รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ทนง ภัครัชพันธ์. เอนไซม์ในอุตสาหกรรม. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2522.

ภาษาอังกฤษ

Aiska, K., and Terada, O. Extracellular microbial lipase. In Macrae, A.(ed.). Microbial Enzyme and Biotechnology. 228. New York : Applied Science Publishers, 1983.

Arnold, R. G., Shahani, R. M., and Dwivedi, B. K. Application of lipolytic enzymes to flavor development in dairy products. J. Diary. Sci. 58 (1975) : 1127-1143.

Bernlohr, W. R. Postlogarithmic phase metabolism of sporulating microorganism I. Protease of *Bacillus licheniformis*. J. Biol. Chem. 239 (1964) : 538-543.

Bezborodov, A. M., Davranov, K. D., and Akhmedova. Lipase inhibitor in *Rhizopus Microsporus* cultures. In F.E.M.S. symposium 23, Kuleav, I. S., Dawes, E. A. and Tempest, D. W. (eds.). Environ. Regul. Microb. Metab. 145-149. London : Academic Press. 1985.

Borgstrom, B., and Erlanson, C. Pancreatic lipase and colipase: Interaction and effect of bile salts and other detergents. Eur. J. Biochem., 37 (1973) : 60-68.

Buchanan, R. E., and Gibbons, N. E.(eds.). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore : The Williams & Willikins Company,1994.

Chapman, G. W. Jr. A proteinaceous competitive inhibitor of lipase isolated from *Heilianthus* seeds. Phytochemistry. 26 (1987) : 3127-3131.

Claudia, S. D., Helena, S., Walter, S., Ulrich, M., and Rolf, D. S.. Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*. Biochim. Biophys. Act. 1214 (1994) : 43-53.

Dalmau, E., Montesinos, J. L., Lotti, M., and Casas, C. Effect of different carbon source on lipase production by *Candida rugosa*. Enz. Microbial. Technol. 26 (2000) : 657-663.

De Moraes, J., and Chandan, R. C. Factors Influencing the production and activity of a *Streptococcus thermophilus* Lipase. J. Food Sci. 47 (1982) : 1579-1583.

Dharmsthiti, S., Pratuangdejkul, J., Theeragool, G., and Luchai, S. Lipase activity and gene cloning of *Acinetobacter calcoaceticus*. J. Gen. Appl. Microbiol. 44 (1998) : 139-145.

Dimitris, G. H., Ekaterini, K., Haralambos, S., Pau,l C., Fragiskos, N. K., Dimitris, K., and Basil, J. M. A novel lipolyfic activity of *Rhodotorula glutinis* cells : Production, partial characterization and application in the synthesis of esters. J. Biosci. Bioeng. 88 (1999) : 53-56.

Doi, J. W. Rule of protease in sporulation. Current Topic in Cellular Regulation. 7 (1973) : 1-20.

Dong, W. L., You, S. K., Ki, J. K., Byung, C. K., Hak, J. C., Doo, S. K., Maggy, T. S., and Yu, R. P. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. FEMS. Microbiol. Lett. 179(1991) : 393-400.

Edward, C. Microbiology of Extreme Environment. New York : McGraw-Hill, 1990.

Ely, N. Control of lipase production by *Rhizopus oligosporus* under various growth condition. J. Gen. Microbiol.134 (1988) : 227-233.

Emmanuel, L., Karin, S., and Charles, C. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extreamly basic pH-tolerant enzyme. Eur. J. Biochem. 216 (1993) : 155-160.

Emmanuelle, C., and Alasdair, R. M. Substrate specificities of lipases A, and B from *Geotrichum candidum* CMICC 335426. Biochim. Biophys. Act. 1123 (1992) : 59-64.

Estell, D. A., Graycar, T. P., and Wells, J. A. Engineering an enzyme to be resistant to chemical oxidation. J. Biol. Chem. 260. (1985) : 6518-6521.

Frederick, M. A., Roger, B., Robert, E.K., David D. M., Seidman, J. G., John, A. S., and Kevin, S. Short Protocols in Molecular Biology. 4th ed. 10-36. New York : John Wiley & Sons, Inc. 1999.

Fumio, I., Yukari, K., Mitsuyo, H., Takuuya, N., and Yasuhiro, Y. Purification, characterization, and molecular cloning of lactonizing lipase from *Pseudomonas* species. J. Bio. Chem. 266 (1991) : 18135-18140.

Gilbert, E. J., Cornish, A., and Jones, C. W. Purification and propoties of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* EF2. J. Gen. Microbiol. 137 (1991) : 2223-2229.

Gilbert, E. J., Drozd, J. W., and Jones, C. W. Physiological regulation and optimization of lipase activity in *Pseudomonas aeruginosa* EF2. J. Gen. Microbiology. 137 (1991) : 2215-2221.

Godtfredsen, S. E. Microbial Lipase. Microbial Enzyme and Biotechnology.,2nd in Forgarty, W. M., and Kelly, C. T. (1990) : 255-274.

Gordillo, M. A., Sanchez, A., Valero, F., Montesinos, J. L., and Lafuente, J. Enhancement of *Candida rugosa* lipase production by using different control fed-batch operation strategies. Biotechnol. Bioeng. 60 (1998) : 156-168.

Haba, E., Breso, O., Ferrer, C., Marques, A., Busquets, M., and Manresa, A. Isolation of lipase-secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. Enzyme and Microbial Technology. 26 (2000) : 40-44.

Hayakawa, K., Ohara, K., and Satake, I. The stepwise conformational change of poly (L-lysine) in aqueous solution of sodium 1-octane sulphate. Chem. Lett. (Chem.Soc Janpan) 1980 : 647-635.

Heineken, F. B., and O'Conner, R. J. Continuous culture studies on the biosynthesis of alkaline protease, neutral protease, neutral protease and α-Amylase by *Bacillus subtilis* NRRL-B3411. J. Gen. Appl. Microbiol. 73 (1972) : 35-44.

Hummel, K. M., Penheiter, A. R., Gathman, A. C., and Lilly, W. W. Anmalous estimation of protease molecular weight using gelatin-containing SDS-PAGE. Anal. Biochem. 218 (1996) : 325-329.

Hyung, K. K., Moon, H. S., Hyoung, M. K., and Tae, K. O. Occurence of thermostable lipase in thermophilic *Bacillus* sp. strain 398. Biosci. Biotech. Biochem, 58(1994) : 961-962.

Hyung, K. K., Sun, Y. P., Jung K. L., and Tae, K. O. Gene cloning and characterization of thermostable lipase from *Bacillus sterothermophilus* L.1 Biosci. Biotechnol. Biochem. 62 (1998) : 66-71.

Kim, H. K., Sung, M. H., Kim, H. M., and Oh, T. K. Occurrence of thermostable lipase in thermophilic *Bacillus sp.* Strain 398. Biosci. Biotech. Biochem. 58 (1994): 961-962.

Kiyotani, K., Tasaka, H., Tsukiyama, F., and Matsuo, Y. Lipase activity in guineapig peritonal macrophages and mycobacterial lipase inhibitor. Hiroshima J. Medical. Sci. 32 (1983) : 267-271.

Kohno, M., Kugimiya, W., Hashimoto, Y., and Moriyama, Y. Purification, characterization and crystallization of two types of lipase from *Rhizopus niveus*. Biosci. Biotech. Biochem. 58 (1994) : 1007-1012.

Kohr, H. T., Tan, N. H., and Chua, C. L. Lipase-catalyzed hydrolysis of palm oil. J. Amer. Oil. Chem. Soc. 63 (1986) : 538-540.

Kojima, Y., Yokoe, M., and Mase, T. Purification and characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescems* AK102. Biosci. Biotech. Biochem. 58 (1994) : 1564-1568.

Kokusho, Y., Machihida, H., and Iwasaka, S. Studies on alkaline lipase : Isolation and identification of lipase producing microorganism. Agr. Biol. Chem. 46 (1982) : 1159-1164.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 (1970) : 680-685.

Laskowski, M., and Kato, I. Protein Inhibitors of proteinases. Ann. Rev. Biochem. 4 (1980) : 593-626.

Lesuisse, E., Schanck, K., and Colson, C. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. Eur. J. Biochem.216 (1993) : 155-160.

Linfield, W. M., O'Brien, D. J., Serota, S., and Robert, A. Lipid-Lipase Internations. I. Fat Splitting with lipase from *Candida rugosa*. JAOCS. 61 (1984) : 1067-1071.

Lowry, O. H. Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 (1951) : 267-275.

Macrae, A. R. In Willium M. F. Extracellular Microbial Lipase. Microbial enzyme and biotechnology. New York : Applied Science Publishers, 1983.

Majda, E.,Valerie, D., and Louis, C. Optimization of lipase production by *Rhizopus oryzae* and study on the stability of lipase activity in organic solvents. J. Biotechnol. 60(1998) : 97-103.

Marcin, C., Katz, L., Greasham, R., and Chartrian, M. Optimization of lipase production by *Pseudomonas aeruginosa* MB5001 in batch cultivation. J. Ind. Microbiol. 12 (1983) : 29-34.

Marianne K., Birgit H., Dietmar, S., and Rolf, D. S. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATTCC 21808 : Purification, characterization, Crystalization, and preliminary X-ray diffraction data. J. Bacteriol. 173 (1991) : 4836-4841.

Masahiro, Y., Hiroyasu, O., Taro, K., Takuya, K., Sinji, T., Takuya, I., Toshimitsu, N., Hideki, F., and Haruo, I.. Purification and characterization of lipase from *Rhizopus chinensis* cells. J. Biosci. Bioeng. 88 (1999) : 571-573.

Masanobu, T., Sakata, M., Takaya, H., and Miruma, K. Hydrolysis of palm stearin oil by a thermostable lipase in a draft tube - type reactor. J. Ferment. Bioeng. 80 (1995) : 340-345.

Masaru, K., Taichi S., Akihiko, K., and Hideki F. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipares in a solvent-fee system. J. Biosci. Bioeng. 91 (2001) : 12-15.

Momsen, W. E., and Brockman, H. L. Inhibition of pancreatic lipase B activity by taurodeoxycolate and its reversal by colipase. J. Biol. Chem. 251 (1767) : 384-388.

Moon, S. H., and Parulekar, S. J. A parametric study of protease in batch and fed-batch cultures of *Bacillus firmus*. Biotech. Bioeng. 37 (1991) : 467-483.

Mori, M., Yamaguchi, K., and Abe, K. Purification of a lipoprotein lipase inhibiting protein produce by a melanoma cell live associated with cancer cachexia. Biochem. Biophy. Res. Com. 160 (1989) : 1085-1092.

Muderhwa, J. M., Ratomahenina, R., Pina, M., Graille, J., and Galzy, P. Purification and properties of the lipase from *Candida deformans* (Zach) Langeron and Guerr. JAOCS. 62 (1985) : 1031-1036.

Okeke, C. N., and Okolo, B. N. The effect of cultural conditions on the production of lipase by *Acremonium strictum*. Biotechnol. Lett. 12 (1990) : 747-750.

Okumura, S., Iwai, M., and Tsujisaka, Y. The effect of reverse action on triglyceride hydrolysis by lipase. Agric. Biol. Chem. 45 (1981) : 185-189.

Omar, I. C., Hayashi M., and Nagai, S. Purification and some properties of a thermostable lipase from *Humicola lanuginosa* No.3. Agr. Bio. Chem. 51 (1987) : 37-45.

Patricia, S., Christiane, B., and Friendrich, G.. Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *streptomyces cinnamomeus*. Appl. Env. Microb. 63 (1997) : 3553-3560.

Perry D. H. Experimental Design in Biotechnology. New York : Marcel Dekker, Inc, 1989.

Peter, H. A. S. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, volume 2. Baltimore : The Williams & Willikins Company.1986.

Pooja, R., Sapina, B., Saxena, R. K., and Rani, G. A hyper-thermostable, alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. with the property of thermal activation. Biotechnol. Lett. 22 (2000) : 495-498.

Posorske, L. H. Industrial-scale application of enzyme to fats and oils industry. J. Amer. Oil. Chem. Soc. 61 (1984) : 1758-1760.

Poulose, A. J. Van, B. J., Power, S., Shew, B., Gray, G., and Norton, S. Protein engineering of lipase from *Pseudomonas* sp. Presented at the 81st . Annual meeting of the American Oil Chemists Society. May 1990, Baltimore. Inform, 1 (4), 318.

Rakshit, S.K., Vasuhi, R., and Kosugi, Y. Enrichment of polyunsaturated fatty acid from tuna oil using immobilized *Pseudomonas fluorescens* lipase. Bioproc. Eng. 23 (2000) : 251-255

Raman, P., Yadav, R., Saxena, K., Rani, G., and Davidson, W. S. Purification and characterization of a regiospecific lipase from *Aspergillus terreus*. Biotechnol. Appl. Biochem. 28 (1998) : 243-249.

Rehm, H. J., and Reed, G. Hydrolases. Biotechnology. 7a, Enzyme Technology VCH. Publushers,1987.

Rhee, J. S., Yoo, O. J., Lee, Y. P., Chung, G. M., and Jeohn, G. H. Cloning and nucleotide sequence of thermostable lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* SIK W1. Agri. Biol. Chem. 9 (1991) : 2359 - 2365.

Rod, A. R. A perspective on the biotechnological potential of extremophiles. Trends in Biotechnology. 10 (1992) : 395-440.

Saovanee, D., and Sudapor, L. Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027. FEMS. Microbiol. Lett. 179 (1999) : 241-246.

Seitz, W. E. Industrial application of microbial lipase : A Review. J. Amer, Oil Chem.Soc. 51 (1974) : 12-16.

Shahani, K. M., In G. Reed (ed.). Lipase and esterases. Enzymes in Food Processing. 2d ed. Newyork : Academic Press,1975.

Shimada, Y., Watanabe, Y., Samukawa, T., Sugihara, A., Noda, H., Pukuda, H., and Tominaga, Y. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. JAOCS. 76 (1999) : 789-793.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Soo, H. Y., Takuya N., and Yasuhiro Y. Screening and identification of a novel lipase from *Burkholderia* sp YY62 which hydrolyzes *t*-butyl esters effectively. J. Gen. Appl. Microbiol. 44 (1998) : 147-152.

Stuer, W., Jaeger, K. E., and Winkler, U. K. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol.168 (1986) : 1070-1074.

Sugihara, A., Tani, T., and Tominaga, Y. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus sp.* J. Biochem. 109 (1991) : 211-216.

Sugiura, A. and Ogiso, T. Studies on bile-sensitive lipase VII. Effect of surfactants on *Mucor* lipase (Studies on enzymes XLVIII). Yakukaku Zasshi. 89 (1969) : 1284-1296.

Suzuki, T., Mushiga, Y., Yamane, T., and Shimizu, S. Mass production of lipase by fed-batch culture of *Pseudomonas fluorescens*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27 (1988) : 417-422.

Takaharu, S., Tsuyoshi, Y., Akira, M., Midori, U., Atsushi, T., Sho, O., and Kazuhiho N. Purification and characterization of monoglycerol lipase from *Pseudomonas* sp. LP7315. J. Biosci. Bioeng. 91 (2001) : 27-32.

Takeshi, S., Toru, N., Tatsuo, K., Tokuzo, N., and Nobuyoshi, E. Cold-active lipolytic activity of psychrotrophic *Acinetobacter* sp. strain No.6 J. Biosci. Bioeng. 92 (2001) : 144-148.

Taro, T., Koichi, N., and Tetsuro, F., Purification and characterization of a thermostable lipase from newly isolated *Pseudomonas* sp. KWI-56. Agric. Biol. Chem. 54 (1990) : 1253-1258.

Toida, J., Kondoh, K., Fukuzawa, M., Onishi, K., and Sekiguchi, J. Purification and characterization of a lipase from *Aspergillus oryzae*. Biosci. Biotech. Biochem. 59 (1995) : 1199-1203.

Ulrich, K. W., and Martina, S. Glycogen, hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. J. Bacteriol.138 (1979) : 663-670.

Uyeda, M., Hirotsu, M.,I tonaga, M., Urata,S., Susuki,K., and Shibata, M. Purification and properties of lipase activater produced by *Streptomyces* sp. sdtrain No. BR-1381. Agr. Biol. Chem. 47(1983) : 2739-2746.

Wang, S., and Huang, A.H.C. Inhibitors of lipase activities in soyabean and other oil seeds. Plant. Physiol. 76 (1984) : 929-934.

Wang, Y., Srivastava, K. C., Shan, G. J., and Wang, H. Y. Thermostable alkaline lipase from a newly isolated thermophilic *Bacillus* sp. strain A30-1. J. Ferment. Bioeng. 79 (1995) : 433 – 438.

Wang, Y. J., Sheu, J. Y., Wang E. F., and Shaw, J. F. Lipase-catalyzed oil hydrolysis in the absence of added emulsifier. Biotech. Bioeng. 31 (1988) : 628-633.

Watanabe, N., Ota, Y., Minoda, Y., and Yamada, K. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganism, cultural condition and some properties of crude enzyme. Agric. Biol. Chem.41 (1977) :1353-1358.

Yamaguchi, T., Muroya, N., Isobe, M., and Sugiura, M. Production and properties of lipase from a newly isolated *Chromobacterium*. Agric. Biol. Chem. 37 (1973) : 999-1005.

Yamane, T. Enzyme technology for the lipids industry: An engineering overview. J. Amer. Oil. Soc. 64 (1987) : 1659-1661.

Yang, J., Kobayashi, K., Iwasaki, Y., Nakano, H., and Yamane, T. *In vitro* analysis of roles of a disulfide bridge and a calcium binding site in activation of *Pseudomonas* sp. strain KWI – 56 lipase. J. Bacteriol. 82 (2000) : 292-302.

Yuji, S., Chigusa, K., Akio, S., Toshihiro, N., Nobus, T., Susumu, T., and Yoshio, T. Purification and characterization of a novel solvent-tolerant lipase from *Fusarium heterosporum*. J. Ferment. Bioeng. 75 (1993) : 349-352.

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเหลวน้ำมันมะกอก (olive oil medium)

แอมโมเนียมซัลเฟต	5.0	กรัม
ซอยโตนเปปโตน	5.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	1.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	5.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน ปรับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 จากนั้นเติมน้ำมันมะกอก 10 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน นาน 15 นาที

2. อาหารแข็งไตรบูไทริน (tributyrin agar) / อาหารแข็งเอียงน้ำมันมะกอก (olive oil slant agar)

แอมโมเนียมซัลเฟต	5.0	กรัม
ซอยบีนเปปโตน	5.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	1.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	5.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผสมสารให้เข้ากัน ปรับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 จากนั้นเติมไตรบูไทริน/น้ำมันมะกอก 10 มิลลิลิตรและวุ้นผง (agar) 20 กรัม นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน นาน 15 นาที

3. อาหารทดสอบการเคลื่อนที่ (motility test medium)

เนื้อสกัด	3.0	กรัม
เปปโตน	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
ไตรฟีนิลเตตระโซเลียมคลอไรด์ (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride)	0.05	กรัม
วุ้นผง	4.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

หลอมอาหารให้เข้ากัน แล้วเติมไตรฟีนิลเตตระโซเลียมคลอไรด์ ต้มเดือดนาน 1 นาที นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน นาน 15 นาที

4. อาหารเหลวไธโอไกลโคเลต (thioglycolate broth)

เปปโตน	20.0	กรัม
แอล-ซีสทีน (L-cystine)	0.25	กรัม
กลูโคส	6.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	2.5	กรัม
โซเดียมไธโอไกลโคเลต	0.5	กรัม
โซเดียมซัลไฟต์	0.1	กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วุ้นผง	4.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ผสมสารให้เข้ากัน ปรับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 จากนั้นเติมน้ำมันมะกอก 10 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน นาน 15 นาที

5. อาหารเหลวฟีนอล เรดเบส (phenol red broth base)

โปรติโอสเปปโตน	10.0	กรัม
เนื้อสกัด	1. 0	กรัม
ฟีนอลเรด	0.018	กรัม
น้ำตาล	1	เปอร์เซนต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร)
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

น้ำตาลที่ใช้ได้แก่ กลูโคส, ไซโลส, อะราบิโนส และแมนนิทอล ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 6.8 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน นาน 15 นาที

6. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวไนเตรต (nitrate broth)

โพแตสเซียมไนเตรต	1.0	กรัม
อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวนิวเทรียนท์	1,000	มิลลิลิตร
(ภาคผนวก ก หมายเลข 11)		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน นาน 15 นาที

7. อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์-วีพี (MR-VP medium)

โปรติโอสเปปโตน	5.0	กรัม
กลูโคส	5.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	5.0	กรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส และความดันมาตรฐานเป็นเวลา 10 นาที

8. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวอินโดล (Indole broth)

เปปโตน	10.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส และความดันมาตรฐาน นาน 20 นาที

9. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสตาร์ช (starch agar)

แป้งมันฝรั่ง	1.0	กรัม
อาหารแข็งนิวเทรียนท์	100	มิลลิลิตร
(ภาคผนวก ก หมายเลข 11)		

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน นาน 15 นาที

10. อาหารแข็งทดสอบการใช้ซิเตรท (simmons' citrate agar)

แมกนีเซียมซัลเฟต	0.2	กรัม
แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟส	1.0	กรัม
โซเดียมซิเตรท	2.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม
วุ้นผง	15.0	กรัม
บรอมไธมอลบลู	0.08	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.8 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน เป็นเวลา 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวนิวเทรียนท์ (nutrient broth)

เนื้อสกัด	3.0	กรัม
แบคโตเปปโตน	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน นาน 15 นาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

วิธีเตรียมสารเคมี

1. สารละลายตรวจวัดแอคติวิตีของไลเปส

1.1 สารละลาย A

พารา-ไนโตรฟีนิล อะซีเตท	0.45	กรัม
2-โพรพานอล	50	มิลลิลิตร

1.2 สารละลาย B

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.61	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.36	กรัม
น้ำกลั่น	450	มิลลิลิตร

ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

ผสมสารละลาย A และ B ที่เตรียมไว้ให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชา

2. สารละลายสำหรับวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

2.1 Lowry A

โซเดียมคาร์บอเนต	60.0	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	12.0	กรัม
โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต	0.6	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	3,000	มิลลิลิตร

2.2 Lowry B

คอปเปอร์ซัลเฟต	5.0	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 Lowry C

ผสม Lowry A	50	ส่วน
กับ Lowry B	1	ส่วน

2.4 Lowry D

สารละลายโฟลินฟีนอลรีเอเจนท์ (folin phenol reagent)	1	ส่วน
น้ำกลั่น	1	ส่วน

3. สารละลายแกรมคริสตัลไวโอเล็ต (Gram's crystal violet solution)

3.1 สารละลาย A

คริสตัลไวโอเล็ต	2.0	กรัม
เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์	20.0	มิลลิลิตร

3.2 สารละลาย B

แอมโมเนียมออกซาเลต	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B ที่เตรียมไว้ให้เข้ากัน แล้วเก็บในขวดสีชา

4. สารละลายแกรมไอโอดีน (Gram's iodine solution)

ไอโอดีนคริสตอล	1.0	กรัม
โพแตสเซียมไอโอไดด์	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันเก็บในขวดสีชา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. สารละลายแกรมซาฟรานินโอ (Gram's safranin staining solution)

ซาฟรานิน	0.25	กรัม
เอทานอล 95 เปอร์เซนต์	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายซาฟรานินในเอทานอล แล้วจึงเติมน้ำกลั่นผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

6. สารละลายมาลาไคท์กรีน (malachite green)

มาลาไคท์กรีน	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

7. สารละลาย แอลฟา-แนพทิลามีน ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซนต์ (alpha-naphthylamine)

แอลฟา-แนพทิลามีน	0.5	มิลลิลิตร
5 นอร์มอล กรดอะซิติก	100	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

8. สารละลายกรดซัลฟานิลิก ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ (sulfanilic acid)

กรดซัลฟานิลิก	0.8	มิลลิลิตร
5 นอร์มอล กรดอะซิติก	100	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

9. สารละลายแอลฟา-แนพทอล ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (alpha-napthol)

แอลฟา-แนพทอล	1.0	กรัม
95 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล	100	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10. สารละลายโคแวคส์ (kovac's solution)

พาราไดเมทิลอะมิโนเบนซัลดีไฮด์ (*p*-dimethylamenobnzaldehyde)	5.0	กรัม
เอมิลหรือบิวทิลแอลกอฮอล์ (amyl or butyl alcohol)	75	มิลลิลิตร
กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	25	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

11. สารละลายสำหรับใช้ในการทำพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเลคโทรโฟริซิส

11.1 สารละลายทริสไกลซีนอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ (เข้มข้น 5 เท่า)

ทริส	9.0	กรัม
ไกลซีน	43.2	กรัม
ปรับความเป็นกรดด่างเท่ากับ	8.3	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	600	มิลลิลิตร

11.2 สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์

ทริส	6.0	กรัม
ความเป็นกรดด่างเท่ากับ	6.8	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	มิลลิลิตร

11.3 สารละลายทริส pH 8.8 ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์

ทริส	18.15	กรัม
ความเป็นกรดด่างเท่ากับ	8.8	
เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	100	มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11.4 สารละลายอะคริลาไมด์ (30% T, 2.67% C)

อะคริลาไมด์	14.6	กรัม
BIS (N,N',-methylene bis acrylamide)	0.4	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

11.5 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1.0	มิลลิลิตร

11.6 บัฟเฟอร์ที่ใช้กับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (sample buffer) ความเข้มข้น 5 เท่า

น้ำกลั่น	3.8	มิลลิลิตร
สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์	1.0	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	0.8	มิลลิลิตร
2-เมอร์แคบโตเอทานอล	0.4	มิลลิลิตร
สารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์บรอมฟีนอลบลู	0.4	มิลลิลิตร

11.7 สารละลายผสมของเซพาเรติงเจล 12 เปอร์เซ็นต์

น้ำกลั่น	3.45	มิลลิลิตร
สารละลายทริส pH 8.8 ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์	2.5	มิลลิลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	4.0	มิลลิลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	50	ไมโครลิตร
TEMED	5	ไมโครลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11.8 สารละลายสแตกกิงเจล 4 เปอร์เซ็นต์

น้ำกลั่น	6.2	มิลลิลิตร
สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ทริส	2.5	มิลลิลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	1.33	มิลลิลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	50	ไมโครลิตร
TEMED	5	ไมโครลิตร

11.9 สารละลายสำหรับย้อมสี (staining solution)

สีคูแมสซี บริลเลียนท์ บลู จี-250	0.1	เปอร์เซ็นต์
เมทานอล	40.0	เปอร์เซ็นต์
กรดอะซิติก	10.0	เปอร์เซ็นต์

11.10 สารละลายสำหรับล้างสี (destaining solution)

เมทานอล	40.0	เปอร์เซ็นต์
กรดอะซิติก	10.0	เปอร์เซ็นต์

12. สารละลายที่ใช้ในการทำอิเลคโทรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลพอลิอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น

12.1 สารละลายทริสไกลซีนอิเลคโทรดบัฟเฟอร์ (เข้มข้น 5 เท่า)

ทริส	9.0	กรัม
ไกลซีน	43.2	กรัม
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	3.0	กรัม
ปรับความเป็นกรดด่างเท่ากับ	8.3	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร	600	มิลลิลิตร

12.2 สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS stock) 10 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	1.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	10	มิลลิลิตร

12.3 บัฟเฟอร์ที่ใช้กับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (sample buffer) ความเข้มข้น 5 เท่า

น้ำกลั่น	3.8	มิลลิลิตร
สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์	1.0	มิลลิลิตร
กลีเซอรอล	0.8	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	1.6	มิลลิลิตร
2-เมอร์แคปโตเอธานอล	0.4	มิลลิลิตร
สารละลาย 1 เปอร์เซ็นต์บรอมฟีนอลบลู	0.4	มิลลิลิตร

12.4 สารละลายผสมของเซพาเรติงเจล 12 เปอร์เซ็นต์

น้ำกลั่น	3.45	มิลลิลิตร
สารละลายทริส pH 8.8 ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์	2.5	มิลลิลิตร
สารูละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	100	ไมโครลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	4.0	มิลลิลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	50	ไมโครลิตร
TEMED	5	ไมโครลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

12.5 สารละลายสแตกกิงเจล 4 เปอร์เซ็นต์

น้ำกลั่น	6.1	มิลลิลิตร
สารละลายทริส pH 6.8 ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์	2.5	มิลลิลิตร
สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	100	ไมโครลิตร
สารละลายอะคริลาไมด์	1.33	มิลลิลิตร
สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์	50	ไมโครลิตร
TEMED	5	ไมโครลิตร

13. สารละลายย้อมแอคติวิตีของไลเปสในพอลิอะคริลาไมด์เจล (polycrylamide gel)

13.1 สารละลาย A

แอลฟา-แนพทิล อะซีเตท (α- naphthyl acetate)	20	มิลลิกรัม
อะซีโตน	1	มิลลิลิตร

13.2 สารละลาย B

ฟาสต์บลู บีบี ซอลท์ (fast blue BB salt)	150	มิลลิกรัม
0.1 โมลาร์ ทริส บัฟเฟอร์ pH 7.0	99	มิลลิลิตร

(ภาคผนวก ข หมายเลข 14)

ผสมสารละลาย A และ B ที่เตรียมไว้ให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชา

14. สารละลายทริส บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 7.0 (Tris-Hcl)

ทริส	1.211	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

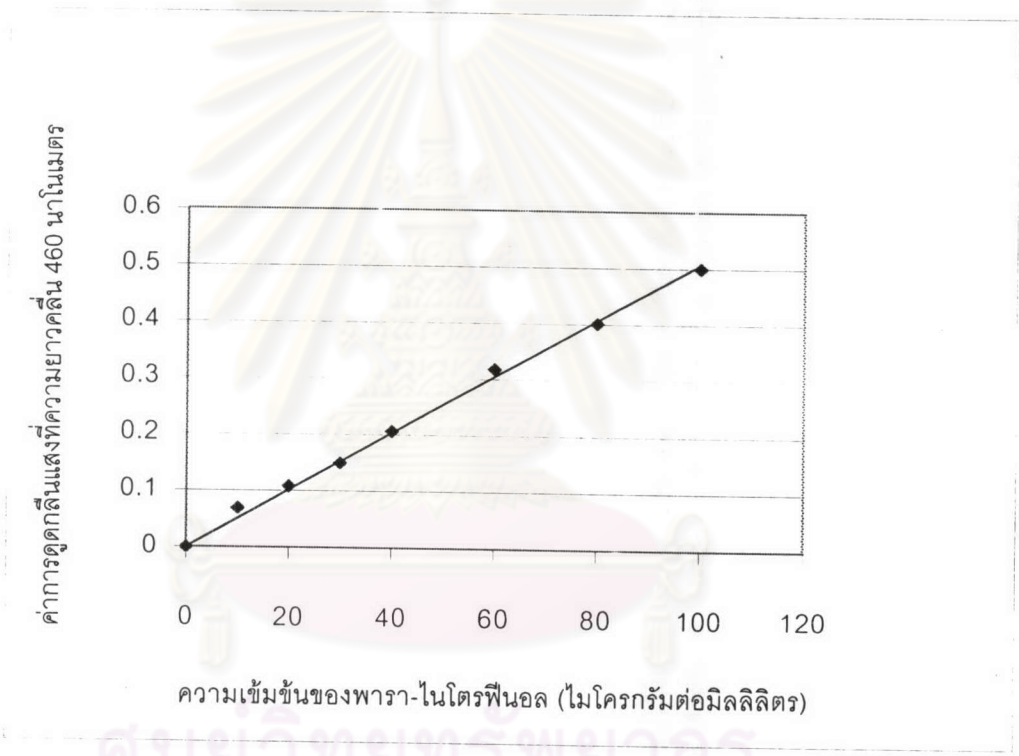
ปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟีนอล (*p*-nitophenol) วิเคราะห์โดยวิธีของ Marianne และคณะ (1991)

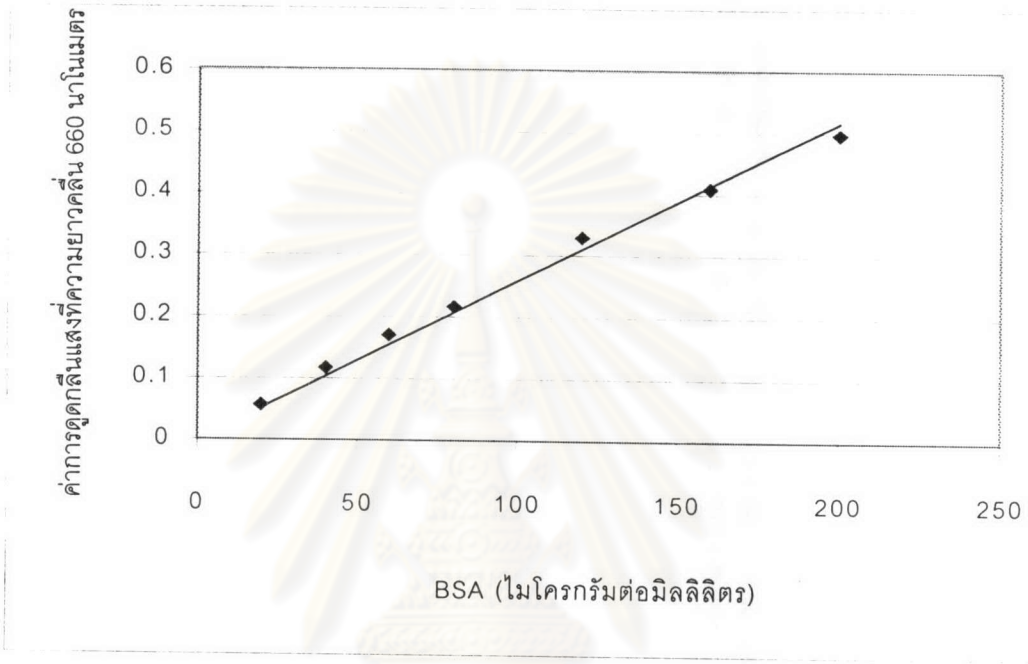


ความชัน = 0.0051

R^2 = 0.9969

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. กราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumin (BSA) วิเคราะห์โดยวิธีของ Lowry และคณะ (1951)



ความชัน = 0.0026

R^2 = 0.9913

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

วิธีการคำนวณ

1. การคำนวณแอคติวิตีของไลเปสโดยวิธีของ Marianne และคณะ (1991)

จากกราฟมาตรฐานของพารา-ไนโตรฟีนอล เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Marianne และคณะ (1991) (ภาคผนวก ค หมายเลข 1) สามารถหาค่าความชันได้ นำค่าความชันที่ได้มาคำนวณแอคติวิตีของไลเปส

$$\text{แอคติวิตีของไลเปส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง}}{\text{เวลาที่บ่มเอนไซม์ (นาที)}} \times \frac{1}{\text{ความชัน}} \times \frac{1}{\text{ปริมาณเอนไซม์ (มิลลิลิตร)}} \times \frac{1}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของ พารา-ไนโตรฟีนอล}} \times \text{ค่าการเจือจาง}$$

2. การคำนวณปริมาณโปรตีนโดยวิธีของวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

จากกราฟมาตรฐาน BSA เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Lowry และคณะ (1951) (ภาคผนวก ค หมายเลข 2) สามารถหาค่าความชันได้ นำค่าความชันที่ได้มาคำนวณปริมาณโปรตีน

$$\text{ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง} \times \text{ค่าการเจือจาง} \times 10^{-3}}{\text{ความชัน}}$$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพัชรวิภา ใจจักรคำ เกิดเมื่อวันที่ 27 มีนาคม พ.ศ. 2522 ที่จังหวัดนครศรีธรรมราช ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับสอง สาขาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2542 และเข้ารับการศึกษาต่อไปในขั้นปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2543 ที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 328 ถ.พญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400

ผลงานทางวิชาการที่เข้าร่วมประชุม

Boonprasert, J., Chaijuckam, P., Kositanont, C. 2002. Thermostable enzyme produding bacteria isolated from high geothermal sites in Thailand. Poster presented at the 7th Biological Science Graduate Congress. 9-11 December, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand. Abstracts book. p. 53.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย