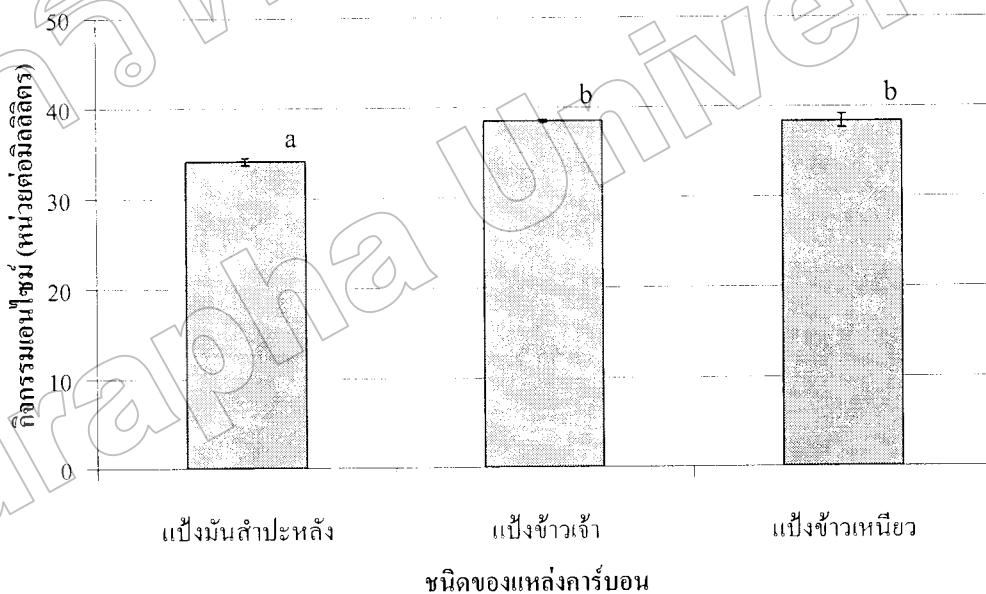


## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### องค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ในระดับ Shake Flask

#### 1. ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

จากการทดสอบหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ *B. licheniformis* ผลิตได้ในเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวเหนียว ที่มีความเข้มข้นเท่ากัน คือ 10 กรัมต่อลิตร ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4-1



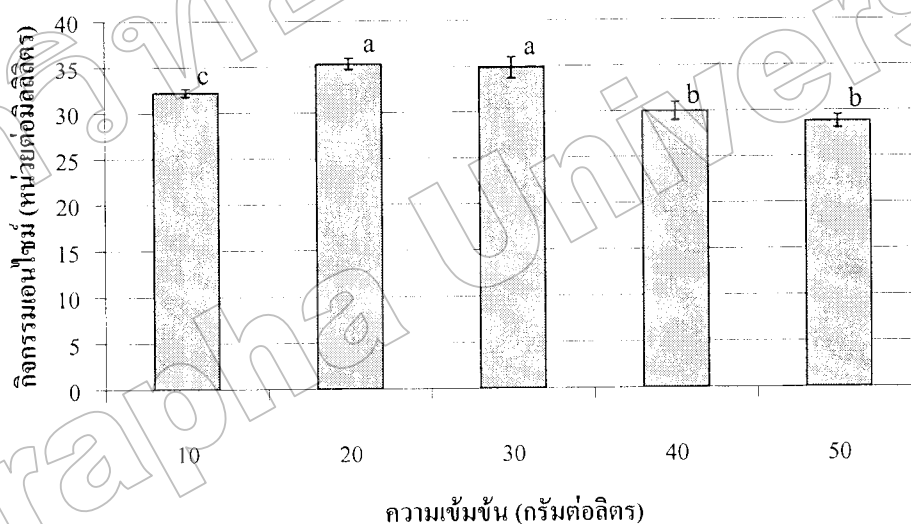
ภาพที่ 4-1 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตได้โดย *B. licheniformis* ในเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน (แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ  $\pm$  ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

a และ b หมายถึง ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

จากภาพที่ 4-1 แป้งข้าวเจ้าให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือเท่ากับ 38.53 หน่วยต่อมิลลิลิตร ใกล้เคียงกับแป้งข้าวเหนียวซึ่งให้กิจกรรมเอนไซม์ 38.42 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนแป้งมันสำปะหลังให้กิจกรรมเอนไซม์ต่ำสุดคือเท่ากับ 34.14 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยผลผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ที่ได้มีความแตกต่างกับแป้งอีกสองชนิดที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 อย่างไรก็ตาม แม้ว่าแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวเหนียวจะให้กิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าแป้งมันสำปะหลัง แต่เนื่องจากแป้งทั้งสองชนิดมีลักษณะจับตัวกันเป็นก้อน ไม่เป็นเนื้อเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างสมบูรณ์แม้จะผ่านขั้นตอนเจลาติไนเซชันแล้ว ซึ่งอาจทำให้เกิดปัญหาด้านการผสมเมื่อนำไปใช้ในการผลิตจริง ดังนั้นแป้งมันสำปะหลังจึงมีความเหมาะสมมากกว่า

ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส คือเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 4-2 ซึ่งจะเห็นได้ว่า ที่ความเข้มข้นดังกล่าวให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือ 35.31 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเมื่อความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังเพิ่มขึ้นเป็น 30 กรัมต่อลิตร กิจกรรมเอนไซม์จะเริ่มลดลง



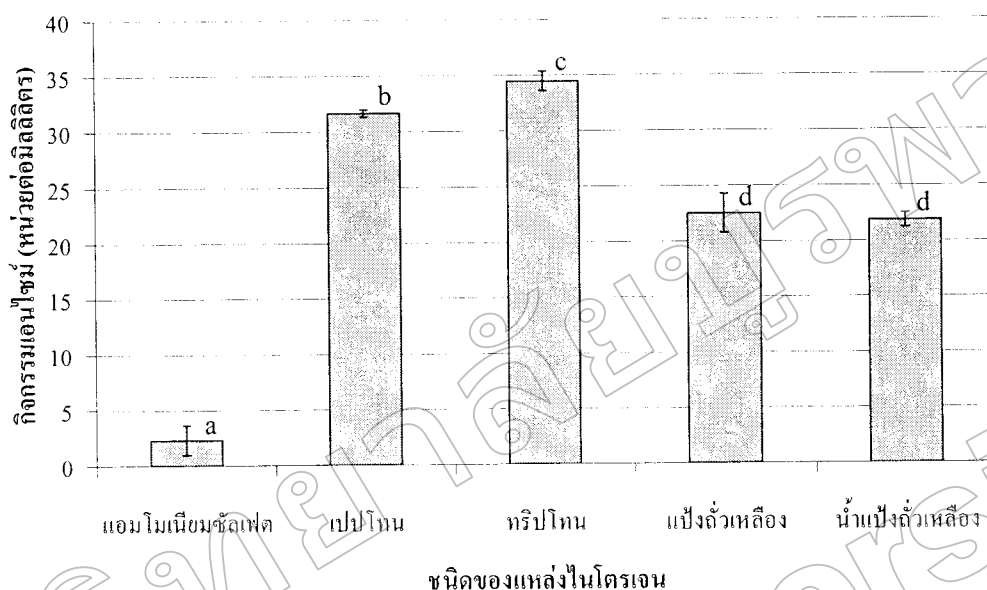
ภาพที่ 4-2 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตได้โดย *B. licheniformis* ในเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่แตกต่างกัน (แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ  $\pm$  ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

a b และ c หมายถึง ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

## 2. ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

จากการทดสอบหาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์ ที่ *B. licheniformis* ผลิตได้ในเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 5 ชนิด ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต เปปโทน ทริปโทน แป้งถั่วเหลืองและ

น้ำเป้งถั่วเหลือง ที่ความเข้มข้นเท่ากัน คือ 3 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4-3



ภาพที่ 4-3 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตได้โดย *B. licheniformis* ในเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน (แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ  $\pm$  ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

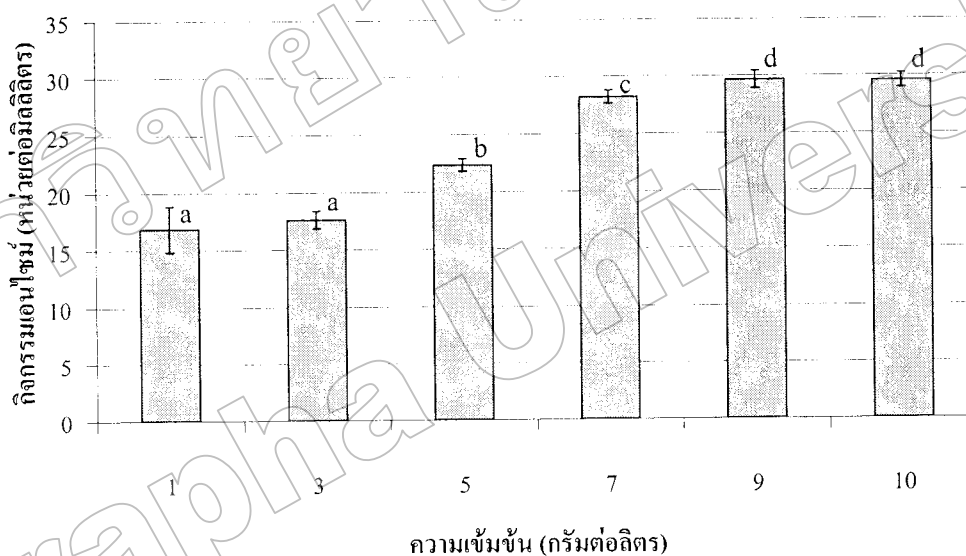
a b c และ d หมายถึง ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

เมื่อพิจารณาจากภาพที่ 4-3 แหล่งไนโตรเจนที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือ ทรีปโทน รองลงมาคือ เปปโทน แป้งถั่วเหลือง น้ำเป้งถั่วเหลืองและแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 34.47, 31.64, 22.50, 21.87 และ 2.32 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาความคุ้มค่าของแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิด พบว่าทั้งเปปโทนและทรีปโทนมีราคาค่อนข้างสูง คือ 4,920 และ 5,020 บาทต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (ราคาจำหน่ายปลีกของบริษัท เคมิคัล เอ็กซ์เพรส จำกัด) ในขณะที่แป้งถั่วเหลืองมีราคาต่ำกว่ามากคือประมาณ 110 บาท ต่อกิโลกรัม (นมถั่วเหลืองแท้ 100 เปอร์เซ็นต์ ตราดอยคำ) รวมทั้งเมื่อพิจารณาราคาของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีราคาไม่สูงมากนัก ดังนั้น แป้งถั่วเหลืองและน้ำเป้งถั่วเหลืองจึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้มากกว่า และเมื่อทำการทดลองเปรียบเทียบระหว่างค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการใช้แป้งถั่วเหลืองและน้ำเป้งถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 5, 7 และ 9 กรัมต่อลิตร พบว่าไม่แตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น ดังนั้น น้ำเป้งถั่วเหลืองจึงเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตในขั้นทดลอง เนื่องจากผ่านการกรองเอากากออกแล้วทำให้ได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน ในขณะที่แป้งถั่วเหลืองจะมี

กากและอนุภาคที่ไม่ละลายน้ำซึ่งจะเป็นปัญหาต่อการวิเคราะห์การเจริญของ *B. licheniformis*

เมื่อพิจารณาค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตได้เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์พบว่าได้ผลผลิตเอนไซม์ต่ำกว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่นำมาทดสอบถึงมากกว่า 9 เท่า

ความเข้มข้นของน้ำแป้งถั่วเหลืองที่เหมาะสม เท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด คือเท่ากับ 29.63 หน่วยต่อมิลลิเมตร โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำแป้งถั่วเหลืองจะทำให้ได้กิจกรรมเอนไซม์สูงขึ้นจนได้ค่าสูงสุดที่ 9 กรัมต่อลิตร แล้วจึงมีแนวโน้มคงที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นจนถึง 10 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 4-4



ภาพที่ 4-4 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตได้โดย *B. licheniformis* ในเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำแป้งถั่วเหลืองที่แตกต่างกัน (แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ  $\pm$  ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

a b c และ d หมายถึง ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

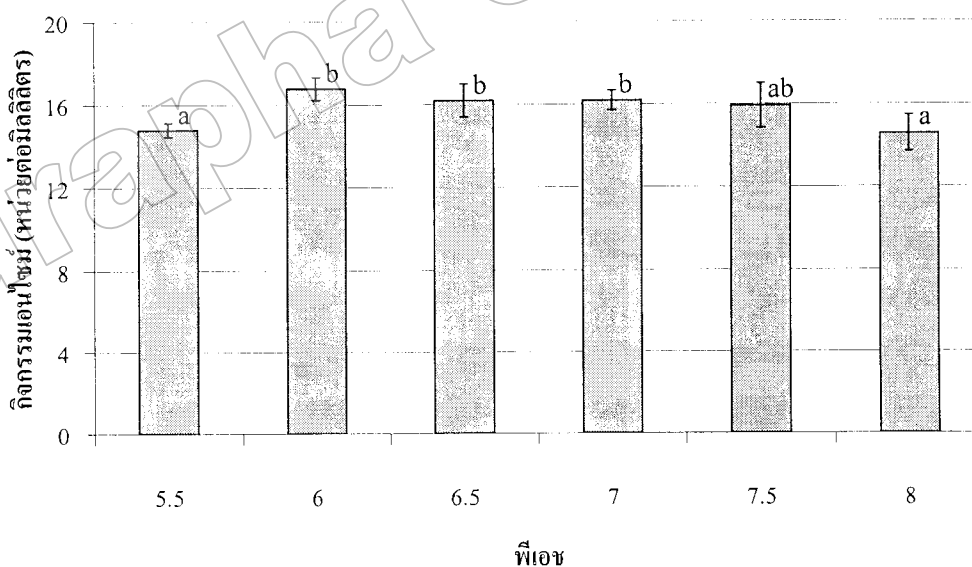
เนื่องจากยีสต์สกัดที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองนี้มีราคาสูงคือกิโลกรัมละ 2,870 บาท (ราคาจำหน่ายปลีกของบริษัท เลมิเคิล เอ็กซ์เพรส จำกัด) ซึ่งจะทำให้ไม่คุ้มทุนเมื่อทำการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้น การทดลองต่อไปจะไม่มี การเติมยีสต์สกัดเป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์ แม้ว่า การตัดยีสต์สกัดออกจากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ลดลงถึง 1.9 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมเอนไซม์ที่ได้เมื่อมีการเติมยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร

จากผลการทดลองข้างต้น สรุปได้ว่าองค์ประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดย *B. licheniformis* เมื่อพิจารณาถึงต้นทุนการผลิตและความเหมาะสมในการนำไปใช้ผลิตจริงร่วมด้วย คือ ใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้น้ำแป้งถั่วเหลืองความเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยไม่มีการเติมยีสต์สกัดเป็นสารอาหารเสริม

### สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในระดับ Shake Flask

#### 1. พีเอช

จากการเพาะเลี้ยง *B. licheniformis* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่มีพีเอชต่าง ๆ กัน คือเท่ากับ 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเท่ากับ 6.0 ทำให้ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 16.75 หน่วยต่อมิลลิเมตร ดังแสดงในภาพที่ 4-5 ซึ่งลดลงจากค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากผลการทดลองตอนที่ 1 อย่างเห็นได้ชัด เนื่องจากมีการตัดยีสต์สกัดออกจากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์ดังเหตุผลที่กล่าวไปแล้ว

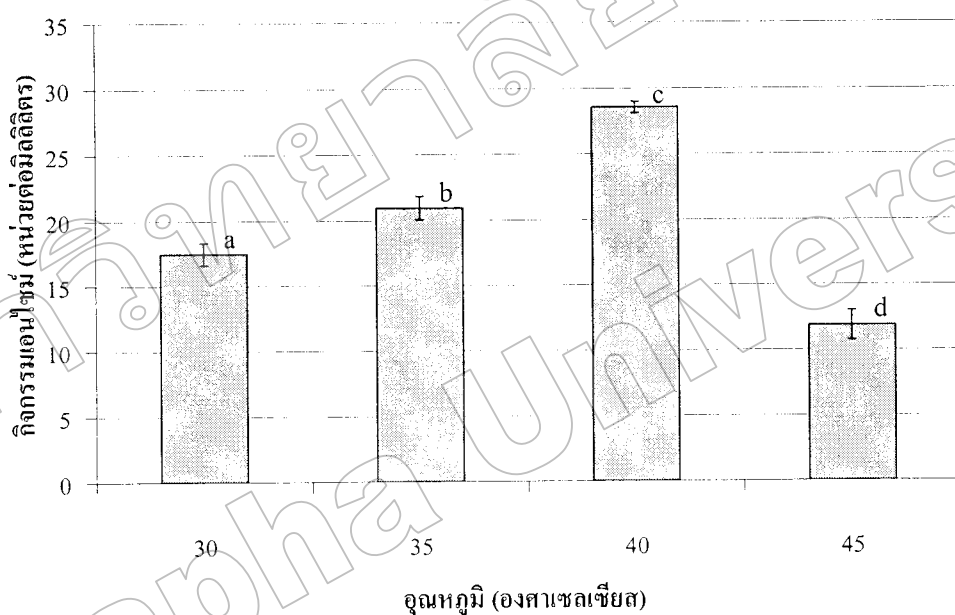


ภาพที่ 4-5 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตได้โดย *B. licheniformis* ในเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน (แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ  $\pm$  ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

a และ b หมายถึง ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

## 2. อุณหภูมิ

เมื่อเพาะเลี้ยง *B. licheniformis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่มีพีเอชเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือเท่ากับ 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดย *B. licheniformis* เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส ทำให้ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 28.56 หน่วยต่อมิลลิลิตร และค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ ที่ทำการทดลองมีความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ดังแสดงในภาพที่ 4-6



ภาพที่ 4-6 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตได้โดย *B. licheniformis* ในเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ (แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ  $\pm$  ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) a b c และ d หมายถึง ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

## กระบวนการหมักสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* เพื่อผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสในถังหมักขนาด 5 ลิตร

### 1. การเพาะเลี้ยงแบบ Batch

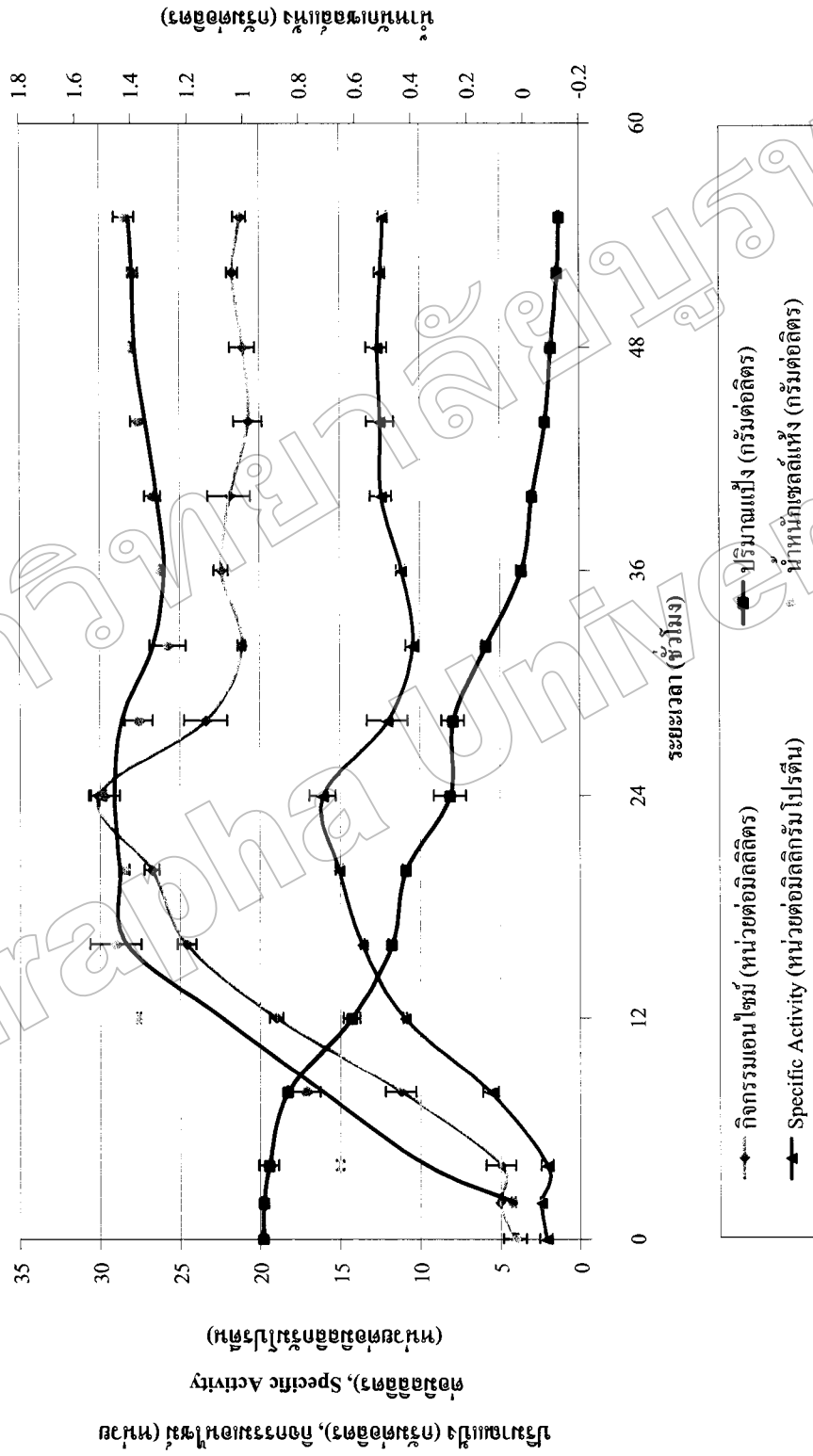
จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ที่เหมาะสม ซึ่งประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และน้ำแป้งหัวเหลืองความเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาตรในการผลิตทั้งหมด (Working Volume) เท่ากับ 3 ลิตร และใช้หัวเชื้อแบคทีเรีย

*B. licheniformis* ปริมาตรคิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรในการผลิตทั้งหมด โดยระหว่างการเพาะเลี้ยงมีการควบคุมพีเอชให้เท่ากับ 6.0 อุณหภูมิเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส และความคุมค่า Dissolved Oxygen ให้มากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ แล้วติดตามการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส การเจริญของจุลินทรีย์และปริมาณแป้งซึ่งเป็นสับสเตรท ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4-7

จากภาพที่ 4-7 เมื่อพิจารณากราฟการเจริญ พบว่า *B. licheniformis* เข้าสู่ระยะ Exponential หลังจาก 2 ชั่วโมงแรกของการเจริญ และสิ้นสุดระยะ Exponential ที่ชั่วโมงที่ 16 ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.39 กรัมต่อลิตร (คำนวณโดยโปรแกรม IFR Microfit Version 1.0) จากนั้นจึงเริ่มมีแนวโน้มคงที่ไปจนสิ้นสุดการทดลองที่ชั่วโมงที่ 55 เมื่อพิจารณาค่ากิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสพบว่า การผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสของ *B. licheniformis* มีลักษณะสัมพันธ์กับการเจริญ (Growth-Associated) กล่าวคือมีการผลิตไปพร้อม ๆ กับการเจริญ โดย *B. licheniformis* เริ่มมีการผลิตเอนไซม์ที่ชั่วโมงที่ 4 ของการเจริญ คือหลังจากการเจริญของเชื้อเข้าสู่ระยะ Exponential เล็กน้อย และได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 30.09 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 24 จากนั้นค่ากิจกรรมเอนไซม์จึงเริ่มลดลง

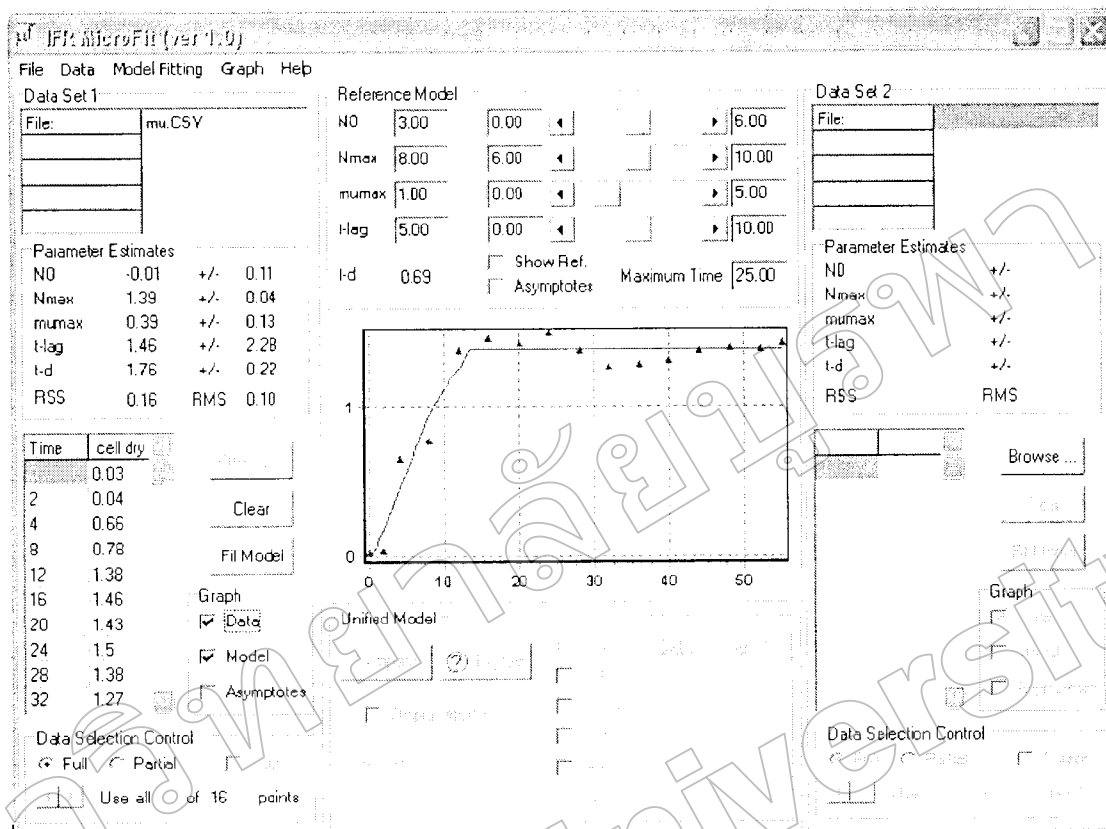
เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณแป้งซึ่งเป็นสับสเตรท พบว่า ในช่วง 4 ชั่วโมงแรกของการทดลองปริมาณแป้งลดลงเล็กน้อยและเริ่มลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อกิจกรรมเอนไซม์เริ่มเพิ่มขึ้นและเชื้ออยู่ในระยะ Exponential

จากการใช้โปรแกรม IFR Microfit Version 1.0 พล็อตกราฟการเจริญและคำนวณค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ได้ดังนี้ น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้น (NO) เท่ากับ 0.01 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด ( $X_{max}$ ) เท่ากับ 1.39 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ( $\mu_{max}$ ) เท่ากับ 0.39 ต่อชั่วโมง ระยะเวลาของระยะ Lag (t-Lag) เท่ากับ 1.46 ชั่วโมง และ Doubling Time (t-d) เท่ากับ 1.76 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 4-8



ภาพที่ 4-7 การเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ต่าง ๆ ระหว่างการเพาะเลี้ยง *B. licheniformis* แบบ Batch ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อผลิตเอนไซม์ แอลฟาอะไมเลส (แสดงค่าเฉลี่ยจากการเก็บตัวอย่าง 3 ซ้ำ + ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)





ภาพที่ 4-8 กราฟการเจริญและค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ได้จากการคำนวณโดยโปรแกรม IFR Microfit Version 1.0

เมื่อนำค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ได้จากการทดลองไปคำนวณค่าผลผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อมวลเซลล์ ( $Y_{p/x}$ ) ผลผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อสับสเตรท ( $Y_{p/s}$ ) อัตราการผลิตเอนไซม์สูงสุดโดยปริมาตร (Maximum Volumetric Enzyme Production Rate) อัตราการผลิตเอนไซม์สูงสุดต่อกรัมสับสเตรท (Maximum Enzyme Production Rate per Substrate) และ ค่า Maximum Specific Activity ได้ผลดังตารางที่ 4-1

จากตารางที่ 4-1 พบว่า ได้ค่าผลผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อมวลเซลล์ ( $Y_{p/x}$ ) เท่ากับ 17,408.84 หน่วยต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ค่าผลผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อสับสเตรท ( $Y_{p/s}$ ) เท่ากับ 2,221.45 หน่วยต่อกรัมสับสเตรท ค่าอัตราการผลิตเอนไซม์สูงสุดโดยปริมาตร (Maximum Volumetric Enzyme Production Rate) เท่ากับ 1,082.96 หน่วยต่อลิตรต่อชั่วโมง อัตราการผลิตเอนไซม์สูงสุดต่อกรัมสับสเตรท (Maximum Enzyme Production Rate per Substrate) เท่ากับ 92.56 หน่วยต่อกรัมสับสเตรทต่อชั่วโมง และค่า Maximum Specific Activity เท่ากับ 16,091.44 หน่วยต่อกรัมโปรตีน

ตารางที่ 4-1 ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ จากการเพาะเลี้ยง *B. licheniformis* แบบ Batch เพื่อผลิตเอนไซม์ แอลฟาอะไมเลส

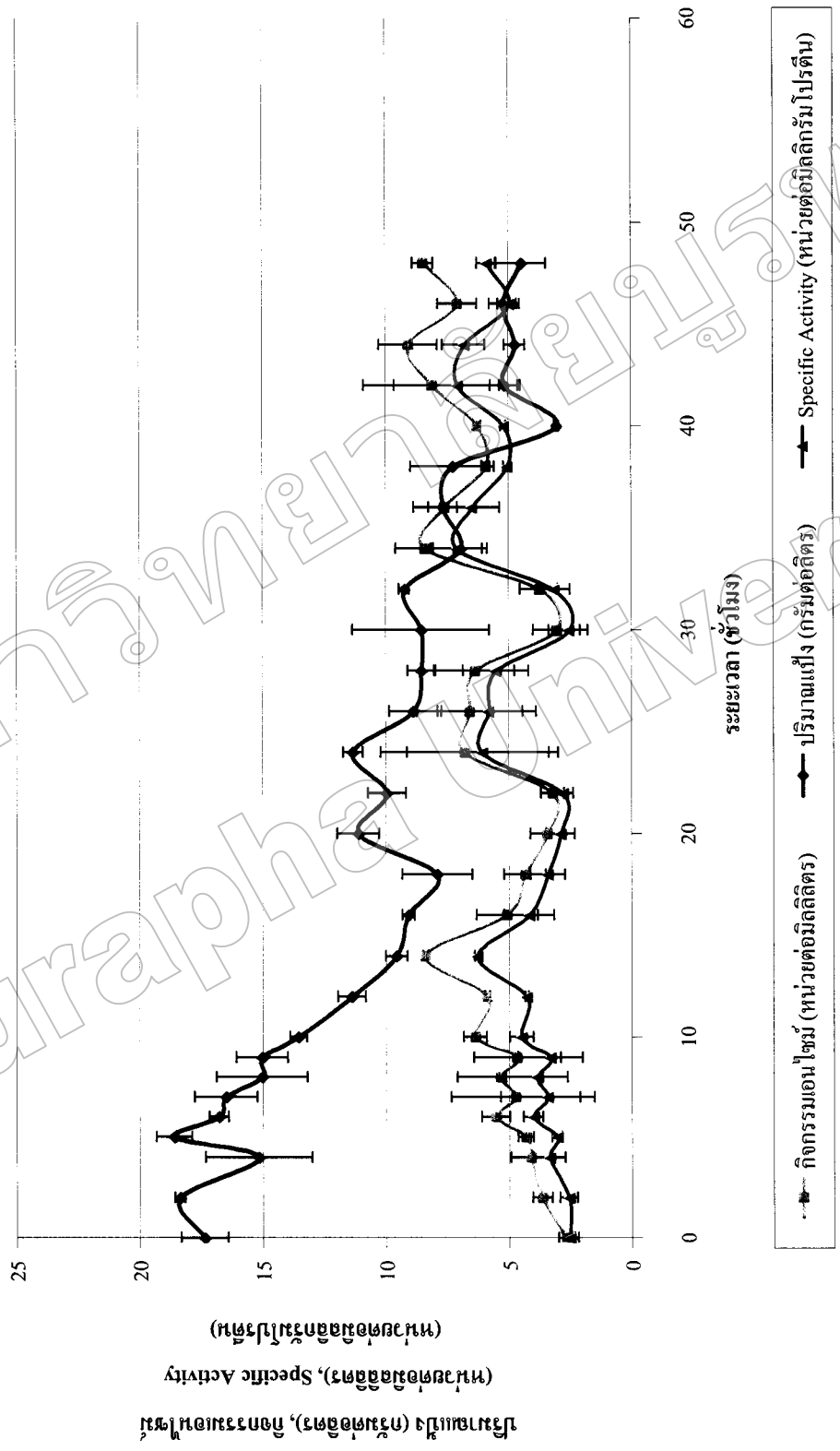
	Culture Method
	Batch Culture
$Y_{p/x}$ (U/ g cell dry weight)	17,408.84
$Y_{p/s}$ (U/ g substrate)	2,221.45
Maximum Volumetric Enzyme Production Rate (U/l/h)	1,082.96
Maximum Enzyme Production Rate per Substrate (U/ g substrate/ h)	92.56
Maximum Specific Activity (U/ g protein)	16,091.44

## 2. การเพาะเลี้ยงแบบ Fed-Batch

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* แบบ Fed-Batch ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ที่เหมาะสม ซึ่งประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และน้ำแป้งหัวเหลืองความเข้มข้น 9 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ปริมาตรในการผลิตทั้งหมด (Working Volume) เท่ากับ 3 ลิตร ปริมาตร เริ่มต้นเท่ากับ 1 ลิตร และใช้หัวเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* ปริมาตรคิดเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ ของ ปริมาตรเริ่มต้น ระหว่างการเพาะเลี้ยงมีการควบคุมพีเอชให้เท่ากับ 6.0 อุณหภูมิเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส และควบคุมค่า Dissolved Oxygen ให้มากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ โดยเปรียบเทียบระหว่างการป้อนแบบ Exponential 3 ลักษณะ ได้ผลการทดลองดังนี้

2.1 การเพาะเลี้ยงแบบ Fed-Batch ที่ให้อัตราการป้อน  $\mu = 1/4\mu_{max}$  โดยเริ่มป้อน ชั่วโมงที่ 4 และให้อัตราการป้อนคงที่หลังจากชั่วโมงที่ 10

จากการเพาะเลี้ยง *B. licheniformis* แบบ Fed-Batch โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบ Batch จนถึงชั่วโมงที่ 4 แล้วจึงเริ่มป้อน Production Medium เข้าสู่ระบบแบบ Exponential ด้วยอัตราการป้อนเริ่มต้น  $F_0 = \mu V_0 X_0 / S_{F_0} Y_{x/s}$  โดยให้  $\mu$  เท่ากับ  $1/4 \mu_{max}$  ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.0975 ต่อชั่วโมง แล้วจึงปรับอัตราการป้อนเพิ่มขึ้นทุกชั่วโมง ตามสูตร  $F = F_0 e^{\mu t}$  จนถึงชั่วโมงที่ 10 จากนั้นให้อัตราการป้อนคงที่เท่ากับอัตราการป้อนในชั่วโมงที่ 10 ป้อนอาหารเข้าสู่ระบบต่อไปจนกระทั่ง Production Medium ปริมาตร 2 ลิตรสำหรับการป้อนถูกป้อนเข้าสู่ระบบจนหมด แล้วติดตามการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและปริมาณแป้งซึ่งเป็นสับสเตรท ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4-9



ภาพที่ 4-9 การเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ต่าง ๆ ระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบ Fed-Batch ที่ให้อัตราการป้อน  $\mu = 1/4\mu_{max}$  โดยเริ่มป้อนที่ ชั่วโมงที่ 4 และใช้อัตราการป้อนคงที่หลังจากชั่วโมงที่ 10 (แสดงค่าเฉลี่ยจากการเก็บตัวอย่าง 3 ชั่วโมง ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

จากภาพที่ 4-9 เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และความเข้มข้นของแป้ง พบว่า ค่ากิจกรรมเอนไซม์มีการเพิ่มขึ้นและลดลงสลับกันไปตลอดการทดลอง กล่าวคือ ค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตั้งแต่เริ่มการทดลองจนได้ค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 8.39 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 14 จากนั้นจึงเริ่มลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 22 แล้วจึงเพิ่มขึ้นจนได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 6.78 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 24 จากนั้นจึงคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 28 แล้วจึงเริ่มลดลงอีก หลังจากนั้นมีการเพิ่มขึ้นและลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงสิ้นสุดการทดลอง ตลอดการทดลองได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 9.09 หน่วยต่อมิลลิลิตรที่ชั่วโมงที่ 44 ในขณะที่เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแป้ง พบว่ามีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงชั่วโมงที่ 18 จากนั้นพบการเพิ่มขึ้นของปริมาณแป้งจนคงที่ในช่วงชั่วโมงที่ 20-24 แล้วจึงลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงสิ้นสุดการทดลอง ส่วนการเปลี่ยนแปลงของค่า Specific Activity ของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมีลักษณะขนานไปกับการเปลี่ยนแปลงของค่ากิจกรรมเอนไซม์โดยมีค่าสูงสุดเท่ากับ 7.09 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ที่ชั่วโมงที่ 34 ส่วนที่ชั่วโมงที่ 44 ซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดนั้น ได้ค่า Specific Activity เท่ากับ 6.80 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

2.2 การเพาะเลี้ยงแบบ Fed-Batch ที่ให้อัตราการป้อน  $\mu = 1/3 \mu_{\max}$  โดยเริ่มป้อน ชั่วโมงที่ 4 และใช้อัตราการป้อนคงที่หลังจากชั่วโมงที่ 10

จากการเพาะเลี้ยง *B. licheniformis* แบบ Fed-Batch โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบ Batch จนถึงชั่วโมงที่ 4 แล้วจึงเริ่มป้อน Production Medium เข้าสู่ระบบแบบ Exponential ด้วยอัตราการป้อนเริ่มต้น  $F_0 = \mu V_0 X_0 / S_{F_0} Y_{x/s}$  โดยให้  $\mu$  เท่ากับ  $1/3 \mu_{\max}$  ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.13 ต่อชั่วโมง แล้วจึงปรับอัตราการป้อนเพิ่มขึ้นทุกชั่วโมง ตามสูตร  $F = F_0 e^{t/10}$  จนถึงชั่วโมงที่ 10 จากนั้นให้อัตราการป้อนคงที่เท่ากับอัตราการป้อนในชั่วโมงที่ 10 ป้อนอาหารเข้าสู่ระบบต่อไปจนกระทั่ง Production Medium ปริมาตร 2 ลิตร สำหรับการป้อนถูกป้อนเข้าสู่ระบบจนหมด แล้วติดตามการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและปริมาณแป้งซึ่งเป็นสับสเตรท ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4-10

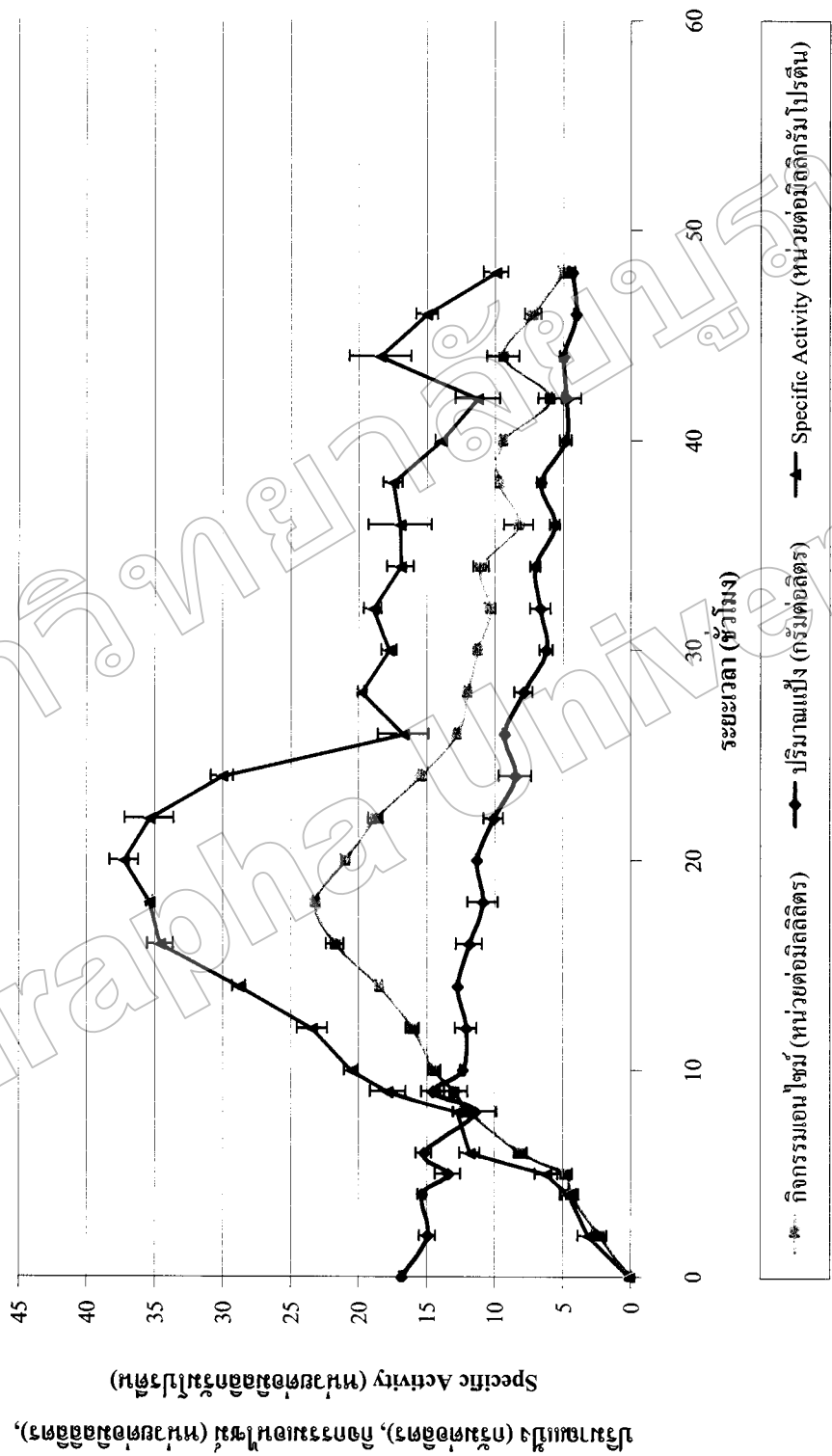
จากภาพที่ 4-10 เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และความเข้มข้นของแป้ง พบว่า ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 23.21 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 18 ของการเพาะเลี้ยง โดยพบว่ามีการผลิตเอนไซม์ตั้งแต่ช่วงแรกของการเจริญ คือ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 และมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนสูงสุดในชั่วโมงที่ 18 จากนั้นจึงเริ่มลดลง ในขณะที่เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแป้ง พบว่ามีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงสิ้นสุดการทดลอง ส่วนการเปลี่ยนแปลงของค่า Specific Activity ของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมีลักษณะขนานไปกับการเปลี่ยนแปลงของค่ากิจกรรมเอนไซม์โดยมีค่าสูงสุดเท่ากับ 37.27 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ที่ชั่วโมงที่ 20 ส่วนที่ชั่วโมงที่ 18 ซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด

นั้น ได้ค่า Specific Activity เท่ากับ 35.39 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

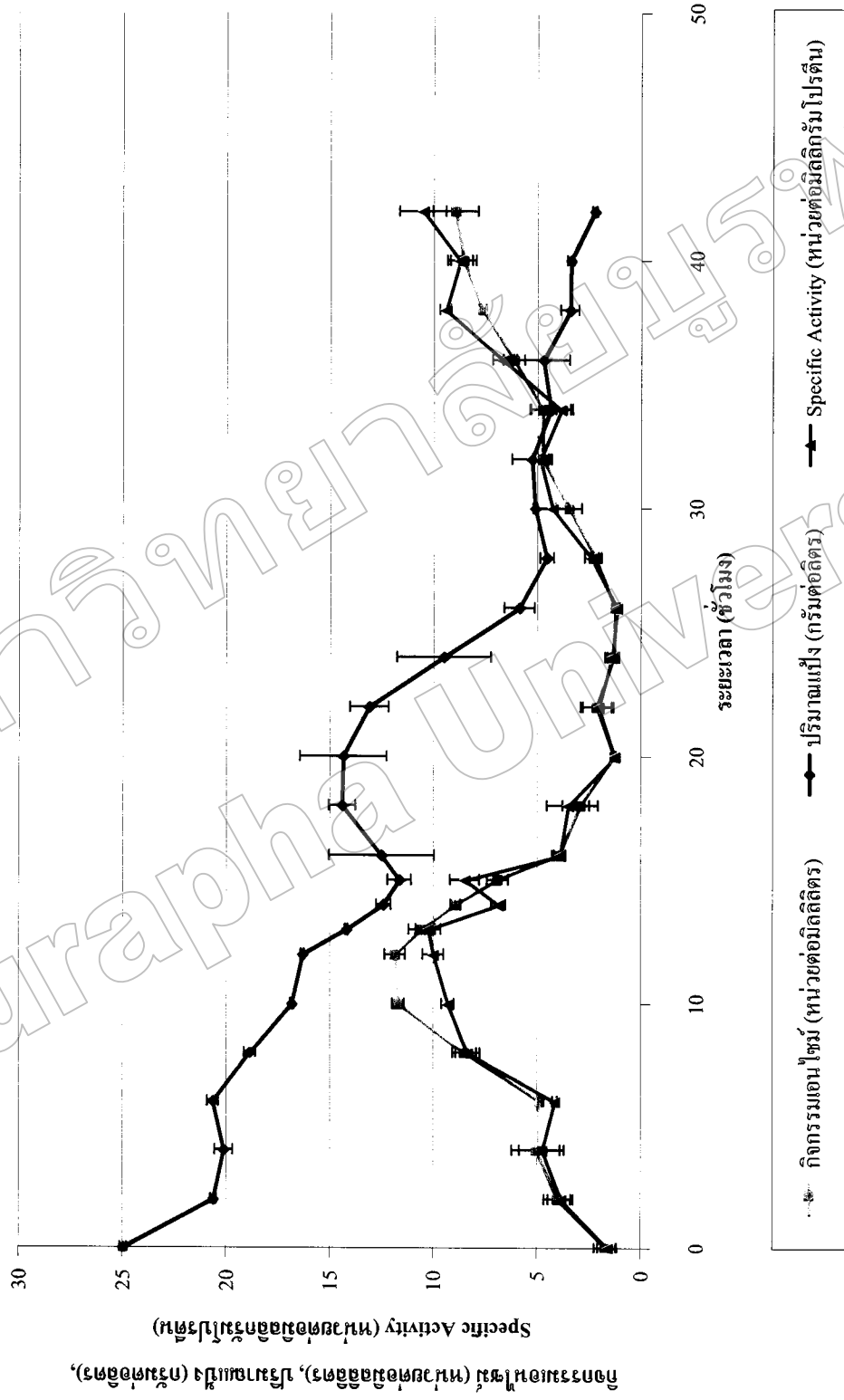
2.3 การเพาะเลี้ยงแบบ Fed-Batch ที่ให้อัตราการป้อน  $\mu = 1/3\mu_{\max}$  โดยเริ่มป้อน ชั่วโมงที่ 12 และให้อัตราการป้อนคงที่หลังจากชั่วโมงที่ 15

จากการเพาะเลี้ยง *B. licheniformis* แบบ Fed-Batch โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบ Batch จนถึงชั่วโมงที่ 12 แล้วจึงเริ่มป้อน Production Medium เข้าสู่ระบบแบบ Exponential ด้วยอัตราการป้อนเริ่มต้น  $F_0 = \mu V_0 X_0 / S_{F_0} Y_{x/s}$  โดยให้  $\mu$  เท่ากับ  $1/3\mu_{\max}$  ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.13 ต่อชั่วโมง แล้วจึงปรับอัตราการป้อนเพิ่มขึ้นทุกชั่วโมง ตามสูตร  $F = F_0 e^{\mu t}$  จนถึงชั่วโมงที่ 15 จากนั้น ให้อัตราการป้อนคงที่เท่ากับอัตราการป้อนในชั่วโมงที่ 15 ป้อนอาหารเข้าสู่ระบบต่อไปจนกระทั่ง Production Medium ปริมาตร 2 ลิตร สำหรับการป้อนถูกป้อนเข้าสู่ระบบจนหมด แล้วติดตามการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและปริมาณแป้งซึ่งเป็นสับสเตรท ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4-11

จากภาพที่ 4-11 เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และความเข้มข้นของแป้ง พบว่า ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 11.85 หน่วยต่อมิลลิลิตร ที่ ชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง โดยพบว่าการผลิตเอนไซม์ตั้งแต่ช่วงแรกของการเจริญ คือ ตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 2 และมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงชั่วโมงที่ 12 ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการป้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่ระบบ จากนั้นจึงเริ่มลดลง อย่างไรก็ตาม กิจกรรมเอนไซม์ที่ได้ในช่วงชั่วโมงที่ 11-12 นั้น มีการเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ในขณะที่เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแป้ง พบว่ามีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงชั่วโมงที่ 16 จากนั้นพบการเพิ่มขึ้นของปริมาณแป้งจนคงที่ในช่วงชั่วโมงที่ 18-20 แล้วจึงลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 20-28 จากนั้นจึงค่อย ๆ ลดลงอย่างช้า ๆ จนสิ้นสุดการทดลอง ส่วนการเปลี่ยนแปลงของค่า Specific Activity ของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมีลักษณะขนานไปกับการเปลี่ยนแปลงของค่ากิจกรรมเอนไซม์โดยมีค่าสูงสุดเท่ากับ 10.25 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ที่ ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งเป็นชั่วโมงที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด



ภาพที่ 4-10 การเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ต่างๆ ระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบ Fed-Batch ที่ให้อัตราการป้อน  $\mu = 1/3\mu_{max}$  โดยเริ่มป้อนที่ชั่วโมงที่ 4 และใช้อัตราการป้อนคงที่หลังจากชั่วโมงที่ 10 (แสดงค่าเฉลี่ยจากการเก็บตัวอย่าง 3 ชั่วโมง ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)



ภาพที่ 4-11 การเปลี่ยนแปลงของพารามิเตอร์ต่าง ๆ ระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบ Fed-Batch ที่ให้อัตราการป้อน  $\mu = 1/3\mu_{max}$  โดยเริ่มป้อนที่ ชั่วโมงที่ 12 และใช้อัตราการป้อนคงที่หลังจากชั่วโมงที่ 15 (แสดงค่าเฉลี่ยจากการเก็บตัวอย่าง 3 ชุด  $\pm$  ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

เมื่อนำค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ได้จากการทดลองทั้งแบบ Batch และ Fed-Batch ไปคำนวณค่าผลผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อมวลเซลล์ ( $Y_{p/x}$ ) ผลผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสต่อสับสเตรท ( $Y_{p/s}$ ) อัตราการผลิตเอนไซม์สูงสุดโดยปริมาตร (Maximum Volumetric Enzyme Production Rate) อัตราการผลิตเอนไซม์สูงสุดต่อกรัมสับสเตรท (Maximum Enzyme Production Rate per Substrate) และ ค่า Maximum Specific Activity ได้ผลดังตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-2 ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ จากการเพาะเลี้ยง *B. licheniformis* แบบ Batch และ Fed-Batch เพื่อผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

	Batch	$\mu = 1/4\mu_{max}$ $\mu = 1/3\mu_{max}$ $\mu = 1/3\mu_{max}$		
		A	A	B
$Y_{p/x}$ (U/ g cell dry weight)	17,408.84	-	-	-
$Y_{p/s}$ (U/ g substrate)	2,221.45	547.53	2,543.52	1,173.26
Maximum Volumetric Enzyme Production Rate (U/ l/ h)	1,082.96	408.43	1,285.22	884.75
Maximum Enzyme Production Rate per Substrate (U/ g substrate/ h)	92.56	39.11	141.31	97.77
Maximum Specific Activity (U/ g protein)	16,091.44	6,258.21	35,166.67	10,010

หมายเหตุ A หมายถึง เริ่มป้อนที่ชั่วโมงที่ 4 และใช้อัตราการป้อนคงที่หลังจากชั่วโมงที่ 10

B หมายถึง เริ่มป้อนที่ชั่วโมงที่ 12 และใช้อัตราการป้อนคงที่หลังจากชั่วโมงที่ 15