมงแรกแล้วการเจริญของเชื้อลดลงอย่างรวดเร็วส่วนแอคติวิตีของเอนไซม์ไลเปสนั้นพบได้สูงสุดเมื่อทำการทดลองใช้แป้งมันสำปะหลัง 1.0 % ถ้าใช้แป้งมันสำปะหลัง 5.0% พบแอคติวิตีของเอนไซม์น้อยมาก คาดว่าคงจะเป็นเพราะปริมาณที่มากเกินไปจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ในขณะที่เมื่อใช้ 0.1% แอคติวิตีของเอนไซม์ต่ำกว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 1.0 เปอร์เซนต์ และการใช้แป้งที่ความเข้มข้น 0.1%,1.0% และ 5.0% ตรวจแอคติวิตีของเอนไซม์ได้เพียง 4.0 ,5.2.และ 2.0 ยูนิต ตามลำดับเท่านั้น ซึ่งค่า Total activity มีค่าเท่ากับ 550,525 และ 245 ยูนิตต่อ OD_{600} เท่ากับ 1 ตามลำดับ ดังนั้นการใช้แป้งเพียงชนิดเดียวจึงไม่เหมาะสมสำหรับเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* อย่างไรก็ตามเพื่อความเป็นไปได้ในการเพิ่มปริมาณแอคติวิตีของเอนไซม์ จึงได้ทดลองเปรียบเทียบเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี น้ำตาลกลูโคส 1% ผสมกับน้ำมันละหุ่ง 0.33% , อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งของคาร์โบไฮเดรทและน้ำมันพืชรวมกันเช่น น้ำตาลฟรุคโตส 1%กับน้ำมันละหุ่ง 0.33% และ แป้งมันสำปะหลัง1%กับน้ำมันละหุ่ง 0.33 % เป็นแหล่งคาร์บอนได้ผลการทดลองดังภาพที่ 20 จากผลการทดลอง

เชื้อเจริญได้ดีเมื่อมีแป้งมันสำปะหลังและน้ำมันละหุ่งเป็นแหล่งต้นตอสำหรับคาร์บอน และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสและน้ำมันละหุ่งเป็นแหล่งคาร์บอนก็มีการเจริญได้ใกล้เคียงกัน และเมื่อทำการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ปรากฏว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีทั้งน้ำตาลฟรุคโตสและน้ำมันละหุ่งเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน ไม่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์เลย ส่วนการใช้ทั้งน้ำมันละหุ่งและแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ให้แอคติวิตีขอเอนไซม์ที่ชั่วโมงที่ 7.5 กับการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำมันละหุ่งเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้แอคติวิตีขอเอนไซม์ที่ชั่วโมงที่ 6.0 ซึ่งเท่ากับ4.0 และ 5.0 ยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มล.และTotal activity เท่ากับ 632.5 และ 700.0 ยูนิตต่อ OD_{600} เท่ากับ 1ตามลำดับ (ตารางที่ 16) ซึ่งจะเห็นว่ามีแอคติวิตีต่ำกว่าการใช้น้ำมันละหุ่งหรือน้ำตาลชนิดใดชนิดหนึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนชนิดเดียว ดังนั้นจึงเลือกน้ำมันละหุ่งเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนเพียงชนิดเดียวซึ่งถึงแม้ว่าจะมีข้อเสียในแง่ที่อาจจะเป็น ซับเสตรทของเอนไซม์แต่เมื่อเทียบกับปริมาณที่ใช้และมูลค่าที่ต่ำกว่าการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเลี้ยงเชื้อจึงเลือกน้ำมันละหุ่งปริมาณ 0.33% เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อต่อไป

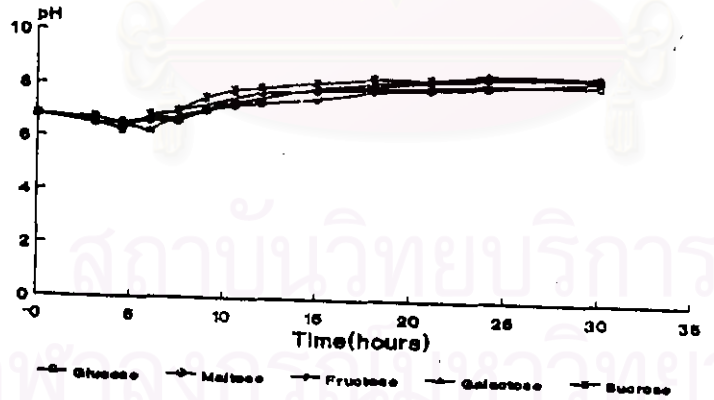
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก



ข



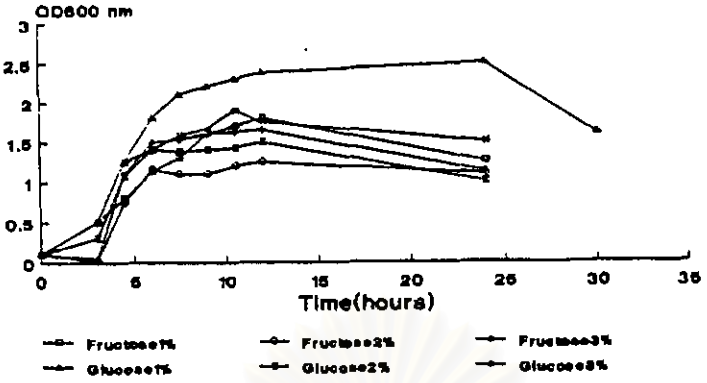
ค

ภาพที่ 16 เปรียบเทียบการเจริญ (ก) แอคติวิตีของเอนไซม์ (ข) และรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH (ค)ของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลชนิดต่าง ๆเป็นแหล่งต้นคาร์บอน

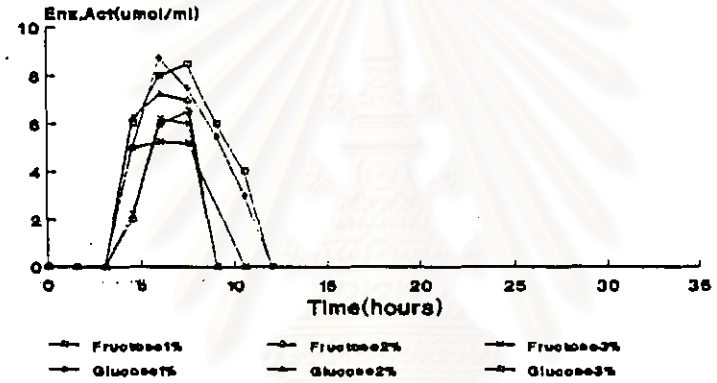
ตารางที่ 13 แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1ความขุ่นเริ่มต้นที่OD600nm เท่ากับ0.1 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเป็น 200 รอบต่อนาที pHตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อ6.8 ที่อุณหภูมิ 30°ซ และมีน้ำตาลชนิดต่างๆ 1%(w/v)เป็นแหล่งต้นตอคาร์บทนน้ำมันมะกอก 0.33% (v/v) ทำการติดตาม Total activity ในน้ำใสจากการเลี้ยง เชื้อ 250 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6 เมื่อให้ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm. เท่ากับ 1.0

น้ำตาล 1g%	Total activity
กลูโคส	1177.5
มอลโตส	0
กาแลคโตส	0
ฟรุคโตส	1100.0
ซูโครส	0

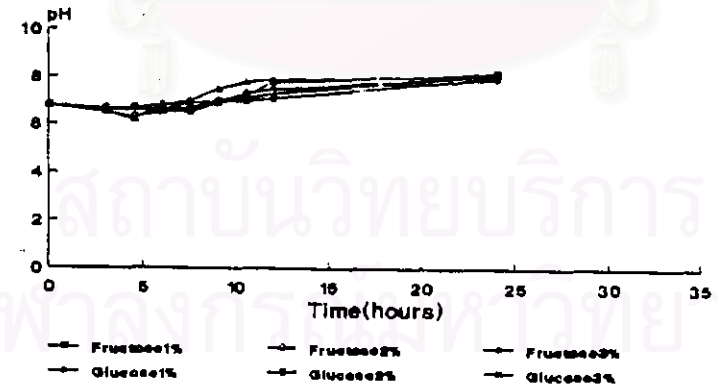
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก



ข



ค

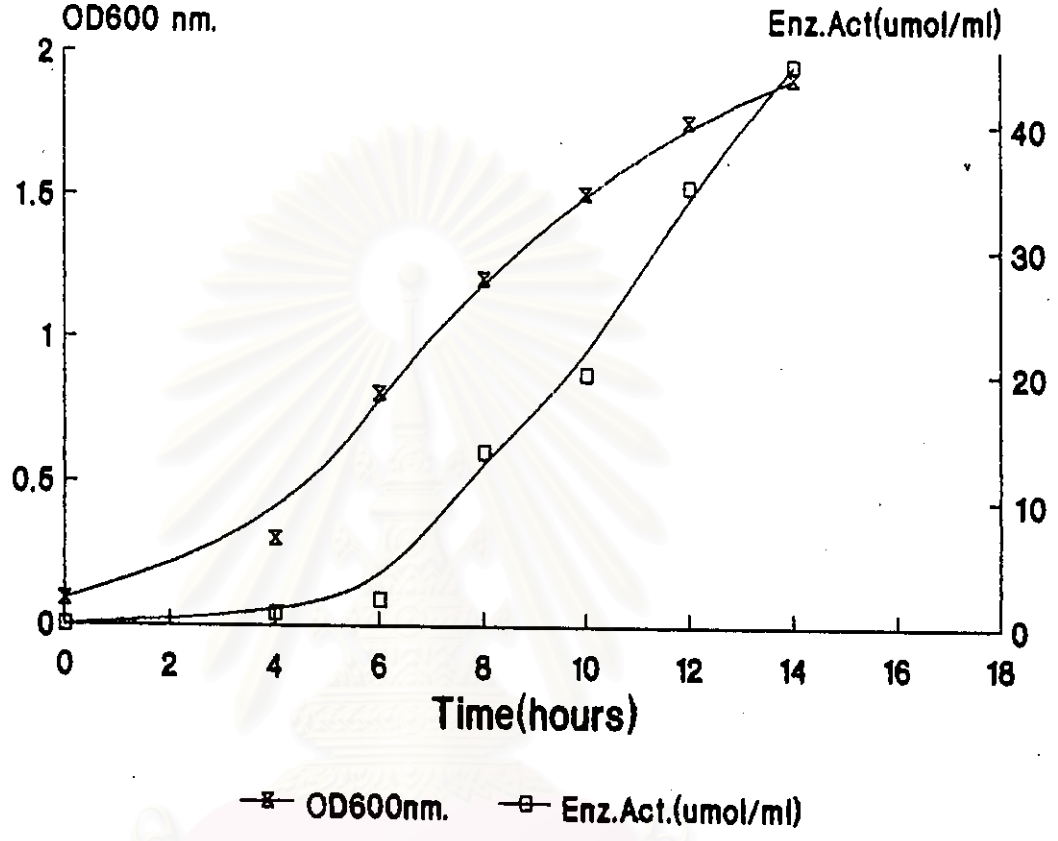
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 17. เปรียบเทียบการเจริญ (ก) แอคติวิตีของเอนไซม์ (ข) และรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH (ค) ของเอนไซม์ไลเปส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1ที่มีน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโตสเป็นแหล่งต้นคอร์บอนในปริมาณต่างๆ

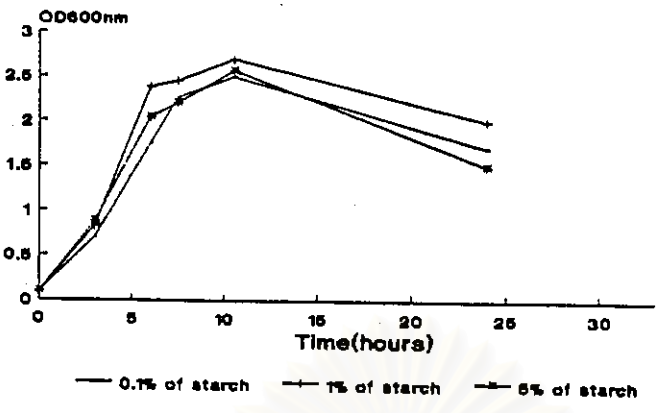
ตารางที่ 14 แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1ความขุ่นเริ่มต้นที่OD600nm เท่ากับ0.1 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเป็น 200 รอบต่อนาที pHตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อ6.8 ที่อุณหภูมิ 30°ซ ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโตสในปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อแทนน้ำมันมะกอก 0.33% (v/v) ทำการติดตาม Total activity ในน้ำใสจากการเลี้ยง เชื้อ 250 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6 เมื่อให้ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm. เท่ากับ 1.0

น้ำตาล %(w/v)	Total activity
ฟรุคโตส 1%	1110.0
ฟรุคโตส 2%	1002.5
ฟรุคโตส 3%	1000.0
กลูโคส 1%	1179.0
กลูโคส 2%	1100.0
กลูโคส 3%	937.5

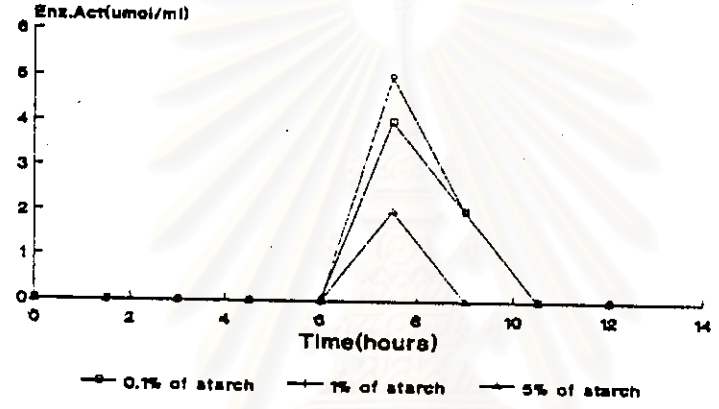
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



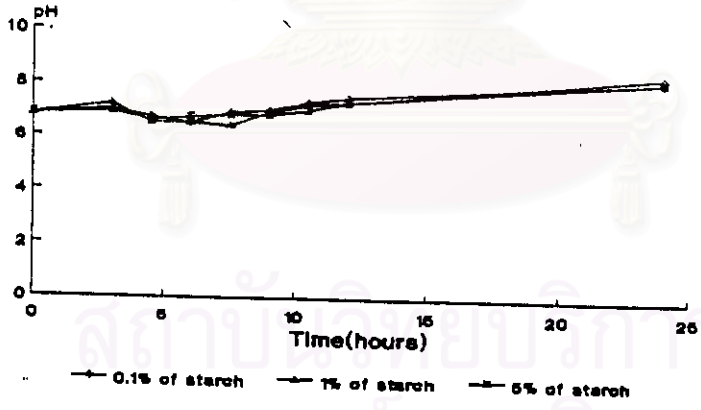
<u>ภาพที่ 18</u>. การเจริญ, แอคติวิตีของเอนไซม์อะไมเลส เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานสูตรที่ 1 ให้ความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 pH เริ่มต้น 6.8 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ 30°ซ



ก



ข



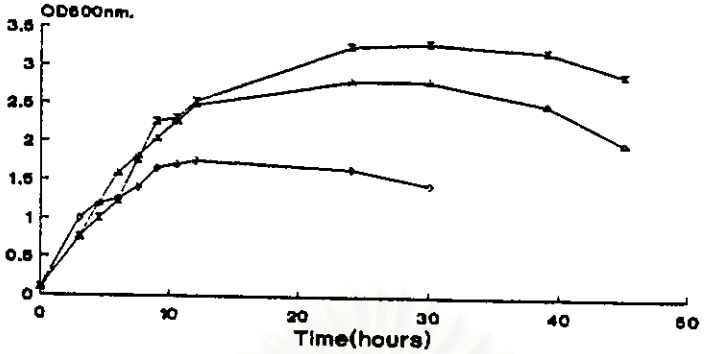
ค

ภาพที่19 . เปรียบเทียบการเจริญ (ก) แอคติวิตีของเอนไซม์ (ข) และรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH (ค) ของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งต้นคอาร์บอนในปริมาณต่าง ๆ

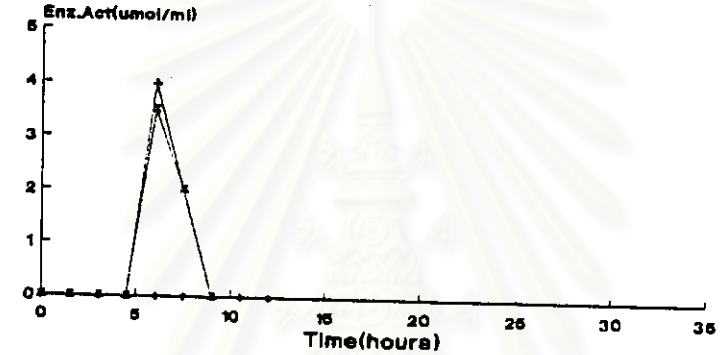
ตารางที่ 15 แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1ความขุ่นเริ่มต้นที่OD600nm เท่ากับ0.1 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเป็น 200 รอบต่อนาที pHตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อ6.8 ที่อุณหภูมิ 30°ซ ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้แป้งมันสำปะหลังในปริมาณต่างๆ เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อแทนน้ำมันมะกอก 0.33% (v/v) ทำการติดตาม Total activity ในน้ำใสจากการเลี้ยง เชื้อ 250 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6 เมื่อให้ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm. เท่ากับ 1.0

แป้ง%(w/v)	Total activity
0.1%	550
1%	525
5%	245

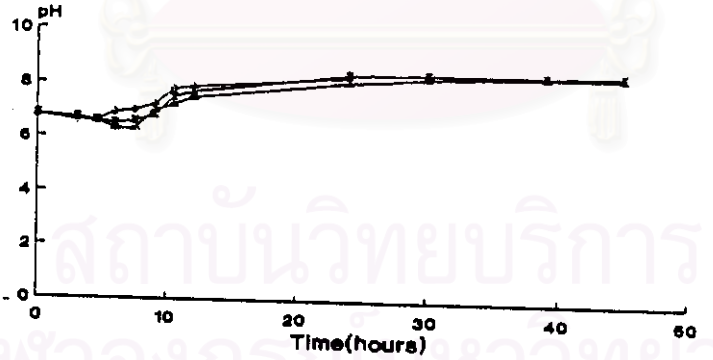
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก



ข



ค

1= น้ำตาลฟรุคโตส1% + น้ำมันละหุ่ง 0.33% 2 = น้ำตาลกลูโคส1% + น้ำมันละหุ่ง 0.33%
3 = แป้งมันสำปะหลัง 1% + น้ำมันละหุ่ง 0.33%

ภาพที่ 20. เปรียบเทียบการเจริญ (ก) แอคติวิตีของเอนไซม์ (ข) และรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH (ค) ของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่คัดเลือกไว้ในปริมาณที่เหมาะสมกับน้ำมันละหุ่งที่คัดเลือกเป็นสารต้นคอคาร์บอน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1ความขุ่นเริ่มต้นที่OD600nm เท่ากับ0.1 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเป็น 200 รอบต่อนาที pHตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อ6.8 ที่อุณหภูมิ 30°C ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้ แป้งมันสำปะหลัง 1%และน้ำตาลกลูโคส 1% เมื่อมีน้ำมันละหุ่ง 0.33%(v/v) เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนอีกชนิดหนึ่งแทนน้ำมันมะกอก 0.33% (v/v) ทำการติดตาม Total activity ในน้ำใสจากการเลี้ยง เชื้อ 250 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6 เมื่อให้ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm. เท่ากับ 1.0

แหล่งคาร์บอน	Total activity
น้ำตาลฟรุคโตส 1%(w/v)+ น้ำมันละหุ่ง 0.33%(v/v)	0
น้ำตาลกลูโคส 1%(w/v)+ น้ำมันละหุ่ง 0.33%(v/v)	632.5
แป้งมันสำปะหลัง1% (w/v)+ น้ำมันละหุ่ง 0.33%(v/v)	700.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 การหาแหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสมจะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยงเชื้อ

4.4.1 ทำการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนรวมของวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยวิธ Kjedahl

แสดงผลการทดลองในตารางที่ 17

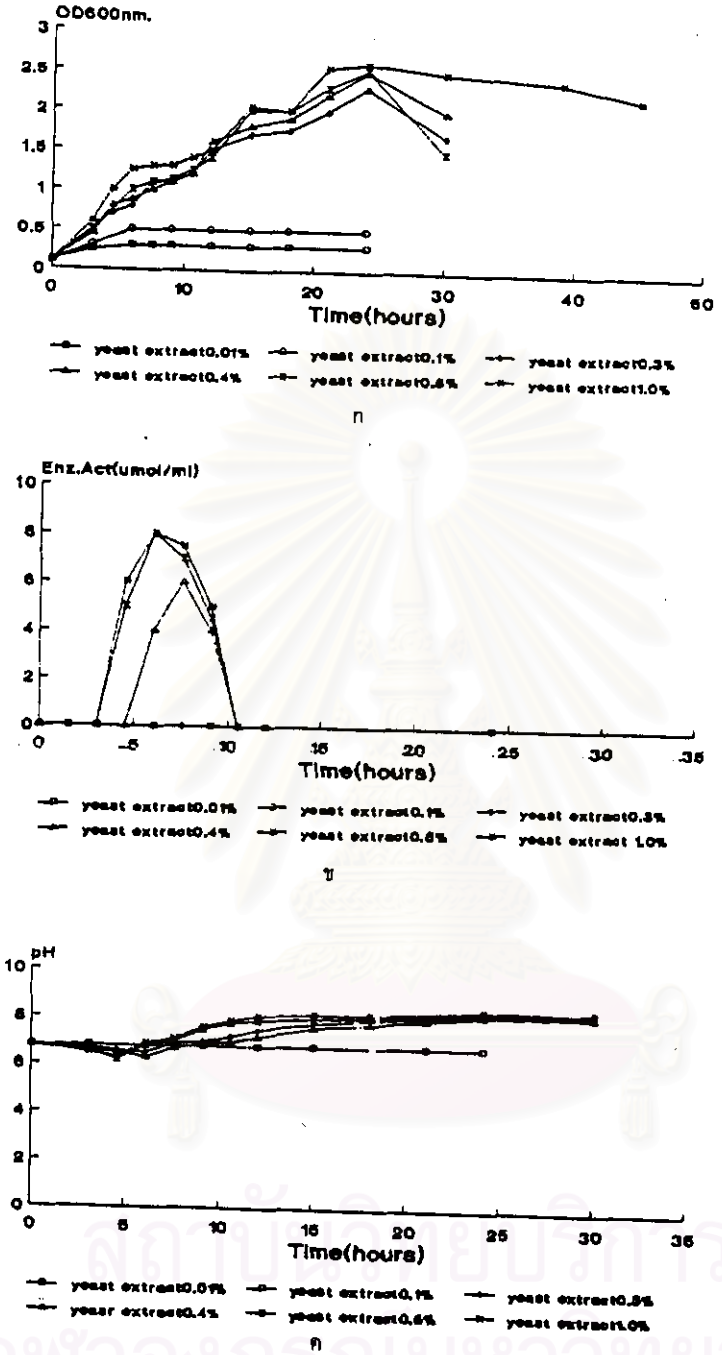
ตารางที่ 17 ผลการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนรวมของวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน

วัตถุดิบ %(w/v)		ปริมาณไนโตรเจนรวม % (v/v)
1 สารสกัดจากยีสต์	0.5%	0.18
2 กากถั่วเหลือง	0.1%	0.55
3 กากเมล็ดทานตะวัน (1:1)	0.1%	0.57

จากผลการทดลองในตารางที่ 17 นำไปใช้ในการแปรผันปริมาณกากวัตถุดิบเพื่อการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อไป

4.4.2 หาปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสม

ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้ สูตรอาหารพื้นฐานสูตรที่ 1 เป็นแหล่งสูตรอาหารพื้นฐาน แปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์เป็น 0.01,0.1,0.3,0.4,0.5และ 1.0 %(w/v) ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซให้ความขุ่นเริ่มต้นเท่ากับ 0.1, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.8 อัตราเร็วในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที แสดงผลการทดลองในภาพที่21 จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้สารสกัดจากยีสต์เท่ากับ 0.01 และ 0.1%เชื้อไม่มีการเจริญเลยในขณะที่ถ้าใช้สารสกัดจากยีสต์เท่ากับ 0.3,0.4,0.5 และ 1%(w/v)เชื้อจะมีการเจริญใกล้เคียงกัน และเมื่อตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เมื่อใช้สารสกัดจากยีสต์ 0.5และ1.0%(w/v)เชื้อจะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ในปริมาณใกล้เคียงกัน คือเท่ากับ 8.3 ยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มล.ในขณะที่ใช้สารสกัดจากยีสต์ 0.3%(w/v)ม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์เลยและการใช้สารสกัดจากยีสต์ 0.4% (w/v)แอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 6.0 ยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มล.ในขณะที่ใช้สารสกัดจากยีสต์ 0.5%(w/v)จะพบ Total enzyme activity สูงสุดคือ 2500 ยูนิตต่อจำนวนเซลล์ที่OD_{600} เท่ากับ 1 (ตารางที่ 18) ดังนั้นจึงใช้สารสกัดจากยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.5 %(w/v)ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 21 . เปรียบเทียบการเจริญ (ก) แอคติวิตีของเอนไซม์ (ข) และรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH (ค) ของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งต้นคอไนโตรเจนในปริมาณต่างๆ

ตารางที่ 18 แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1ความขุ่นเริ่มต้นที่OD600nm เท่ากับ0.1 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเป็น 200 รอบต่อนาที pHตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อ6.8 ที่อุณหภูมิ 30°ซ ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารสกัดจากยีสต์ในปริมาณต่างๆเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนและน้ำมันมะกอก 0.33% (v/v) เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน ทำการดิดตาม Total activity ในน้ำใสจากการเลี้ยง เชื้อ 250 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6 เมื่อให้ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm. เท่ากับ 1.0

สารสกัดจากยีสต์ %(w/v)	Total activity
0.01	0
0.1	0
0.3	0
0.4	1500
0.5	2500
1.0	1600

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4.3 ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปส

ผลการทดลองแสดงในภาพที่22 โดยทำการเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารพื้นฐานที่ 1 มีน้ำมันละหุ่งเป็นแหล่งคาร์บอน สารสกัดจากยีสต์ 0.5%เป็นแหล่งไนโตรเจน เติมสารต่อไปนี้ที่คาดว่าจะเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนลงไป ได้แก่ ทริปโตน, โซเดียมไนเตรท, ยูเรีย, แอมโมเนียมไนเตรท , เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต เติมลงไปด้วยความเข้มข้น 0.2 %(w/v) ผลปรากฏว่าเชื้อมีการเจริญใกล้เคียงกันยกเว้นเมื่อเติมเปปโตนและแอมโมเนียมซัลเฟต เชื้อจะมีการเจริญเพิ่มขึ้นมาก แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ปรากฏว่าพบแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดเมื่อเติม แอมโมเนียมไนเตรท 0.2 % และแอคติวิตีเท่ากับ 13.2 ยูนิต ต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1มล.(ภาพที่ 22) โดยมี Total activity เท่ากับ 2539.0 ยูนิตต่อ OD_{600} เท่ากับ 1(ตารางที่ 19) จึงเลือกแอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนอีกแหล่งหนึ่งเพื่อเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ในการทดลองต่อไป

4.4.4 การศึกษาใช้กากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน

จากผลการทดลองหาเปอร์เซนต์ไนโตรเจนในตารางที่ 17 ทดลองทำการเลี้ยงเชื้อ ด้วยกากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวันที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.18%(v/v) กับแอมโมเนียมไนเตรท 0.2 %(w/v) เปรียบเทียบกับเมื่อใช้สารสกัดจากยีสต์ ความเข้มข้น 0.5%(w/v) (ความเข้มข้นเป็นเปอร์เซนต์ไนโตรเจนเท่ากับ 0.18%)และแอมโมเนียมไนเตรท 0.2 %เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน โดยมีน้ำมันละหุ่ง 0.33%(v/v) เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในสูตรอาหารพื้นฐานที่ 1 ทำการเลี้ยงเชื้อที่ภาวะเหมาะสม คือที่อุณหภูมิ 30°ซ ความฟุ้นตั้งต้น 0.1 pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.8 และความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ได้ผลดังภาพที่23 เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการเจริญแล้วพบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* มีการเจริญได้ดีเมื่อเลี้ยงในกากถั่วเหลือง สำหรับการเจริญในสูตรอาหารที่มีกากเมล็ดทานตะวัน และกากเมล็ดถั่วเหลืองผสมกับกากเมล็ดทานตะวัน และสารสกัดจากยีสต์มีอัตราการเจริญใกล้เคียงกัน(ภาพที่ 23ก) แต่เมื่อตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์แล้วพบว่า เมื่อเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์และแอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนและมีน้ำมันละหุ่งเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงถึง 13.2 ยูนิต โดยมี Total activity 2539.0 ต่อ OD_{600} เท่ากับ 1 ถ้าเลี้ยงเชื้อโดยสูตรอาหารเดียวกันแต่ใช้กากถั่วเหลืองในปริมาณเปอร์เซนต์ไนโตรเจนเท่ากับสารสกัจากยีสต์คือ 0.18% พบว่าจะมีแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 7.2 ยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มล. Total activity 1170 ยูนิต ต่อ OD_{600} เท่ากับ 1(ตารางที่ 20) ซึ่งยังมีปริมาณสูงกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยกากเมล็ดทานตะวัน 0.18% และ เมื่อเลี้ยงเชื้อในสาร

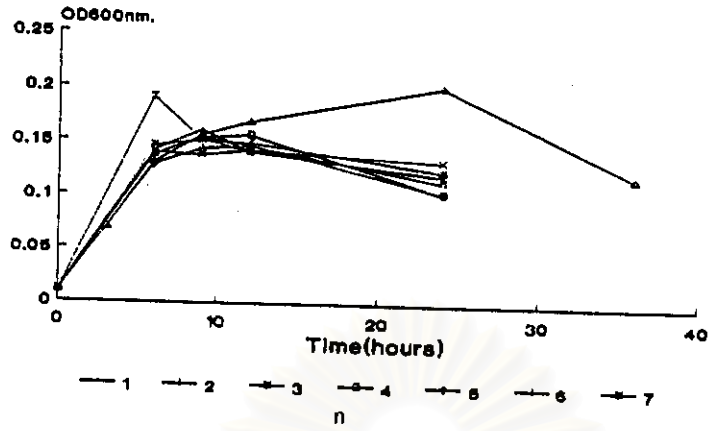
ผสมระหว่างกากไนโตรเจนและกากถั่วเหลืองในอัตราส่วน 1:1 ที่เปอร์เซนต์ไนโตรเจน 0.18 % และแอมโมเนียมไนเตรท 0.2 % เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน มีน้ำมันละหุ่ง 0.33% เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน ในสูตรอาหารพื้นฐานสูตรที่1ปรากฏว่าตรวจไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์เลย(ภาพที่ 23ข) จะเห็นได้ว่าการใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนแทนสารสกัดจากยีสต์ถึงแม้ว่าจะให้แอคติวิตีที่ต่ำกว่าการใช้สารสกัดจากยีสต์ก็ตามแต่ก็ทำให้ต้นทุนในการผลิตลดลงด้วย ดังนั้นจึงทำการแปรผันหาปริมาณกากถั่วเหลืองที่เหมาะสม ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ได้ผลดังการทดลองที่ 24ข จะเห็นว่าปริมาณกากถั่วเหลืองที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเลี้ยงเชื้อคือที่ 0.3 %มีแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 8.2 ยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มล.

4.5 <u>การเตรียมเอนไซม์ไลเปสในรูปผงและการเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ</u>

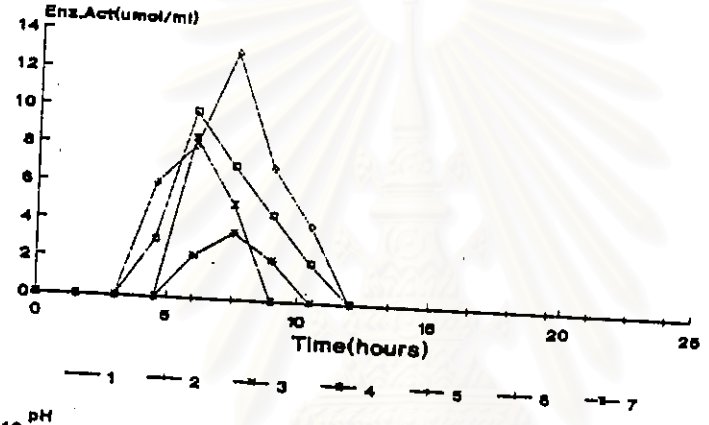
การเตรียมเอนไซม์ในรูปผงโดยวิธีตกตะกอนน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตหลังจากได้แปรผันปริมาณความเข้มข้นอิ่มตัวที่เหมาะสมได้เท่ากับ 55% จึงทดลองเปรียบเทียบระหว่างวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 55% , โซเดียมซัลเฟต 30% , เอธานอลที่ความเข้มข้นเท่ากับ 80%(Gowland,1987) และการทำให้เข้มข้นก่อนโดยการกรองด้วยอุลตราฟิวเตรชั่นแล้วจึงทำให้แห้งเป็นผงโดยวิธีไลโอฟิไลเซชั่น (วิธีทำอยู่ในข้อ 3.15) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 9 น้ำเลี้ยงเชื้อที่มีเอนไซม์เท่ากับ 12,000 ยูนิตต่อลิตรและค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 6.4 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนเมื่อนำมาตกตะกอนด้วย เอธานอล 80 % แล้วเมื่อเทียบกับวิธีอื่นโดยพิจารณาจากยูนิตทั้งหมดและแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ที่เตรียมได้แล้วจะเห็นว่าได้แอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 6.5 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ตารางที่ 22)ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีการตกตะกอนด้วยเอธานอล ซึ่งสามารถอบแห้งได้ที่อุณหภูมิห้อง (25°ซ) โดยแอคติวิตีของเอนไซม์ยังไม่เสียไปเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด

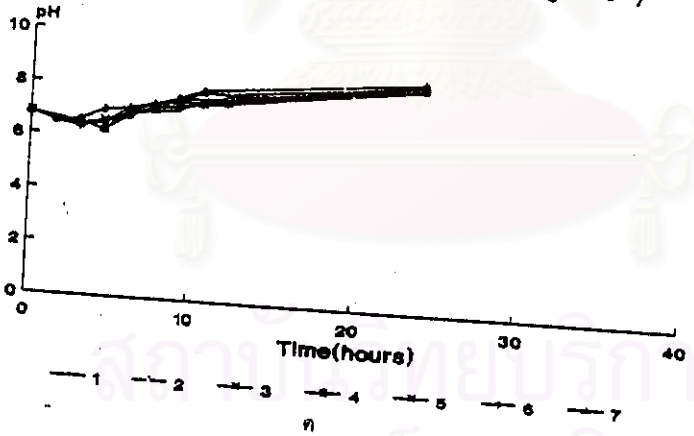
4.6 <u>การเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่อุณหภูมิต่าง ๆ</u>

การเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่เตรียมได้จากการตกตะกอนด้วยเอธานอลและปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (25°ซ) เมื่อตรวจแอคติวิตีของเอนไซม์ผงก่อนที่จะแบ่งไปเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ คือ -20 °ซ,4 °ซ,30 °ซ ,45 °ซ, และ 60 °ซ เป็นเวลา 28 วัน และเก็บตัวอย่างมาตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์เป็นระยะๆ เปรียบเทียบกับแอคติวิตีของเอนไซม์เริ่มต้นผลการทดลองได้แสดงไว้ในตารางที่ 23 จะเห็นว่าเมื่อเก็บเอนไซม์ที่ 60 °ซ ไปได้ 21 วันแอคติวิตีของเอนไซม์จะสูญเสียไปและถ้าเก็บที่ 45 °ซ แอคติวิตีของเอนไซม์จะสูญเสียไปในวันที่ 28



ก





ค

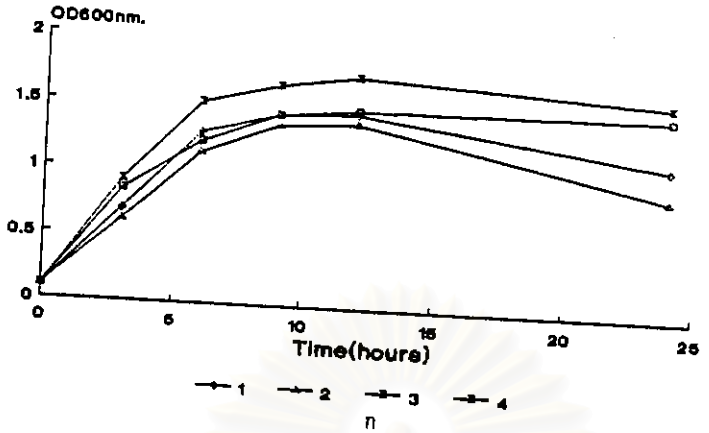
1= ทริปโตน 2= โซเดียมไนเตรท 3= ยูเรีย 4= ไม่ได้เติมสารประกอบไนโตรเจนอื่นๆนอกจากสารสกัดจากยีสต์(control) 5= แอมโมเนียมไนเตรท 6= เปปโตน 7= แอมโมเนียมซัลเฟต

<u>ภาพที่ 22</u> . เปรียบเทียบการเจริญ (ก)แอคติวิตีของเอนไซม์ (ข) และรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH (ค) ของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อเติมสารประกอบไนโตรเจนชนิดต่างๆ 0.2% ลงในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 ที่มีน้ำมันละหุ่ง 0.33%(v/v) เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนและสารสกัดจากยีสต์ 0.5% เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน

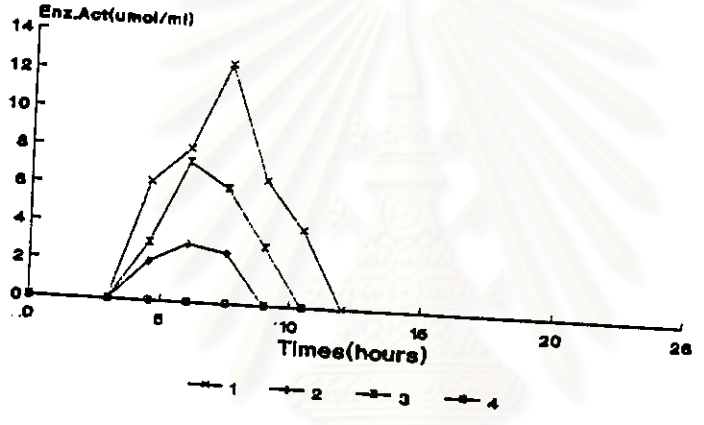
ตารางที่ 19 แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1ความขุ่นเริ่มต้นที่OD600nm เท่ากับ0.1 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเป็น 200 รอบต่อนาที pHตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อ6.8 ที่อุณหภูมิ 30°ซ ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารสกัดจากยีสต์ในปริมาณต่างๆเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนและเติมสารประกอบไนโตรเจนชนิดต่างๆปริมาณ 0.2%(w/v) โดยมีน้ำมันละหุ่ง 0.33% (v/v) เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน ทำการติดตาม Total activity ในน้ำใสจากการเลี้ยง เชื้อ 250 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6 เมื่อให้ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm. เท่ากับ 1.0

สารประกอบไนโตรเจน 0.2%(w/v)	Total activity
ทริปโตน	0
ยูเรีย	550
control	1775
แอมโมเนียมไนเตรท	2539.0
เปปโตน	0
แอมโมเนียมซัลเฟต	1105.3

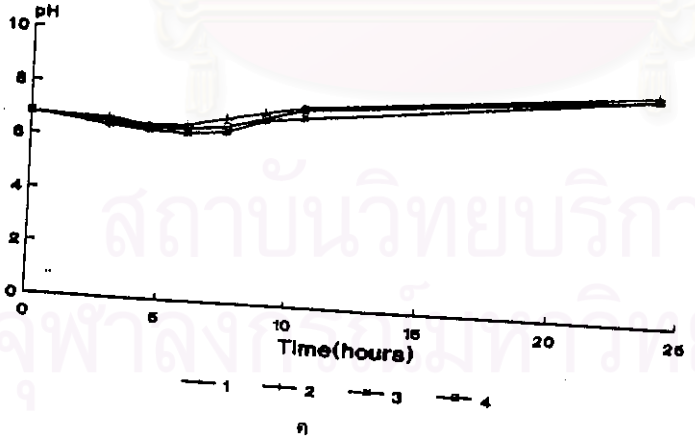
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก



ข



ค

1= สารสกัดจากยีสต์ 0.18%N 2= กากเมล็ดทานตะวัน0.18%N

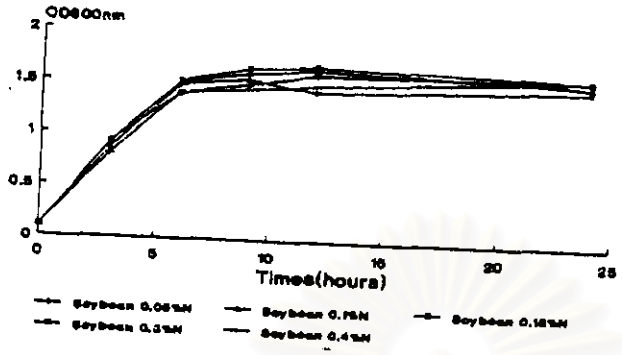
3= กากถั่วเหลือง 0.18%N 4= กากเมล็ดทานตะวัน + กากถั่วเหลือง(1:1) 0.18%N

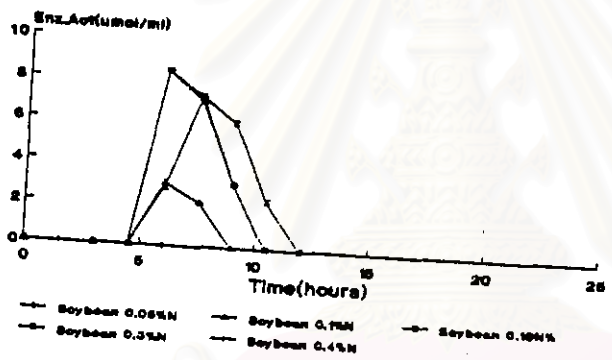
ภาพที่ 23 เปรียบเทียบการเจริญ (ก) แอคติวิตีของเอนไซม์ (ข) และรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH (ค) ของเอนไซม์ไลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อใช้สารสกัดจากยีสต์ที่มีไนโตรเจน 0.18% กากเมล็ดถั่วเหลือง ที่มีไนโตรเจน 0.18 % กากเมล็ดทานตะวันที่มี ไนโตรเจน 0.18% และกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในอัตราส่วน1:1 ที่มีไนโตรเจน 0.18 % เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1 มีน้ำมันละหุ่ง 0.33% เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน และแอมโมเนียมไนเตรท 0.2 % เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน

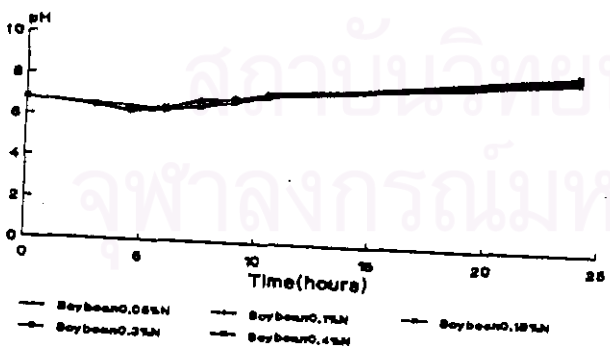
ตารางที่ 20 แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1ความขุ่นเริ่มต้นที่OD600nm เท่ากับ0.1 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเป็น 200 รอบต่อนาที pHตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อ6.8 ที่อุณหภูมิ 30°ซ โดยใช้กากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวันที่มีไนโตรเจน 0.18%(v/v) แทนสารสกัดจากยีสต์ที่มีไนโตรเจน 0.18%(v/v)และมีแอมโมเนียมไนเตรท 0.2%(w/v) โดยมีน้ำมันละหุ่ง 0.33% (v/v) เป็นแหล่งต้นคอคาร์บอน ทำการติดตาม Total activity ในน้ำใสจากการเลี้ยง เชื้อ 250 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6 เมื่อให้ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm. เท่ากับ 1.0

สาร (0.18%N)	Total activity
สารสกัดจากยีสต์	2539.0
กากเมล็ดทานตะวัน	682.5
กากถั่วเหลือง	1170.0
กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวัน(1:1)	0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย







ภาพที่ 24. เปรียบเทียบการเจริญ (ก)แอคติวิตีของเอนไซม์ (ข) และรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH (ค) ของเอนไซม์โลเปสของเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อใช้กากถั่วเหลืองที่มีไนโตรเจน 0.05%, 0.1%, 0.18%, 0.3% และ 0.4% เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนแทนสารสกัดจากยีสต์ในอาหารสูตรพื้นฐานที่1 โดยมีน้ำมันละหุ่ง 0.33% เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนและมีแอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนอีกชนิดหนึ่ง

ตารางที่ 21 แสดง Total activity ของเอนไซม์ไลเปสเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารสูตรพื้นฐานที่ 1ความขุ่นเริ่มต้นที่OD600nm เท่ากับ0.1 ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเป็น 200 รอบต่อนาที pHตั้งต้นในการเลี้ยงเชื้อ6.8 ที่อุณหภูมิ 30°ซ ใช้กากถั่วเหลืองที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.05%(v/v),0.1%(v/v), 0.18% (v/v)0.3%(v/v)0.4%(v/v)ใน การเลี้ยงเชื้อ โดยมีน้ำมันละหุ่ง 0.33 % เป็นแหล่งต้นคอคาร์บอนและแอมโมเนียมไนเตรท 0.2% เป็นต้นคอไนโตรเจนอีกชนิดหนึ่ง ทำการติดตาม Total activity ในน้ำใสจากการเลี้ยง เชื้อ 250 มล. ที่ชั่วโมงที่ 6 เมื่อไหความขุ่น ของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 nm. เท่ากับ 1.0

กากถั่วเหลือง(%N)	Total activity
0.05	0
0.1	500
0.18	1200
0.3	1500
0.4	1500

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 22 การเตรียมเอนไซม์ในรูปผงโดยวิธีต่าง ๆ

วิธีการ	ยูนิตทั้งหมด (ยูนิต/ 1 ลิตร)	ปริมาณโปรตีน (mg./1ลิตร)	Specific Acyivity (ยูนิต / มก.โปรตีน)
1. Crude enzyme culture	12,000	1,875.0	6.4
2. ตกตะกอนด้วย แอมโมเนียม ซัลเฟต 55%	8,000	1,801.8	4.4
3.ตกตะกอนด้วย โซเดียมซัลเฟต 30%	5,000	1,000	5.0
4. ตกตะกอนด้วย เอธานอล 80%	12,000	1,846.15	6.5
5. Ultrafiltration and Lyophilization	6,000	1,500	4.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 23 ผลการเก็บเอนไซม์ไลเปสซึ่งเตรียมโดยวิธีตกตะกอนด้วยเอธานอล 80 %

จำนวนวันที่เก็บ	Relative Activity %				
	-20°C	4°C	30°C	45°C	60°C
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
7	103.1	105.0	105.0	101.0	103.0
14	105.5	103.3	103.5	105.3	102.0
21	103.8	104.4	106.2	103.0	-
28	105.3	103.5	100.0	-	-

Crude enzyme powder12,000 U/mg = 100%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย