



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการผลิตอัลคาไลน์โปรตีนจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน  
ภายใต้สภาวะการหมักแบบเติมกะ

ผศ.ดร. เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

รหัสโครงการ 2559A10802044  
สัญญาเลขที่ 89/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน  
ภายใต้สภาวะการหมักแบบเติมกะ

Alkaline Protease Production by Bacterial Isolated from Soil  
Using Fed-batch Fermentation Technique

ผศ.ดร.เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยบูรพา

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ (วช) เลขที่สัญญา 89/2559 คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณทาง วช. ที่เล็งเห็นความสำคัญของงานด้านวิศวกรรมกระบวนการชีวภาพ และให้การสนับสนุนการทำวิจัยครั้งนี้

โครงการนี้ได้ดำเนินงานเสร็จลุล่วงเป็นอย่างดี คณะผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบคุณหน่วยงานต่าง ๆ ที่ให้ความร่วมมือ และอนุเคราะห์ให้ความช่วยเหลือเรื่องเครื่องมือ อุปกรณ์ และข้อมูลต่าง ๆ

คณะผู้วิจัย



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากดิน  
ภายใต้สภาวะการหมักแบบเติมกะ

Alkaline Protease Production by Bacterial Isolated from Soil  
Using Fed-batch Fermentation Technique

ผศ.ดร.เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

รหัสโครงการ.....  
สัญญาเลขที่ XXX/2559

## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน  
ภายใต้สภาวะการหมักแบบเติมกะ  
Alkaline Protease Production by Bacterial Isolated from Soil  
Using Fed-batch Fermentation Technique

ผศ.ดร.เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
มหาวิทยาลัยบูรพา

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา XXX/2559 คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณทาง วช. ที่เล็งเห็นความสำคัญของงานด้านวิศวกรรมกระบวนการชีวภาพ และให้การสนับสนุนการทำวิจัยครั้งนี้ โครงการนี้ได้ดำเนินงานเสร็จลุล่วงเป็นอย่างดี คณะผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบคุณหน่วยงานต่าง ๆ ที่ให้ความร่วมมือ และอนุเคราะห์ให้ความช่วยเหลือเรื่องเครื่องมือ อุปกรณ์ และข้อมูลต่าง ๆ

คณะผู้วิจัย

ชื่อโครงการ: การผลิตอัลคาไลโนโปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน ภายใต้สภาวะ  
การหมักแบบเติมกะ

แหล่งเงิน งบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 907,500 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม พ.ศ. 2559 ถึง ตุลาคม พ.ศ. 2561

หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร.เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.บูรพา

### บทคัดย่อ

แบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลโนโปรตีเอสซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างดินภายในประเทศ สายพันธุ์ *Bacillus cohnii* มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ดีที่สุดในเมื่อใช้อาหารสูตร BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ภายใต้อุณหภูมิ 37 °C เมื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิคในการเพาะเลี้ยง *B. cohnii* สำหรับการผลิตอัลคาไลโนโปรตีเอสในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่า *B. cohnii* มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยง BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้น 2 เท่า ไม่มีการเติมสับสเตรทและไม่มีการควบคุมค่าพีเอช อุณหภูมิ 37 °C อัตราการให้อากาศ 1 vvm ความเร็วใบกวน 500 rpm เติมอาหารที่ระยะ deceleration phase ด้วยอาหารที่มีองค์ประกอบและความเข้มข้นเดียวกันกับในถังหมัก อัตราคงที่ที่ 0.65 L/h ทำให้สามารถวัดค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) ได้ 0.124 h<sup>-1</sup> อัตราการจำเพาะของการสร้างเอนไซม์ ( $q_p$ ) ได้ 1.785 U/g cell.h ค่ากิจกรรมเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 9.51 U/mL และ 0.396 U/mL/h ตามลำดับ โดยค่าที่วัดได้สูงกว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะถึง 1.6 เท่า เมื่อนำเอนไซม์ไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 60-80 ทำให้ได้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุดมีค่าเท่ากับ 1.93 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.7 เท่า อัลคาไลโนโปรตีเอสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีนี้ สามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชประมาณ 9.5 ถึง 11 โดยมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการทำงานที่พีเอช 10 และมีเสถียรภาพในช่วงพีเอชที่กว้างระหว่าง 7-12 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 70 องศาเซลเซียส และมีเสถียรภาพต่ออุณหภูมิในช่วง 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส สามารถถูกยับยั้งการทำงานได้โดยสาร EDTA ที่ความเข้มข้น 10 mM ส่วนสาร PMSF และ 1,10-phenantroline มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลโนโปรตีเอสได้ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 10 mM นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ยังความคงตัวอยู่ได้ในสภาวะที่มีสารลดแรงตึงผิวชนิดที่ไม่มีประจุ (Nonionic surfactant) และสารฟอกขาว ได้แก่ triton x-100, tween 80 และ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้นทั้ง 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้สภาวะที่มีไอออนของโลหะ Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> และ Mg<sup>2+</sup> ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จะทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมเพิ่มสูงขึ้น

คำสำคัญ: อัลคาไลโนโปรตีเอส, การหมักแบบเติมกะ, alkaline protease, fed-batch fermentation

Research Title: Alkaline Protease Production by Bacterial Isolated from Soil  
Using Fed-batch Fermentation Technique

Financial supported by the Research Grant of Burapha University through  
National Research Council of Thailand

Researcher: Assist.professor Dr. Saedthawat Chamsart

Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University

### ABSTRACT

The alkaline protease producing bacteria, *Bacillus cohnii*, isolated from soil in Thailand showed the highest enzyme activity when cultivated in BPMM medium, pH 10, with dextrin and soybean meal as carbon and nitrogen source at 37 °C. The efficiency of various cultivation techniques for alkaline protease production from this strain was observed in 5-L fermenter. The results revealed that cultivation of *B. cohnii* using fed-batch fermentation technique in BPMM medium, pH 10, containing dextrin and soybean meal as carbon and nitrogen source with non-substrate adding and non-pH controlling, at 37 °C, aeration rate 1 vvm, agitation speed 500 rpm, feeding with the same medium concentration when its growth was deceleration phase at dilution rate of 0.90 L/h were the most suitable. Consequently, the specific growth rate ( $\mu$ ) and specific alkaline protease production rate ( $q_p$ ) of 0.124 h<sup>-1</sup> and 1.785 U/g cell.h, respectively, and the maximum enzyme activity and enzyme productivity of 9.51 U/mL and 0.396 U/mL/h that were higher than using batch cultivation technique for 1.6 times. Partial purification of enzyme by ammonium sulfate precipitation at 60-80% saturated concentration with 1.7 fold increase in specific activity (1.93 U/mg). The optimum pH of partial purified was found to be 10 and stable in the broad pH range (7.0-12.0). This enzyme retains 100% activity at its optimum temperature of 70 °C. The thermo stability exhibited at temperature ranged from 30-50 °C. Furthermore, in the presence of Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> enhanced enzyme activity at low concentration (1mM). Divalent cation chelator EDTA inhibited enzyme activity by 50% while the inhibition caused by PMSF and 1,10-phenantroline were 30% and this enzyme also stable in the presence of nonionic surfactant and bleaching.

**Keywords:** alkaline protease, fed-batch fermentation, purification, characterization



## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
สารบัญเรื่อง.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฌ
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
<b>บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>4</b>
2.1 คุณสมบัติและการจำแนกเอนไซม์โปรตีเอส.....	4
2.2 แหล่งที่มาของเอนไซม์โปรตีเอส.....	5
2.3 อัลคาไลน์โปรตีเอส (Alkaline protease).....	7
2.4 การผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากแบคทีเรีย.....	9
2.5 สมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส.....	13
2.6 การทำให้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์.....	14
2.7 การนำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ.....	15
2.8 สรุปทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิด.....	16
2.9 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง.....	16
<b>บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย.....</b>	<b>23</b>
3.1 วัสดุ และอุปกรณ์.....	23
3.2 สารเคมี.....	24
3.3 สูตรอาหาร.....	25
3.4 เชื้อจุลินทรีย์.....	25
3.5 วิธีดำเนินการวิจัย.....	26
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัย.....</b>	<b>37</b>
4.1 ผลการเก็บตัวอย่างดินและการคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์.....	37
4.2 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส.....	38
4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส ในระดับฟลasks.....	42

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.4 ผลการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูง โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนด้วยวิธี 16S rDNA sequencing.....	79
4.5 ผลการศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus cohnii</i> ในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	81
4.6 การศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในถังหมักขนาด 50 ลิตร.....	89
4.7 ผลการทำให้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอน.....	92
4.8 ผลการศึกษาสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส.....	93
<b>บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผล.....</b>	<b>100</b>
5.1 อภิปรายผล.....	100
5.2 สรุปผล.....	115
5.3 ข้อเสนอแนะ.....	118
5.4 ผลผลิต (Output).....	119
<b>บรรณานุกรม.....</b>	<b>120</b>
<b>ภาคผนวก.....</b>	<b>126</b>
ภาคผนวก ก.....	127
ภาคผนวก ข.....	132
ภาคผนวก ค.....	139
ภาคผนวก ง.....	145
<b>ประวัตินักวิจัยและคณะ.....</b>	<b>157</b>

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 อัลคาไลน์โปรตีเอสที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม.....	7
2 ข้อดีข้อเสียของการหมักในอาหารเหลวแต่ละวิธี.....	12
3 สภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ.....	30
4 แหล่งที่มาของตัวอย่างดินและจำนวนโคโลนีที่สร้างวงใสบนอาหาร BMSM พีเอช 10.....	37
5 กลุ่มของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ตามความสามารถในการสร้างเอนไซม์.....	39
6 กิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ทั้งหกไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกันทั้ง 3 สูตร.....	43
7 กิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ทั้งหกไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด.....	50
8 กิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหกไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 5 ชนิด.....	57
9 อัตราการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหกไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 5 ชนิด.....	58
10 กิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหกไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ.....	66
11 อัตราการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหกไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ.....	67
12 กิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ทั้งหกไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิที่แตกต่างกันทั้ง 3 ระดับ.....	74
13 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหกสายพันธุ์ ในสภาวะที่ค่าพีเอชของอาหารเท่ากับ 10 และอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส.....	79
14 พารามิเตอร์การเจริญของ <i>B. cohnii</i> จากการเพาะเลี้ยงแบบกะ และแบบเติมกะ ในสภาวะต่าง ๆ กัน.....	84
15 พารามิเตอร์การเจริญของ <i>B. cohnii</i> จากการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร และ 50 ลิตร.....	91
16 ผลการตกตะกอนอัลคาไลน์โปรตีเอสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นอิมิตัวต่าง ๆ กัน.....	92

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสบนอาหารแข็ง.....	38
2 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก ในอาหารเหลว BMSM พีเอช 10.....	41
3 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน 3 สูตร.....	44
4 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท ในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน 3 สูตร.....	45
5 ปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท ในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน 3 สูตร.....	46
6 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน 3 สูตร ตัวอักษรยกกำลังที่ต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ.....	47
7 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด.....	51
8 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท ในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด.....	52
9 ปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท ในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด.....	53
10 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด ตัวอักษรยกกำลังที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ.....	54
11 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท ในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มี เด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 5 ชนิด.....	59
12 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตร อาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแหล่งไนโตรเจน แตกต่างกัน 5 ชนิด.....	60
13 ปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 5 ชนิด.....	61
14 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 5 ชนิด ตัวอักษรยกกำลังที่ต่างกันมีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ.....	62

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
15 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท ในสูตรอาหาร BPMM ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน มีกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน และมีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ.....	68
16 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน มีกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน และมีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ.....	69
17 ปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน มีกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน และมีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ.....	70
18 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โพรตีเอสในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน มีกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน และมีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ ตัวอักษรยกกำลังที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ.....	71
19 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท ในสูตรอาหาร BPMM โดยใช้เด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 10 และเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ.....	75
20 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM โดยใช้เด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 10 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 ระดับ....	76
21 ปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM โดยใช้เด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 10 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 ระดับ.....	77
22 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โพรตีเอสในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกสายพันธุ์ในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 โดยใช้เด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 ระดับ ตัวอักษรยกกำลังที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ.....	78
23 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย 032 ( <i>B. cohnii</i> ) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar ที่ 37 องศาเซลเซียส อายุ 48 ชั่วโมง.....	80
24 ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรีย 032 ( <i>B. cohnii</i> ) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar ที่ 37 องศาเซลเซียส อายุ 24 ชั่วโมง (กำลังขยาย 1000 เท่า).....	80

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
25 รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของ <i>B. cohnii</i> เมื่อเพาะเลี้ยงแบบกะ โดยใช้อาหาร BPMM เข้มข้น 2 เท่า ใช้หางนมผงเข้มข้น 1% (W/V) เป็นสับสเตรท ควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 10 ตลอดกระบวนการ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 VVM และความเร็วใบกวน 500 rpm (Batch No.1).....	85
26 รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของ <i>B. cohnii</i> เมื่อเพาะเลี้ยงแบบกะ โดยใช้อาหาร BPMM เข้มข้น 2 เท่า พีเอช 10 ที่ไม่มีการเติม สับสเตรท ไม่มีการควบคุมค่า พีเอช อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 VVM และความเร็วใบกวน 500 rpm (Batch No.2).....	86
27 รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของ <i>B. cohnii</i> เมื่อเพาะเลี้ยงแบบกะ โดยใช้อาหาร BPMM เข้มข้น 4 เท่า พีเอช 10 ที่ไม่มีการเติม สับสเตรท ไม่มีการควบคุมค่า พีเอช อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 VVM และความเร็วใบกวน 500 rpm (Batch No.3).....	87
28 รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของ <i>B. cohnii</i> เมื่อเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ โดยใช้อาหาร BPMM เข้มข้น 2 เท่า พีเอช 10 ที่ไม่มีการเติมสับสเตรท ความเข้มข้นของอาหารที่ใช้เติม 1 เท่า ด้วยอัตราคงที่ 0.90 L/h ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 VVM และความเร็วใบกวน 500 rpm.....	88
29 รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของ <i>B. cohnii</i> เมื่อเพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังหมักขนาด 50 ลิตร โดยใช้อาหาร BPMM เข้มข้น 2 เท่า พีเอช 10 ที่ไม่มีการเติมสับสเตรท ความเข้มข้นของอาหารที่ใช้เติม 1 เท่า ด้วยอัตราคงที่ 1.20 L/h ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 VVM และความเร็วใบกวน 320 rpm.....	90
30 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก <i>B. cohnii</i> .....	94
31 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก <i>B. cohnii</i> .....	94
32 ผลของพีเอชต่อเสถียรภาพของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก <i>B. cohnii</i> .....	96
33 ผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก <i>B. cohnii</i> .....	96
34 ผลของสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก <i>B. cohnii</i> .....	97
35 ผลของสารลดแรงตึงผิวและสารออกซิไดซ์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส ที่ได้จาก <i>B. cohnii</i> .....	98
36 ผลของไอออนของโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก <i>B. cohnii</i> .....	99

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส (E.C. 3.4.21-24) จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์โปรตีเอส ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในสายโพลีเปปไทด์ ได้เป็นเปปไทด์ที่สั้นลง ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่พีเอชเป็นกลางไปจนถึงเป็นด่างได้ (Gupta et al., 2002) ด้วยคุณสมบัติในการมีกิจกรรมและความเสถียรในสภาวะดังกล่าว ทำให้มีการนำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสไปใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรม เริ่มจากการใช้อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากแบคทีเรียมาเป็นส่วนประกอบในผงซักฟอกเป็นครั้งแรกในช่วงปี 1960 (Saeki et al., 2007) เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสิ่งสกปรกบนเนื้อผ้าให้ดียิ่งขึ้น หลังจากนั้นก็แพร่หลายไปยังอุตสาหกรรมอื่น ๆ อีกมากมาย ไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมการฟอกหนังที่นำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสไปใช้ในการย่อยกำจัดเส้นขนออกจากหนังสัตว์ รวมไปถึงการนำไปใช้อุตสาหกรรมอาหาร การแพทย์ และการกำจัดของเสียที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรม เป็นต้น (Kumar & Takagi, 1999) ด้วยเหตุนี้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจึงมีส่วนแบ่งทางการตลาดมากที่สุด คิดเป็นประมาณร้อยละ 60-65 ของตลาดการค้าเอนไซม์ทุกชนิดทั่วโลก (Genckal & Tari, 2006)

โดยส่วนใหญ่ เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรมนั้น ผลิตมาจากจุลินทรีย์จำพวกราและแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียจีส *Bacillus* ที่เป็นแบคทีเรียกลุ่มสำคัญในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสชนิดหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (Kumar et al., 2012) ซึ่งการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์เหล่านี้ในระดับอุตสาหกรรมให้มีประสิทธิภาพสูงที่สุด จำเป็นต้องมีการควบคุมสภาวะต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยง เช่น สูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยง พีเอช อุณหภูมิ อัตราการให้อากาศและการกวนผสม เป็นต้น ให้มีความเหมาะสมทั้งต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ นอกจากนี้ เทคนิคที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงก็เป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่ง ที่ทำให้การผลิตเอนไซม์เกิดประสิทธิภาพสูงสุด เช่น การเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ (fed-batch fermentation) ซึ่งเป็นเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่ช่วยลดปัญหาการเกิด Catabolite repression จากการที่มีระดับความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงสูงแล้วส่งผลให้เกิดการยับยั้งหรือลดอัตราการผลิตเอนไซม์ลงอย่างถาวร (กฤษฎากร จริโมภาส, 2549)

จะเห็นได้ว่าอัลคาไลน์โปรตีเอสนั้น มีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมชนิดต่าง ๆ ภายในประเทศเป็นอย่างมาก แต่เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสทั้งหมดที่นำมาใช้ประโยชน์ภายในประเทศนั้น ต้องนำเข้าจากต่างประเทศแทบทั้งสิ้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกและคัดเลือกได้จากตัวอย่างดินภายในประเทศไทย โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch fermentation ภายในถังหมักขนาด 50 ลิตร รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์ดังกล่าว เพื่อเป็นแนวทางหนึ่งในการประยุกต์ใช้และขยายขนาดกำลังการผลิตไปสู่ระดับอุตสาหกรรม ซึ่งจะช่วยประหยัดเงินตราของประเทศจากการลดปริมาณการนำเข้าเอนไซม์ได้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากตัวอย่างดินภายในประเทศ และจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

1.2.2 เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

1.2.3 เพื่อศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและถังหมักขนาด 50 ลิตร

1.2.4 เพื่อศึกษาวิธีการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีการตกตะกอน

1.2.5 เพื่อศึกษาสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

## 1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1.3.1 คัดแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างอัลคาไลน์โปรตีเอสจากตัวอย่างดินที่เก็บได้จากสถานที่ต่าง ๆ ภายในประเทศ และจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

1.3.2 ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ได้แก่ สูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยง แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน พีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสม

1.3.3 ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยเปรียบเทียบระหว่างการหมักแบบกะ (Batch fermentation) และการหมักแบบเติมกะ (Fed-batch fermentation) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

1.3.4 ศึกษาการเจริญและการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ภายในถังหมักขนาด 50 ลิตร โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในถังหมักขนาด 5 ลิตร

1.3.5 ศึกษาวิธีการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนโดยวิธีการตกตะกอน

1.3.6 ศึกษาสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส ซึ่งได้แก่ ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ ผลของสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ผลของสารลดแรงตึงผิว สารออกซิไดซ์ และไอออนของโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส ได้มีประสิทธิภาพสูง

1.4.2. ทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้



1.4.3. ทราบเทคนิคในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

1.4.4. สามารถนำข้อมูลพื้นฐานต่าง ๆ ที่ได้จากงานวิจัยไปพัฒนาเพื่อเป็นแนวทางในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในระดับอุตสาหกรรม

1.4.5 ทราบถึงประสิทธิภาพของเทคนิคการทำให้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้บริสุทธิ์บางส่วน โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

1.4.6 ทราบถึงคุณสมบัติเบื้องต้นทางชีวเคมีของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

## บทที่ 2

### แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 คุณสมบัติและการจำแนกเอนไซม์โปรตีเอส

โปรตีเอส (Protease) คือ กลุ่มเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีน ได้เป็นกรดอะมิโนและโพลีเปปไทด์สายสั้น ๆ ซึ่งแหล่งที่มาของเอนไซม์โปรตีเอสมีทั้งจากพืช, สัตว์ และจุลินทรีย์ แต่โปรตีเอสที่มีบทบาทสำคัญที่สุดในอุตสาหกรรมต่าง ๆ นั้น เป็นโปรตีเอสที่ได้จากจุลินทรีย์จำพวกราและแบคทีเรีย โดยครองปริมาณการผลิตถึงสองในสามส่วนของตลาดการค้าเอนไซม์ทั่วโลก (Gupta et al., 2002) โปรตีเอสที่ได้มาจากจุลินทรีย์นั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม ตามลักษณะบริเวณเร่งของเอนไซม์ (พิมล จ้างงค์, 2545) ได้แก่

##### 2.1.1 Metalloprotease (E.C. 3.4.24)

Metalloprotease เป็นโปรตีเอสที่มีไอออนของโลหะเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ และจะพบไอออนของโลหะที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ในลักษณะของโคแฟกเตอร์ หรือร่วมในปฏิกิริยาการย่อยสลายของเอนไซม์ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

**2.1.1.1 Neutral protease** เป็นเอนไซม์ที่มีอะตอมของสังกะสี (Zn) อยู่ตรงบริเวณเร่ง ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมอยู่ในช่วง 6.5-7.0 เมื่อใช้สับสเตรทสังเคราะห์ FAGLA (furylacrylylglycylleucinamide) และถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วยสารจำพวก chelating agent

**2.1.1.2 Alkaline-metalloprotease** เป็นเอนไซม์ที่มีโมเลกุลของธาตุโลหะอยู่ตรงบริเวณเร่ง สามารถทำงานได้ดีเมื่อพีเอชอยู่ในช่วง 7.0-9.0 และต้องใช้ EDTA ที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 0.1 โมลาร์ จึงจะสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้

##### 2.1.2 Acid protease (E.C. 3.4.23)

Acid protease เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Aspartic protease เป็นเอนไซม์ที่มีหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนแอสปาร์ติกอยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ ส่วนใหญ่ได้มาจากราและยีสต์ แต่ก็มีแบคทีเรียบางจำพวกที่สามารถผลิตได้ โดยมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วง 2.0-4.0 สารที่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้ เช่น Pepstatin, Dansyl-pepstatin และ Diazoketone แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วยสาร EDTA และ Diisopropyl fluorophosphates (DFP)

##### 2.1.3 Cysteine protease (E.C. 3.4.22)

หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Sulphydryl protease เป็นเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโน Cysteine อยู่ตรงบริเวณเร่ง หรืออีกนัยหนึ่งคือ มี -SH ในบริเวณเร่ง ทำงานได้ดีที่พีเอชระหว่าง 6.0-7.5 มีกิจกรรมการทำงานที่ดีขึ้นเมื่อมีสารรีดิวซ์ และถูกยับยั้งการทำงานได้โดยสารจำพวก sulphydryl reagents หรือ

Sulphydryl group (-SH) หรือ กลุ่มไทออล ซึ่งจะมีผลทำให้หมู่ซัลไฟดริลที่อยู่ตรงบริเวณเร่งได้รับความกระทบกระเทือนและสูญเสียกิจกรรมในที่สุด

#### 2.1.4 Serine protease (E.C. 3.4.21)

เป็นเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโนเซรีนและฮิสทีดีนอยู่ที่บริเวณเร่ง มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง 7.0-11.0 สามารถถูกยับยั้งปฏิกิริยาได้โดยสาร DFP และ Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) แบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่ม (Gupta et al., 2002) ดังนี้

**2.1.4.1 Chymotrypsin-like protease** เป็นเอนไซม์ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ Trypsin, Elastase และ Thrombin มีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่เป็นกรดอะมิโนพื้นฐานชนิดต่าง ๆ ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 8.0 สามารถถูกยับยั้งปฏิกิริยาได้โดยสารจำพวก *N*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone, L-1-tosylamide-2-phenylethyl chloromethyl ketone, Diisopropylfluorophosphate และ Soyabean trypsin inhi bitor

**2.1.4.2 Subtilisin-like protease หรือ Subtilase** เป็นเอนไซม์ที่มีจุดกำเนิดมาจากแบคทีเรีย ซึ่งจะถูกล้างออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลายสารอาหาร มีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่เป็นวงแหวนและมีคุณสมบัติไฮโดรโฟบิก ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 10.0 สามารถถูกยับยั้งการทำงานได้โดยสาร PMSF, Diisopropylfluorophosphate และ Potato inhibitor

**2.1.4.3 Wheat serine carboxypeptidase II-like protease** เป็นเอนไซม์ที่มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 4.5-5.5 แสดงให้เห็นว่าฮิสทีดีนที่บริเวณเร่งมีค่า  $pK_a$  ต่ำกว่าปกติ

**2.1.4.4 Prolyloligopeptidase-like serine protease** เป็นเอนไซม์กลุ่มที่ยังไม่ค่อยทราบคุณสมบัติมากนัก แต่สามารถใช้เทคนิค sequence homology มาอธิบายได้

**2.1.4.5 Myxobacter  $\alpha$ -lytic protease** เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนที่เป็นกลางและมีโครงสร้างเป็นสาย พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 9.0 และสามารถถูกยับยั้งการทำงานได้โดยสารจำพวก Diisopropylfluorophosphate

**2.1.4.6 Staphylococcal protease** ถูกสร้างจากแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 4.0-7.8 มีความจำเพาะต่อพันธะเปปไทด์ตรงหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนที่มีความเป็นกรด สามารถถูกยับยั้งการทำงานได้โดยสาร diisopropyl-fluorophosphate

## 2.2 แหล่งที่มาของเอนไซม์โปรตีเอส

เอนไซม์โปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ทำให้สามารถพบเอนไซม์ชนิดนี้ได้หลาย ๆ แหล่ง ทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์

### 2.2.1 โปรตีเอสจากพืช

การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์โปรตีเอสที่ได้จากพืชมีหลายประการ เช่น การมีพื้นที่ที่เหมาะสมต่อการเพาะปลูก และภูมิอากาศที่เหมาะสมแก่การเจริญของพืช เป็นต้น โปรตีเอสจากพืชที่เป็นที่รู้จักกันดีนั้น ได้แก่ Papain จากยางมะละกอ Bromelain จากสับปะรด และ Keratinase จากพืชสมุนไพรบางชนิด เป็นต้น ปัญหาหลักของการนำเอนไซม์โปรตีเอสที่ได้จากพืชไปใช้ประโยชน์คือ ต้องเพาะปลูกพืชในบริเวณที่มีสภาพภูมิอากาศเหมาะสมเท่านั้น ทำให้ได้ผลผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากพืชได้เพียงบางพื้นที่ นอกจากนี้ เอนไซม์ที่ได้จากพืชนั้นยังมีความเข้มข้นต่ำ จึงต้องใช้วัตถุดิบในปริมาณมากเพื่อผลิตเอนไซม์ให้ได้ตามต้องการ

### 2.2.2 โปรตีเอสจากสัตว์

เอนไซม์โปรตีเอสจากสัตว์ที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ Chymotrypsin, Trypsin, Pepsin, และ Renin เอนไซม์เหล่านี้สามารถผลิตได้ในรูปของเอนไซม์บริสุทธิ์และในปริมาณมาก แต่อย่างไรก็ตาม การผลิตเอนไซม์เหล่านี้ขึ้นขึ้นอยู่กับการเลี้ยงสัตว์เพื่อบริโภค จึงมักถูกควบคุมด้วยนโยบายทางการเมืองและเกษตรกรรม

### 2.2.3 โปรตีเอสจากจุลินทรีย์

แม้ว่าเอนไซม์โปรตีเอสจากพืชและสัตว์จะถูกนำไปใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลายทั่วโลก แต่อย่างไรก็ตาม ในระดับอุตสาหกรรม มักเลือกที่จะผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากเชื้อจุลินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากสามารถเติบโตได้อย่างรวดเร็ว และง่ายต่อการปรับปรุงสายพันธุ์ เพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการได้ ดังนั้น เอนไซม์โปรตีเอสจากจุลินทรีย์จึงสามารถครองส่วนแบ่งในตลาดการค้าเอนไซม์ทั่วโลกได้ถึงสองในสามส่วน โดยมักถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมสารซักล้าง อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมยา เป็นต้น เอนไซม์โปรตีเอสจากจุลินทรีย์นั้น สามารถผลิตได้จากทั้งราและแบคทีเรีย

**2.2.3.1 โปรตีเอสจากรา** โปรตีเอสราได้รับความสนใจในการนำมาศึกษาวิจัยเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีความหลากหลายสูง มีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่ค่อนข้างหลากหลาย อีกทั้งยังมีความเสถียรภายใต้สภาวะที่รุนแรง จึงมีข้อดีคือ ทำให้สามารถแยกเอนไซม์ออกจากเส้นใยไมซีเลียม (Mycelium) ได้โดยการกรอง (Filtration) โดยทั่วไปเอนไซม์โปรตีเอสจากเชื้อรามักจะผลิตด้วยวิธีการหมักบนอาหารแข็ง (Solid-State Fermentation) และมักนำไปใช้ในการแปรรูปอาหารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ

**2.2.3.2 โปรตีเอสจากแบคทีเรีย** เอนไซม์โปรตีเอสในอุตสาหกรรมที่สำคัญนั้นมักผลิตจากแบคทีเรีย โดยเฉพาะที่ได้จากแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* เนื่องจากสามารถผลิตได้ในปริมาณมากและมีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์สูง โปรตีเอสที่ผลิตได้จากแบคทีเรีย สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน ความคงตัว และลักษณะโครงสร้างของบริเวณเร่ง ได้แก่

#### 1) Neutral bacterial protease

Neutral bacterial protease ได้แก่ Metalloenzymes (CAS Number: 9068-59-1) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ต้องการไอออนของโลหะในการทำงาน สามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอช

ระหว่าง 6 ถึง 9 ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis*, *B. thermoproteolyticus* และ *Streptomyces griseus* ซึ่งมีการผลิตทั้งในรูปผงและสารละลายที่คงตัว (Stabilized solutions) มักนำไปใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมเปปเปอร์ และการผลิต Protein Hydrolysate

## 2) Alkaline bacterial protease

Alkaline bacterial protease ได้แก่ Subtilisin (CAS Number: 9014-01-1) เป็นเอนไซม์ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยาเป็นกรดอะมิโน Serine สามารถทำงานได้ดีในช่วงที่มีค่าพีเอชระหว่าง 7 ถึง 11 และสามารถทำงานได้ดีที่สุดในช่วงพีเอชระหว่าง 7.5 ถึง 9.5 สามารถถูกยับยั้งแบบไม่ผันกลับได้ด้วยสารเคมีจำพวก Chelating agent

## 2.3 อัลคาไลน์โปรตีเอส (Alkaline Protease)

อัลคาไลน์โปรตีเอส (E.C. 3.4.21-24) จัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์โปรตีเอสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในสายโพลีเปปไทด์ ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่พีเอชเป็นกลางไปจนถึงเป็นด่างได้ จึงถูกนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ อย่างมากมาย โดยเฉพาะอุตสาหกรรมซักล้าง เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมแสดงไว้ในตารางที่ 1 โดยทั่วไป อัลคาไลน์โปรตีเอสสามารถทำงานได้ในสภาวะที่มีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 8 ถึง 12 และอุณหภูมิอยู่ในช่วง 50 ถึง 70 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่สุดอยู่ระหว่าง 9 ถึง 11 แต่มีส่วนน้อยที่สามารถทำงานได้ดีเมื่อค่าพีเอชสูงถึง 12 และ 13 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานนั้นอยู่ระหว่าง 50 ถึง 70 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่ อัลคาไลน์โปรตีเอสต้องการไอออนของโลหะเพื่อให้มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด ซึ่งไอออนของโลหะที่นิยมนำมาใช้ส่วนใหญ่ได้แก่  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  และ  $\text{Ca}^{2+}$  โดยที่  $\text{Ca}^{2+}$  จะมีบทบาทสำคัญต่อความเสถียรของเอนไซม์ เนื่องจากช่วยเพิ่มกิจกรรมการทำงานและความทนต่อความร้อน (Thermal stability) ของอัลคาไลน์โปรตีเอสได้ เมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิสูง นอกจากนี้ ไอออนของโลหะชนิดอื่น เช่น  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , และ  $\text{Zn}^{2+}$  ก็มักถูกนำมาใช้ในการคงสภาพ (Stabilization) ของเอนไซม์ด้วยเช่นกัน ส่วนไอออนของโลหะจำพวก  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  และ  $\text{Zn}^{2+}$  มักจะยับยั้งการทำงานของอัลคาไลน์โปรตีเอสส่วนมาก

ตารางที่ 1 อัลคาไลน์โปรตีเอสที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม (Anwar and Saleemuddin, 1998)

Species	Source	pH Optimum	Industrial applications
<i>Streptococcus</i> sp	Bacterial	8.0	Dairy/cheese production
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Bacterial	9.5	Detergents and heavy duty laundry powder
<i>Tritirachium album</i> (proteinase T)	Fungal	9.0-12.0	Laundry detergents Formulations
<i>Tritirachium album</i> (proteinase R)	Fungal	7.0-10.0	Laundry detergents Formulations

ตารางที่ 1 อัลคาไลน์โปรตีเอสที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม (ต่อ)

Species	Source	pH Optimum	Industrial applications
<i>Conidiobolus coronatus</i> (alkaline proteinase B)	Fungal	9-7	Resolution of racemic mixtures of D,L phenyl alanine and glycine
<i>Bacillus</i> sp. Y. (BYA)	Bacterial	10.0-12.5	Detergent formulations
<i>Bacillus licheniformis</i> (Alcalase)	Bacterial	8.2	Catalyst for <i>N</i> -protected amino acid
<i>Bacillus</i> sp. (AH-101)	Bacterial	12.0-13.0	Dehairing/leather
<i>Rhizopus oryzae</i> (RO, IIT, KGP)	Fungal	3.0-11.0	?
<i>Conidiobolus coronatus</i> (NCI 86.8.20)	Fungal	8.5	Commercial detergents
<i>Bacillus firmus</i>	Bacterial	8.0	Detergent industry
<i>Bacillus</i> sp. (P-001A)	Bacterial	9.5	Production of biomass from natural waste
<i>Bacillus</i> sp. (B 18)	Bacterial	12.0	?
<i>Bacillus</i> sp.	Bacterial	12.0	?
<i>Bacillus</i> sp.	Bacterial	8.5	Dehairing/leather industry
<i>Bacillus</i> sp.	Bacterial	11.0	?
<i>Thermus</i> Rt 41A	Bacterial	9.0-11.0	Detergent formulations
<i>Bacillus</i> sp. (Savinase/ Durazym)	Bacterial	8.2	Synthesis of biologically active peptides
<i>Bacillus licheniformis</i> (Alcalase)	Bacterial	8.5	Bating agent in leather industry
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacterial	8.5	?
	Bacterial	-	Contact lens cleansing agent
	-	8-11.0	Cheese and detergents
<i>Bacillus</i> sp.	Insect larvae	11.0	Commercial detergents and stain remover formulations
<i>Bacillus subtilis</i>			
<i>Amycolata/Amycolatopsis</i>			
<i>Spilosoma obliqua</i> (Lepidoptera)			

## 2.4 การผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากแบคทีเรีย

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้ส่วนใหญ่มักผลิตเอนไซม์ออกมาในปริมาณน้อย ดังนั้น การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เหล่านี้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ จึงเป็นสิ่งสำคัญ สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์มักมีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมมักจะใช้แหล่งคาร์บอน โปรตีน และองค์ประกอบอื่น ที่ความเข้มข้นสูง ประมาณ 100 - 150 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ดังนั้น ในการที่จะพัฒนาเทคโนโลยีในการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสให้สามารถใช้จริงในระดับอุตสาหกรรมได้ จะต้องคำนึงถึงการเพิ่มผลผลิต (Yield) ของเอนไซม์ และการหาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต (Kumar & Takagi, 1999)

### 2.4.1 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

เนื่องจากเอนไซม์เป็นสารเมทาบอลิต์ที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด รวมไปถึงจุลินทรีย์ด้วย ดังนั้นหากต้องการผลิตเอนไซม์ให้ได้ในปริมาณมาก ก็จำเป็นที่จะต้องเพิ่มอัตราการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ควบคู่กันไป ดังนั้น การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ จึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้สามารถพัฒนากระบวนการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยปัจจัยต่าง ๆ ที่สำคัญต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสนั้น (Kumar & Takagi, 1999) ได้แก่

#### 2.4.1.1 แหล่งไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยง

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ สามารถใช้ในโตรเจนทั้งที่อยู่ในรูปอินทรีย์และอนินทรีย์ แล้วสร้างเป็นกรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก โปรตีน และองค์ประกอบของผนังเซลล์ได้ โดยทั่วไป เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจะมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 15.6 เปอร์เซ็นต์ และการผลิตเอนไซม์นั้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยง มีการรายงานว่า เมื่อใช้ inorganic nitrogen เป็นแหล่งไนโตรเจน จะทำให้อัตราการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสลดต่ำลง นอกจากนี้ยังพบว่า การสังเคราะห์เอนไซม์มักจะถูกยับยั้ง เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนที่ถูกเมตาบอลิซ์ได้ง่าย เช่น กรดอะมิโน และโอออนของแอมโมเนียม แต่อย่างไรก็ดี มีงานวิจัยบางชิ้นที่ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้เกลือของแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจน ไม่มีผลไปยังกิจกรรมของเอนไซม์

#### 2.4.1.2 แหล่งคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยง

จากการศึกษาพบว่า การเกิด Catabolite repression จากกลูโคสความเข้มข้นสูง ทำให้อัตราการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสลดต่ำลง และพบว่าเมื่อค่าพีเอชในอาหารเพาะเลี้ยงลดต่ำลง อันเนื่องมาจากการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของจุลินทรีย์ จะส่งผลให้การผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสลดลงด้วยเช่นกัน สำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม จะใช้คาร์โบไฮเดรตที่ความเข้มข้นสูง ซึ่งจะมีผลไปยังการผลิตเอนไซม์ ดังนั้นจึงต้องใช้วิธีการเติมคาร์โบไฮเดรตลงในอาหารอย่างต่อเนื่อง หรือเติมเป็นชุด ๆ ตลอดกระบวนการหมัก เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดการยับยั้งการผลิต โดยการควบคุมให้ปริมาณสารอาหารอยู่ในสภาวะจำกัดอยู่เสมอ และช่วยลดการให้พลังงานแก่กระบวนการผลิตอีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า การเติมกรดอินทรีย์ต่าง ๆ เช่น Acetic acid, Methyl acetate และ Citric acid หรือ Sodium citrate ลงในอาหารเพาะเลี้ยง ช่วยเพิ่มอัตราการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสได้

### 2.4.1.3 ความต้องการไอออนของโลหะ

การผลิตเอนไซม์อัลคาไลโนโปรตีเอสจากจุลินทรีย์ จะต้องมีการเติมไอออนของโลหะ เช่น แคลเซียม โคบอลต์ คอปเปอร์ โบรอน เหล็ก แมกนีเซียม แมงกานีส และโมลิบดีนัม เป็นต้น ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มอัตราการผลิต อย่างไรก็ตาม การเติมไอออนของโลหะที่จำเพาะบางอย่างก็ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ด้วย ในงานวิจัยส่วนใหญ่จะใช้โพแทสเซียมฟอสเฟตเป็นแหล่งของฟอสเฟตไอออนในอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อรักษาค่าพีเอชในอาหารเพาะเลี้ยงให้คงที่ โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของฟอสเฟตที่ช่วยส่งเสริมอัตราการผลิตเอนไซม์นั้นอยู่ที่ 2 กรัมต่อลิตร แต่หากใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่า 4 กรัมต่อลิตร จะทำให้เกิดการตกตะกอนของอาหารในระหว่างการนึ่งฆ่าเชื้อ ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยการเติม disodium salt ของ EDTA ลงในอาหารเพาะเลี้ยง โดยที่เกลือชนิดนี้จะไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตได้

### 2.4.1.4 พีเอชและอุณหภูมิ

คุณสมบัติที่สำคัญของ Alkalophilic organisms คือการที่สามารถเจริญเติบโตและสร้างเอนไซม์ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่มีความเป็นด่างได้ ดังนั้น การที่จะเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลโนโปรตีเอสจากจุลินทรีย์ Alkalophiles เหล่านี้ จึงจำเป็นที่จะต้องรักษาค่าพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงให้สูงกว่า 7.5 ไปตลอดกระบวนการหมัก ซึ่งการใช้คาร์บอนเตในการปรับพีเอชจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตได้

อุณหภูมิ เป็นปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องควบคุมในระหว่างกระบวนการผลิตเอนไซม์ ซึ่งมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต แม้ว่ากลไกในการควบคุมอุณหภูมิที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด อย่างไรก็ตาม มีงานวิจัยที่พบว่าการสังเคราะห์เอนไซม์และการเผาผลาญพลังงานใน *Bacilli* มีความสัมพันธ์กัน

### 2.4.1.5 การให้อากาศและการกวน

ในระหว่างการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ อัตราการให้อากาศจะเป็นปัจจัยที่บ่งบอกระดับของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง เนื่องจากจุลินทรีย์จะนำออกซิเจนไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมต่าง ๆ ภายในเซลล์ เพื่อสนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์ ดังนั้นปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงจึงมีความสัมพันธ์กับการเจริญของจุลินทรีย์ ดังนั้น หากมีปริมาณของออกซิเจนละลายอยู่ในอาหารเพียงพอ เชื่อสามารถดูดซึมออกซิเจนได้สูง ก็จะทำให้เกิดการสร้างมวลเซลล์และเอนไซม์สูงตามไปด้วย ด้วยเหตุนี้ การกวนและการให้อากาศจึงเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการส่งผ่านออกซิเจนจากอาหารเพาะเลี้ยงไปยังเซลล์จุลินทรีย์เป็นอย่างมาก

## 2.4.2 เทคนิคในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตเอนไซม์อัลคาไลโนโปรตีเอส

### 2.4.2.1 การหมักด้วยอาหารแข็ง (Solid-state fermentation)

เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารแข็งที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งจะทำการเติมน้ำหรือให้ความชื้นในอาหารเพียงแค่นี้ให้เหมาะสมต่อการเจริญเท่านั้น ทำให้อาหารมีความชื้นต่ำเหมาะสำหรับการเจริญและการสร้างเอนไซม์เท่านั้น ทำให้วิธีการนี้เหมาะสำหรับใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สร้างเส้นใย



(Filamentous organisms) ที่สามารถเจริญเติบโตบริเวณผิวหน้าของอาหารได้ ข้อดีของวิธีการนี้คือสามารถทำได้ง่าย ต้นทุนในการผลิตต่ำและได้ผลผลิตของเอนไซม์สูง

จากการศึกษาของ Oda และคณะ (2006) พบว่าระดับการแสดงออกของกิจกรรมของเอนไซม์ ภายใต้สภาวะการหมักด้วยอาหารแข็งมีค่าสูงกว่าการหมักในอาหารเหลว เนื่องจากสภาวะของการหมักด้วยอาหารแข็งมีความใกล้เคียงกับลักษณะการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์ในธรรมชาติ

#### 2.4.2.2 การหมักด้วยอาหารเหลว (Submerged fermentation)

เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการผลิตเอนไซม์และสารเมตาบอไลต์ต่าง ๆ ในอุตสาหกรรมมากที่สุด วิธีการนี้จะเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวซึ่งง่ายต่อการเตรียม การควบคุมอุณหภูมิและพีเอช และการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ การหมักชนิดนี้สามารถแบ่งตามลักษณะของการดำเนินการ ดังนี้

##### 1) การหมักแบบกะ (Batch fermentation)

การหมักแบบกะเป็นการเพาะเลี้ยงในระบบปิด ความเข้มข้นของสารอาหารในอาหารเพาะเลี้ยงจะสูงในช่วงเริ่มต้นของกระบวนการ จากนั้นจะค่อย ๆ ลดลงจนกระทั่งถูกใช้หมดไปหรือเหลือน้อยที่สุด และจะได้ผลิตภัณฑ์ในช่วงสุดท้ายของกระบวนการ การเพาะเลี้ยงด้วยวิธีนี้จะได้รับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหลายช่วง โดยที่แต่ละช่วงของการเจริญจะแตกต่างกันอย่างชัดเจน ในระยะแรกของการเพาะเลี้ยง แบคทีเรียจะยังไม่มีการเพิ่มจำนวน เนื่องจากเชื้อกำลังปรับตัวต่อสภาพแวดล้อม และสังเคราะห์เอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต เรียกระยะนี้ว่า ระยะพักตัว (Lag phase) จากนั้นเชื้อจะเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงระยะเร่ง (Log phase หรือ Exponential phase) และการเจริญจะคงที่เมื่อเข้าสู่ระยะ Stationary phase ซึ่งเป็นระยะที่แบคทีเรียมีจำนวนเซลล์สูงสุด และมีอัตราการเจริญเท่ากับอัตราการตาย หลังจากนั้นเชื้อจะเข้าสู่ระยะ Dead phase ที่อัตราการเจริญของเชื้อจะลดลง เนื่องมาจากสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญหมดลง

##### 2) การหมักแบบเติมกะ (Fed-batch fermentation)

การหมักแบบเติมกะ จะต้องทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแบบกะก่อน แล้วจึงเติมอาหารเข้าไปในถังหมักเป็นช่วง ๆ หรืออย่างต่อเนื่อง โดยที่ไม่มีการดึงเอาอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากระบบ การหมักด้วยวิธีนี้เป็นที่นิยมมาก ๆ เติมสารอาหารให้พอดีกับความต้องการในการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เพื่อไม่ให้เกิดการขาดแคลนออกซิเจนอันเนื่องมาจากการเจริญอย่างรวดเร็ว ซึ่งหากปริมาณของออกซิเจนมีไม่เพียงพอกับปริมาณของสารอาหารในอาหารเพาะเลี้ยง แบคทีเรียจะนำสารอาหารไปใช้ในการสร้างสารอื่นที่เป็นพิษ เช่น กรดอะซิติก (Acetic acid) เป็นต้น แทนการนำไปใช้สร้างพลังงานในกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า แครบทรีเอฟเฟกต์ (Crabtree effect) วิธีการหมักแบบเติมกะนี้ นอกจากจะทำให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์สูงแล้ว ยังช่วยลดการเกิดการยับยั้งการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์จากความเข้มข้นเริ่มต้นของสับสเตรทที่สูงได้อีกด้วย ดังนั้นจึงนิยมใช้การเพาะเลี้ยงแบบเติมกะในระดับอุตสาหกรรมมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบอื่น ๆ ข้อดีและข้อเสียของการหมักในอาหารเหลวแต่ละวิธี แสดงไว้ในตารางที่ 2 (Fauziah, 2010)

ตารางที่ 2 ข้อดีข้อเสียของการหมักในอาหารเหลวแต่ละวิธี (Patrick & Finn, 2008)

ข้อดี	ข้อเสีย/ข้อจำกัด
<p>การหมักแบบกะ</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. เหมาะสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์ในปริมาณน้อย</li> <li>2. จุลินทรีย์มีความแข็งแรง เกิดการผ่าเหล่ายาก</li> <li>3. การควบคุมระหว่างการเพาะเลี้ยงทำได้ง่าย</li> <li>4. การควบคุมระบบให้อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อทำได้ง่าย เพราะเป็นระบบปิด ไม่มีการนำสารเข้าหรือออกจากระบบ</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. ต้องเตรียมหัวเชื้อและอาหารใหม่ทุกครั้ง จึงเสียเวลาและค่าใช้จ่ายมาก</li> <li>2. ต้องรอให้จุลินทรีย์เติบโตในช่วงแรกทุกครั้ง เนื่องจากการเตรียมหัวเชื้อใหม่ จึงต้องมีการปรับสภาวะของจุลินทรีย์ก่อน</li> </ol>
<p>การหมักแบบเติมกะ</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. ลดผลการยับยั้งการผลิตผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากอาหารความเข้มข้นสูง</li> <li>2. ผลิตเซลล์ได้ที่มีความเข้มข้นสูง</li> <li>3. ลดผลจากกลูโคส (Glucose effect) เมื่อใช้กลูโคสในอาหารที่ความเข้มข้นสูง</li> <li>4. ลดความหนืดของอาหารที่เกิดจากจุลินทรีย์และผลผลิตจากจุลินทรีย์</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. จำเป็นต้องทราบลักษณะของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง เพื่อให้สามารถเติมอาหารได้ตรงตามลักษณะการเจริญ</li> <li>2. การควบคุมระบบจำเป็นต้องใช้ทักษะในการดำเนินการสูง</li> </ol>

## 2.5 สมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส (Kumar และ Takagi, 1999)

### 2.5.1 พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์

โดยทั่วไป พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจะอยู่ในช่วง 9-11 แต่มีเอนไซม์บางชนิดที่มีค่าพีเอชที่เหมาะสมค่อนข้างสูง โดยมีค่าเท่า 11.5, 11-12, 12.3 และ 12-13 นอกจากนี้ยังมีค่า Isoelectric point สูง ทำให้มีความเสถียรเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 6-12 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสอยู่ในช่วง 50-70 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., และ *Thermus* sp. ค่อนข้างเสถียรที่อุณหภูมิสูง และการเติมไอออนของแคลเซียมในอาหารเพาะเลี้ยงยังช่วยเพิ่มความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงได้อีกด้วย

### 2.5.2 น้ำหนักโมเลกุล

น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจะอยู่ในช่วง 15 ถึง 30 กิโลดาลตัน

### 2.5.3 ความต้องการไอออนของโลหะและสารยับยั้ง

เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสต้องการ Divalent cation เช่น  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  และ  $\text{Mn}^{2+}$  หรือการรวมไอออนของโลหะเหล่านี้เข้าด้วยกันในอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อให้มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด และพบว่า cations เหล่านี้ช่วยเพิ่มความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ที่ได้จาก *Bacillus* ด้วย โดยเชื่อว่า cations จะปกป้องเอนไซม์ไม่ให้เสียสภาพจากความร้อน และมีบทบาทสำคัญในการรักษาโครงสร้างที่สามารถทำงานได้ของเอนไซม์ (Active form) เมื่ออยู่ภายใต้อุณหภูมิสูง

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ ความต้องการโคแฟกเตอร์และลักษณะของบริเวณเร่ง เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจะถูกยับยั้งกิจกรรมอย่างสมบูรณ์โดยสาร Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) และ Diisopropylfluorophosphates (DFP)

### 2.5.4 ความจำเพาะต่อสับสเตรท

แม้ว่าอัลคาไลน์โปรตีเอสจะสามารถย่อยสลายสับสเตรทสังเคราะห์ได้ดีเช่นเดียวกับสับสเตรทที่ได้จากธรรมชาติ แต่อัตราการเร่งปฏิกิริยาจะค่อนข้างผันแปร นอกจากนี้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสและ Subtilisins ยังสามารถย่อย casein ได้ดีกว่า haemoglobin หรือ bovine serum albumin หรือ BSA

## 2.6 การทำให้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์

### 2.6.1 การตกตะกอน (Precipitation)

การตกตะกอนเป็นการทำให้สารละลายเอนไซม์มีความเข้มข้นมากขึ้น โดยการเติมเกลือหรือสารละลายอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เช่น เมทานอล, เอทานอล และโพรพานอล เป็นต้น ซึ่งจะไปมีผลทำให้การละลายของโปรตีนลดลง เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนกับโปรตีนมากกว่าโปรตีนกับน้ำ ทำให้โปรตีนเกิดการตกตะกอน (ปราณี พัฒนพิพิชไพศาล, 2556) แม้ว่าเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตจะเป็นที่นิยมใช้ในการตกตะกอนโปรตีนทั่วไป แต่ไม่นิยมนำมาใช้ในการตกตะกอนเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส เนื่องจากสามารถตกตะกอนได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดหรือเป็นกลางเท่านั้น จึงนิยมใช้สารพวกโซเดียมซัลเฟต หรือสารละลายอินทรีย์มากกว่า แต่การใช้โซเดียมซัลเฟตก็มีข้อจำกัด เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำจะมีความสามารถในการละลายต่ำ (Kumar & Takagi, 1999)

### 2.6.2 โครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเรชัน (Gel filtration chromatography)

เป็นเทคนิคในการแยกและทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ โดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุล โดยสารตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านสารตัวกลางซึ่งเป็นเจลที่มีลักษณะพรุน ทำหน้าที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสาร โดยสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะสามารถเคลื่อนที่เข้าไปในรูพรุนของเจลได้ จึงเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ที่หลัง ส่วนสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่กว่าจะเข้าไปในเจลได้บางส่วนหรือไม่สามารถเข้าไปในรูพรุนของเจลได้เลย จึงเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์มาเป็นอันดับแรก

### 2.6.3 โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion-exchange chromatography)

เป็นเทคนิคในการแยกเอนไซม์โดยอาศัยความแตกต่างและการแลกเปลี่ยนประจุระหว่างเอนไซม์กับสารตัวกลางที่มีประจุบริเวณผิว เช่น เรซินแลกเปลี่ยนไอออน (Ion exchange resins) เซลลูโลสแลกเปลี่ยนไอออน (Ion exchange cellulose) และเจลแลกเปลี่ยนไอออน (Ion exchange gel) เป็นต้น อัลคาไลน์โปรตีเอสส่วนใหญ่จะมีประจุบวกบนผิว จึงไม่จับกับสารตัวกลางชนิด Anion exchange ดังนั้น การใช้ Cation exchange เป็นสารตัวกลางในการแลกเปลี่ยนประจุจึงเป็นทางเลือกที่ดีกว่าในการแยกอัลคาไลน์โปรตีเอส และสามารถชะเอนไซม์ออกมาได้โดยการเติมเกลือหรือปรับค่าพีเอชเท่านั้น สารตัวกลางที่นิยมใช้ในการแยกอัลคาไลน์โปรตีเอสมักจะมีหมู่ที่มีลักษณะเป็น Ionizable functional group เช่น Diethyl amino ethyl (DEAE) และ Carboxy methyl (CM)

### 2.6.4 โครมาโทกราฟีแบบจำเพาะ (Affinity chromatography)

เป็นเทคนิคในการแยกเอนไซม์โดยอาศัยความจำเพาะของการจับกันทางโครงสร้างเคมีระหว่างสารตัวอย่างกับสารที่มีความจำเพาะต่อโมเลกุลที่ต้องการแยก เรียกว่า ลิแกนด์ (Ligand) โดยลิแกนด์จะถูกตรึงอยู่บนผิวของสารตัวกลางที่ทำหน้าที่เป็นสารพุง (Carrier) สารดูดซับ (Adsorbent) ที่นิยมใช้ในการแยกอัลคาไลน์โปรตีเอสด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบจำเพาะ เช่น Hydroxyapatite, Immobilized N-benzoyloxycarbonyl phenylalanine agarose, Immobilized casein glutamic acid และ Aprotinin agarose เป็นต้น แม้ว่าเทคนิคการแยกโปรตีนแบบโครมาโทกราฟี

แบบจำเพาะจะเป็นวิธีการแยกที่มีประสิทธิภาพวิธีหนึ่ง แต่มีข้อจำกัดคืออุปกรณ์ที่ใช้ในการแยกมีราคาแพง ทำให้นำไปใช้ในการแยกโปรตีนในระดับอุตสาหกรรมได้ยาก

## 2.7 การนำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ

### 2.7.1 อุตสาหกรรมผงซักฟอก

การเติมเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในผงซักฟอกช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดคราบโปรตีนที่ติดอยู่บนเนื้อผ้าได้ดี การนำอัลคาไลน์โปรตีเอสไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายในการผลิตผงซักฟอกเป็นผลมาจากการที่เอนไซม์มีคุณสมบัติในการทำมาสะอาดและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดคราบสกปรกอีกด้วย จึงทำให้สามารถทำความสะอาดเสื้อผ้าได้ที่อุณหภูมิต่ำและใช้ระยะเวลาในการปั่นผ้าสั้นลง ภายหลังจากขั้นตอนการแช่ผ้า

### 2.7.2 อุตสาหกรรมฟอกหนัง

เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสมีคุณสมบัติที่สามารถย่อย Elastin และ Keratin ได้ จึงถูกนำมาใช้ในขั้นตอน Biotreatment ของอุตสาหกรรมฟอกหนัง เพื่อกำจัดเส้นขนและเศษเนื้อเยื่อที่ติดอยู่บนหนังสัตว์ให้หลุดลอกออกไป ภายใต้อุณหภูมิที่ต่ำกว่าปานกลาง รุขุมขนบนหนังสัตว์จะเกิดการขยาย เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนจึงสามารถเข้าไปย่อยโปรตีนบริเวณ Hair follicle ได้ ทำให้ง่ายต่อการกำจัดเส้นขน เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่เป็นด่างสูงซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้กันแต่ก่อน การใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจึงเป็นที่ยอมรับและปลอดภัยกว่าการใช้ Sodium sulfide ในการกำจัดเส้นขน ซึ่งก่อให้เกิดซัลไฟด์ร้อยละ 100 และมากกว่าร้อยละ 80 ของซัลไฟด์ที่เกิดขึ้นมักปนเปื้อนไปกับของเสียจากโรงงานฟอกหนัง นอกจากนี้ หนังสัตว์ที่ผ่านการฟอกโดยใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนนั้น จะมีคุณภาพดีกว่าหนังสัตว์ที่ได้จากการฟอกแบบเก่า

### 2.7.3 อุตสาหกรรมอาหาร

อัลคาไลน์โปรตีเอสสามารถย่อยสลายโปรตีนทั้งจากพืชและสัตว์ได้ Alcalase เป็นเอนไซม์ทางการค้าที่มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนประเภทไฮโดรโฟบิกค่อนข้างกว้าง จึงมีการนำเอนไซม์ชนิดนี้ไปใช้ย่อยโปรตีน ให้ได้เป็น Protein hydrolysate ที่มีความขมลดลง นอกจากอัลคาไลน์โปรตีเอสชนิดนี้แล้ว ยังมีเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสชนิดอื่น ๆ ที่ถูกนำไปใช้เป็นส่วนผสมในน้ำผลไม้ หรือผลิตภัณฑ์อาหารโปรตีนสูงสำหรับผู้ที่ต้องการลดน้ำหนัก รวมทั้งนำไปใช้ในการทำให้เนื้ออ่อนนุ่ม

### 2.7.4 อุตสาหกรรมเคมี

การเติมเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสลงในสารละลายอินทรีย์ สามารถใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพในทางเคมีสังเคราะห์ได้ แต่มีข้อเสียคือ กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเป็นอย่างมาก เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มีน้ำ ดังนั้น จึงต้องศึกษาวิจัยเพื่อหาวิธีการในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในสารละลายอินทรีย์ให้ได้

### 2.7.5 การบำบัดของเสีย

อัลคาไลน์โปรตีนเอสถูกนำไปใช้ในการจัดการของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารและชุมชน โดยอัลคาไลน์โปรตีนเอสเหล่านี้สามารถย่อยสลายโปรตีนที่อยู่ในของเสียจำนวนหลายขั้นตอน เพื่อให้ได้ อาหารเหลวหรืออาหารแห้งที่มีความเข้มข้นของสารอาหารสูง สำหรับใช้ในการเลี้ยงสัตว์ (Kumar & Takagi, 1999)

## 2.8 สรุปทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิด

### 2.8.1 ทฤษฎี และสมมติฐาน

เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกและคัดเลือกได้จากตัวอย่างดินบริเวณสถานที่ต่าง ๆ ภายในประเทศไทย สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนเอสได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ได้ จากการทดลอง และใช้เทคนิคการหมักแบบเติมกะ (Fed-batch fermentation) จนสามารถขยายขนาดการผลิตไปสู่ระดับอุตสาหกรรมได้

### 2.8.2 กรอบแนวคิด

คัดแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนเอสที่ดีที่สุดจากตัวอย่างดินที่เก็บจากสถานที่ต่าง ๆ ภายในประเทศ จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในถังหมัก ภายใต้สภาวะที่มีสูตรอาหารและปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสม โดยใช้เทคนิคการหมักแบบเติมกะ (Fed-batch fermentation) ในระยะเวลาไม่เกิน 48 ชั่วโมง แล้วเก็บเกี่ยวผลผลิตโดยการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง จากนั้นนำส่วนใสของอาหารที่แยกได้ ไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต เพื่อให้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนเอสที่ผลิตได้บริสุทธิ์และมีความเข้มข้นสูงขึ้น

## 2.9 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง

### งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วรรณวิมล ทรัพย์ดี (2540) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในถังหมัก 5 ลิตร โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch fermentation) พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีนเอสได้สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ความเข้มข้น 0.001 เปอร์เซ็นต์ แปะมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ และกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.3 เปอร์เซ็นต์ และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของของเหลวต่อนาที อัตราเร็วในการกวน 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 7.0 ซึ่งได้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 174.82 ยูนิตต่อกรัม น้ำหนักเซลล์แห้ง

สุดิธา แสงยนต์ (2548) ทำการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อ *Bacillus* ที่คัดแยกได้จากดิน พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว BMSM ที่มียีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร และหางนมผง (Skim milk) 10 กรัมต่อลิตร ทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเท่ากับ 233.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อลดปริมาณหางนมผงลงเหลือ 2.5 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงขึ้น โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 467.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จึงสันนิษฐานว่าเคซินที่เป็นโปรตีนหลักในหางนมผงเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เชื้อมีการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสออกมา

กฤษฎากร จริโมภาส (2549) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสโดยใช้เชื้อ *Bacillus* sp. ในอาหารเหลว BMSM ภายในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยวิธีการหมักแบบเติมกะที่มีการเติมอาหารอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราคงที่ (Constantly fed-batch fermentation) พบว่าภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ใช้อาหาร BMSM ที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่า และมีกลูโคส 4 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ได้อัตราการผลิตเอนไซม์จำเพาะสูงที่สุดเท่ากับ 28,484 ยูนิตต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง

Ferrero, Castro, Abate, Baigori, & Sineriz (1996) ศึกษาการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* MIR 29 ที่คัดแยกได้ พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดีที่พีเอช 9.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยมีเคซินเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด และเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์ ทำให้มีการหลั่งเอนไซม์ชนิดหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ (Extracellular enzyme) ได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ โดยระดับการสังเคราะห์เอนไซม์จะขึ้นกับชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ใช้ สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือพีเอช 12 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

Mehrotra, Pandey, Gaur, & Darmwal (1999) ศึกษาการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยง Milk agar medium พบว่าแบคทีเรียที่มีแนวโน้มสามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงที่สุด จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ทั้งหมด 52 สายพันธุ์ คือ *Bacillus* sp. ที่มีลักษณะเป็น Saline-alkali และเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 10.5 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะทำให้ได้กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด

Joo และคณะ (Joo et al.,2002) ทำการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus horikoshii* ที่คัดแยกได้จากสารเหลวภายในร่างกายของไส้เดือนทะเลที่เจริญอยู่ในโคลนบริเวณชายฝั่งทะเลเหลืองของประเทศเกาหลี พบว่าการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *B. horikoshii* ในอาหารที่ประกอบด้วย กากถั่วเหลือง 1.5 เปอร์เซ็นต์ และเคซิน 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส พีเอช 9 เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ทำให้ได้กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด และเอนไซม์ที่ผลิตได้สามารถทำงานได้ดีที่พีเอชระหว่าง 5.5-12 แต่สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอชประมาณ 9 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 45 องศาเซลเซียส นอกจากนี้กิจกรรมของเอนไซม์ยังสามารถถูกยับยั้งได้โดยสาร PMSF เนื่องจากเอนไซม์ที่ผลิตได้อยู่ในกลุ่มของ serine protease

Singh, Vohra, & Sahoo (2004) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus sphaericus* โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ พบว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นมากกว่า 3.3 กรัมต่อลิตร ไม่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามกิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์จะมีค่าสูงสุดเมื่อใช้กลูโคสที่ความเข้มข้น 10.4 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่า การเพาะเลี้ยงแบบเติมกะที่มีการเติมอาหารที่ประกอบด้วย

กลูโคสและสารอาหารความเข้มข้นสูง จะส่งผลให้การหลั่งเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียลดลง

Joo and Chang (2005) ศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่มีความเสถียรต่อสาร SDS จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. I-132 ซึ่งคัดแยกได้จากดินโคลนบริเวณหาดที่มีการปนเปื้อนของสารเคมี และตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณใกล้เขตของโอด เมืองอินซอน ประเทศเกาหลี พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่ประกอบด้วย กากถั่วเหลือง 15 กรัมต่อลิตร แป้งสาลี 10 กรัมต่อลิตร ฟรุคโตส 5 กรัมต่อลิตร  $K_2HPO_4$  4 กรัมต่อลิตร  $Na_2HPO_4$  1 กรัมต่อลิตร  $CaCl_2$  0.05 กรัมต่อลิตร และ  $Na_2CO_3$  8 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที จะทำให้ได้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 42,520 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยเอนไซม์ที่ผลิตได้จะมีกิจกรรมการทำงานที่เหมาะสมในสภาวะพีเอช 11 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อีกทั้งยังมีความเสถียรต่อสารทั้ง SDS และสารออกซิไดส์ โดยมีกิจกรรมคงเหลือเท่ากับ 87.8 และ 87.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในสภาวะที่มีสาร SDS ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และ  $H_2O_2$  ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 72 ชั่วโมง ดังนั้นอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียชนิดนี้ จึงมีแนวโน้มที่จะสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมซักล้างได้ค่อนข้างสูง

Potumarthi, Subhakar, & Jetty (2007) ศึกษาอิทธิพลของการให้อากาศและการกวนผสมภายในถังหมักแบบ stirred tank-reactor สำหรับการเพาะเลี้ยง *Bacillus licheniformis* NCIM-2042 เพื่อผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีการผันแปรอัตราการให้อากาศอยู่ระหว่าง 1-3 ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของของเหลวต่อนาที และอัตราการกวนผสมระหว่าง 200-400 รอบต่อนาที พบว่าในทุกรอบของการเพาะเลี้ยงแบบกวน การสร้างเอนไซม์จะเกิดขึ้นสูงสุดในวันที่สามของการเพาะเลี้ยง (72 ชั่วโมง) จากนั้นจะลดลงในช่วงวันที่สี่และห้า และเมื่อให้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 3 ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของของเหลวต่อนาที ร่วมกับอัตราการกวนผสม 200 รอบต่อนาที จะได้อัตราการสร้างเอนไซม์จำเพาะสูงสุดเท่ากับ 102 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของ DC นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้เคซินที่ระดับความเข้มข้นสูงจะทำให้อาหารเพาะเลี้ยงมีความหนืดขึ้น ส่งผลให้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงยาวนานขึ้นตามไปด้วย ซึ่งเป็นผลมาจากอัตราการส่งผ่านก๊าซออกซิเจน (Oxygen transfer rate) ภายในถังหมักลดลง

Ahmed and Abdel-Fattah (2010) ทำการศึกษาการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* ATCC 21415 แบบเซลล์อิสระ เปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดเดียวกันที่ผ่านการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการต่าง ๆ โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงต่างกัน ได้แก่ การเพาะเลี้ยงแบบกะ แบบ repeated batch และแบบต่อเนื่อง พบว่าการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *B. licheniformis* ATCC 21415 ที่ถูกตรึงเซลล์ด้วยการเกาะบนผ้าขนสัตว์โดยใช้พันธะโควาเลนต์ด้วยกลูตาโรลดีไฮด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบ repeated batch มีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้เซลล์อิสระ เห็นได้จากกิจกรรมเอนไซม์คงเหลือที่มีอยู่ถึง 57 เปอร์เซ็นต์ หลังการเพาะเลี้ยงผ่านไป 5 รอบ (เป็นเวลา 480 ชั่วโมง) ในขณะที่กิจกรรมเอนไซม์ของเซลล์อิสระคงเหลือเพียง 35 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงได้เพียง 2 รอบ ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องทำให้ได้ผลผลิตของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 763.6 ยูนิตต่อชั่วโมง เมื่อให้อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.1 ต่อชั่วโมง และอัตราการผลิตเอนไซม์ของ



ถึงหมักจะมีค่าสูงสุดเท่ากับ 3.32 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.4 ต่อ ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่า ถึงหมักชนิด Packed-bed reactor เหมาะสำหรับการเพาะเลี้ยงแบบที่เรียเพื่อผลิตอัลคาไลน์โปรตีนด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง ที่ต้องใช้เวลานาน (168 ชั่วโมง) มากที่สุด โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพันธ์เท่ากับ 53 เปอร์เซ็นต์

Sevinc and Demirkan (2011) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. N-40 ที่คัดแยกได้จากดิน พบว่าการใช้อาหารเพาะเลี้ยงที่มีองค์ประกอบที่เหมาะสมช่วยเพิ่มอัตราการผลิตเอนไซม์ได้ถึง 51 เปอร์เซ็นต์ โดยแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ ฟรุคโตสและหางนมผง ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ไม่มีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ และการใช้ไอออนของโลหะร่วมกันระหว่าง  $Ca^{2+}$  กับ  $Mg^{2+}$  ในอาหารเพาะเลี้ยงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต แต่ไม่มีผลต่อการผลิตเมื่อใช้เพียงแคตัวใดตัวหนึ่ง เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนที่ผลิตได้จากแบคทีเรียชนิดนี้ สามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และเมื่อศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์ที่สภาวะต่าง ๆ พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรที่พีเอชระหว่าง 6 ถึง 9 และอุณหภูมิระหว่าง 40 ถึง 70 องศาเซลเซียส สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ได้โดยใช้  $Mn^{2+}$  และ  $Ca^{2+}$

Tabandeh และคณะ (Tabandeh et al., 2011) ศึกษาการอิทธิพลของวิธีการเติมอาหารแบบต่าง ๆ ในการผลิตอัลคาไลน์โปรตีนจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus clausii* โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ พบว่าวิธีการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะที่มีการเติมอาหารเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วยเกลือแร่ ยีสต์สกัด และปราศจากกลูโคส ด้วยอัตราค่าที่ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนจาก *B. clausii* ทำให้สามารถวัดกิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์ได้เท่ากับ  $2,430 \pm 67$  ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้นจากการใช้วิธีการเพาะเลี้ยงแบบกะ ( $1,800 \pm 14$  ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร) ถึง 35 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าผลผลิตของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ของวิธีการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะที่เท่ากับ 121,500 ยูนิต์ต่อกรัม และ 71,470 ยูนิต์ต่อลิตร ตามลำดับ ยังมีความสูงกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบกะ (90,000 ยูนิต์ต่อกรัม และ 64,285 ยูนิต์ต่อลิตร) อีกด้วย ดังนั้น แนวโน้มในการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะดังกล่าวข้างต้น ไปใช้ในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนสำหรับใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมซักล้างจึงมีความเป็นไปได้สูง

Kumar และคณะ (Kumar et al., 2012) ศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนจากเชื้อ *Bacillus* sp. MPTK 712 ที่คัดแยกได้จากกากตะกอนของโรงงานนม โดยใช้ Modified production medium ที่มีกากตะกอนจากโรงงานนมเป็นสับสเตรท พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ควบคุมพีเอชเท่ากับ 9.0 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และมีความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 2 เปอร์เซ็นต์ อัลคาไลน์โปรตีนที่ได้จากแบคทีเรียชนิดนี้ สามารถถูกยับยั้งการทำงานได้โดย Cetrinide, Tween-80, SDS และ Tween-20 และมีความเสถียรที่พีเอช 9 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

Smita, Ray, & Mohapatra (2012) ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอัลคาไลน์โปรตีนจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Serratia liquefaciens* ที่คัดแยกได้จากบริเวณเขตเมืองโอริสสา (Orissa) ประเทศอินเดีย พบว่าได้ผลผลิตเอนไซม์สูงสุด (74.3 พียูต่อมิลลิลิตร) เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะ

พีเอชเท่ากับ 9 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

Tekin และคณะ (Tekin et al., 2012) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อ *Bacillus cohnii* APT5 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดิน พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเคซีนเป็นองค์ประกอบ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 11.0 ทำให้ได้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 693,318 หน่วยต่อนาที่ เอนไซม์ที่ได้มีความเสถียรที่พีเอช 11 อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เอนไซม์ที่ผลิตได้จะมีกิจกรรมลดลงเล็กน้อยเมื่อใช้ตัวบัฟเฟอร์ PMSF ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยมีกิจกรรมสัมพันธ์เท่ากับ 76 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่า เอนไซม์มีความเสถียรสูงในสภาวะที่มีสารลดแรงตึงผิว (Surface active agents) ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ SDS, Tween 20, Tween 80 และ Triton X-100

Agarwal & Katiyar (2013) ทำการศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากแบคทีเรียที่ชอบด่างและทนร้อน *Bacillus* sp. BHA ซึ่งคัดแยกได้จากสับسترที่เป็นโปรตีนที่ผ่านการย่อยแล้ว (Decaying protein substrate) ซึ่งสามารถเจริญได้ในสภาวะที่ค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 7-11 แต่สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่พีเอช 9.0 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้เท่ากับ 68.98 เอพียูต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่วัดได้จากเชื้อมาตรฐานที่นำมาเปรียบเทียบคือ *Bacillus amyloliquefaciens* MTCC 610 (8.98 เอพียูต่อมิลลิลิตร) และ *Bacillus subtilis* MTCC 8349 (12.14 เอพียูต่อมิลลิลิตร) นอกจากนี้ยังพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จากเชื้อที่คัดแยกได้ (68.98 เอพียูต่อมิลลิลิตร เท่ากับ 30.38 เอพียูต่อมิลลิกรัม) ยังมีค่าสูงกว่ากิจกรรมเอนไซม์ที่วัดได้จากเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสทางการค้าของบริษัท Novo Nordisk ประเทศเดนมาร์ก (30.35 เอพียูต่อมิลลิกรัม) อีกเช่นกัน และเมื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการผลิตเอนไซม์จาก *Bacillus* sp. BHA โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบเติมกะ พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. BHA มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์สูงเมื่อใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นจากการเพาะเลี้ยงแบบกะถึง 36.84 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้อาหารเพาะเลี้ยง Basal medium ที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนและยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนการใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เคซีน เปปโทน และสารสกัดจากเนื้อวัว ที่ความเข้มข้น 1-4 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จะส่งผลกระทบต่อผลของการสร้างเอนไซม์ในช่วงแรก แต่การยับยั้งนี้จะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซูโครส

Kamran, Bibi, & Kamal (2014) ศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรีย สายพันธุ์ที่ทนร้อน โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นร้อยละ 80 ตามด้วยการทำโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุด้วย CM-cellulose และ DEAE-cellulose พบว่าผลผลิตเอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 16.5 เท่า และมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 417 หน่วยต่อมิลลิกรัม เป็น 6900 หน่วยต่อมิลลิกรัม น้ำหนักโมลกุลของอัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์เท่ากับ 62 กิโลดาลตัน

Radah, Prasad, Devi, & Mamata (2014) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสโดยใช้เชื้อ *Pseudomonas putida* ร่วมกับ *Staphylococcus aureus* ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบเติมกะ พบว่าการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบกะของเชื้อทั้ง

สองชนิดในอาหารสังเคราะห์ (Synthetic medium) ที่ใช้เปลือกกล้วยแห้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เวลาในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 72 ชั่วโมง พีเอช เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 8 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทำให้ได้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ  $1,443.67 \pm 5.6$  ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร แต่การใช้เปลือกกล้วยแห้งบดและกากถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นสูงจะทำให้อัตราการสร้างเอนไซม์ลดลง ซึ่งสามารถแก้ปัญหาได้โดยการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ ที่มีการเติมอาหารที่มีเปลือกกล้วยแห้งบด ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ กากถั่วเหลืองเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นองค์ประกอบ ด้วยอัตราคงที่ เป็นเวลา 70 ชั่วโมง ซึ่งจะทำให้อัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรียลดลงเนื่องจากอาหารเพาะเลี้ยงถูกเจือจาง ในขณะที่ความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียและกิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และคงที่ในที่สุด ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคเติมกะจะมีค่าสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะถึง 1.81 เท่า

Kocher and Joshi (2015) ศึกษาการใช้เปลือกมันฝรั่งเป็นสับสเตรทราคาถูกแทนการใช้เคซีน สำหรับการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus circulans* MTCC 7906 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสเพิ่มขึ้น 2.74 เท่า ที่เวลาการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 96 ชั่วโมง และเมื่อนำเอนไซม์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์ โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและโครมาโตกราฟีด้วย DEAE คอลัมน์ จะทำให้ได้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 18.761 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัม ที่ระดับความบริสุทธิ์ 6.185 เท่า และภายหลังจากการทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้นด้วย PEG ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเป็น 69.332 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัม ที่ระดับความบริสุทธิ์ 22.859 เท่า นอกจากนี้ เมื่อนำเอนไซม์บริสุทธิ์เข้มข้นไปทำการแยกโปรตีนด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS PAGE) เทียบกับเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากการใช้เคซีนเป็นสับสเตรท พบว่าแถบโปรตีนของเอนไซม์ทั้งสองชนิดปรากฏที่บริเวณ 40 กิโลดาลตัน เท่ากัน จึงสามารถบ่งชี้ได้ว่าเปลือกมันฝรั่งสามารถใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อ *Bacillus circulans* MTCC 7906 ได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกับการใช้เคซีน

Lakshmi and Prasad (2015) ศึกษาการทำบริสุทธิ์และตรวจสอบคุณสมบัติของอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อสายพันธุ์ *Bacillus licheniformis* B18 โดยตกตะกอนเอนไซม์ที่ละลายอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และทำโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุด้วย DEAE-cellulose ตามด้วยการทำโครมาโตกราฟีแบบเจลฟิวเรชันด้วย Sephadex G-100 พบว่าผลผลิตเอนไซม์ที่ได้หลังจากการทำบริสุทธิ์มีค่าร้อยละ 10 เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน (Homogeneous) และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 28 กิโลดาลตัน และเมื่อตรวจสอบคุณสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์พบว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ พีเอช 10 แต่มีความเสถียรที่พีเอชระหว่าง 5.0 – 12.0 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 50 องศาเซลเซียส แต่สามารถทำงานได้ในสภาวะที่อุณหภูมิอยู่ระหว่าง 30-70 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงานได้โดยสาร PMSF บ่งชี้ได้ว่าเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียชนิดนี้มีลักษณะเป็น Serine protease ที่สามารถเพิ่มกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ได้เมื่อใช้  $\text{Ca}^{2+}$  และ  $\text{Mn}^{2+}$  ในอาหารเพาะเลี้ยง

Sminathan and Narayanan (2015) ศึกษาการทำบริสุทธิ์และคุณสมบัติของอัลคาไลน์โปรตีนที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* IAS 01 พบว่าเอนไซม์มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 70 หลังจากผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ เริ่มจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต การทำโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุด้วย DEAE-cellulose และโครมาโตกราฟีแบบเจลฟิวเรชันด้วย Sephadex G-100 โดยมี Percent of recovery เท่ากับ 10.45 และมีค่ากิจกรรมจำเพาะเพิ่มขึ้น 11.63 เท่า เมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยวิธี SDS-PAGE มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 14.3 กิโลดาลตัน คุณสมบัติของเอนไซม์หลังจากผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นร้อยละ 70 เอนไซม์มีกิจกรรมการทำงานที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 12.0 และมีกิจกรรมและความเสถียรเพิ่มขึ้นเมื่อมี  $\text{Na}^+$  ( $76.42 \pm 1.41\%$ ) และ  $\text{CaCl}_2$  ( $130.88 \pm 1.48\%$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยง และสามารถถูกยับยั้งกิจกรรมการทำงานได้ถึงร้อยละ 94.2 โดยสาร EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จึงบ่งชี้ได้ว่าอัลคาไลน์โปรตีนที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ เป็นอัลคาไลน์โปรตีนชนิด Metalloprotease นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อทำการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นร้อยละ 70 เอนไซม์ที่ได้จะมีประสิทธิภาพในการขจัดคราบเลือดแห้งที่ติดอยู่บนเสื้อผ้าจากโรงพยาบาลภายในระยะเวลา 30 นาที ซึ่งให้ผลดีกว่าผงซักฟอกตามท้องตลาดทั่วไป ดังนั้นจึงบ่งชี้ได้ว่าอัลคาไลน์โปรตีนที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* IAS 01 มีแนวโน้มที่จะสามารถนำไปใช้เป็นองค์ประกอบในผงซักฟอกได้ในอนาคต

## บทที่ 3

### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 วัสดุ และอุปกรณ์

3.1.1 เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง (Digital Balances) รุ่น Sartorius cp 224s บริษัท Sartorius Mechanics ประเทศเยอรมนี

3.1.2 ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator Shaker) รุ่น C25 KC Classic Incubator Shaker บริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.3 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) รุ่น Memmert BE 200 บริษัท Memmert GmbH & Co. ประเทศ เยอรมนี

3.1.4 ตู้อบแห้ง (Oven) รุ่น Memmert model 500 บริษัท Memmert GmbH & Co. ประเทศ เยอรมนี

3.1.5 อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) รุ่น Julabo TW20 บริษัท Julabo ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.6 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Visible Spectrophotometer) รุ่น GVC Cinta 40 บริษัท GBC Scientific Equipment ประเทศออสเตรเลีย

3.1.7 เครื่องปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Micro centrifuge (MSE) บริษัท Sanyo ประเทศญี่ปุ่น

3.1.8 เครื่องวัดค่าพีเอช (pH Meter) รุ่น Basic บริษัท Denver Instrument ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.9 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) รุ่น WEST 4100+ บริษัท Astoll Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.1.10 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน บริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น

3.1.11 ถังหมัก (Fermenter) ขนาด 5 ลิตรพร้อมชุดควบคุม รุ่น Biostat B บริษัท B. Braun Biotech International ประเทศเยอรมนี

3.1.12 เครื่องปั่นผสม (Vortex Mixer)

3.1.13 หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge Tube) ขนาดบรรจุ 1.5 15 และ 50 มิลลิลิตร

3.1.14 ปิเปต (Auto Pipette) ขนาด 200 ไมโครลิตร 1000 ไมโครลิตร และ 10 มิลลิลิตร

3.1.15 เครื่องแก้วที่จำเป็นในการวิเคราะห์

### 3.2 สารเคมี

- 3.2.1 1,10 ฟีนแอนโทรลีน (1,10 Phenantroline)
- 3.2.2 กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid)
- 3.2.3 กรดไดไนโตรซาลิซิลิก (3,5-Dinitrosalicylic acid: DNS)
- 3.2.4 กรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid: TCA)
- 3.2.5 กรดบอริก (Boric acid)
- 3.2.6 กลูโคส (Glucose)
- 3.2.7 กากถั่วเหลือง (Soybean meal)
- 3.2.8 คอปเปอร์ซัลเฟต ( $\text{CuSO}_4$ )
- 3.2.9 เคซีน (Casein)
- 3.2.10 แคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2$ )
- 3.2.11 โคบอลต์คลอไรด์ ( $\text{CoCl}_2$ )
- 3.2.12 ซิงค์คลอไรด์ ( $\text{ZnCl}_2$ )
- 3.2.13 ซิงค์ซัลเฟต ( $\text{ZnSO}_4$ )
- 3.2.14 โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
- 3.2.15 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodecyl sulfate: SDS)
- 3.2.16 โซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ )
- 3.2.17 โซเดียมไบคาร์บอเนต ( $\text{NaHCO}_3$ )
- 3.2.18 โซเดียมโมลิบเดต ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ )
- 3.2.19 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- 3.2.20 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
- 3.2.21 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )
- 3.2.22 ไตรโซเดียมซิเตรท ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ )
- 3.2.23 ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (Tris HCl)
- 3.2.24 ทวิน 80 (Tween 80)
- 3.2.25 ไทรัน เอ็กซ์ 100 (Triton X-100)
- 3.2.26 นิกเกิลซัลเฟต ( $\text{NiSO}_4$ )
- 3.2.27 เปปโตน (Peptone)
- 3.2.28 ผงวุ้น (Agar)
- 3.2.29 โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
- 3.2.30 โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )
- 3.2.31 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- 3.2.32 ฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (Phenylmethylsulfonyl fluoride: PMSF)
- 3.2.33 โพแทสเซียมไนเตรท ( $\text{KNO}_3$ )
- 3.2.34 เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

- 3.2.35 โฟลินรีเอเจนต์ (Folin-ciocalteu reagent)
- 3.2.36 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )
- 3.2.37 แมงกานีสคลอไรด์ ( $MnCl_2$ )
- 3.2.38 แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต ( $MnSO_4 \cdot H_2O$ )
- 3.2.39 สารละลายกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้นร้อยละ 40 (ภาคผนวก ก)
- 3.2.40 สารละลายเด็กซ์ทรีนที่ได้จากการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้นร้อยละ 40 (ภาคผนวก ก)
- 3.2.41 สารสกัดจากเนื้อวัว (Beef extract)
- 3.2.42 สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)
- 3.2.43 หางนมผง (Skim milk)
- 3.2.44 เอทิลีนไดเอมีนเททราอะซิติกแอซิด (Ethylene diamine tetra-acetic acid: EDTA)
- 3.2.45 แอมโมเนียมซัลเฟต  $[(NH_4)_2SO_4]$
- 3.2.46 แอมโมเนียมเฟอร์ริกซิเตรท  $\{(NH_4)_5[Fe(C_6H_4O_7)_2]\}$
- 3.2.47 แอมโมเนียมเฮปตะโมลิบเดต  $[(NH_4)_6Mo_7O_{24}]$
- 3.2.48 แอล-ไทโรซีน (L-tyrosine)
- 3.2.49 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ )

### 3.3 สูตรอาหาร (ภาคผนวก ก)

- 3.3.1 สูตรอาหาร NB (Nutrient Broth)
- 3.3.2 สูตรอาหาร BMSM (Basal Medium ที่มีหางนม 1 เปอร์เซ็นต์) (สุดิธา แสงยนต์, 2548)
- 3.3.3 สูตรอาหาร BPMM (Batch Production Medium ที่มีหางนม 1 เปอร์เซ็นต์) (ขวัญฤทัย มาลัยเรือง, 2556)
- 3.3.4 สูตรอาหาร PPMM (Protease Production Medium ที่มีหางนม 1 เปอร์เซ็นต์) (ดัดแปลงจาก Tabandeh et al., 2011)

### 3.4 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณบ่อพักน้ำและบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงงานนม และผลิตภัณฑ์นม โรงฆ่าสัตว์ และโรงงานฟอกหนัง ภายในประเทศ

### 3.5 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.5.1 การเก็บตัวอย่างดินและการคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

เก็บตัวอย่างดินบริเวณผิวหน้าของดิน ระดับความลึกไม่เกิน 5 เซนติเมตร ประมาณ 50 กรัม ใส่ในภาชนะที่ปลอดเชื้อ แล้วเก็บไว้ในที่เย็นจนกว่าจะทำการวิเคราะห์ โดยสถานที่ในการเก็บตัวอย่างคือบริเวณที่คาดว่าจะพบแบคทีเรียที่มีการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส เนื่องจากมีการปนเปื้อนของโปรตีนที่เป็นสับสเตรทของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส ซึ่งได้แก่ ดินบริเวณบ่อบำบัดน้ำเสีย และบ่อพักน้ำของโรงงานอุตสาหกรรมนมและผลิตภัณฑ์นม โรงฆ่าสัตว์ และโรงงานฟอกหนัง

#### 3.5.2 การเพิ่มปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ (Enrichment) ในตัวอย่างดิน

นำตัวอย่างดินปริมาณ 0.5 กรัม มาทำการเพิ่มปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ (Enrichment) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB (ภาคผนวก ก) ที่ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 10 ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อแบบ 10-fold serial dilution ให้มีระดับความเข้มข้นระหว่าง  $10^{-1} - 10^{-9}$  เท่า แล้วดูลดตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาทำการกระจายเชื้อ (Spread plate technique) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BMSM พีเอช 10 (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่สร้างวงใส (Clear zone) รอบโคโลนีเดี่ยว ๆ แล้วทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธีขีดเชื้อบนอาหารแข็ง (Cross streak technique) เก็บเชื้อที่บริสุทธิ์ไว้ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อผิวเอียง BMSM agar slant

#### 3.5.3 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

แบ่งวิธีการในการคัดเลือกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

##### 3.5.3.1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสบนอาหารแข็ง

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BMSM พีเอช 10 ที่มีการขีดเส้นแบ่งใต้จานเพาะเชื้อออกเป็น 4 ส่วน ด้วยวิธี Point inoculation บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (CO) และวงใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนี (CZ) บันทึกผลที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบค่าผลต่างระหว่าง CZ และ CO (CZ-CO) แล้วจดกลุ่มแบคทีเรียตามความสามารถในการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส พิจารณาจากค่าผลต่าง CZ-CO เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ และไม่มีการสร้างเอนไซม์
- กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มที่มีค่า CZ-CO ที่เวลา 48 ชั่วโมง มากกว่าและเท่ากับ 1.50 ซม.
- กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มที่มีค่า CZ-CO ที่เวลา 48 ชั่วโมง อยู่ระหว่าง 1.00 – 1.49 ซม.
- กลุ่มที่ 4 คือ กลุ่มที่มีค่า CZ-CO ที่เวลา 48 ชั่วโมง น้อยกว่า 1.00 ซม.



จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ได้สูงที่สุด ไปทำการคัดเลือกต่อในขั้นตอนต่อไป

### 3.5.3.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในอาหารเหลว

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่ 2 ที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.5.3.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BSM พีเอช 10 บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกแล้วนำส่วนใสไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส (ภาคผนวก ข) แล้วเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ แล้วจึงคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสได้ดีที่สุด

### 3.5.4 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียที่ถูกเก็บรักษาในหลอดอาหารวันเอียงประมาณ 1-2 loops ลงในอาหารเหลว BSM พีเอช 10 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในบัพเฟิลพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร และผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเพาะเลี้ยงมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 2.0 แล้วจึงนำไปใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลองตามความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

### 3.5.5 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในระดับพลาสก์

#### 3.5.5.1 สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 3.5.3.2 ในอาหารเหลว 3 ชนิด ที่แตกต่างกัน คือ อาหารเหลว BSM (Complex medium) อาหาร BPMM และอาหาร PPMM ที่เป็นอาหารชนิด Semi-defined medium (ภาคผนวก ก) ที่มีการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 10 ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลคงเหลือ และกิจกรรมของเอนไซม์ (ภาคผนวก ข)

#### 3.5.5.2 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 3.5.3.2 ในอาหารเหลว BPMM ที่มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันได้แก่ กลูโคส สารละลายกลูโคส (Glucose hydrolysate) และสารละลายเด็กซ์ทรีน (Dextrin) ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 10 ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลคงเหลือ และกิจกรรมของเอนไซม์

### 3.5.5.3 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 3.5.3.2 ในอาหารเหลว BPMM ที่มีสารละลายเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) สารสกัดจากเนื้อวัว (Beef extract) กากถั่วเหลือง (Soybean meal) โซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) และ โพแทสเซียมไนเตรท ( $\text{KNO}_3$ ) ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 10 ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลคงเหลือ และกิจกรรมของเอนไซม์

### 3.5.5.4 ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 3.5.3.2 ในอาหารเหลว BPMM ที่มีสารละลายเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และมีกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับค่าพีเอชในอาหารเริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 7, 8, 9, และ 10 ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลคงเหลือ และกิจกรรมของเอนไซม์

### 3.5.5.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 3.5.3.2 ในอาหารเหลว BPMM ที่มีสารละลายเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน มีกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับค่าพีเอชในอาหารเริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 10 ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิแตกต่างกันดังนี้ 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลคงเหลือ และกิจกรรมของเอนไซม์

### 3.5.6 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

จำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธี partial 16s rDNA sequence analysis โดยส่งวิเคราะห์ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (.วว)

### 3.5.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในถังหมัก 5 ลิตร

ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน 2 วิธี คือ เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch fermentation) และเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ (Fed-batch fermentation) โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

### 3.5.7.1 ศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ

ทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ ที่สภาวะการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3-1 โดยขั้นตอนในการทดลองมีดังนี้

1) เตรียมอาหารเพาะเลี้ยง BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนและกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ให้มีปริมาตรในการทำงานรวมทั้งหมด 3 ลิตร จากนั้นทำการปรับเทียบ (Calibration) อุปกรณ์วัดค่าพีเอช พร้อมทั้งตั้งค่าสภาวะการทำงานต่าง ๆ ของถังหมัก ตามสภาวะที่ต้องการศึกษา

2) นำถังหมักที่บรรจุอาหารเพาะเลี้ยงแล้ว ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีที่อาหารเพาะเลี้ยงที่ศึกษามีการใช้ skim milk ให้แยกนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3) ติดตั้งถังหมักบรรจุอาหารเพาะเลี้ยงปลอดเชื้อเข้ากับชุดควบคุม และปรับตั้งค่าปริมาณการเติมอากาศและความเร็วของใบพัดในการกวนผสม

4) เติมสารอาหารต่าง ๆ ที่แยกนึ่งฆ่าเชื้อไว้ลงในถังหมัก เปิดใบกวนกวนผสมสารอาหารในถังหมัก เป็นเวลาประมาณ 5 นาที เพื่อให้สารอาหารต่าง ๆ ผสมเข้ากันดี

5) เติมหัวเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมไว้ตามวิธีการในข้อ 4) ลงในถังหมัก โดยใช้ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (คิดเป็นปริมาตร 150 มิลลิลิตร เมื่อเทียบกับปริมาตรการทำงานในถังหมักทั้งหมด 3 ลิตร)

6) เพาะเลี้ยงแบคทีเรียตามสภาวะที่กำหนด และทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ใส่ลงในขวดฝาเกลียว เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ได้แก่ การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี Total viable count ปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร และกิจกรรมของเอนไซม์ พร้อมทั้งบันทึกผลการทดลอง

ตารางที่ 3 สภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ

Batch NO.	อาหารเพาะเลี้ยง	สับสเตรท	พีเอช	อุณหภูมิ (°C)	อัตราการให้อากาศ (vvm)	ความเร็วใบกวน (rpm)
1	อาหารในข้อ 1) ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 2 เท่า	หางนมผงเข้มข้น 1% (w/v)	ควบคุมค่า pH = 10 ด้วย 20% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ตลอดการเพาะเลี้ยง	37	1	500
2	อาหารในข้อ 1) ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 2 เท่า	-	ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช	37	1	500
3	อาหารในข้อ 1) ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 4 เท่า	-	ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช	37	1	500

หมายเหตุ vvm = หน่วย ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที  
rpm = หน่วย รอบต่อนาที (revolutions per min)

### 3.5.7.2 ศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ

ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบ constantly fed-batch fermentation โดยจะทำการเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch culture) ในระยะแรกก่อน จากนั้นจึงทำการเติมอาหารลงในถังหมักด้วยอัตราเร็วคงที่ โดยคำนวณอัตราการเติมอาหารจากสูตรอัตราการเจือจางที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงแบบ continuous culture ดังนี้

$$D = F/V \quad \text{เมื่อ}$$

D คือ อัตราการเจือจาง (ต่อชั่วโมง)

F คือ อัตราการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ (ลิตรต่อชั่วโมง)

V คือ ปริมาตรของเหลวในถังหมักก่อนเติมอาหาร (ลิตร)

วิธีการทดลองศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย เพื่อผลิตเอนไซม์ อัลคาไลน์โปรตีเอสแบบ constantly fed-batch fermentation ในถังหมักขนาด 5 ลิตร มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1) ขั้นแรก จะทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยปริมาตรในการทำงาน 1.5 ลิตร โดยใช้อาหารสูตร BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้น 2 เท่า หัวเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีการเติมสับสเตรทและไม่มีการควบคุมค่าพีเอชตลอดทั้งกระบวนการ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อหน้าที่ ความเร็วใบกวน 500 รอบต่อหน้าที่ เป็นเวลา 9 ชั่วโมง

2 เมื่อครบเวลา 9 ชั่วโมง ทำการเติมอาหารที่มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบบกะ ด้วยอัตราการเติมอาหาร 0.90 ลิตรต่อชั่วโมง และกำหนดให้เวลานี้เท่ากับเวลาเริ่มต้นใหม่ 0 ชั่วโมง ซึ่งการเติมอาหารจะดำเนินไปด้วยอัตราคงที่ เป็นระยะเวลา 29 ชั่วโมง

3 เก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ เพื่อนำไปตรวจนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี Total viable count ปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร และกิจกรรมของเอนไซม์ พร้อมทั้งบันทึกผลการทดลอง

### 3.5.8 การศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลโนโปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ในถังหมักขนาด 50 ลิตร

ศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลโนโปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เมื่อใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบ constantly fed-batch fermentation ในถังหมักขนาด 50 ลิตร โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากการเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคเดียวกันในถังหมักขนาด 5 ลิตร มีรายละเอียดดังนี้

3.5.8.1 ขั้นแรก ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) ในถังหมักขนาด 50 ลิตร ด้วยปริมาตรในการทำงาน 18 ลิตร โดยใช้อาหารสูตร BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้น 2 เท่า หัวเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีการเติมสับสเตรทและไม่มีการควบคุมค่าพีเอชตลอดทั้งกระบวนการ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อหน้าที่ ความเร็วใบกวน 320 รอบต่อหน้าที่ เป็นเวลา 9 ชั่วโมง

3.5.8.2 เมื่อครบเวลา 9 ชั่วโมง ทำการเติมอาหารที่มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบบกะ ด้วยอัตราการเติมอาหาร 1.20 ลิตรต่อชั่วโมง และกำหนดให้เวลานี้เท่ากับเวลาเริ่มต้นใหม่ 0 ชั่วโมง ซึ่งการเติมอาหารจะดำเนินไปด้วยอัตราคงที่ เป็นระยะเวลา 29 ชั่วโมง

3.5.8.3 เก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ เพื่อนำไปตรวจนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี Total viable count ปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร และกิจกรรมของเอนไซม์ พร้อมทั้งบันทึกผลการทดลอง

### 3.5.9 การทำให้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอน

3.5.9.1 นำอาหารเหลวที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเอาเซลล์ออก จากนั้นเก็บเอาเฉพาะส่วนใสมาตกตะกอนเอนไซม์ โดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟต  $(\text{NH}_4\text{SO}_4)$  ที่บดละเอียดแล้วลงในสารละลายตัวอย่าง จนกระทั่งมีความเข้มข้นอิ่มตัวเริ่มต้นร้อยละ 20 กวนเบา ๆ ตลอดเวลา นาน 10 นาที แล้วทิ้งให้ตกตะกอนสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แยกส่วนใสและตะกอนออกจากกัน ส่วนตะกอนนำไปละลายด้วยบัฟเฟอร์ Tris – HCl ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 8.0 และบรรจุลงในถุงไดอะไลซิส นำไปไดอะไลซิสในบัฟเฟอร์ชนิดเดียวกัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ไปวัดปริมาตร ปริมาณโปรตีน และกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรตีเอส

3.5.9.2 นำสารละลายส่วนใสจากข้อ 3.5.9.1 มาเติมแอมโมเนียมซัลเฟตบดละเอียด ให้มีความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 40 แล้วทำการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.5.9.1

3.5.9.3 นำสารละลายส่วนใสจากข้อ 3.5.9.2 มาเติมแอมโมเนียมซัลเฟตบดละเอียด ให้มีความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 60 แล้วทำการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.5.9.1

3.5.9.4 นำสารละลายส่วนใสจากข้อ 3.5.9.3 มาเติมแอมโมเนียมซัลเฟตบดละเอียด ให้มีความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 80 แล้วทำการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.5.9.1

### 3.5.10 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

#### 3.5.10.1 สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

##### 1) พีเอช

เจือจางตัวอย่างเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส โดยใช้เคซินที่ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ความเข้มข้น ร้อยละ 0.5 เป็นสับสเตรท ได้แก่ Sodium phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0.05 โมลาร์ ที่พีเอช 6.0-7.0, Tris-HCl 0.05 โมลาร์ ที่พีเอช 8.0-9.0 Sodium carbonate-bicarbonate 0.05 โมลาร์ ที่พีเอช 10.0, Phosphate buffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$ ) 0.05 โมลาร์ ที่พีเอช 11.0, Hydroxide-chloride 0.05 โมลาร์ ที่พีเอช 12.0

##### 2) อุณหภูมิ

เจือจางตัวอย่างเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Sodium carbonate-bicarbonate 0.05 โมลาร์ พีเอช 10.0 แล้วนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

### 3.5.10.2 เสถียรภาพของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่สภาวะต่าง ๆ

#### 1) พีเอช

เจือจางตัวอย่างเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลาย

บัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Sodium phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ ) 0.05 โมลาร์ ที่พีเอช 6.0-7.0, Tris-HCl 0.05 โมลาร์ ที่พีเอช 8.0-9.0 Sodium carbonate-bicarbonate 0.05 โมลาร์ ที่พีเอช 10.0, Phosphate buffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaOH}$ ) 0.05 โมลาร์ ที่พีเอช 11.0, Hydroxide-chloride 0.05 โมลาร์ ที่พีเอช 12.0

นำไปบ่มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

#### 2) อุณหภูมิ

เจือจางตัวอย่างเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลาย

บัฟเฟอร์ Sodium carbonate-bicarbonate ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 10.0 บ่มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาทำให้ตัวอย่างเอนไซม์เย็นลงทันที โดยการนำไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

### 3.5.10.3 ผลของสารยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

แช่ตัวอย่างเอนไซม์ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลายบัฟเฟอร์ Sodium carbonate-bicarbonate ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 10.0 ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ที่มีสารยับยั้งชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) และ 1,10-Phenanthroline ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสคงเหลือ

### 3.5.10.4 ผลของสารลดแรงตึงผิวและสารออกซิไดซ์ ต่อเสถียรภาพของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

แช่ตัวอย่างเอนไซม์ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลายบัฟเฟอร์ Sodium carbonate-bicarbonate ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 10.0 ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ที่มีสารลดแรงตึงผิว และสารออกซิไดซ์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Sodium dodecyl sulfate (SDS), triton X-100, tween 80 และ Hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 0.5 และ 1.0 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสคงเหลือ

### 3.5.10.5 ผลของไอออนของโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

แช่ตัวอย่างเอนไซม์ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร กับสารละลายบัฟเฟอร์ Sodium carbonate-bicarbonate ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 10.0 ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ที่มีไอออนของโลหะชนิดต่างๆ ได้แก่  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$  และ  $\text{MnSO}_4$  โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสคงเหลือ

### 3.5.11 การคำนวณค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์

#### 3.5.11.1 อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, $\mu$ )

การเจริญในระยะทวีคูณ (log phase หรือ Exponential phase) เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบกะ จะเป็นระยะที่จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญสูงสุดและคงที่ และมีบทบาทต่อการเจริญมากที่สุด เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ( $dx$ ) ในระยะเวลาที่จำกัด ( $dt$ ) จึงสามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$\begin{aligned} dx/dt &= \mu x & \text{หรือ} \\ dN/dt &= \mu N \end{aligned} \quad (1)$$

เมื่อ  $x$  = ความเข้มข้นของมวลเซลล์ (กรัมเซลล์ต่อลิตร)  
 $N$  = จำนวนเซลล์ (จำนวนเซลล์ต่อลิตร)  
 $t$  = เวลา (ชั่วโมง)  
 $\mu$  = อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate) มีหน่วยเป็น ชั่วโมง<sup>-1</sup>

$$\text{หรือจัดรูปใหม่ } \mu = 1/x(dx/dt) \quad (2)$$

ในระยะเวลาการเจริญแบบทวีคูณ อัตราการเจริญจำเพาะหรือ  $\mu$  มีค่าคงที่ สามารถอินทิเกรตโดยตรงต่อสภาวะเริ่มต้นโดย  $x = x_0$  ที่  $t = 0$  จากสมการ (1) จะได้

$$x = x_0 e^{\mu t} \quad (3)$$

เมื่อ  $x_0$  = ความเข้มข้นของมวลเซลล์เริ่มต้น  
 $x$  = ความเข้มข้นของมวลเซลล์หลักจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา  $t$  ชั่วโมง  
 $e$  = ฐานของ natural logarithm

เมื่อใส่ natural logarithm ในสมการ (3) จะได้

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad (4)$$



### 3.5.11.2 ผลได้ของมวลเซลล์จุลินทรีย์จากมวลสับสเตรท

$$Y_{x/s} = \Delta X / \Delta S \quad (5)$$

เมื่อ	$Y_{x/s}$	=	ผลได้ของมวลเซลล์จากมวลสับสเตรท (กรัมต่อกรัม)
	$\Delta X$	=	อัตราการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้น (กรัมต่อลิตร)
	$\Delta S$	=	อัตราการใช้สับสเตรท (กรัมต่อลิตร)

### 3.5.11.3 ผลได้ของผลผลิตต่อมวลสับสเตรท

$$Y_{p/s} = \Delta P / \Delta S \quad (6)$$

เมื่อ	$Y_{p/s}$	=	ผลได้ของผลผลิตจากมวลสับสเตรท (กรัมต่อกรัม)
	$\Delta P$	=	อัตราการสร้างผลผลิตที่เกิดขึ้น (กรัมต่อลิตร)
	$\Delta S$	=	อัตราการใช้สับสเตรท (กรัมต่อลิตร)

### 3.5.11.4 ผลได้ผลิตภัณฑ์จำเพาะ

$$Y_{p/x} = \Delta P / \Delta X \quad (7)$$

เมื่อ	$Y_{p/x}$	=	ผลได้ของผลิตภัณฑ์จำเพาะ (กรัมต่อกรัม)
	$\Delta P$	=	อัตราการสร้างผลผลิตที่เกิดขึ้น (กรัมต่อลิตร)
	$\Delta x$	=	อัตราการสร้างมวลเซลล์จุลินทรีย์ (กรัมต่อลิตร)

### 3.5.11.5 อัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์

$$q_p = Y_{p/x} \mu \quad (8)$$

ค่า  $q_p$  เป็นค่าทางจลนพลศาสตร์ที่สำคัญ ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์กับมวลเซลล์และเวลา เมื่อผลผลิตที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สัมพันธ์กับการเจริญ (Growth associated product)

### 3.5.12 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของปัจจัยที่ศึกษา ด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (One-Way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละการทดลองด้วยวิธี Tukey's HSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p$ -value = 0.05) โดยวิเคราะห์จากโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ Minitab

## บทที่ 4 ผลการวิจัย

### 4.1. ผลการเก็บตัวอย่างดินและการคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์

จากการคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในตัวอย่างดิน จำนวนทั้งหมด 28 ตัวอย่าง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BSMM พีเอช 10 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยโปรตีนในอาหารเพาะเลี้ยงและสร้างวงใสรอบโคโลนี (Clear zone) ทั้งหมด 157 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แหล่งที่มาของตัวอย่างดินและจำนวนโคโลนีที่สร้างวงใสบนอาหาร BSMM พีเอช 10

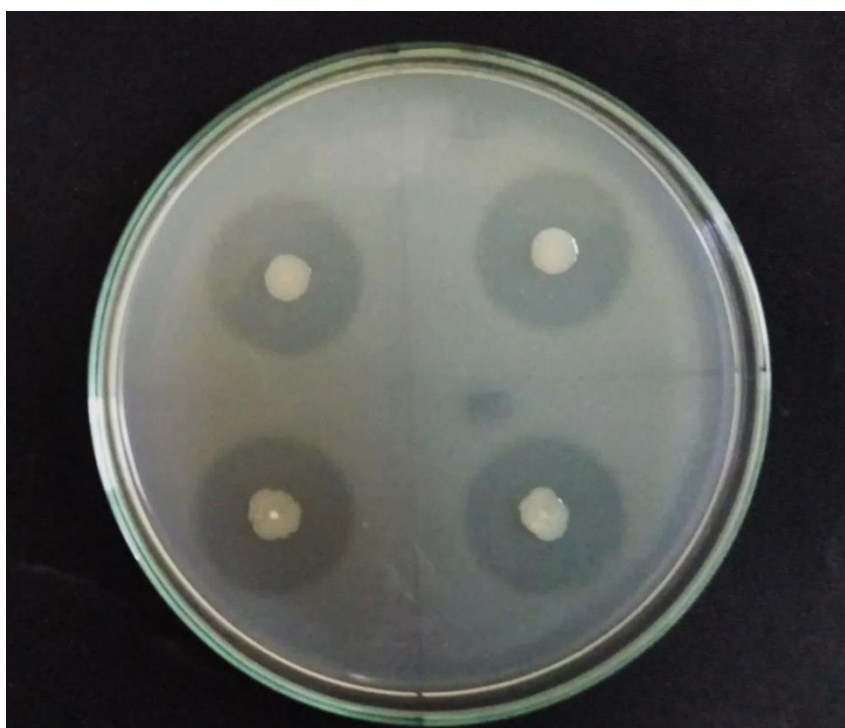
แหล่งตัวอย่าง	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรีย ที่สร้างวงใส	รหัสชื่อ แบคทีเรีย
โรงงานนมและผลิตภัณฑ์นม	16	97	001 – 081 121 – 136
โรงฆ่าสัตว์	4	33	082 – 114
โรงงานฟอกหนัง	8	27	115 – 120 137 - 157
รวม	28	157	

เชื้อแบคทีเรียทั้ง 157 ไอโซเลท เป็นเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่คาดว่าจะพบกลุ่มของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส ซึ่งเมื่อนำตัวอย่างดินจากสถานที่ดังกล่าวมาเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (Enrichment) และคัดแยกเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Spread plate technique บนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแข็ง Basal medium agar ที่มีหางนม ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (BSMM) พีเอช 10 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว มีการสร้างวงใสรอบโคโลนีที่อยู่บนผิวหน้าของอาหาร เป็นผลมาจากการที่แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยเคซีนที่เป็นสับสเตรทในอาหารภายใต้สภาวะที่เป็นต่างได้ จึงมีความเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียทั้ง 157 ไอโซเลทนี้ สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องนำแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวไปทำการคัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์สูงในขั้นตอนต่อไป

## 4.2. ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

### 4.2.1 ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสบนอาหารแข็ง

จากการนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินจำนวน 157 ไอโซเลท มาทำการศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ด้วยวิธี Point inoculation บนอาหารแข็ง BMSM พีเอช 10 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (CO) ที่เจริญบนผิวหน้าของอาหาร เทียบกับขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี (CZ) ของเชื้อแบคทีเรีย ได้ผลดังภาพที่ 1 และ ตารางภาคผนวกที่ ง-1



ภาพที่ 1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสบนอาหารแข็ง

จากผลการศึกษาดังแสดงในตารางภาคผนวกที่ ง-1 เห็นได้ว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินส่วนใหญ่ สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนภายใต้สภาวะที่เป็นต่างได้ เมื่อทำการตรวจวัดประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท โดยการเปรียบเทียบขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (CO) กับขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี (CZ) แล้วจัดกลุ่มของแบคทีเรียตามระดับความสามารถในการสร้างเอนไซม์โดยพิจารณาจากค่า CZ-CO ออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่

- กลุ่มที่ 1 คือ กลุ่มที่ไม่มีการเจริญของเชื้อ และไม่มีการสร้างเอนไซม์
- กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มที่มีค่า CZ-CO ที่เวลา 48 ชั่วโมง มากกว่าและเท่ากับ 1.50 ซม.
- กลุ่มที่ 3 คือ กลุ่มที่มีค่า CZ-CO ที่เวลา 48 ชั่วโมง อยู่ระหว่าง 1.00 – 1.49 ซม.
- กลุ่มที่ 4 คือ กลุ่มที่มีค่า CZ-CO ที่เวลา 48 ชั่วโมง น้อยกว่า 1.00 ซม.

ผลการจัดกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียที่เรียงตามความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 กลุ่มของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ตามความสามารถในการสร้างเอนไซม์

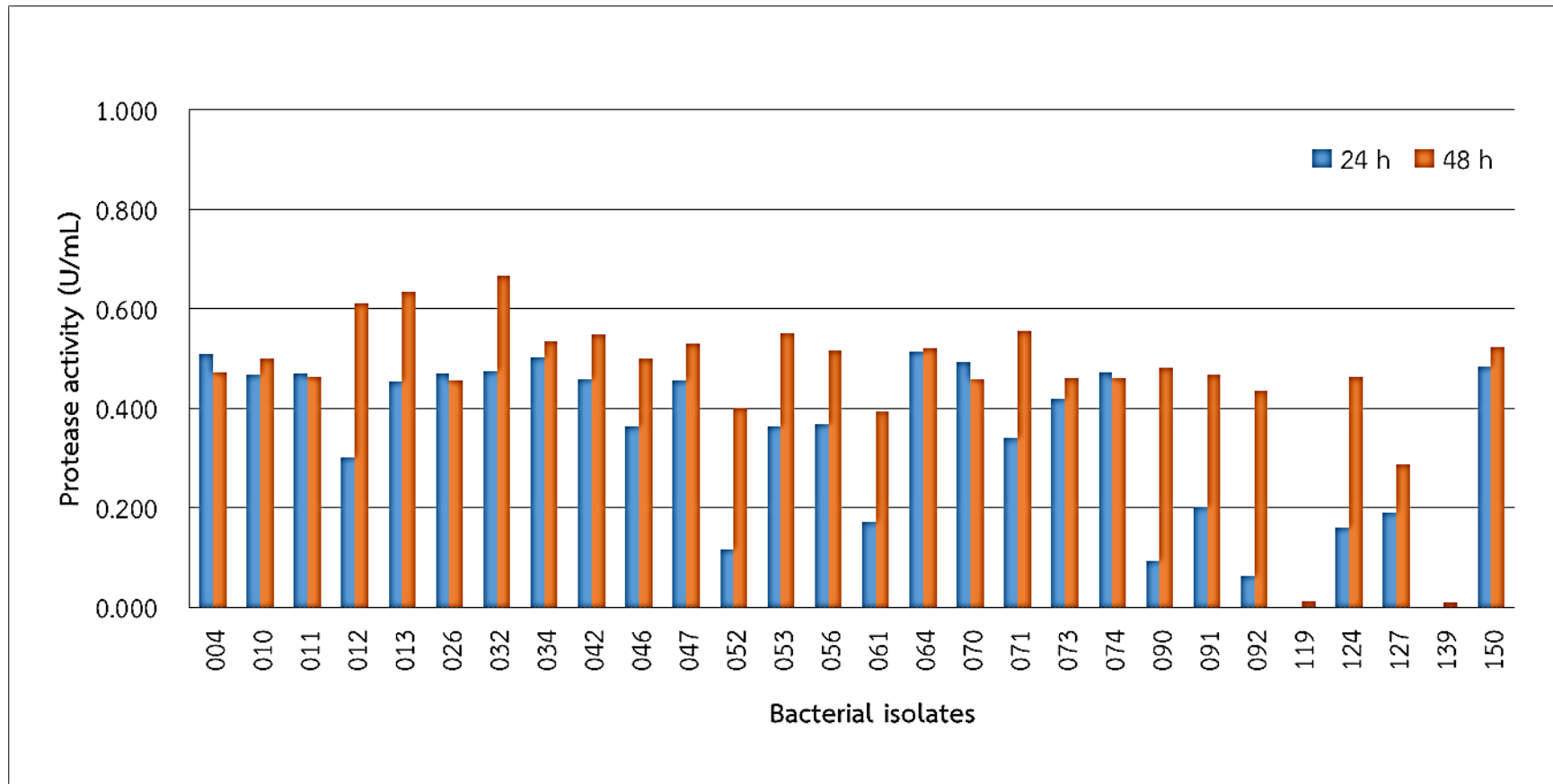
กลุ่มของแบคทีเรีย	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 4
ค่า CZ-CO (cm)	ไม่มีการสร้างเอนไซม์	$\geq 1.50$	อยู่ระหว่าง 1.00 – 1.49	$< 1.00$
รหัสเชื้อ	025, 028, 029, 031, 030, 033, 043, 055, 067, 084, 086, 096, 116, 120, 128, 151	004, 010, 011, 012, 013, 026, 032, 034, 042, 046, 047, 052, 053, 056, 061, 064, 070, 071, 073, 074, 090, 091, 092, 119, 124, 127, 139, 150	001, 002, 003, 005, 008, 009, 014, 015, 016, 017, 018, 019, 020, 022, 027, 040, 041, 045, 048, 049, 051, 057, 058, 059, 060, 062, 063, 065, 066, 068, 069, 072, 075, 076, 078, 079, 080, 081, 082, 083, 087, 088, 089, 093, 094, 095, 097, 098, 101, 104, 105, 106, 108, 109, 110, 115, 121, 123, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 138, 142, 144, 145, 147	006, 007, 021, 023, 024, 035, 036, 037, 038, 039, 044, 050, 054, 077, 085, 099, 100, 102, 103, 107, 111, 112, 113, 114, 117, 118, 122, 125, 126, 129, 137, 140, 141, 143, 146, 148, 149, 152, 153, 154, 155, 156, 157
รวม	16	28	70	43

จากตารางที่ 5 เมื่อจัดแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียตามความสามารถในการสร้างเอนไซม์ พบว่ามีจำนวนของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์สูงที่สุดจากทั้ง 4 กลุ่ม จำนวนทั้งสิ้น 28 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 17.8 ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินทั้งหมด และแบคทีเรียในกลุ่มนี้โดยส่วนใหญ่เป็นเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่เก็บจากโรงงานนม และผลิตภัณฑ์นม คิดเป็นจำนวนทั้งสิ้น 22 ไอโซเลท รองลงมา คือ ตัวอย่างดินจากโรงงานฟอกหนัง จำนวน 3 ไอโซเลท และตัวอย่างดินจากโรงฆ่าสัตว์ จำนวน 3 ไอโซเลท ตามลำดับ เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่มีแนวโน้มในการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง จึงจะนำแบคทีเรียในกลุ่มนี้ไปตรวจสอบประสิทธิภาพของเชื้อในการสร้างเอนไซม์ในอาหารเหลือต่อไป

#### 4.2.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในอาหารเหลือ

เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.2.1 จำนวน 28 ไอโซเลท มาศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในอาหารเหลือ BMSM พีเอช 10 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วตรวจวัดความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 2

จากภาพที่ 2 เมื่อพิจารณาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ในอาหารเหลือ BMSM พีเอช 10 ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ ที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรีย 032, 013, 012, 071, 053 และ 042 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์สูงกว่าแบคทีเรียไอโซเลทอื่น โดยสามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์ได้เท่ากับ 0.667, 0.635, 0.611, 0.555, 0.551 และ 0.549 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ ง-2) และเนื่องจากแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทนี้สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสได้อย่างใกล้เคียงกัน ดังนั้น ผู้วิจัยจึงนำแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทไปทำการเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ แล้วเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างเอนไซม์อีกครั้ง ก่อนที่จะคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดสำหรับการทดสอบผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 2 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก ในอาหารเหลว BMSM พีเอช 10

### 4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในระดับฟลasks

#### 4.3.1 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในข้อ 4.2.2 โดยใช้สูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน 3 สูตร คือ BPMM, BMSM และ PPMM ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 10 ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ความเข้มข้นร้อยละ 20 แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 6 และภาพที่ 3 – 6

เมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท ในอาหารเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันทั้ง 3 สูตร ดังแสดงในภาพที่ 3 พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ส่วนมากมีการเจริญในอาหารทั้งสามสูตรอย่างใกล้เคียงกัน โดยเชื้อจะเจริญเข้าสู่ระยะ log phase ในช่วง 0 ถึง 6 ชั่วโมงแรก จากนั้นการเจริญจะลดลงเข้าสู่ระยะ stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป สามารถวัดค่าความขุ่นสูงสุดของอาหารที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้ค่าประมาณ 4 ในสูตรอาหารทั้ง 3 สูตร

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 3 สูตร ดังแสดงในภาพที่ 4 พบว่าค่าพีเอชของอาหารจะลดลงในช่วง 6 ชั่วโมงแรก ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทมีการเจริญในช่วง log phase จากนั้นค่าพีเอชจะคงที่อยู่ที่ประมาณ 8 ไปจนกระทั่งเสร็จสิ้นกระบวนการเพาะเลี้ยง

เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร (ภาพที่ 5) พบว่า ปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหารเพาะเลี้ยงทั้งสามสูตรลดลงอย่างต่อเนื่องไปจนสิ้นสุดกระบวนการเพาะเลี้ยง แต่เชื้อแบคทีเรียทุกชนิดไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสที่เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารได้หมด โดยจะมีน้ำตาลคงเหลือในอาหารเพาะเลี้ยงทุกชนิดอยู่ประมาณ 5-10 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่า แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ส่วนมากสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ดีกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BMSM และ BPMM เห็นได้จากปริมาณน้ำตาลที่คงเหลือเมื่อสิ้นสุดกระบวนการเพาะเลี้ยงที่เวลา 48 ชั่วโมง มีปริมาณน้อยกว่าเมื่อเทียบกับสูตรอาหาร PPMM

เมื่อพิจารณาการสร้างอัลคาไลน์โปรตีเอสของแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในอาหารทั้ง 3 สูตร ดังแสดงในตารางที่ 6 และภาพที่ 6 พบว่า เชื้อแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 012, 013, 032, 042 และ 071 มีกิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงที่สุดเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BPMM ซึ่งสามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์ได้ 0.59, 0.38, 0.63, 0.61 และ 0.60 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีอัตราการสร้างเอนไซม์เท่ากับ 0.023, 0.016, 0.024, 0.013 และ 0.024 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 053 นั้น พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร PPMM โดยวัดกิจกรรมได้ 0.50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และมีอัตราการสร้างเอนไซม์เท่ากับ 0.014 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง จากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ BPMM มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าสูตรอาหาร BMSM และ PPMM ในการนำไปใช้เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์ โปรตีเอส เห็นได้จากกิจกรรมของเอนไซม์ที่มีค่าสูง

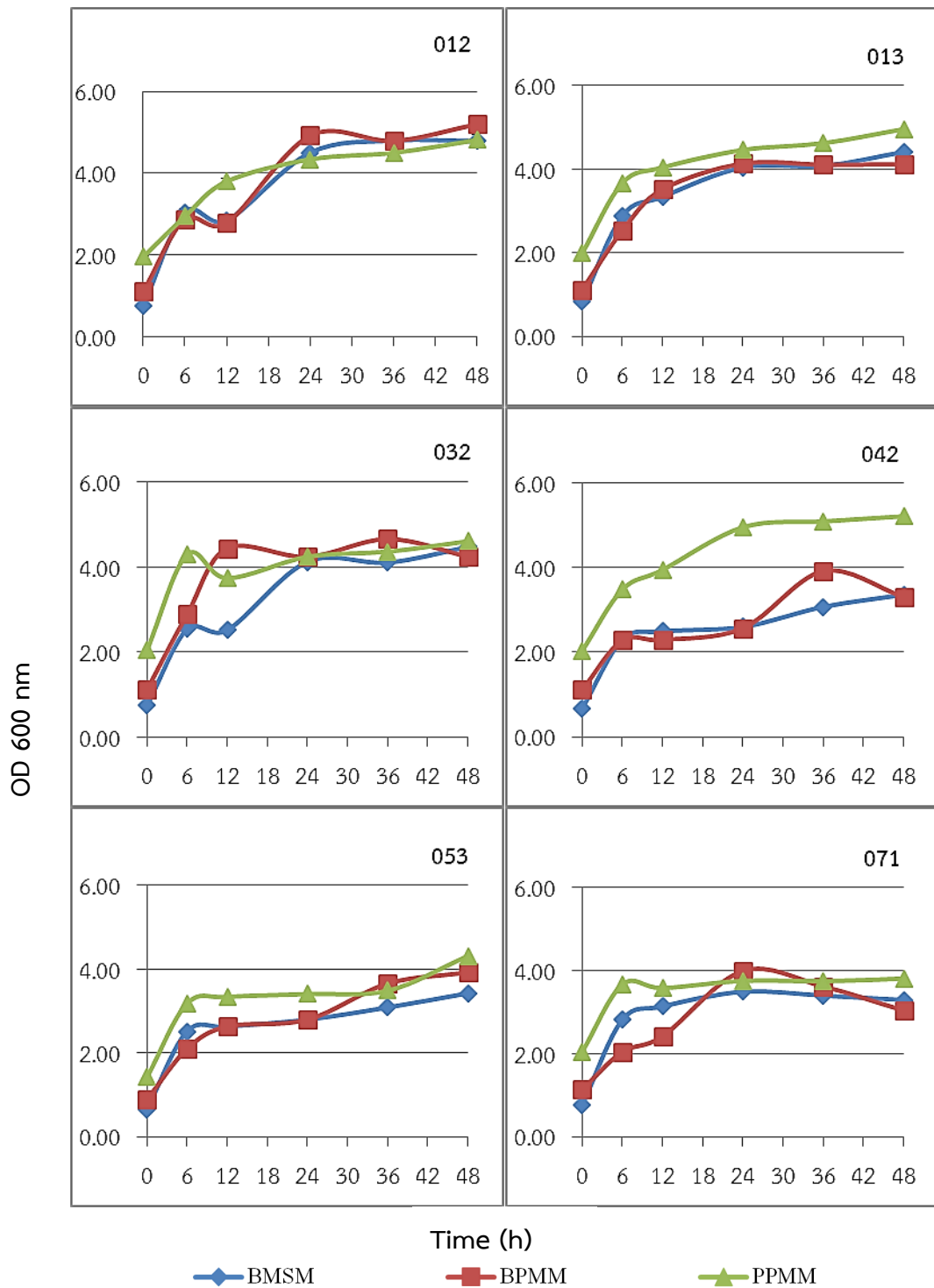


ดังนั้นในการทดลองต่อจากนี้จะใช้สูตรอาหาร BPMM เป็นอาหารในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดไอโซเลท

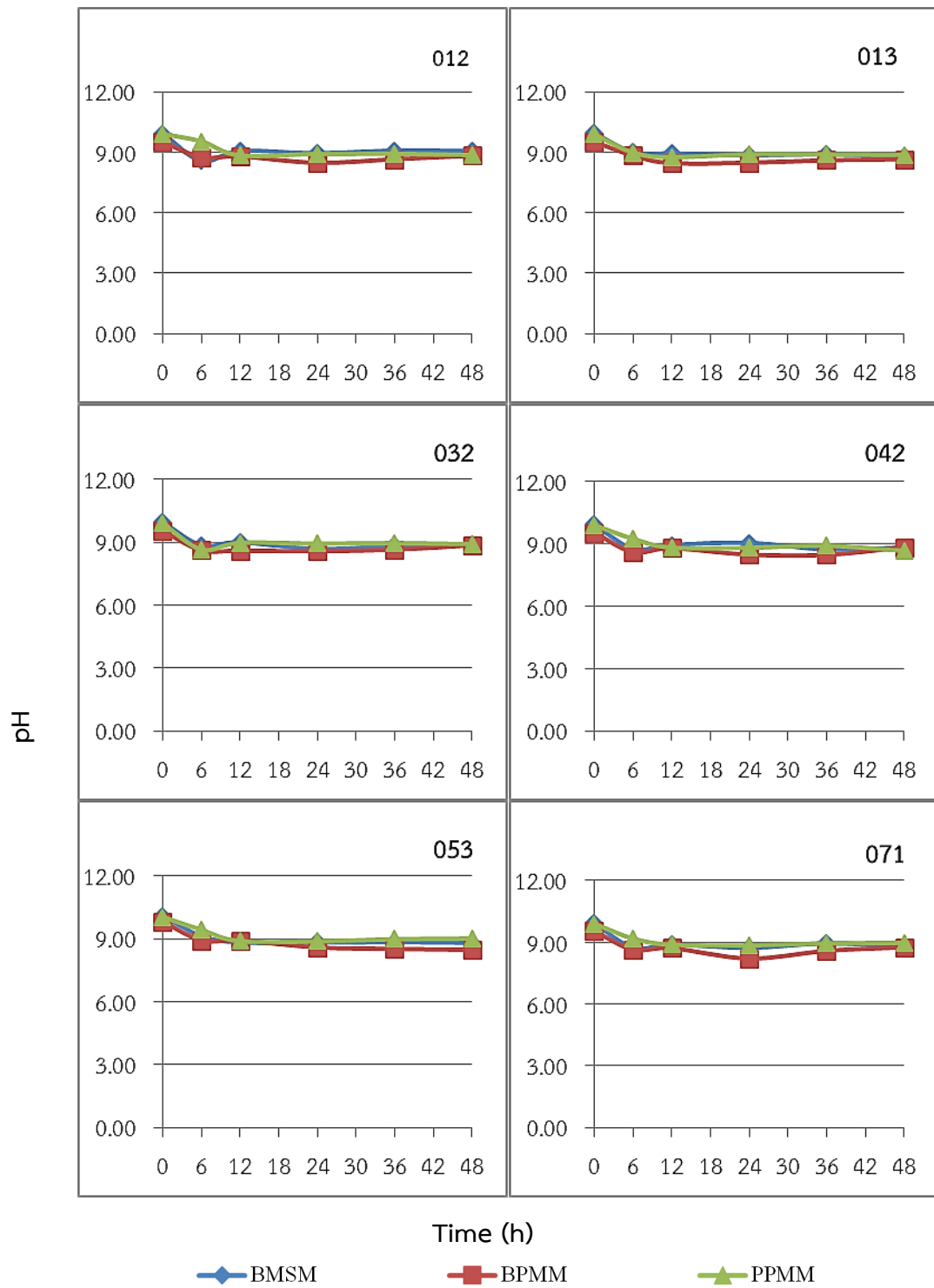
ตารางที่ 6 กิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกันทั้ง 3 สูตร

สายพันธุ์	เวลา (ชั่วโมง)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/mL)			อัตราการสร้างเอนไซม์ (U/mL/h)		
		BMSM	BPMM	PPMM	BMSM	BPMM	PPMM
012	24	0.08±0.00 <sup>b</sup>	0.55±0.01 <sup>a</sup>	0.08±0.02 <sup>b</sup>	0.003±0.000 <sup>b</sup>	0.023±0.000 <sup>a</sup>	0.003±0.000 <sup>b</sup>
	36	0.48±0.03 <sup>b</sup>	0.54±0.01 <sup>a</sup>	0.44±0.01 <sup>b</sup>	0.013±0.000 <sup>ab</sup>	0.015±0.000 <sup>a</sup>	0.012±0.000 <sup>b</sup>
	48	0.51±0.00 <sup>b</sup>	0.59±0.01 <sup>a</sup>	0.46±0.02 <sup>c</sup>	0.011±0.000 <sup>b</sup>	0.012±0.000 <sup>a</sup>	0.010±0.000 <sup>c</sup>
013	24	0.00±0.00 <sup>b</sup>	0.38±0.03 <sup>a</sup>	0.03±0.00 <sup>b</sup>	0.000±0.000 <sup>b</sup>	0.016±0.001 <sup>a</sup>	0.001±0.000 <sup>b</sup>
	36	0.05±0.00 <sup>b</sup>	0.11±0.01 <sup>a</sup>	0.09±0.01 <sup>a</sup>	0.001±0.000 <sup>b</sup>	0.003±0.000 <sup>a</sup>	0.002±0.000 <sup>ab</sup>
	48	0.08±0.03 <sup>b</sup>	0.38±0.03 <sup>a</sup>	0.09±0.02 <sup>b</sup>	0.002±0.001 <sup>b</sup>	0.008±0.001 <sup>a</sup>	0.002±0.000 <sup>b</sup>
032	24	0.49±0.05 <sup>b</sup>	0.58±0.02 <sup>a</sup>	0.08±0.01 <sup>c</sup>	0.020±0.002 <sup>b</sup>	0.024±0.001 <sup>a</sup>	0.003±0.001 <sup>c</sup>
	36	0.53±0.02 <sup>a</sup>	0.33±0.01 <sup>b</sup>	0.27±0.01 <sup>c</sup>	0.015±0.001 <sup>a</sup>	0.009±0.000 <sup>b</sup>	0.007±0.000 <sup>c</sup>
	48	0.52±0.01 <sup>b</sup>	0.63±0.01 <sup>a</sup>	0.35±0.01 <sup>c</sup>	0.011±0.000	0.013±0.000	0.007±0.000
042	24	0.10±0.00 <sup>b</sup>	0.14±0.05 <sup>b</sup>	0.27±0.02 <sup>a</sup>	0.004±0.000 <sup>b</sup>	0.006±0.002 <sup>b</sup>	0.011±0.001 <sup>a</sup>
	36	0.50±0.01 <sup>a</sup>	0.48±0.02 <sup>a</sup>	0.39±0.02 <sup>b</sup>	0.014±0.000 <sup>a</sup>	0.013±0.001 <sup>a</sup>	0.011±0.000 <sup>b</sup>
	48	0.52±0.02 <sup>b</sup>	0.61±0.02 <sup>a</sup>	0.46±0.01 <sup>c</sup>	0.011±0.000 <sup>b</sup>	0.013±0.000 <sup>a</sup>	0.009±0.000 <sup>b</sup>
053	24	0.16±0.02 <sup>b</sup>	0.10±0.01 <sup>c</sup>	0.26±0.01 <sup>a</sup>	0.007±0.001 <sup>b</sup>	0.004±0.000 <sup>c</sup>	0.011±0.000 <sup>a</sup>
	36	0.20±0.01 <sup>b</sup>	0.20±0.00 <sup>b</sup>	0.50±0.02 <sup>a</sup>	0.006±0.000 <sup>b</sup>	0.006±0.000 <sup>b</sup>	0.014±0.000 <sup>a</sup>
	48	0.19±0.03 <sup>b</sup>	0.23±0.01 <sup>b</sup>	0.51±0.01 <sup>a</sup>	0.004±0.001 <sup>b</sup>	0.005±0.000 <sup>b</sup>	0.011±0.000 <sup>a</sup>
071	24	0.22±0.05 <sup>b</sup>	0.57±0.02 <sup>a</sup>	0.03±0.00 <sup>c</sup>	0.009±0.002 <sup>b</sup>	0.024±0.001 <sup>a</sup>	0.001±0.000 <sup>c</sup>
	36	0.43±0.02 <sup>a</sup>	0.20±0.01 <sup>b</sup>	0.16±0.01 <sup>c</sup>	0.012±0.000 <sup>a</sup>	0.005±0.000 <sup>b</sup>	0.004±0.000 <sup>b</sup>
	48	0.44±0.02 <sup>b</sup>	0.60±0.01 <sup>a</sup>	0.01±0.01 <sup>c</sup>	0.009±0.000 <sup>b</sup>	0.013±0.000 <sup>a</sup>	0.000±0.000 <sup>c</sup>

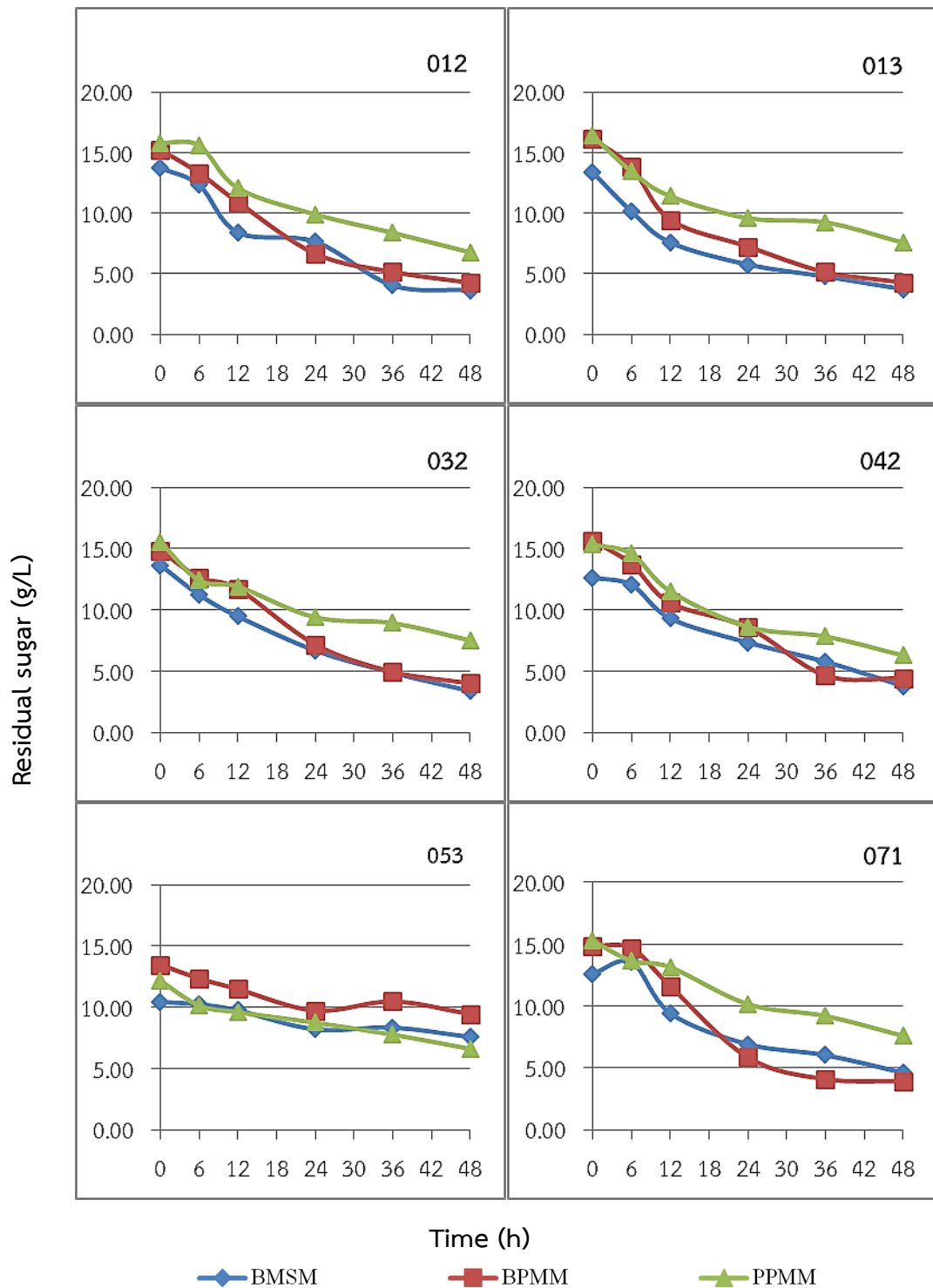
หมายเหตุ: เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ ในอาหารแต่ละสูตรที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ )



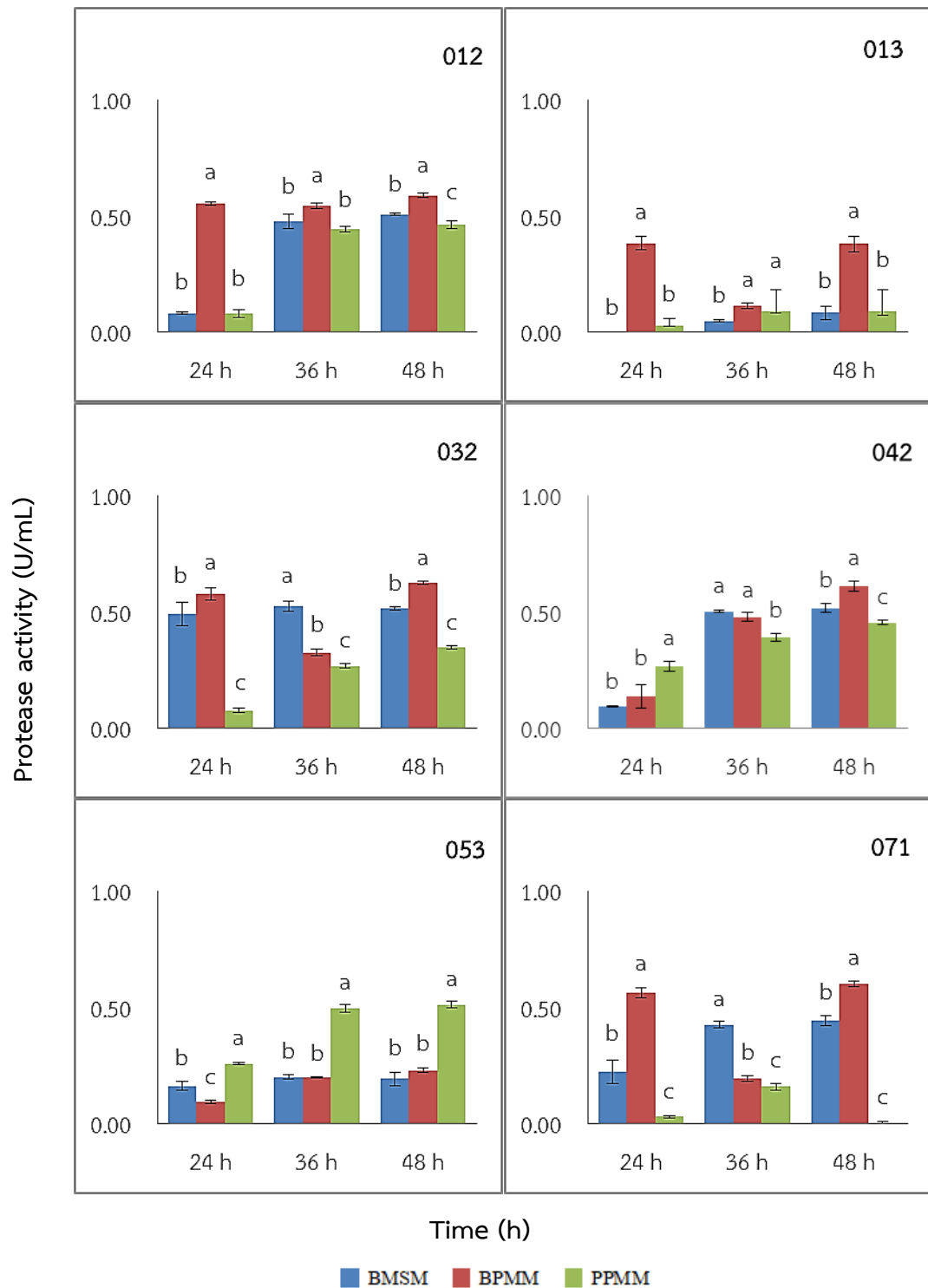
ภาพที่ 3 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน 3 สูตร (bar = SD)



ภาพที่ 4 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท ในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน 3 สูตร (bar = SD)



ภาพที่ 5 ปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท  
ในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน 3 สูตร (bar = SD)



ภาพที่ 6 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท ในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน 3 สูตร ตัวอักษรยกกำลังที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

#### 4.3.2 ผลการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในข้อ 4.2.2 โดยใช้สูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด คือ กลูโคส (Glucose) ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนทางการค้า และกลูโคสจากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (Glucose Hydrolysate) กับเด็กซ์ทริน (Dextrin) ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 7 – 10

เมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหกไอโซเลท ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด ดังแสดงในภาพที่ 7 พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 012, 032, 053, และ 071 มีการเจริญเข้าสู่ระยะ log phase ในช่วง 0 ถึง 12 ชั่วโมงแรก โดยไม่มีระยะ lag phase เหมือนกันในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิด แต่ค่าความขุ่นของอาหารที่ใช้กลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังและเด็กซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน ในระยะ late log phase (ที่เวลา 12 ชั่วโมง) มีค่าสูงกว่าอาหารที่ใช้กลูโคสทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งบ่งชี้ว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลทนั้นสามารถเจริญได้ดีกว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนทดแทน เช่นเดียวกับเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 042 ที่เจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนทดแทน เนื่องจากที่ระยะ late log phase สามารถวัดค่าความขุ่นของอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนทดแทนได้สูงกว่าอาหารที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ต่างกันที่แบคทีเรียไอโซเลท 042 นั้น จะมีการเจริญในช่วง log phase ที่ค่อนข้างยาวนานกว่า โดยจะเข้าสู่ระยะ late log phase ที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนทดแทน และที่เวลา 6 ชั่วโมง ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 013 นั้น มีการเจริญในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิด อย่างใกล้เคียงกัน โดยจะเจริญในระยะ log phase ที่เวลา 0-12 ชั่วโมง จึงเข้าสู่ระยะ stationary phase

เมื่อพิจารณาปริมาณการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้แหล่งคาร์บอนแตกต่างกันทั้ง 3 ชนิด ดังแสดงในภาพที่ 8 พบว่าค่าพีเอชในอาหารทั้ง 3 ชนิด ของแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทมีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะเดียวกันคือ ค่าพีเอชของอาหารจะลดลงจาก 10 ที่เวลา 0 ชั่วโมง จนมีค่าประมาณ 8 ที่เวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทมีการเจริญในช่วง log phase จากนั้นค่าพีเอชในอาหารจะค่อนข้างคงที่จนเสร็จสิ้นกระบวนการเพาะเลี้ยงที่เวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร (ภาพที่ 9) พบว่า การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหารที่แตกต่างกันทั้ง 3 ชนิด ของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางเดียวกันคือ ปริมาณน้ำตาลในอาหารมีการลดลงอย่างต่อเนื่องไปจนถึงสิ้นสุดกระบวนการเพาะเลี้ยง ซึ่งจะมีปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหารเพาะเลี้ยงทุกชนิดอยู่ประมาณ 4-8 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทสามารถใช้แหล่งคาร์บอนทดแทนได้อย่างมีประสิทธิภาพไม่ต่างจากแหล่งกลูโคสทางการค้า

เมื่อพิจารณาการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในอาหาร BPMM ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันทั้ง 3 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 7 และภาพที่ 10 พบว่าเชื้อ

แบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 012, 032 และ 042 มีกิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันทั้ง 3 ชนิด ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ได้สูงที่สุดในอาหารทั้ง 3 ชนิด (ตารางที่ 7) ส่วนเชื้อไอโซเลท 071 มีกิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงที่สุดในเวลา 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกัน แต่สามารถสร้างเอนไซม์ได้ดีกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้กลูโคสทางการค้าและกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียที่เหลืออีกสองไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 013 และ 053 สามารถใช้แหล่งคาร์บอนทดแทนแล้วสร้างเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกับเชื้อชนิดอื่น ต่างกันตรงที่ไอโซเลท 013 สามารถสร้างเอนไซม์ได้สูงสุด เมื่อใช้กลูโคสที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ที่เวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 053 สามารถสร้างเอนไซม์ได้มีประสิทธิภาพสูงสุด เมื่อใช้เด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน ที่เวลา 36 ชั่วโมง จากการทดลองจะเห็นว่าแหล่งคาร์บอนทดแทนทั้งสองชนิด สามารถส่งเสริมประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทไม่แตกต่างกันเท่าใดนัก แต่เนื่องจากต้นทุนที่ใช้ในการผลิตเด็กซ์ทรีนนั้นต่ำกว่ากลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมัน (มรกต กระจำจาง, 2558) จึงเลือกใช้เด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยงสำหรับการทดลองต่อไป

ตารางที่ 7 กิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้  
 ทั้งหมดไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด

สายพันธุ์	เวลา (ชั่วโมง)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/mL)			อัตราการสร้างเอนไซม์ (U/mL/h)		
		G	GH	D	G	GH	D
012	24	0.51±0.01 <sup>a</sup>	0.52±0.02 <sup>a</sup>	0.55±0.01 <sup>a</sup>	0.021±0.000 <sup>a</sup>	0.022±0.001 <sup>a</sup>	0.023±0.001 <sup>a</sup>
	36	0.51±0.01 <sup>ab</sup>	0.54±0.02 <sup>a</sup>	0.49±0.03 <sup>b</sup>	0.014±0.000 <sup>b</sup>	0.015±0.000 <sup>a</sup>	0.014±0.001 <sup>b</sup>
	48	0.50±0.05 <sup>a</sup>	0.53±0.03 <sup>a</sup>	0.54±0.03 <sup>a</sup>	0.010±0.001 <sup>a</sup>	0.011±0.001 <sup>a</sup>	0.011±0.001 <sup>a</sup>
013	24	0.46±0.04 <sup>b</sup>	0.64±0.01 <sup>a</sup>	0.40±0.03 <sup>b</sup>	0.019±0.002 <sup>b</sup>	0.027±0.000 <sup>a</sup>	0.017±0.001 <sup>b</sup>
	36	0.38±0.02 <sup>a</sup>	0.42±0.02 <sup>a</sup>	0.30±0.01 <sup>b</sup>	0.011±0.001 <sup>a</sup>	0.012±0.000 <sup>a</sup>	0.008±0.000 <sup>b</sup>
	48	0.27±0.03 <sup>a</sup>	0.31±0.01 <sup>a</sup>	0.19±0.01 <sup>b</sup>	0.006±0.001 <sup>ab</sup>	0.006±0.000 <sup>a</sup>	0.004±0.000 <sup>b</sup>
032	24	0.53±0.01 <sup>a</sup>	0.53±0.02 <sup>a</sup>	0.53±0.01 <sup>a</sup>	0.022±0.000 <sup>a</sup>	0.022±0.001 <sup>a</sup>	0.022±0.000 <sup>a</sup>
	36	0.51±0.01 <sup>a</sup>	0.51±0.02 <sup>a</sup>	0.52±0.02 <sup>a</sup>	0.014±0.000 <sup>a</sup>	0.014±0.000 <sup>a</sup>	0.015±0.001 <sup>a</sup>
	48	0.49±0.03 <sup>a</sup>	0.53±0.01 <sup>a</sup>	0.49±0.00 <sup>a</sup>	0.010±0.001 <sup>a</sup>	0.011±0.000 <sup>a</sup>	0.010±0.000 <sup>a</sup>
042	24	0.44±0.04 <sup>a</sup>	0.46±0.01 <sup>a</sup>	0.48±0.01 <sup>a</sup>	0.018±0.002 <sup>a</sup>	0.019±0.000 <sup>a</sup>	0.020±0.000 <sup>a</sup>
	36	0.42±0.02 <sup>b</sup>	0.52±0.02 <sup>a</sup>	0.54±0.00 <sup>a</sup>	0.012±0.001 <sup>b</sup>	0.014±0.001 <sup>a</sup>	0.015±0.000 <sup>a</sup>
	48	0.48±0.03 <sup>a</sup>	0.46±0.08 <sup>a</sup>	0.46±0.01 <sup>a</sup>	0.010±0.001 <sup>a</sup>	0.010±0.002 <sup>a</sup>	0.009±0.000 <sup>a</sup>
053	24	0.08±0.02 <sup>b</sup>	0.41±0.01 <sup>a</sup>	0.16±0.04 <sup>b</sup>	0.003±0.001 <sup>b</sup>	0.017±0.000 <sup>a</sup>	0.007±0.002 <sup>b</sup>
	36	0.34±0.01 <sup>b</sup>	0.37±0.02 <sup>b</sup>	0.49±0.02 <sup>a</sup>	0.010±0.000 <sup>b</sup>	0.010±0.001 <sup>b</sup>	0.014±0.001 <sup>a</sup>
	48	0.37±0.04 <sup>c</sup>	0.78±0.05 <sup>b</sup>	1.05±0.05 <sup>a</sup>	0.008±0.001 <sup>c</sup>	0.016±0.001 <sup>b</sup>	0.022±0.001 <sup>a</sup>
071	24	0.52±0.01 <sup>a</sup>	0.51±0.01 <sup>a</sup>	0.48±0.01 <sup>b</sup>	0.022±0.000 <sup>a</sup>	0.021±0.000 <sup>a</sup>	0.020±0.000 <sup>b</sup>
	36	0.49±0.02 <sup>a</sup>	0.53±0.02 <sup>a</sup>	0.49±0.02 <sup>a</sup>	0.014±0.001 <sup>a</sup>	0.015±0.000 <sup>a</sup>	0.014±0.000 <sup>a</sup>
	48	0.50±0.01 <sup>ab</sup>	0.53±0.01 <sup>a</sup>	0.48±0.02 <sup>b</sup>	0.010±0.000 <sup>ab</sup>	0.011±0.000 <sup>a</sup>	0.010±0.001 <sup>b</sup>

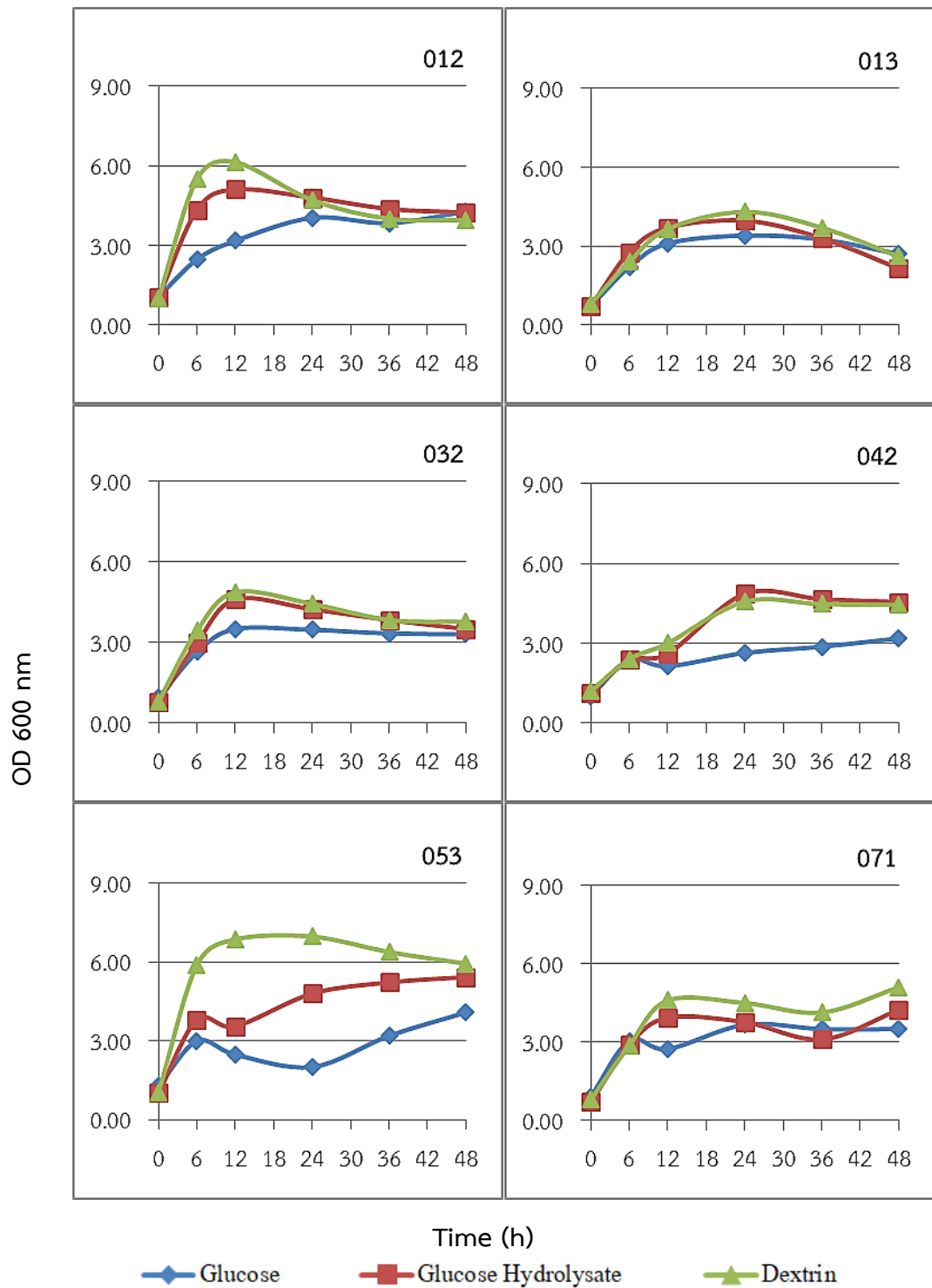
หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ ในแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิด ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ )

G คือ กลูโคสทางการค้า

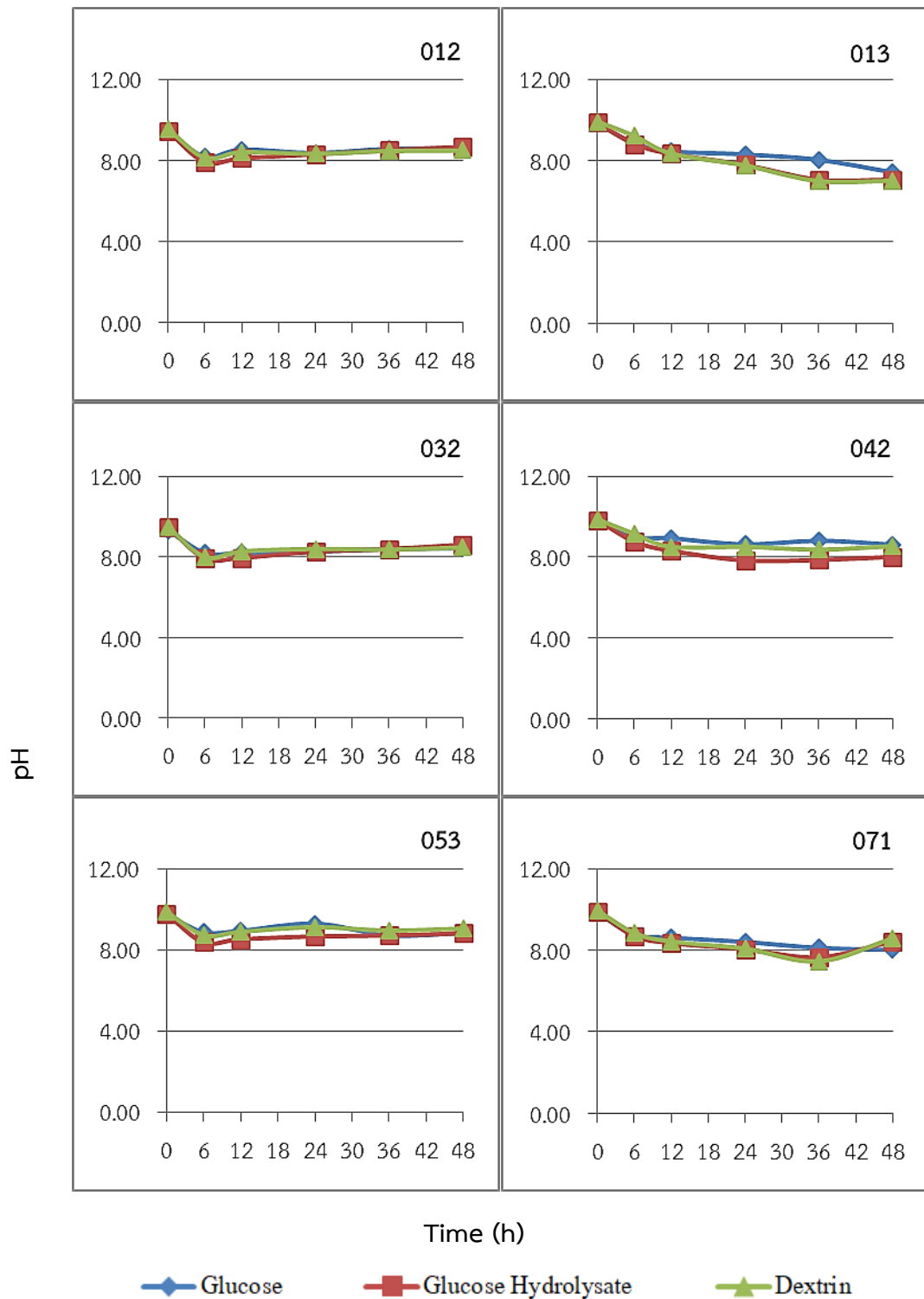
GH คือ กลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

D คือ เด็กซ์ทรีน

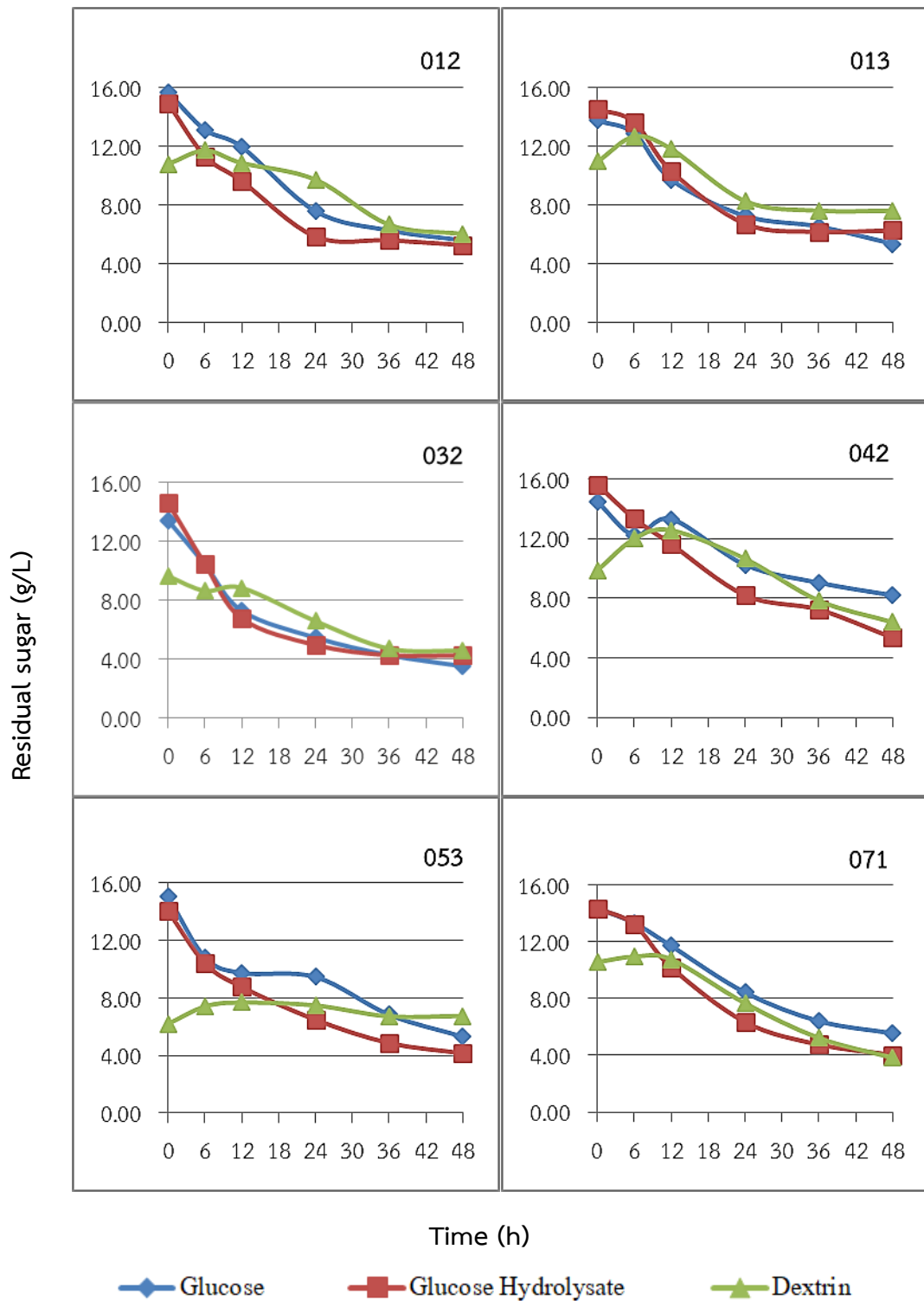




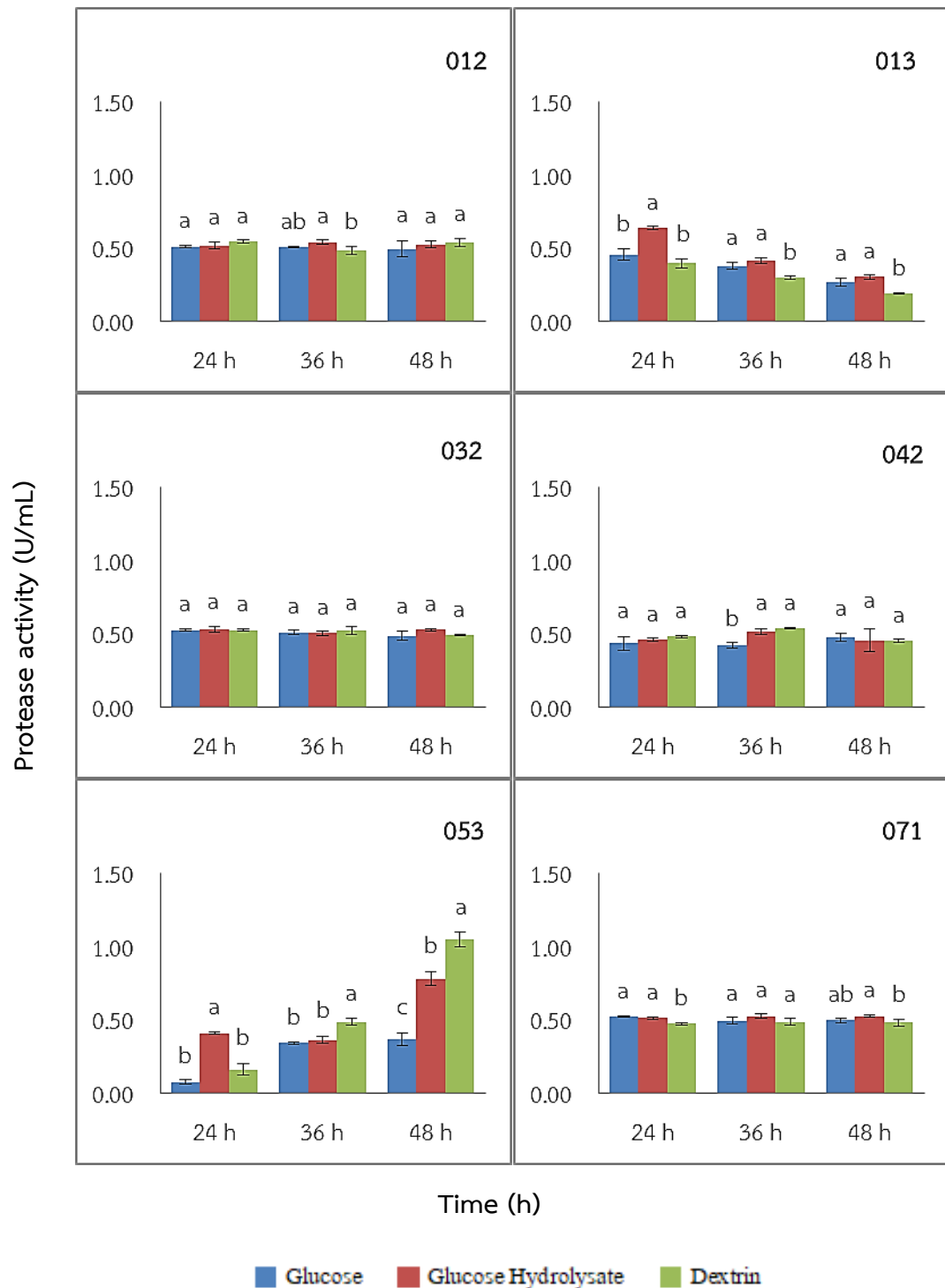
ภาพที่ 7 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด (bar = SD)



ภาพที่ 8 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท ในสูตร อาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด (bar = SD)



ภาพที่ 9 ปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท  
 ในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด (bar = SD)



ภาพที่ 10 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลโนโปรตีเอสในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท ในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด ตัวอักษรยกกำลัง ที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

#### 4.3.3 ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

จากการศึกษาการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหกไอโซเลท โดยใช้สูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แหล่งของไนโตรเจนแตกต่างกัน 5 ชนิด ได้แก่ ยีสต์สกัด (Yeast extract) สารสกัดจากเนื้อวัว (Beef extract) กากถั่วเหลือง (Soybean meal) โซเดียมไนเตรท ( $\text{NaNO}_3$ ) และโพแทสเซียมไนเตรท ( $\text{KNO}_3$ ) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 11 - 14 และตารางที่ 8 - 9

เมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันทั้ง 5 ชนิด ดังแสดงในภาพที่ 11 พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 013, 032 และ 071 มีการเจริญเติบโตเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน สูงแตกต่างจากการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ๆ อย่างเห็นได้ชัด ซึ่งในกรณีที่ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อแบคทีเรีย 013 และ 071 จะเจริญเข้าสู่ระยะ log phase โดยไม่มีระยะ lag phase ที่เวลา 0 - 12 ชั่วโมง และมีความขุ่นสูงสุดของอาหารที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ประมาณ 12 และ 10 ตามลำดับ แต่เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น ๆ ในอาหาร เชื้อทั้งสองชนิดมีการเจริญลดต่ำลง โดยสามารถวัดค่าความขุ่นสูงสุดของอาหารได้ประมาณ 5 เท่านั้น ส่วนเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 032 จะเจริญเข้าสู่ระยะ log phase ที่เวลา 0 ถึง 24 ชั่วโมง ซึ่งใช้ระยะเวลานานกว่าเชื้อไอโซเลท 013 และ 071 เมื่อใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถวัดค่าความขุ่นของอาหารสูงสุดได้ประมาณ 15 และมีการเจริญลดต่ำลงเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับเชื้อ 013 และ 071 เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดอื่น ๆ ในอาหาร นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า เชื้อแบคทีเรียที่เหลืออีก 3 ไอโซเลท ซึ่งได้แก่ ไอโซเลท 012, 042 และ 053 มีแนวโน้มในการเจริญที่ต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ (Organic nitrogen source) คือ ยีสต์สกัด สารสกัดจากเนื้อวัว และกากถั่วเหลือง ส่วนการใช้โซเดียมไนเตรทและโพแทสเซียมไนเตรทที่เป็นแหล่งไนโตรเจนชนิดสารอนินทรีย์ (Inorganic nitrogen source) ไม่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิด โดยสามารถวัดค่าความขุ่นสูงสุดของอาหารได้ประมาณ 4 เท่านั้น

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหาร ดังแสดงในภาพที่ 12 พบว่า ค่าพีเอชในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกันทั้ง 5 ชนิด ของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทนั้น มีการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางเดียวกัน โดยค่าพีเอชจะลดลงจาก 10 ที่เวลา 0 ชั่วโมง ไปจนกระทั่งเหลือค่าพีเอชประมาณ 7 - 8 ที่เวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นจะมีค่าค่อนข้างคงที่ไปจนกระทั่งเสร็จสิ้นกระบวนการเพาะเลี้ยงที่เวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร ดังแสดงในภาพที่ 13 พบว่าการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน 5 ชนิด ของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทมีแนวโน้มเช่นเดียวกัน โดยในอาหารที่ใช้โซเดียมไนเตรทและโพแทสเซียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน จะมีการลดลงของปริมาณน้ำตาลน้อยกว่าอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์เล็กน้อย และในอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่ง ไนโตรเจนของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 012, 032 และ 053 จะมีการลดลงของปริมาณน้ำตาลอย่างรวดเร็วในช่วง 0-12 ชั่วโมง จากนั้นจะมีค่าคงที่ตลอดทั้งกระบวนการ

เมื่อพิจารณาการสร้างอัลคาไลน์โปรตีนเอสและอัตราการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน 5 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 8 – 9 และภาพที่ 14 พบว่า แบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทมีค่ากิจกรรมเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งการใช้กากถั่วเหลืองที่เป็นแหล่งไนโตรเจนชนิดสารอินทรีย์ชนิดหนึ่งในอาหาร จะทำให้ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการผลิตเอนไซม์สูงสุดในเชื้อแบคทีเรียจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ 013, 032, 053 และ 071 ยกเว้นเชื้อแบคทีเรีย 012 ที่มีกิจกรรมเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้ยีสต์สกัดและสารสกัดจากเนื้อวัว ส่วนเชื้อแบคทีเรีย 042 มีการสร้างเอนไซม์ใกล้เคียงกันในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกันทั้ง 5 ชนิด จากผลการทดลองบ่งชี้ให้เห็นว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่มีการสร้างเอนไซม์อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยง ไม่ต่างจากการใช้สารอินทรีย์ชนิดอื่น อีกทั้งยังเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูกกว่าสารอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่นำมาใช้ในการทดลอง ดังนั้นจึงเลือกใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงสำหรับการทดลองต่อไป

ตารางที่ 8 กิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดไอโซเลท  
เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 5 ชนิด

สายพันธุ์	เวลา (ชั่วโมง)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/mL)				
		YE	BE	SB	NaNO <sub>3</sub>	KNO <sub>3</sub>
012	24	1.66±0.01 <sup>a</sup>	1.73±0.03 <sup>a</sup>	0.68±0.04 <sup>c</sup>	0.80±0.01 <sup>b</sup>	0.74±0.04 <sup>bc</sup>
	36	1.76±0.01 <sup>a</sup>	1.79±0.01 <sup>a</sup>	0.81±0.03 <sup>c</sup>	0.87±0.01 <sup>bc</sup>	0.88±0.02 <sup>b</sup>
	48	1.77±0.06 <sup>a</sup>	1.77±0.03 <sup>a</sup>	0.82±0.02 <sup>b</sup>	0.87±0.02 <sup>b</sup>	0.88±0.00 <sup>b</sup>
013	24	1.60±0.01 <sup>ab</sup>	1.31±0.06 <sup>b</sup>	1.93±0.03 <sup>a</sup>	1.47±0.20 <sup>b</sup>	1.42±0.05 <sup>b</sup>
	36	1.71±0.03 <sup>a</sup>	1.67±0.01 <sup>a</sup>	1.75±0.03 <sup>a</sup>	1.36±0.09 <sup>a</sup>	1.35±0.12 <sup>a</sup>
	48	1.68±0.07 <sup>a</sup>	1.46±0.02 <sup>ab</sup>	1.32±0.01 <sup>b</sup>	1.21±0.14 <sup>b</sup>	1.20±0.09 <sup>b</sup>
032	24	2.36±0.10 <sup>a</sup>	1.24±0.04 <sup>b</sup>	2.59±0.26 <sup>a</sup>	0.93±0.13 <sup>b</sup>	0.89±0.12 <sup>b</sup>
	36	2.39±0.10 <sup>a</sup>	1.03±0.05 <sup>b</sup>	2.11±0.27 <sup>a</sup>	1.02±0.09 <sup>b</sup>	1.01±0.00 <sup>b</sup>
	48	2.08±0.17 <sup>a</sup>	0.87±0.02 <sup>c</sup>	1.42±0.06 <sup>b</sup>	1.35±0.04 <sup>b</sup>	1.28±0.14 <sup>b</sup>
042	24	0.54±0.01 <sup>a</sup>	0.53±0.01 <sup>ab</sup>	0.54±0.01 <sup>a</sup>	0.52±0.01 <sup>ab</sup>	0.51±0.00 <sup>b</sup>
	36	0.52±0.01 <sup>a</sup>	0.52±0.00 <sup>a</sup>	0.54±0.01 <sup>a</sup>	0.51±0.00 <sup>a</sup>	0.51±0.01 <sup>a</sup>
	48	0.51±0.01 <sup>a</sup>	0.51±0.01 <sup>a</sup>	0.51±0.02 <sup>a</sup>	0.50±0.01 <sup>a</sup>	0.51±0.01 <sup>a</sup>
053	24	0.18±0.04 <sup>d</sup>	1.88±0.05 <sup>a</sup>	1.76±0.06 <sup>a</sup>	0.52±0.06 <sup>c</sup>	0.82±0.05 <sup>b</sup>
	36	0.53±0.03 <sup>d</sup>	2.10±0.04 <sup>a</sup>	1.69±0.06 <sup>b</sup>	0.65±0.04 <sup>d</sup>	0.93±0.01 <sup>c</sup>
	48	1.13±0.06 <sup>c</sup>	2.02±0.02 <sup>a</sup>	1.75±0.09 <sup>b</sup>	0.55±0.02 <sup>d</sup>	0.98±0.02 <sup>c</sup>
071	24	1.69±0.11 <sup>c</sup>	1.69±0.19 <sup>c</sup>	2.52±0.09 <sup>a</sup>	1.99±0.12 <sup>bc</sup>	2.21±0.06 <sup>ab</sup>
	36	1.97±0.12 <sup>c</sup>	2.16±0.20 <sup>bc</sup>	2.55±0.06 <sup>a</sup>	1.96±0.16 <sup>c</sup>	2.38±0.01 <sup>ab</sup>
	48	1.84±0.02 <sup>b</sup>	2.33±0.01 <sup>a</sup>	2.43±0.04 <sup>a</sup>	1.81±0.09 <sup>b</sup>	2.31±0.03 <sup>a</sup>

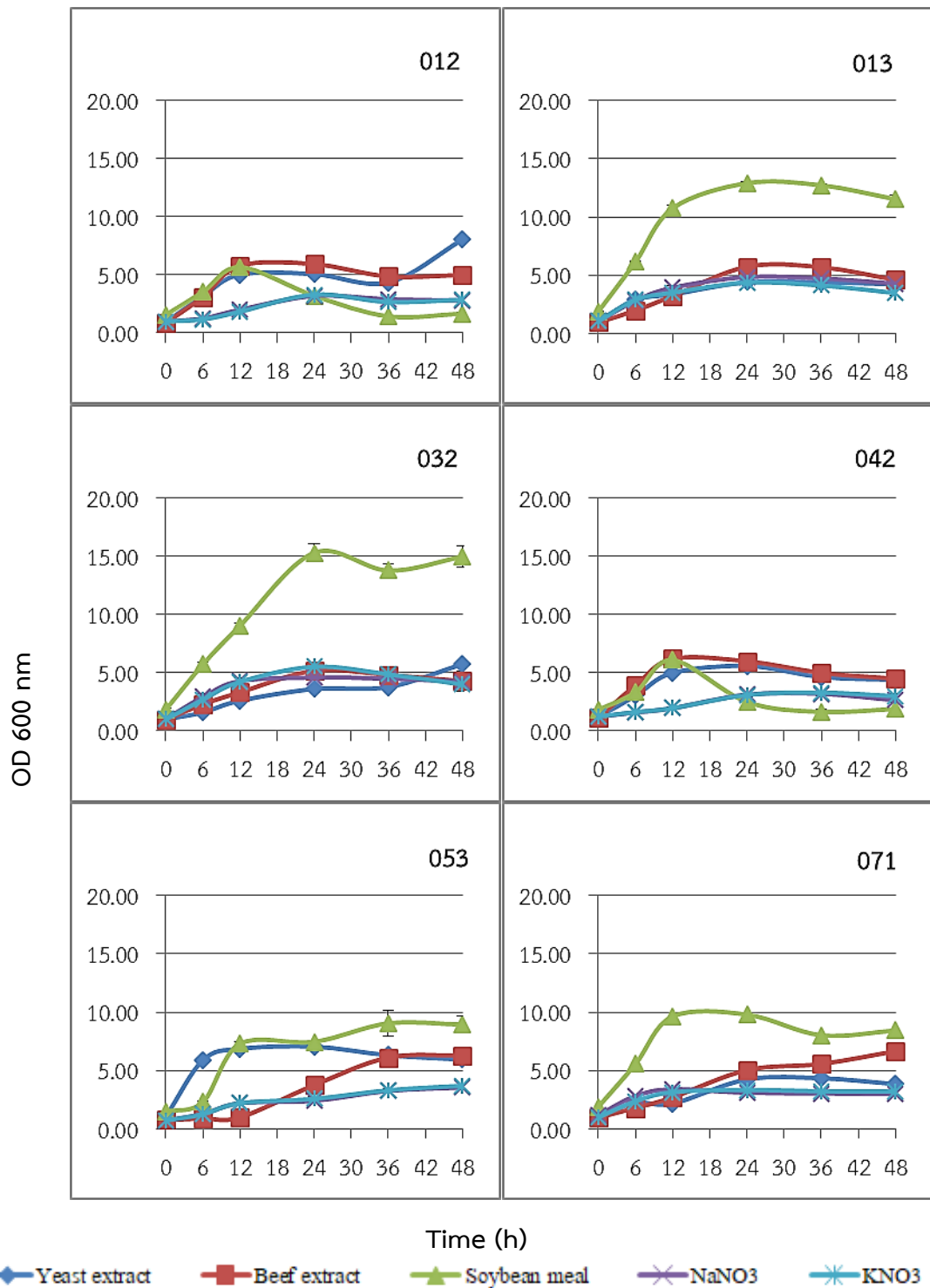
หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์ ในแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิด  
ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ )  
YE คือ ยีสต์สกัด  
BE คือ สารสกัดจากเนื้อวัว  
SB คือ กากถั่วเหลือง

ตารางที่ 9 อัตราการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดไอโซเลท  
เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 5 ชนิด

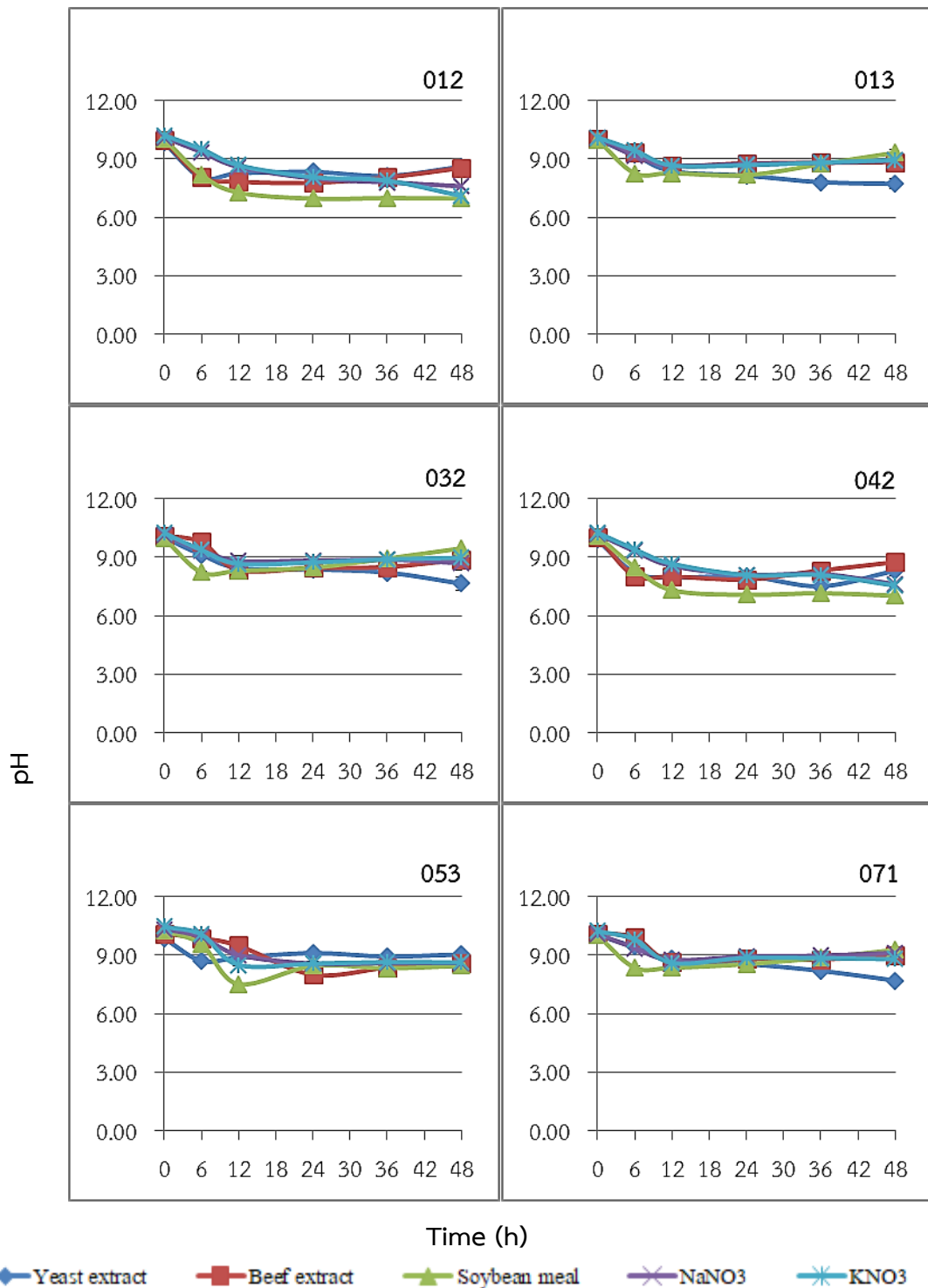
สายพันธุ์	เวลา (ชั่วโมง)	อัตราการสร้างเอนไซม์ (U/mL/h)				
		YE	BE	SB	NaNO <sub>3</sub>	KNO <sub>3</sub>
012	24	0.069±0.000 <sup>a</sup>	0.072±0.001 <sup>a</sup>	0.028±0.002 <sup>c</sup>	0.033±0.000 <sup>b</sup>	0.031±0.001 <sup>bc</sup>
	36	0.049±0.000 <sup>a</sup>	0.050±0.000 <sup>a</sup>	0.023±0.001 <sup>c</sup>	0.024±0.000 <sup>bc</sup>	0.025±0.001 <sup>b</sup>
	48	0.037±0.001 <sup>a</sup>	0.037±0.001 <sup>a</sup>	0.017±0.000 <sup>b</sup>	0.018±0.000 <sup>b</sup>	0.018±0.000 <sup>b</sup>
013	24	0.067±0.000 <sup>ab</sup>	0.054±0.002 <sup>b</sup>	0.080±0.001 <sup>a</sup>	0.061±0.008 <sup>b</sup>	0.059±0.002 <sup>b</sup>
	36	0.047±0.001 <sup>a</sup>	0.046±0.000 <sup>a</sup>	0.049±0.001 <sup>a</sup>	0.038±0.003 <sup>b</sup>	0.038±0.003 <sup>b</sup>
	48	0.035±0.001 <sup>a</sup>	0.030±0.000 <sup>ab</sup>	0.027±0.000 <sup>b</sup>	0.025±0.003 <sup>b</sup>	0.025±0.002 <sup>b</sup>
032	24	0.098±0.004 <sup>a</sup>	0.052±0.002 <sup>b</sup>	0.108±0.011 <sup>a</sup>	0.039±0.006 <sup>b</sup>	0.037±0.005 <sup>b</sup>
	36	0.067±0.003 <sup>a</sup>	0.029±0.001 <sup>b</sup>	0.058±0.008 <sup>a</sup>	0.028±0.002 <sup>b</sup>	0.028±0.002 <sup>b</sup>
	48	0.043±0.003 <sup>a</sup>	0.018±0.001 <sup>c</sup>	0.030±0.001 <sup>b</sup>	0.028±0.001 <sup>b</sup>	0.027±0.003 <sup>b</sup>
042	24	0.022±0.001 <sup>a</sup>	0.022±0.000 <sup>ab</sup>	0.023±0.000 <sup>a</sup>	0.022±0.000 <sup>ab</sup>	0.021±0.000 <sup>b</sup>
	36	0.015±0.000 <sup>a</sup>	0.014±0.000 <sup>a</sup>	0.015±0.000 <sup>a</sup>	0.014±0.000 <sup>a</sup>	0.014±0.000 <sup>a</sup>
	48	0.011±0.000 <sup>a</sup>	0.011±0.000 <sup>a</sup>	0.011±0.000 <sup>a</sup>	0.010±0.000 <sup>a</sup>	0.011±0.000 <sup>a</sup>
053	24	0.007±0.002 <sup>d</sup>	0.078±0.002 <sup>a</sup>	0.074±0.002 <sup>a</sup>	0.022±0.003 <sup>c</sup>	0.034±0.002 <sup>b</sup>
	36	0.015±0.001 <sup>e</sup>	0.058±0.001 <sup>a</sup>	0.047±0.002 <sup>b</sup>	0.018±0.001 <sup>d</sup>	0.026±0.000 <sup>c</sup>
	48	0.024±0.001 <sup>c</sup>	0.042±0.000 <sup>a</sup>	0.036±0.002 <sup>b</sup>	0.011±0.000 <sup>d</sup>	0.020±0.000 <sup>c</sup>
071	24	0.070±0.005 <sup>c</sup>	0.071±0.008 <sup>c</sup>	0.105±0.004 <sup>a</sup>	0.083±0.005 <sup>bc</sup>	0.092±0.003 <sup>ab</sup>
	36	0.055±0.003 <sup>b</sup>	0.060±0.006 <sup>ab</sup>	0.071±0.002 <sup>a</sup>	0.054±0.004 <sup>b</sup>	0.066±0.000 <sup>a</sup>
	48	0.038±0.000 <sup>b</sup>	0.048±0.000 <sup>a</sup>	0.051±0.001 <sup>a</sup>	0.038±0.002 <sup>b</sup>	0.048±0.001 <sup>a</sup>

หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอัตราการสร้างเอนไซม์ ในแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิด  
ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ )  
YE คือ ยีสต์สกัด  
BE คือ สารสกัดจากเนื้อวัว  
SB คือ กากถั่วเหลือง

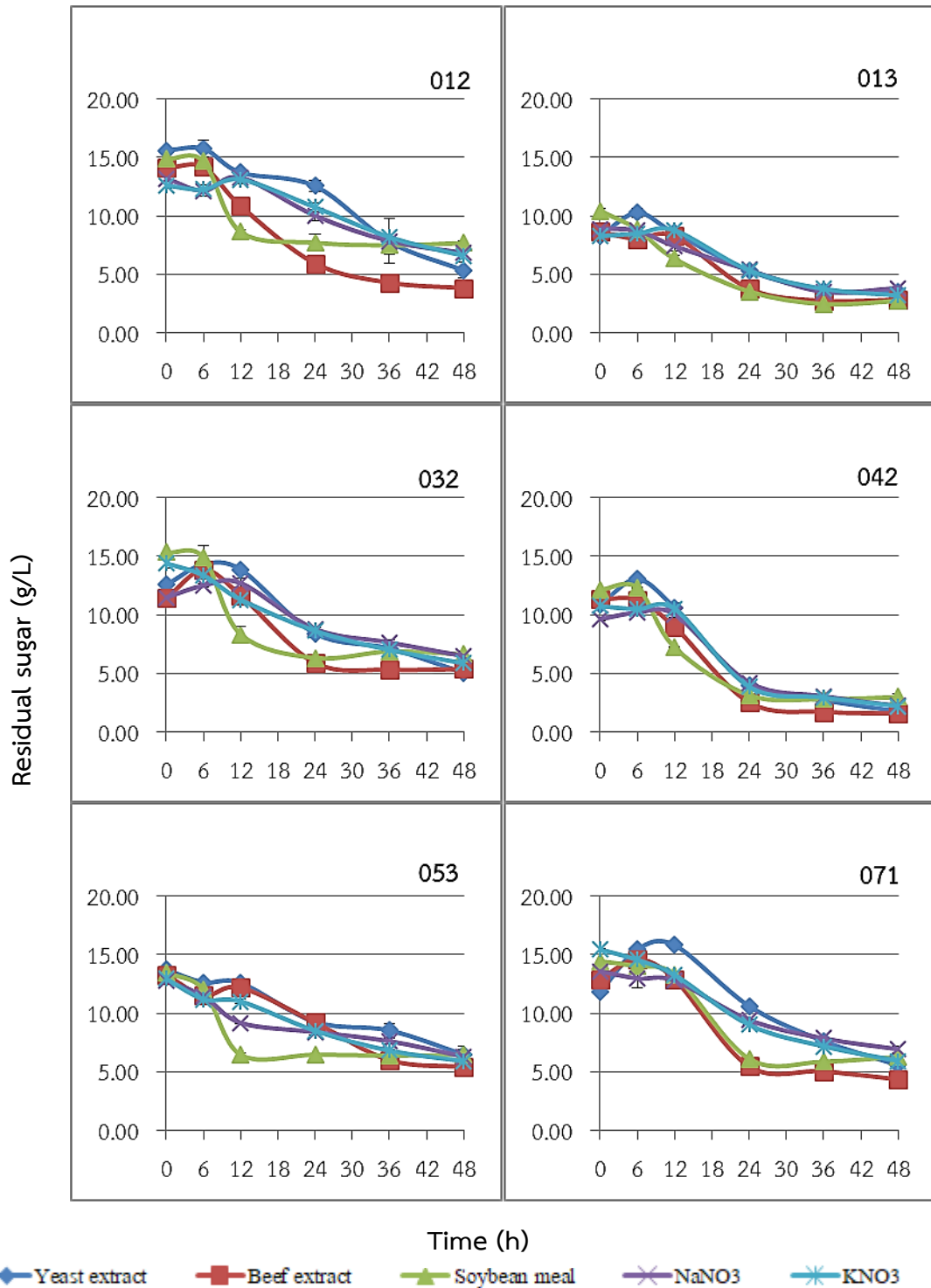




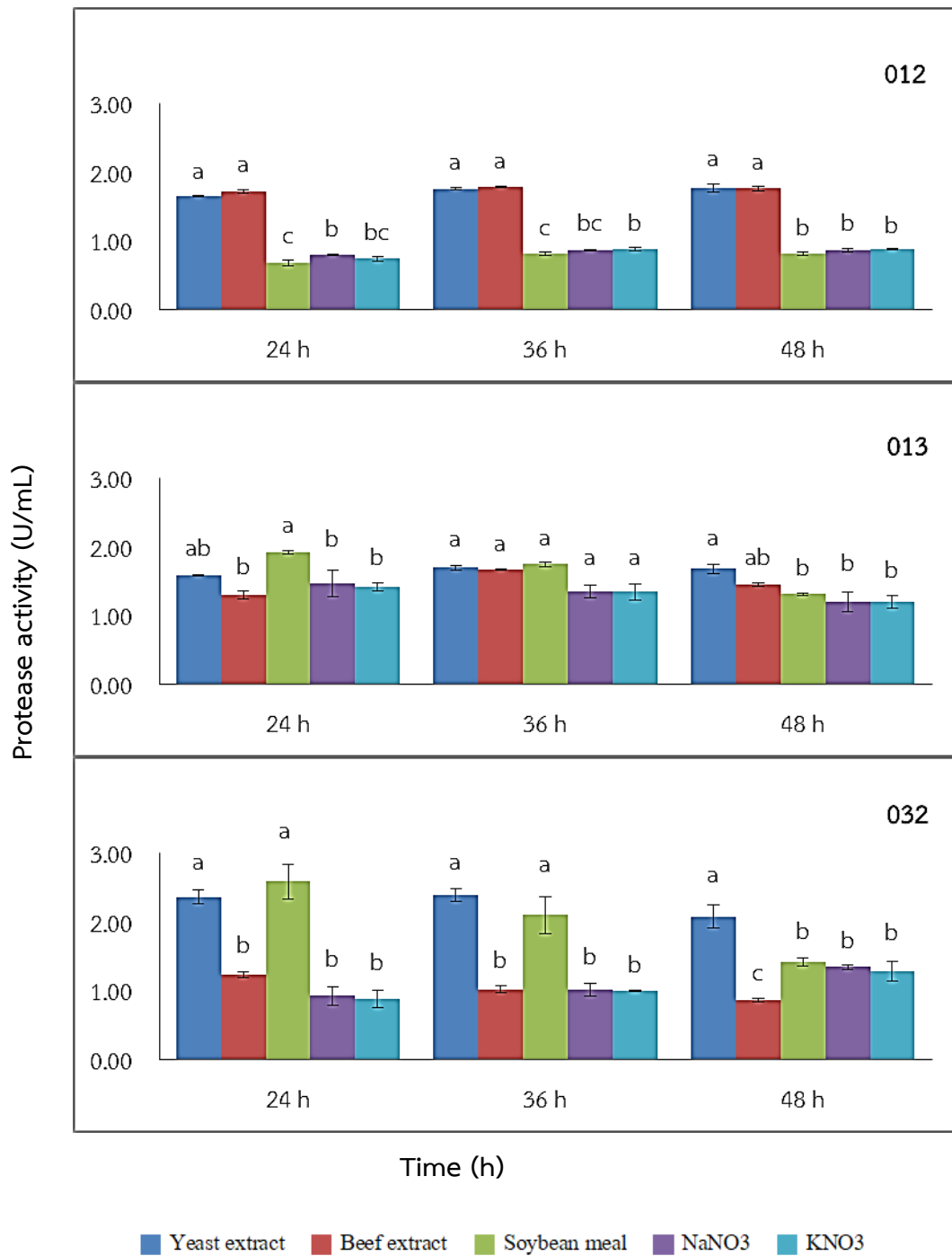
ภาพที่ 11 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท ในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 5 ชนิด (bar =SD)



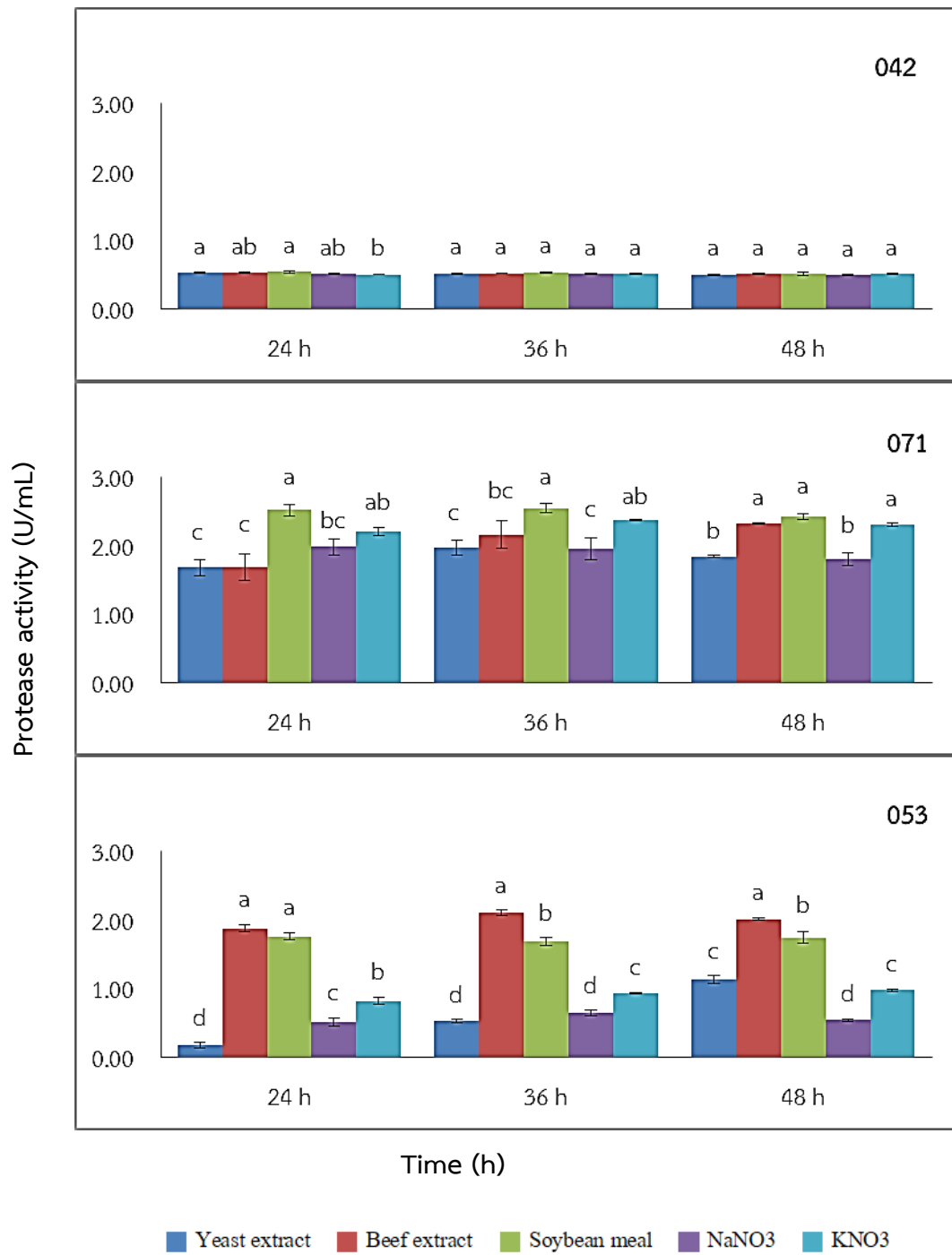
ภาพที่ 12 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 5 ชนิด (bar = SD)



ภาพที่ 13 ปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 5 ชนิด (bar = SD)



ภาพที่ 14 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 5 ชนิด ตัวอักษรยกกำลังที่ต่างกันมีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



ภาพที่ 14 (ต่อ)

#### 4.3.4 ผลการศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร BPMM ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน มีกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน และปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ความเข้มข้นร้อยละ 20 ให้มีค่าแตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 7, 8, 9 และ 10 บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ผลการทดลองดังภาพที่ 15 – 18 และตารางที่ 10 – 11

เมื่อพิจารณาการเจริญของแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในอาหารที่มีค่าพีเอชแตกต่างกัน 4 ระดับ ดังแสดงในภาพที่ 15 พบว่าค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียมีการเจริญดีที่สุดคือ 9 โดยให้ผลดีในเชื้อไอโซเลท 013, 032, และ 042 ซึ่งแบคทีเรียไอโซเลท 042 นั้น ยังมีการเจริญที่ดีในอาหารที่มีค่าพีเอช 8 อีกด้วย ส่วนค่าพีเอชในอาหารที่ทำให้แบคทีเรียเจริญได้ตรงลงมาคือ 7 ที่ให้ผลดีในเชื้อไอโซเลท 012 และ 053 และค่าพีเอช 8 ที่ให้ผลดีในเชื้อไอโซเลท 042 และ 071 นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อทั้งหกไอโซเลทเจริญได้น้อยที่สุดเมื่อค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 10

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารที่มีค่าต่างกันทั้ง 4 ระดับ พบว่าค่าพีเอชของอาหารทั้ง 4 ชนิด ที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท มีการลดลงจากค่าเริ่มต้นในช่วงที่เชื้อมีการเจริญระยะ log phase หลังจากนั้นค่าพีเอชจะค่อนข้างคงที่หรือมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยในระยะ stationary phase จนกระทั่งเสร็จสิ้นกระบวนการเพาะเลี้ยง

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลในอาหาร ดังแสดงในภาพที่ 17 พบว่า ปริมาณน้ำตาลในอาหารเกือบทุกชนิดจะลดลงเมื่อแบคทีเรียมีการเจริญในระยะ log phase หลังจากนั้นจะค่อนข้างคงที่เมื่อเชื้อเข้าสู่ระยะ stationary phase โดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 042 และ 071 มีการลดลงของปริมาณน้ำตาลอย่างใกล้เคียงกันในอาหารที่มีค่าพีเอชแตกต่างกันทั้ง 4 ค่า ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการเจริญที่ใกล้เคียงกันในอาหารทั้ง 4 ชนิด และเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงที่เวลา 48 ชั่วโมง สามารถวัดปริมาณน้ำตาลคงเหลือได้ประมาณ 3-5 กรัมต่อลิตร ส่วนเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 012 นำน้ำตาลไปใช้ปริมาณน้ำตาลน้อยมากหรือแทบไม่ใช้เลยในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8 เห็นได้จากปริมาณน้ำตาลคงเหลือที่เวลา 48 ชั่วโมง ใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลตอนเริ่มต้นการเพาะเลี้ยง ส่วนอาหารที่มีค่าพีเอชอื่น ๆ มีการใช้น้ำตาลมากกว่า และคงเหลือในอาหารในปริมาณที่น้อยกว่าเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง เช่นเดียวกับแบคทีเรีย 032 ที่ลักษณะการใช้น้ำตาลเป็นไปในรูปแบบเดียวกันกับแบคทีเรียไอโซเลท 012 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 8 แต่แบคทีเรีย 032 นั้น ยังมีการใช้น้ำตาลน้อยในอาหารที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 7 ด้วย และมีการใช้น้ำตาลจนเกือบหมดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 9 ส่วนเชื้อแบคทีเรีย 013 มีการใช้น้ำตาลมากที่สุดในอาหารที่มีค่าพีเอช 8 ตรงลงมาคือ พีเอช 10, 7 และ 9 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากแบคทีเรีย 053 ที่มีการใช้น้ำตาลในอาหารที่มีค่าพีเอช 7, 8 และ 9 อย่างใกล้เคียงกัน และมีการใช้น้ำตาลน้อยสุดหรือแทบไม่ใช้เลยในอาหารที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 10

เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่างกัน 4 ระดับ ดังแสดงในภาพที่ 18 และตารางที่ 10 และ 11 พบว่า เชื้อแบคทีเรียจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ 012, 013, 032, และ 042 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 10 และมีอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง สามารถวัดค่าได้เท่ากับ 0.081, 0.048, 0.126 และ 0.080 ยูนิต ต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 071 มีกิจกรรมและอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 10 เช่นเดียวกัน แต่ต่างกันตรงที่ต้องใช้ระยะเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ค่าสูงสุดดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้ค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ 7 ให้ผลดีในเชื้อแบคทีเรีย 053 โดยสามารถวัดกิจกรรมและอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดได้ที่เวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 1.68 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.070 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เนื่องจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 10 จะส่งผลให้แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้ค่าพีเอชอื่น ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 10 ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 10 กิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหกไอโซเลท  
เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ

สายพันธุ์	เวลา (ชั่วโมง)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/mL)			
		7	8	9	10
012	24	0.38±0.05 <sup>b</sup>	0.28±0.00 <sup>bc</sup>	0.23±0.03 <sup>c</sup>	1.95±0.02 <sup>a</sup>
	36	0.47±0.07 <sup>b</sup>	0.13±0.00 <sup>c</sup>	0.26±0.06 <sup>c</sup>	1.92±0.04 <sup>a</sup>
	48	0.41±0.07 <sup>b</sup>	0.12±0.00 <sup>c</sup>	0.20±0.05 <sup>bc</sup>	1.58±0.10 <sup>a</sup>
013	24	0.12±0.04 <sup>b</sup>	0.13±0.03 <sup>b</sup>	0.09±0.05 <sup>b</sup>	1.16±0.18 <sup>a</sup>
	36	0.02±0.02 <sup>b</sup>	0.01±0.01 <sup>b</sup>	0.03±0.05 <sup>b</sup>	1.05±0.06 <sup>a</sup>
	48	0.08±0.01 <sup>c</sup>	0.14±0.00 <sup>c</sup>	1.89±0.05 <sup>a</sup>	1.47±0.14 <sup>b</sup>
032	24	0.09±0.03 <sup>b</sup>	0.01±0.01 <sup>c</sup>	0.06±0.03 <sup>bc</sup>	3.02±0.03 <sup>a</sup>
	36	0.00±0.00 <sup>b</sup>	0.01±0.02 <sup>b</sup>	0.00±0.00 <sup>b</sup>	2.59±0.02 <sup>a</sup>
	48	0.13±0.01 <sup>b</sup>	0.04±0.03 <sup>b</sup>	0.04±0.01 <sup>b</sup>	2.62±0.10 <sup>a</sup>
042	24	0.43±0.12 <sup>c</sup>	0.44±0.00 <sup>c</sup>	0.88±0.01 <sup>b</sup>	1.91±0.13 <sup>a</sup>
	36	0.77±0.02 <sup>b</sup>	0.33±0.00 <sup>c</sup>	0.72±0.03 <sup>b</sup>	1.92±0.04 <sup>a</sup>
	48	0.74±0.01 <sup>b</sup>	0.43±0.00 <sup>c</sup>	0.65±0.08 <sup>b</sup>	1.62±0.07 <sup>a</sup>
053	24	1.68±0.08 <sup>a</sup>	0.69±0.05 <sup>d</sup>	0.96±0.07 <sup>c</sup>	1.41±0.02 <sup>b</sup>
	36	1.71±0.02 <sup>a</sup>	1.55±0.00 <sup>a</sup>	0.80±0.09 <sup>b</sup>	1.54±0.00 <sup>a</sup>
	48	1.75±0.05 <sup>b</sup>	1.47±0.07 <sup>c</sup>	0.98±0.00 <sup>d</sup>	2.00±0.00 <sup>a</sup>
071	24	0.06±0.10 <sup>b</sup>	0.09±0.04 <sup>b</sup>	0.04±0.00 <sup>b</sup>	0.80±0.03 <sup>a</sup>
	36	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.00±0.00 <sup>c</sup>	0.68±0.00 <sup>b</sup>	0.93±0.06 <sup>a</sup>
	48	0.06±0.00 <sup>c</sup>	0.02±0.03 <sup>c</sup>	0.64±0.00 <sup>b</sup>	2.46±0.15 <sup>a</sup>

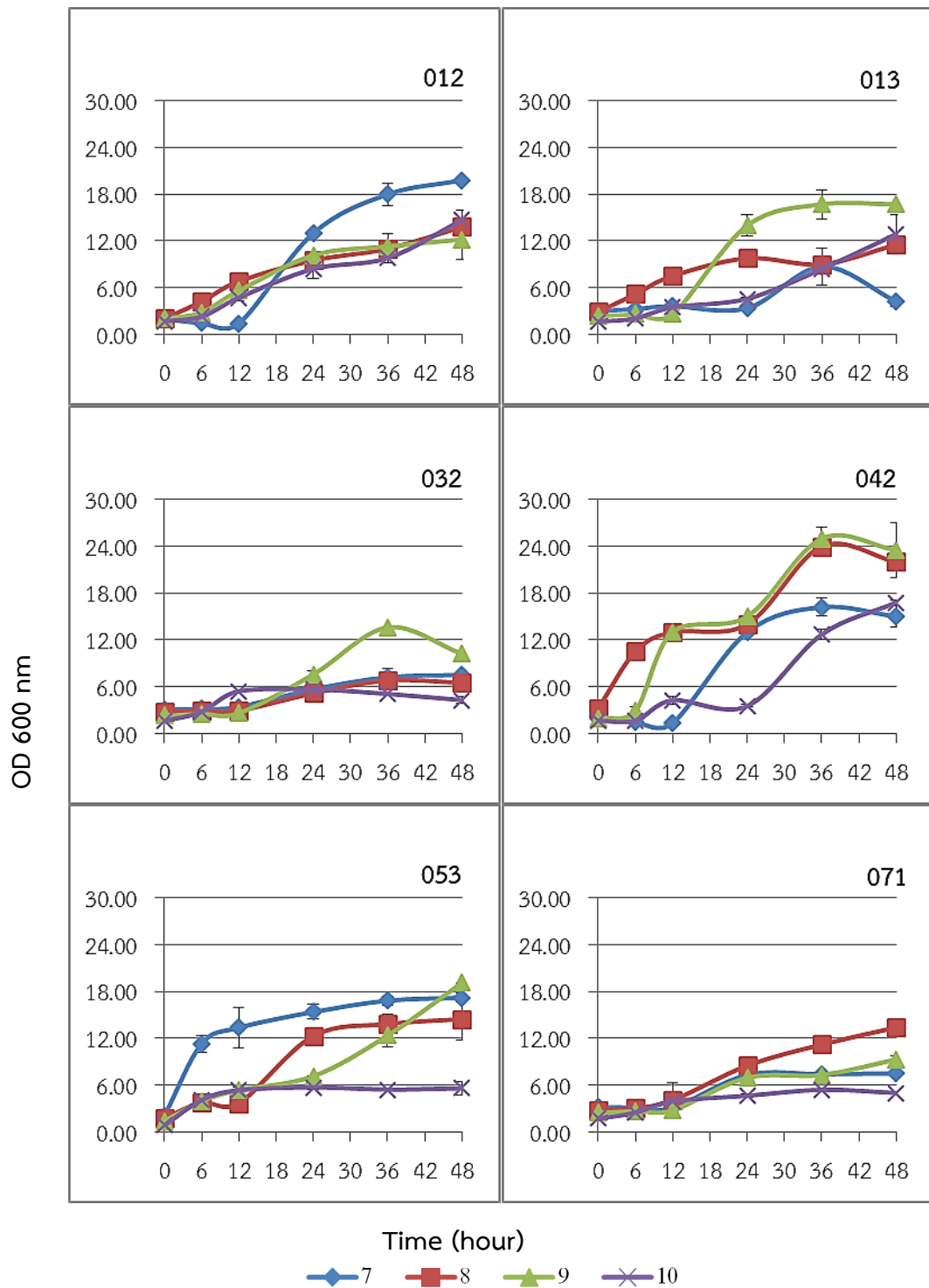
หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์ ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ )



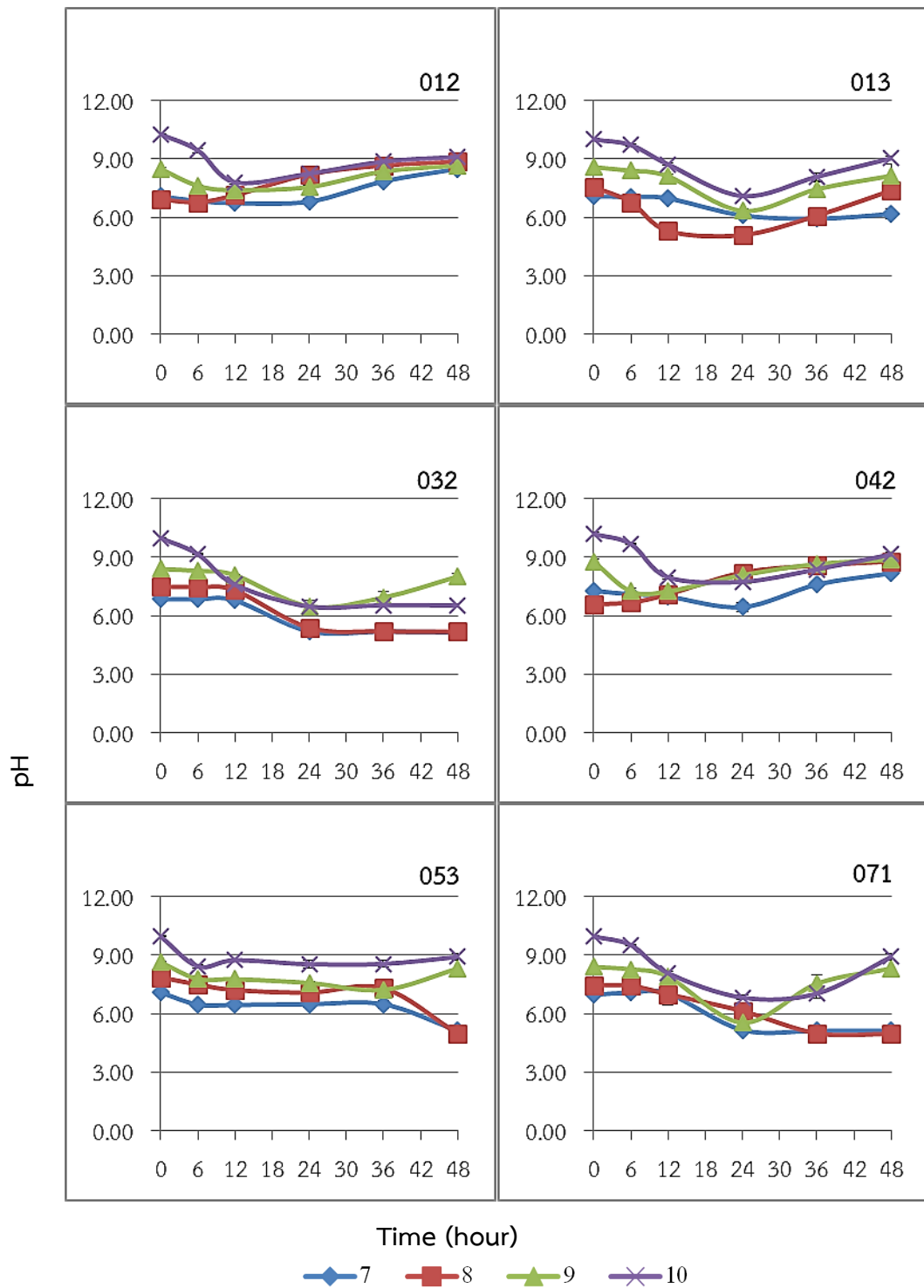
ตารางที่ 11 อัตราการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดไอโซเลท  
เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ

สายพันธุ์	เวลา (ชั่วโมง)	อัตราการสร้างเอนไซม์ (U/mL/h)			
		7	8	9	10
012	24	0.016±0.002 <sup>b</sup>	0.012±0.000 <sup>bc</sup>	0.010±0.001 <sup>c</sup>	0.081±0.001 <sup>a</sup>
	36	0.013±0.002 <sup>b</sup>	0.003±0.000 <sup>c</sup>	0.007±0.002 <sup>c</sup>	0.053±0.001 <sup>a</sup>
	48	0.009±0.001 <sup>b</sup>	0.003±0.000 <sup>c</sup>	0.004±0.001 <sup>bc</sup>	0.033±0.002 <sup>a</sup>
013	24	0.005±0.001 <sup>b</sup>	0.006±0.001 <sup>b</sup>	0.004±0.002 <sup>b</sup>	0.048±0.008 <sup>a</sup>
	36	0.001±0.001 <sup>b</sup>	0.000±0.000 <sup>b</sup>	0.001±0.001 <sup>b</sup>	0.029±0.002 <sup>a</sup>
	48	0.002±0.000 <sup>c</sup>	0.003±0.000 <sup>c</sup>	0.039±0.001 <sup>a</sup>	0.031±0.003 <sup>b</sup>
032	24	0.004±0.001 <sup>b</sup>	0.000±0.000 <sup>c</sup>	0.003±0.001 <sup>bc</sup>	0.126±0.001 <sup>a</sup>
	36	0.000±0.000 <sup>b</sup>	0.000±0.001 <sup>b</sup>	0.000±0.000 <sup>b</sup>	0.072±0.001 <sup>a</sup>
	48	0.003±0.000 <sup>bs</sup>	0.001±0.001 <sup>b</sup>	0.001±0.000 <sup>b</sup>	0.055±0.002 <sup>a</sup>
042	24	0.018±0.005 <sup>c</sup>	0.018±0.000 <sup>c</sup>	0.037±0.000 <sup>b</sup>	0.080±0.005 <sup>a</sup>
	36	0.021±0.000 <sup>b</sup>	0.009±0.000 <sup>c</sup>	0.020±0.001 <sup>b</sup>	0.053±0.001 <sup>a</sup>
	48	0.015±0.000 <sup>b</sup>	0.009±0.000 <sup>c</sup>	0.013±0.002 <sup>bc</sup>	0.034±0.002 <sup>a</sup>
053	24	0.070±0.003 <sup>a</sup>	0.029±0.002 <sup>d</sup>	0.048±0.014 <sup>c</sup>	0.059±0.001 <sup>b</sup>
	36	0.048±0.001 <sup>a</sup>	0.043±0.006 <sup>a</sup>	0.022±0.003 <sup>b</sup>	0.043±0.000 <sup>a</sup>
	48	0.036±0.001 <sup>b</sup>	0.031±0.001 <sup>c</sup>	0.020±0.000 <sup>d</sup>	0.042±0.000 <sup>a</sup>
071	24	0.003±0.000 <sup>b</sup>	0.004±0.002 <sup>b</sup>	0.002±0.000 <sup>b</sup>	0.033±0.001 <sup>a</sup>
	36	0.000±0.000 <sup>c</sup>	0.000±0.000 <sup>c</sup>	0.019±0.000 <sup>b</sup>	0.026±0.002 <sup>a</sup>
	48	0.001±0.000 <sup>c</sup>	0.000±0.001 <sup>c</sup>	0.013±0.000 <sup>b</sup>	0.051±0.003 <sup>a</sup>

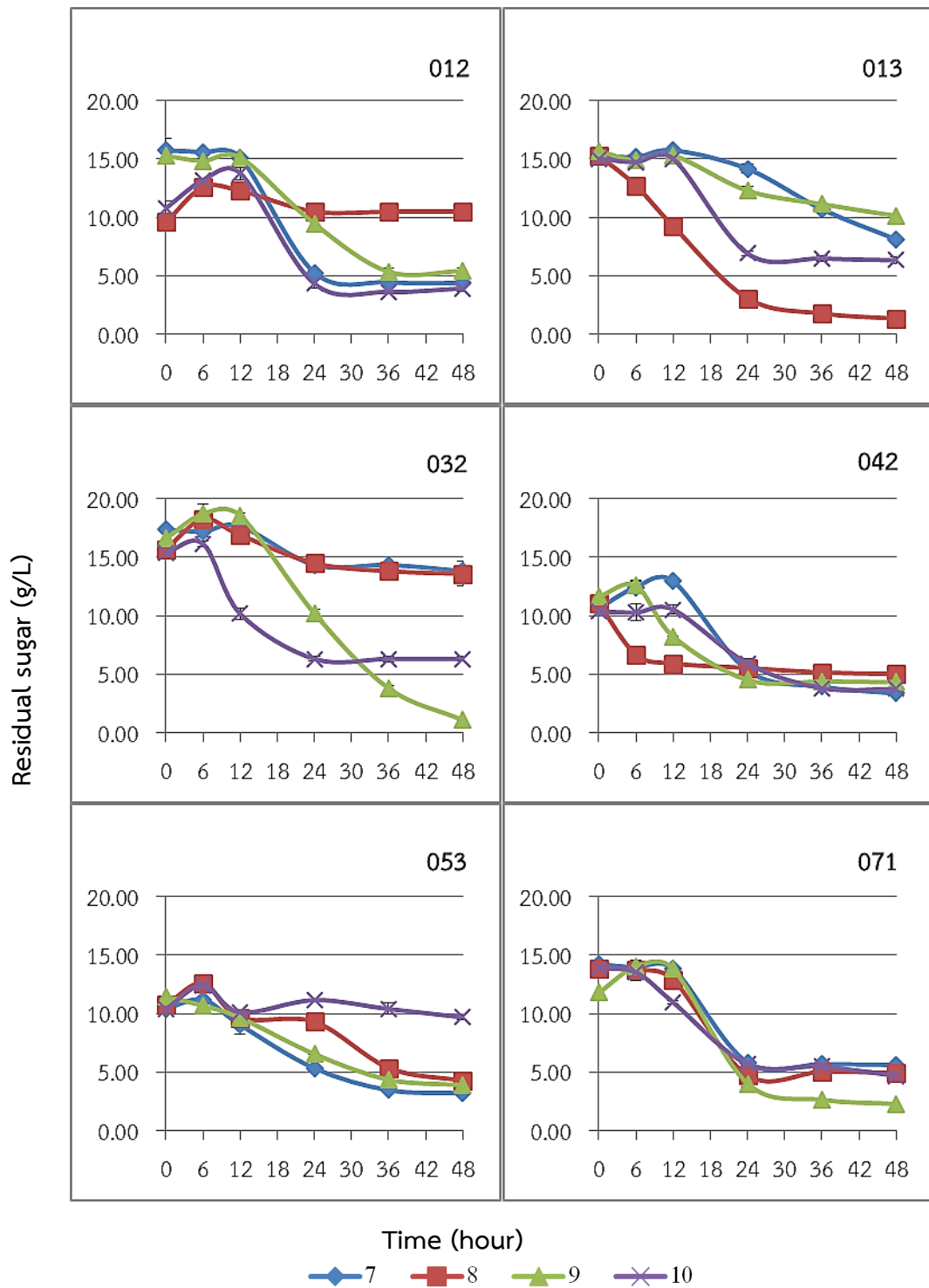
หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอัตราการสร้างเอนไซม์ ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหาร  
แตกต่างกัน ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ )



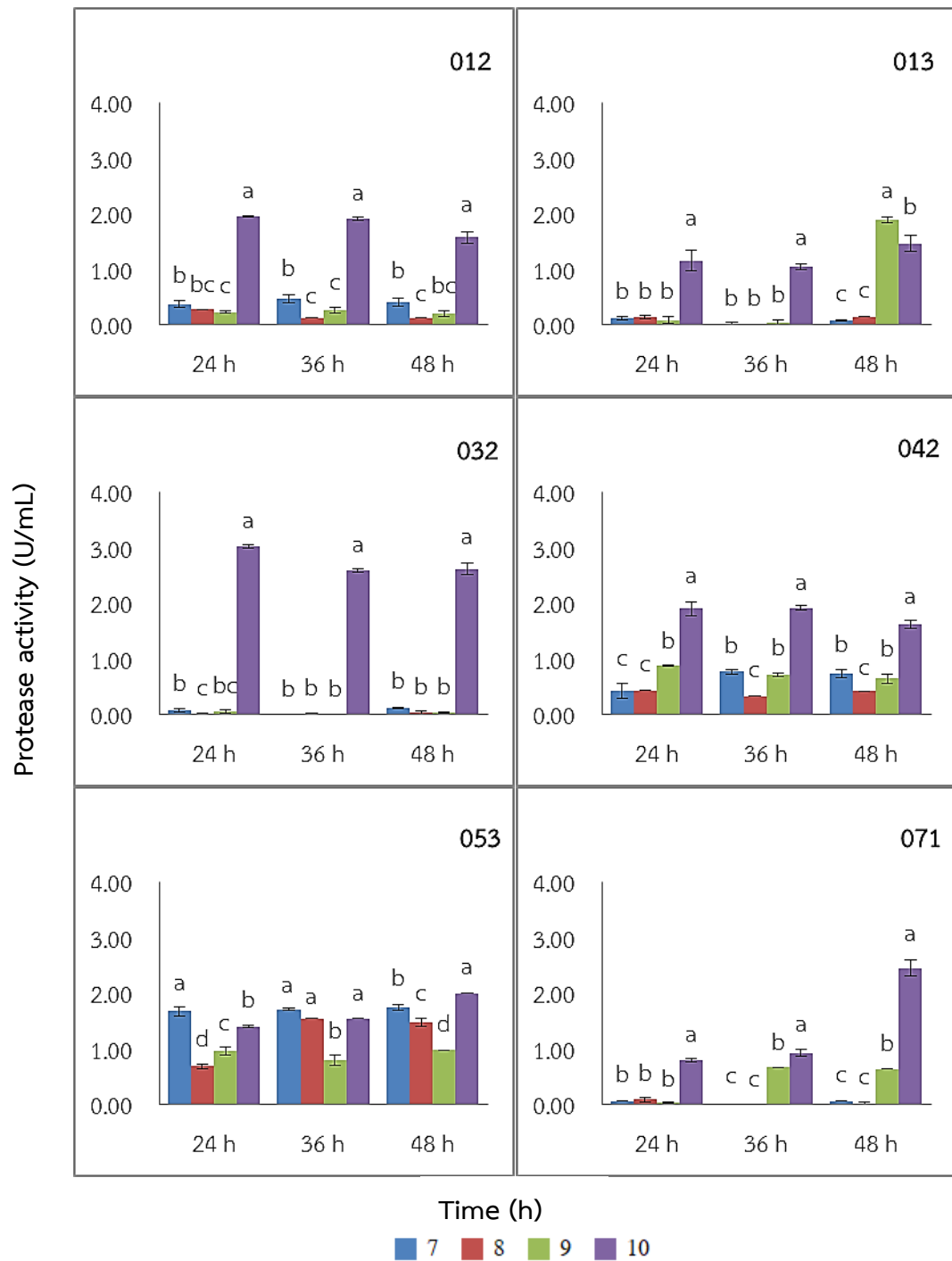
ภาพที่ 15 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท ในสูตรอาหาร BPMM ที่มีเด็กซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน มีกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน และมีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ (bar = SD)



ภาพที่ 16 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน มีกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน และมีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ (bar = SD)



ภาพที่ 17 ปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน มีกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน และมีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ (bar = SD)



ภาพที่ 18 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลโนโปรตีเอสในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท ในสูตรอาหาร BPMM ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน มีกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน และมีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ ตัวอักษรยกกำลังที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

#### 4.3.5 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้สูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน มีกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างกันคือ 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 19–22 และตารางที่ 12

เมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ หลังจากทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่างกัน 3 ระดับ ดังแสดงในภาพที่ 19 พบว่า เชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 013, 032 และ 053 มีการเจริญใกล้เคียงกันเมื่อเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิที่ต่างกันทั้ง 3 ระดับ ส่วนเชื้อแบคทีเรีย 012 และ 042 สามารถเจริญเติบโตได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส รองลงมาคือ 35 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากเชื้อแบคทีเรีย 071 ที่มีการเจริญดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และการเจริญจะลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหาร ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิของการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน 3 ระดับ ดังแสดงในภาพที่ 20 พบว่าการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารทั้งหมดมีความใกล้เคียงกัน แม้ว่าจะทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทภายใต้อุณหภูมิที่ต่างกันก็ตาม โดยค่าพีเอชของอาหารของแต่ละอุณหภูมิของแบคทีเรียไอโซเลท 012, 013, 032, 042 และ 071 จะลดลงจาก 10 ที่เวลา 0 ชั่วโมง จนเหลือค่าประมาณ 7 ที่เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นค่าพีเอชจะคงที่หรือมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยจนกระทั่งสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง ส่วนเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 053 พบว่าการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับเชื้อชนิดอื่นนั่นคือ การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในอาหารของแต่ละอุณหภูมิไม่มีความแตกต่างกัน แต่ค่าพีเอชของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย 053 ลดลงจากตอนเริ่มต้นไม่มากนัก โดยค่าพีเอชจะลดลงเหลือประมาณ 9 ที่เวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นจะค่อนข้างคงที่ตลอดทั้งกระบวนการ

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลในอาหาร ดังแสดงในภาพที่ 21 พบว่าการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงของเชื้อแบคทีเรีย 012, 013, 032, 042 และ 071 เป็นไปในทิศทางเดียวกันคือ ปริมาณน้ำตาลมีการลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 0 - 24 ชั่วโมงแรก จากนั้นจะค่อนข้างคงที่หรือมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย โดยสามารถวัดปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงในทุกสภาวะของเชื้อแบคทีเรียทั้งห้าไอโซเลทได้ประมาณ 3-6 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง และพบว่าปริมาณน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ของเชื้อแบคทีเรียทั้งห้าไอโซเลทมีปริมาณคงเหลือน้อยกว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำกว่าเล็กน้อย แบคทีเรียไอโซเลท 053 ปริมาณน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส มีการลดลงอย่างช้า ๆ จนกระทั่งเสร็จสิ้นกระบวนการ ซึ่งสามารถวัดปริมาณน้ำตาลคงเหลือได้ประมาณ 6 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง ในอาหารเพาะเลี้ยงทั้งสอง ส่วนอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีการลดลงของปริมาณน้ำตาลน้อยมากหรือแทบไม่ลดลงจากตอนเริ่มการเพาะเลี้ยง โดยสามารถวัดปริมาณหลังสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงได้ประมาณ 9.5 กรัมต่อลิตร

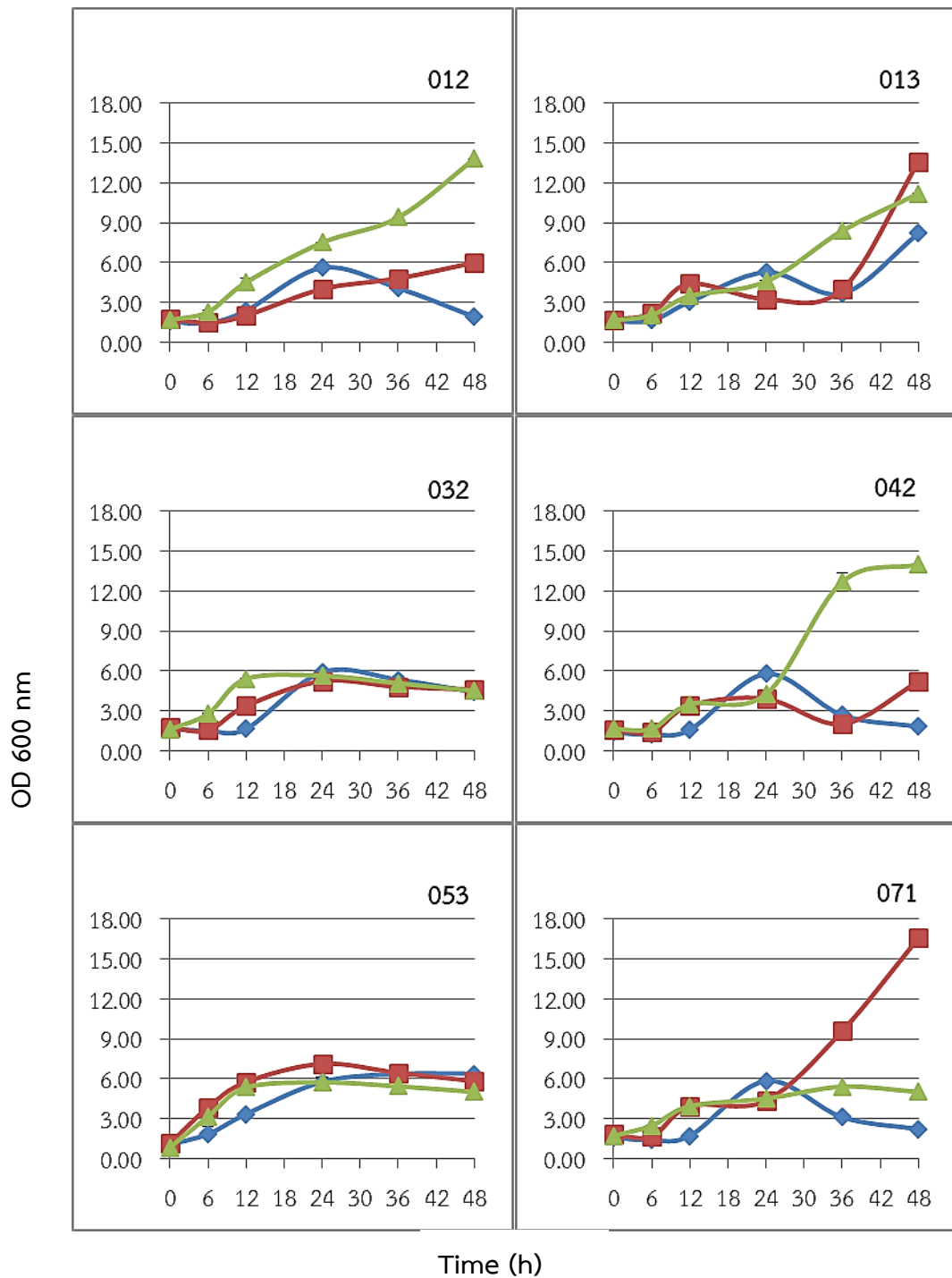
เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ในอาหารเพาะเลี้ยง ดังแสดงในภาพที่ 22 และตารางที่ 12 พบว่าเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่มีกิจกรรมและอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยให้ผลดีที่สุดแตกต่างจากสภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 012, 013 และ 032 ซึ่งสามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้เท่ากับ 1.81, 1.25 และ 3.02 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดได้เท่ากับ 0.075, 0.029 และ 0.126 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ผลดีที่สุดในเชื้อไอโซเลท 071 โดยวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ได้เท่ากับ 1.64 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.068 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 042 ที่อุณหภูมิต่างกันทั้ง 3 ระดับนั้น ไม่ส่งผลให้เกิดการผลิตเอนไซม์ที่แตกต่างกัน เห็นได้จากกิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่มียูนิตกิจกรรมและอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุด มีค่าใกล้เคียงกันในทั้ง 3 สภาวะ ดังตารางที่ 12 ส่วนเชื้อแบคทีเรีย 053 นั้น สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส และเชื้อจะสร้างเอนไซม์ได้น้อยลงเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองดังกล่าว จะเห็นว่าอุณหภูมิที่ส่งผลให้เชื้อมีการสร้างเอนไซม์ได้ดีที่สุด คือ 37 องศาเซลเซียส ดังนั้น จึงเลือกใช้เป็นอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรียในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 12 กิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้  
 ทั้งหมดไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิต่างกันทั้ง 3 ระดับ

สายพันธุ์	เวลา (ชั่วโมง)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/mL)			อัตราการสร้างเอนไซม์ (U/mL/h)		
		30 °C	35 °C	37 °C	30 °C	35 °C	37 °C
012	24	0.80±0.06 <sup>b</sup>	0.65±0.06 <sup>b</sup>	1.81±0.01 <sup>a</sup>	0.033±0.002 <sup>b</sup>	0.027±0.003 <sup>c</sup>	0.075±0.001 <sup>a</sup>
	36	0.97±0.05 <sup>b</sup>	0.77±0.08 <sup>c</sup>	1.78±0.04 <sup>a</sup>	0.027±0.001 <sup>b</sup>	0.021±0.002 <sup>c</sup>	0.033±0.002 <sup>a</sup>
	48	1.18±0.02 <sup>b</sup>	1.56±0.08 <sup>a</sup>	1.46±0.10 <sup>a</sup>	0.025±0.000 <sup>b</sup>	0.033±0.002 <sup>a</sup>	0.031±0.002 <sup>a</sup>
013	24	0.17±0.02 <sup>b</sup>	0.30±0.01 <sup>b</sup>	0.71±0.11 <sup>a</sup>	0.007±0.001 <sup>b</sup>	0.013±0.001 <sup>b</sup>	0.029±0.004 <sup>a</sup>
	36	0.25±0.06 <sup>b</sup>	0.30±0.03 <sup>b</sup>	0.79±0.04 <sup>a</sup>	0.007±0.002 <sup>b</sup>	0.008±0.001 <sup>b</sup>	0.022±0.001 <sup>a</sup>
	48	0.29±0.04 <sup>c</sup>	0.47±0.04 <sup>b</sup>	1.25±0.11 <sup>a</sup>	0.006±0.001 <sup>c</sup>	0.010±0.001 <sup>b</sup>	0.023±0.002 <sup>a</sup>
032	24	1.72±0.07 <sup>b</sup>	1.60±0.04 <sup>b</sup>	3.02±0.03 <sup>a</sup>	0.072±0.003 <sup>b</sup>	0.067±0.002 <sup>b</sup>	0.126±0.001 <sup>a</sup>
	36	1.77±0.07 <sup>b</sup>	1.69±0.06 <sup>b</sup>	2.59±0.02 <sup>a</sup>	0.049±0.002 <sup>b</sup>	0.047±0.002 <sup>b</sup>	0.072±0.001 <sup>a</sup>
	48	1.76±0.02 <sup>b</sup>	1.33±0.09 <sup>c</sup>	2.62±0.10 <sup>a</sup>	0.037±0.001 <sup>b</sup>	0.028±0.002 <sup>c</sup>	0.055±0.002 <sup>a</sup>
042	24	1.75±0.04 <sup>a</sup>	1.68±0.06 <sup>a</sup>	1.68±0.11 <sup>a</sup>	0.073±0.002 <sup>a</sup>	0.070±0.003 <sup>a</sup>	0.070±0.005 <sup>a</sup>
	36	1.78±0.05 <sup>a</sup>	1.75±0.04 <sup>a</sup>	1.69±0.04 <sup>a</sup>	0.050±0.001 <sup>a</sup>	0.049±0.001 <sup>a</sup>	0.047±0.001 <sup>a</sup>
	48	1.76±0.04 <sup>a</sup>	1.69±0.00 <sup>a</sup>	1.46±0.06 <sup>b</sup>	0.037±0.001 <sup>a</sup>	0.035±0.000 <sup>a</sup>	0.030±0.001 <sup>b</sup>
053	24	1.64±0.01 <sup>a</sup>	1.60±0.07 <sup>a</sup>	1.07±0.02 <sup>b</sup>	0.068±0.000 <sup>a</sup>	0.067±0.003 <sup>a</sup>	0.045±0.001 <sup>b</sup>
	36	1.79±0.02 <sup>a</sup>	1.77±0.06 <sup>a</sup>	1.30±0.18 <sup>b</sup>	0.050±0.001 <sup>a</sup>	0.049±0.002 <sup>a</sup>	0.036±0.005 <sup>b</sup>
	48	1.78±0.02 <sup>a</sup>	1.68±0.12 <sup>ab</sup>	1.42±0.14 <sup>b</sup>	0.037±0.001 <sup>a</sup>	0.035±0.002 <sup>ab</sup>	0.030±0.000 <sup>b</sup>
071	24	1.64±0.01 <sup>a</sup>	1.56±0.02 <sup>b</sup>	0.61±0.02 <sup>c</sup>	0.068±0.000 <sup>a</sup>	0.065±0.001 <sup>b</sup>	0.025±0.001 <sup>c</sup>
	36	1.79±0.02 <sup>a</sup>	1.80±0.02 <sup>a</sup>	0.70±0.05 <sup>b</sup>	0.050±0.001 <sup>a</sup>	0.050±0.001 <sup>a</sup>	0.020±0.001 <sup>b</sup>
	48	1.78±0.02 <sup>a</sup>	1.74±0.06 <sup>a</sup>	1.87±0.11 <sup>a</sup>	0.037±0.001 <sup>a</sup>	0.036±0.001 <sup>a</sup>	0.039±0.002 <sup>a</sup>

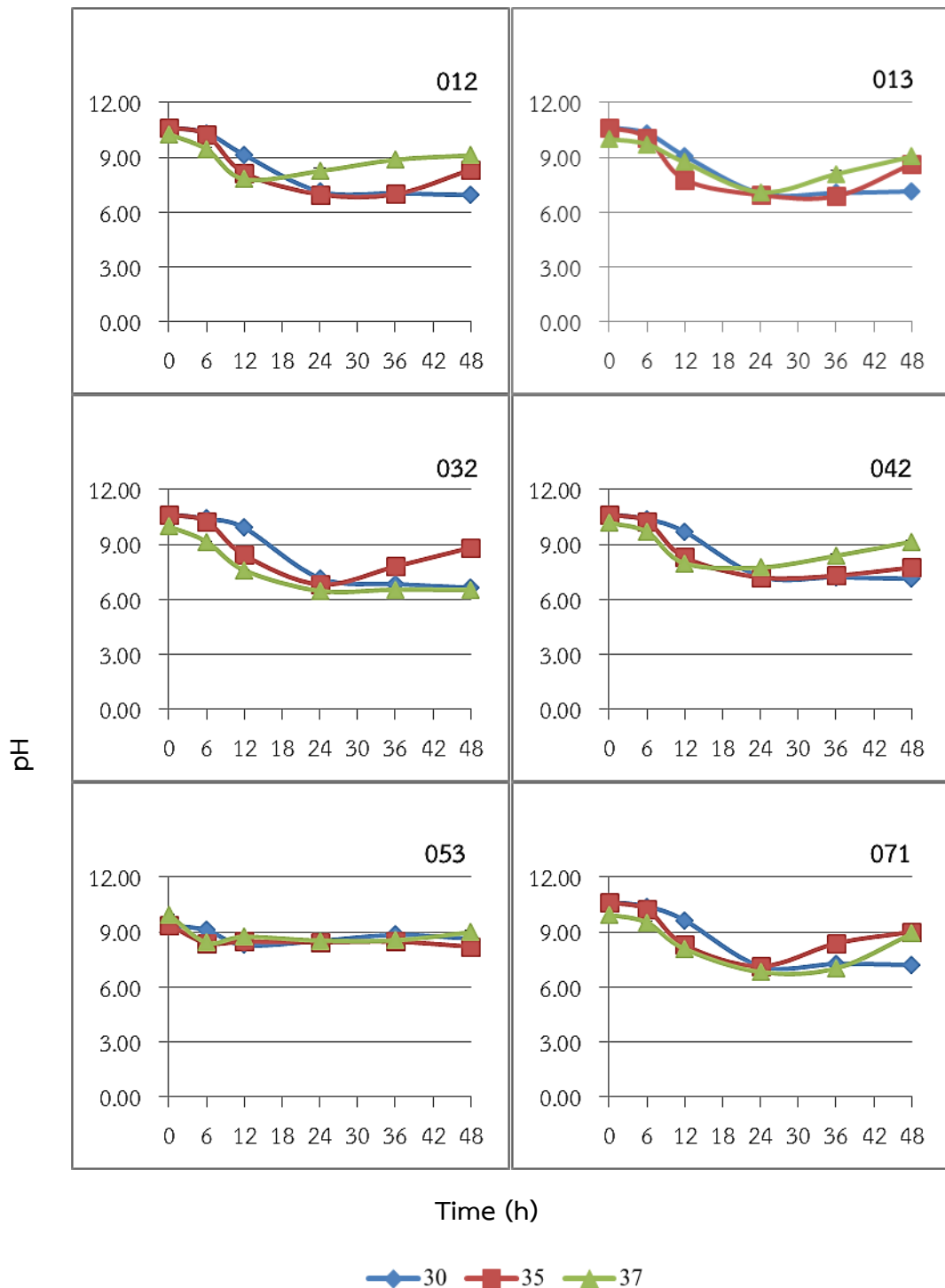
หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ )



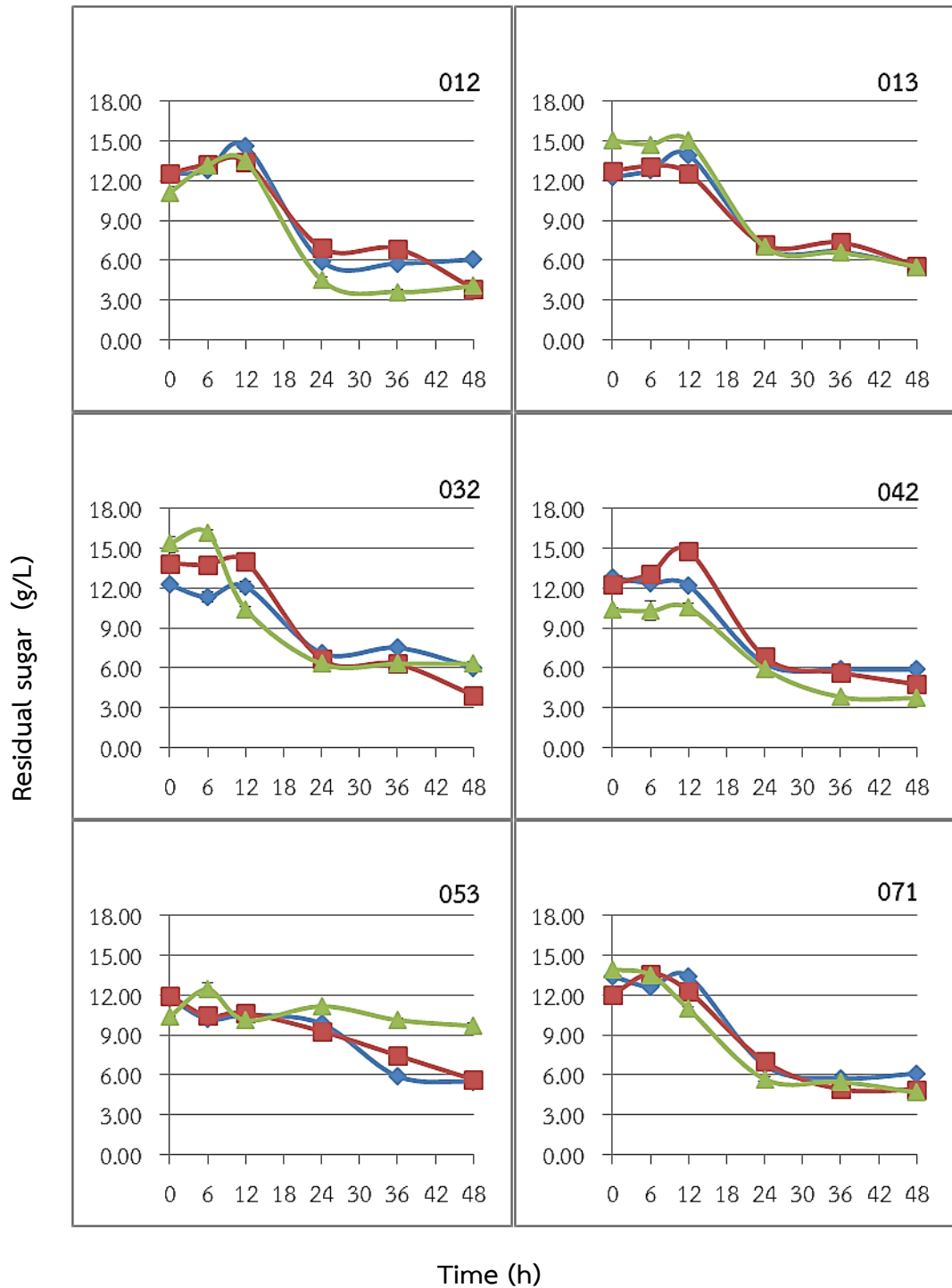


◆ 30    ■ 35    ▲ 37

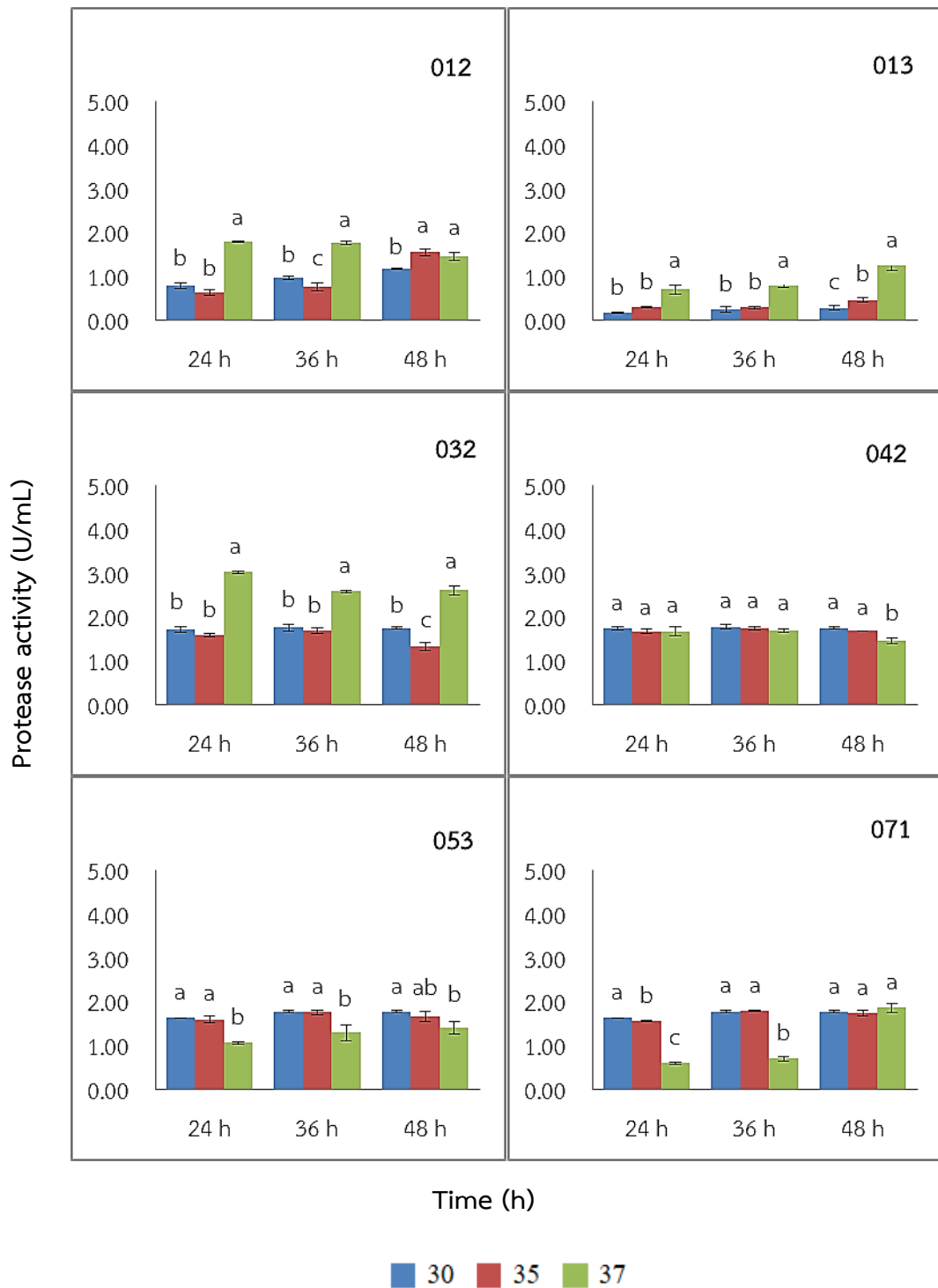
ภาพที่ 19 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท ในสูตรอาหาร BPMM โดยใช้เด็กซ์ทรีน เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหาร เท่ากับ 10 และเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ (bar = SD)



ภาพที่ 20 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM โดยใช้เต็ทริกซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 10 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 ระดับ (bar = SD)



ภาพที่ 21 ปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM โดยใช้เด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 10 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 ระดับ (bar = SD)



ภาพที่ 22 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกสายพันธุ์ในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 โดยใช้เด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 ระดับ ตัวอักษรยกกำลังที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (bar = SD)

#### 4.4 ผลการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูง โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนด้วยวิธี 16S rDNA sequencing

จากผลการทดลองในข้อ 4.3 ที่หาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เพื่อผลิตเอนไซม์ แล้วคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์สูงสุด พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์สูงสุด แตกต่างจากแบคทีเรียชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น  $p > 0.05$  คือ แบคทีเรียไอโซเลท 032 โดยสามารถวัดกิจกรรมและอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดได้เท่ากับ 3.02 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และ 0.126 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 13 จึงนำเชื้อแบคทีเรีย 032 ไปจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนด้วยวิธี 16S rDNA sequencing analysis พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cohnii* ที่ระดับ 98.27 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ง) โดยมีลักษณะโคโลนีเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดังภาพที่ 23 และลักษณะของเซลล์แบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า ดังภาพที่ 24

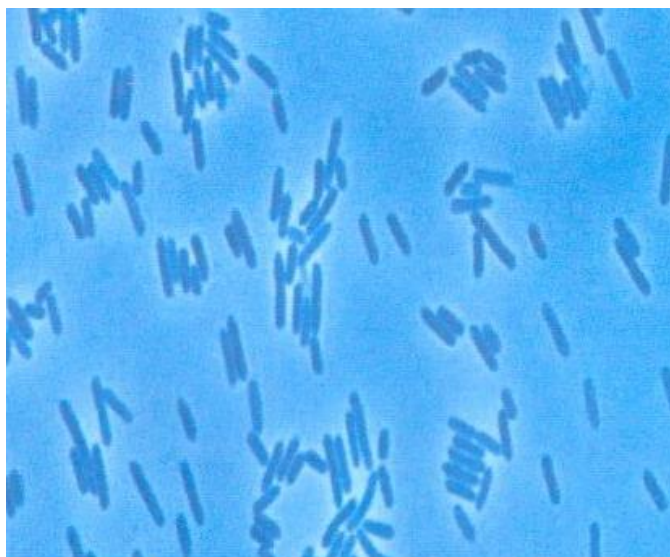
**ตารางที่ 13** เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหกสายพันธุ์ ในสภาวะที่ค่าพีเอชของอาหารเท่ากับ 10 และอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์	เวลา	กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด (U/mL)	อัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุด (U/mL/h <sup>-1</sup> )
012	24 ชั่วโมง	1.81±0.01 <sup>b</sup>	0.075±0.001 <sup>b</sup>
013	24 ชั่วโมง	0.71±0.11 <sup>d</sup>	0.029±0.004 <sup>d</sup>
<b>032</b>	<b>24 ชั่วโมง</b>	<b>3.02±0.03<sup>a</sup></b>	<b>0.126±0.001<sup>a</sup></b>
042	24 ชั่วโมง	1.68±0.11 <sup>b</sup>	0.070±0.005 <sup>b</sup>
053	24 ชั่วโมง	1.07±0.02 <sup>c</sup>	0.045±0.001 <sup>c</sup>
071	24 ชั่วโมง	0.61±0.02 <sup>d</sup>	0.025±0.001 <sup>d</sup>

$p > 0.05$



ภาพที่ 23 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย 032 (*B. cohnii*) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar ที่ 37 องศาเซลเซียส อายุ 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 24 ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรีย 032 (*B. cohnii*) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar ที่ 37 องศาเซลเซียส อายุ 24 ชั่วโมง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

#### 4.5 ผลการศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตอัลคาไลน์โปรตีนเอสจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cohnii* ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

##### 4.5.1 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus cohnii* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินภายในประเทศ สำหรับนำไปใช้ในการผลิตอัลคาไลน์โปรตีนเอส ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมซึ่งได้จากผลการทดลองในข้อ 3 ที่มีการแปรผันปัจจัยในการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ กัน ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 25 – 27 และตารางที่ 14

เมื่อพิจารณาการทดลองเพาะเลี้ยง *B. cohnii* แบบกะในการสภาวะการทดลองที่ 1 (ภาพที่ 25) ซึ่งเป็นการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงจากระดับฟลาสก์ ไปเป็นการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตรโดยใช้อาหาร BPMM ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และมีกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 2 เท่า เพื่อศึกษาการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียเมื่อมีปริมาณของสารอาหารในอาหารเพาะเลี้ยงเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งจากการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยดังกล่าว ไม่สามารถทำการทดลองได้ในการเพาะเลี้ยงระดับฟลาสก์ เนื่องจากการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในอาหารที่มีความเข้มข้นสูงจะถูกจำกัดโดยปริมาณอากาศที่มีอยู่เพียงในฟลาสก์เท่านั้น ทำให้ผลที่ได้ไม่เป็นไปตามลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอย่างแท้จริง จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาปัจจัยนี้ภายในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีการควบคุมการให้อากาศและการกวนอย่างเหมาะสมเพื่อหลีกเลี่ยงข้อจำกัดดังกล่าว นอกจากนี้ ในการทดลองมีการเติมสับสเตรทที่เป็นหางนมผง เข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และควบคุมพีเอชในระหว่างการเพาะเลี้ยงให้เท่ากับ 10 ตลอดทั้งกระบวนการ โดยใช้สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เข้มข้นร้อยละ 20 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่ออนาที และความเร็วใบกวนเท่ากับ 500 รอบต่ออนาที พบว่าภายใต้สภาวะดังกล่าว แบคทีเรีย *B. cohnii* มีการเจริญที่ต่ำมาก เห็นได้จากอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) ที่มีค่าเพียง  $0.167 \text{ h}^{-1}$  และค่าผลได้ของเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ ( $Y_{x/s}$ ) เท่ากับ 0.341 กรัมเซลล์ต่อกรัมกลูโคส และเมื่อพิจารณาการสร้างเอนไซม์ พบว่าการเพาะเลี้ยงที่สภาวะนี้ *B. cohnii* แทบไม่มีการสร้างเอนไซม์เลย โดยสามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดได้เพียง 0.07 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.002 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังนั้นจึงทำให้ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในการสร้างเอนไซม์มีค่าค่อนข้างต่ำตามไปด้วย ดังนี้ อัตราจำเพาะของการสร้างเอนไซม์ ( $q_p$ ) เท่ากับ 0.011 ยูนิตต่อชั่วโมงต่อกรัมเซลล์ ผลได้ของเอนไซม์ต่อน้ำตาลที่ใช้ ( $Y_{p/s}$ ) เท่ากับ 0.023 ยูนิตต่อกรัมกลูโคส และผลได้เอนไซม์จำเพาะ ( $Y_{p/x}$ ) เท่ากับ 0.067 ยูนิตต่อกรัมเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่าการควบคุมเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *B. cohnii* ภายใต้สภาวะการทดลองนี้ทำได้ยาก เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนในอาหารค่อนข้างมาก และมีการควบคุมค่าพีเอชภายในถังหมักให้อยู่ในระดับที่สูงตลอดเวลา จึงทำให้มีฟองเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากภายในถังหมัก ปริมาณของสารลดการเกิดฟอง (antifoam) ที่ใช้จึงมากตามไปด้วย ส่งผลให้การเจริญและการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียลดลง ดังนั้น ในการทดลองถัดไปจึง

เพาะเลี้ยง *B. cohnii* โดยกำหนดค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 10 ไม่มีการเติมสับสเตอร์ท และไม่มี การควบคุมค่าพีเอชของอาหารในระหว่างการเพาะเลี้ยง

เมื่อพิจารณาผลการทดลองเพาะเลี้ยง *B. cohnii* แบบกะในการสภาวะการทดลองที่ 2 (ภาพ ที่ 26) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้อาหาร BPMM พีเอช 10 ความเข้มข้น 2 เท่า ไม่มีการเติมหาง นมผงเพื่อใช้เป็นสับสเตอร์ท และไม่มี การควบคุมค่าพีเอชในระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที และความเร็วใบกวน เท่ากับ 500 รอบต่อนาที พบว่าภายใต้สภาวะดังกล่าว แบคทีเรีย *B. cohnii* มีการเจริญที่ดีขึ้นจากการ ทดลองที่ 1 เห็นได้จากค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) ที่เพิ่มขึ้นจาก 0.167 เป็น 0.437  $h^{-1}$  แต่ค่าผลได้ ของเซลล์ต่อกลูโคสที่ใช้กลับลดลงจาก 0.341 เป็น 0.231 กรัมเซลล์ต่อกรัมกลูโคส เป็นผลมาจากการ ที่แบคทีเรีนำกลูโคสไปใช้ในการสร้างเอนไซม์มากกว่าการสร้างเซลล์ เห็นได้จากกิจกรรมของเอนไซม์ และอัตราการผลิตเอนไซม์สูงสุดที่เพิ่มขึ้นจากการทดลองที่ 1 ถึง 80 และ 110 เท่า ตามลำดับ ทำให้ ค่าพารามิเตอร์ต่างในการสร้างเอนไซม์มีค่าสูงขึ้นด้วย โดยวัดค่าได้มีดังนี้ อัตราจำเพาะของการสร้าง เอนไซม์ ( $q_p$ ) เท่ากับ 1.113 ยูนิตต่อชั่วโมงต่อกรัมกลูโคส ผลได้ของเอนไซม์ต่อกลูโคสที่ใช้ ( $Y_p/s$ ) เท่ากับ 0.588 ยูนิตต่อกรัมกลูโคส และผลได้เอนไซม์จำเพาะ ( $Y_p/x$ ) เท่ากับ 2.546 ยูนิตต่อกรัมเซลล์ (ตารางที่ 14) จากผลการทดลองข้างต้นในการทดลองถัดไปจะทำการเพาะเลี้ยง *B. cohnii* ในอาหาร เพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเติมสับสเตอร์ทใด ๆ และไม่มี การควบคุมค่าพีเอชระหว่างการเพาะเลี้ยง เนื่องจาก เป็นวิธีการที่ให้ประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์สูงกว่า และควบคุมการเพาะเลี้ยงทำได้ง่ายกว่ามาก

เมื่อพิจารณาผลการทดลองเพาะเลี้ยง *B. cohnii* แบบกะในการสภาวะการทดลองที่ 3 (ภาพ ที่ 27) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อเปรียบเทียบอิทธิพลของความเข้มข้นของอาหารเพาะเลี้ยงที่มีต่อ การสร้างเอนไซม์ โดยใช้อาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 4 เท่า ภายใต้ สภาวะการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 พบว่า ลักษณะการเจริญของ *B. cohnii* ที่สภาวะนี้มี รูปแบบเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 กล่าวคือ แบคทีเรียมีการเจริญในระยะ log phase ที่ 0-12 ชั่วโมง โดยไม่มีระยะ lag phase แล้วเข้าสู่ระยะ stationary phase ที่เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง และการเพิ่ม ความเข้มข้นของอาหารเพาะเลี้ยงเป็น 4 เท่า ทำให้แบคทีเรีย *B. cohnii* มีอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) และค่าผลได้ของเซลล์ต่อกลูโคสที่ใช้ ( $Y_x/s$ ) เพิ่มขึ้นจากการใช้ความเข้มข้นของอาหารเพาะเลี้ยง 2 เท่า เล็กน้อย โดยมีค่าเท่ากับ 0.496  $h^{-1}$  และ 0.397 กรัมเซลล์ต่อกรัมกลูโคส และเมื่อพิจารณา ประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของ *B. cohnii* เมื่อเพาะเลี้ยงที่สภาวะนี้พบว่า อัตราจำเพาะของการ สร้างเอนไซม์ ( $q_p$ ) มีค่าสูงขึ้นจากเดิมเล็กน้อย วัดค่าได้เท่ากับ 1.175 ยูนิตต่อชั่วโมงต่อกรัมเซลล์ แต่ ค่าผลได้ของเอนไซม์ต่อกลูโคสที่ใช้ ( $Y_p/s$ ) มีค่าเพิ่มขึ้นค่อนข้างสูง จากเดิม 0.588 เป็น 0.940 ยูนิตต่อ กรัมกลูโคส ส่วนค่าผลได้เอนไซม์จำเพาะ ( $Y_p/x$ ) กลับมีค่าลดลงเล็กน้อย โดยมีค่าเท่ากับ 2.370 ยูนิต ต่อกรัมเซลล์ และที่เวลา 24 ชั่วโมงสามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุด ได้เท่ากับ 5.94 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.247 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการ ทดลองที่ 2 ที่ใช้ความเข้มข้นของอาหาร 2 เท่า จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น สรุปได้ว่าการใช้ ความเข้มข้นอาหารเพิ่มขึ้นเป็น 4 เท่า ไม่มีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญและการสร้างเอนไซม์



ของแบคทีเรีย *B. cohnii* เท่าใดนัก เห็นได้จากค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของการเจริญและการสร้างเอนไซม์ที่มีค่าใกล้เคียงกับการใช้ความเข้มข้นของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 2 เท่า และเนื่องจากการทดลองมุ่งเน้นไปที่การผลิตเอนไซม์อัลคาไลโนโปรตีนเอสและให้ความสำคัญกับค่า  $q_p$  ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงอัตราการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับมวลเซลล์และเวลา จึงใช้ค่าดังกล่าวในการพิจารณาสถานะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการนำไปศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ ดังนั้นจึงเลือกสถานะที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2 ที่เป็นสถานะที่มีค่า  $q_p$  สูง และต้นทุนราคาในการผลิตต่ำกว่าสถานะอื่นไปใช้เป็นสถานะในการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะสำหรับขั้นตอนต่อไป

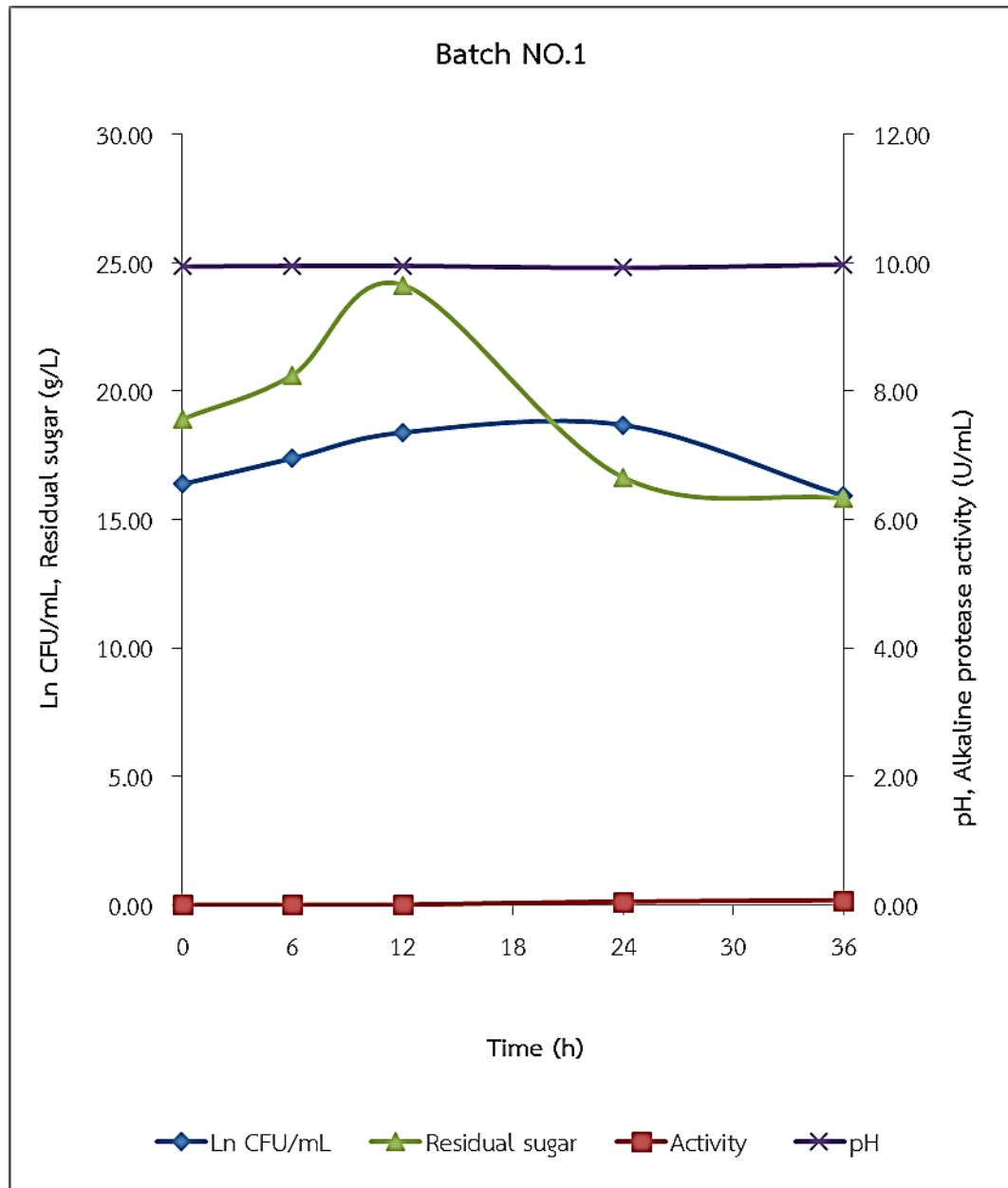
#### 4.5.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ

เมื่อพิจารณาผลการทดลองเพาะเลี้ยง *B. cohnii* แบบเติมกะ (ภาพที่ 28 และตารางที่ 14) ในถังหมักขนาด 5 ลิตรโดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture ด้วยอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนและกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตรในการทำงาน 1.5 ลิตร ไม่มีเติมสับสเตรทและไม่มีการควบคุมพีเอชตลอดการเพาะเลี้ยง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที และความเร็วใบกวนเท่ากับ 500 รอบต่อนาที จากนั้นทำการเติมอาหารที่ระยะ deceleration phase ด้วยอาหารที่มีองค์ประกอบและความเข้มข้นเดียวกันกับในถังหมัก อัตราคงที่ที่ 0.90 ลิตรต่อชั่วโมง พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) ของ *B. cohnii* เท่ากับ  $0.124 \text{ h}^{-1}$  และอัตราจำเพาะของการสร้างเอนไซม์ ( $q_p$ ) เท่ากับ 1.785 ยูนิตต่อชั่วโมงต่อกรัมกลูโคส ถ้าพิจารณาจากภาพที่ 28 จะเห็นว่าภายหลังจากการเติมอาหารกราฟการเจริญของเชื้อ ( $\ln \text{ CFU/mL}$ ) จะมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เนื่องจากยังคงเหลือปริมาณน้ำตาลในอาหาร ทำให้เชื้อสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มมวลเซลล์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการสร้างเอนไซม์ของเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากที่มีการเติมอาหารลงในถังหมัก จนกระทั่งเวลาในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 24 ชั่วโมง อัตราการสร้างเอนไซม์จึงลดลง ซึ่งการเพาะเลี้ยง *B. cohnii* ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเช่นนี้ ทำให้อัตราจำเพาะของการสร้างเอนไซม์และกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเพิ่มสูงขึ้นจากการเพาะเลี้ยงแบบกะ ที่ความเข้มข้นของอาหารเท่ากันถึง 1.6 เท่า และสามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดได้เท่ากับ 9.51 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.396 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

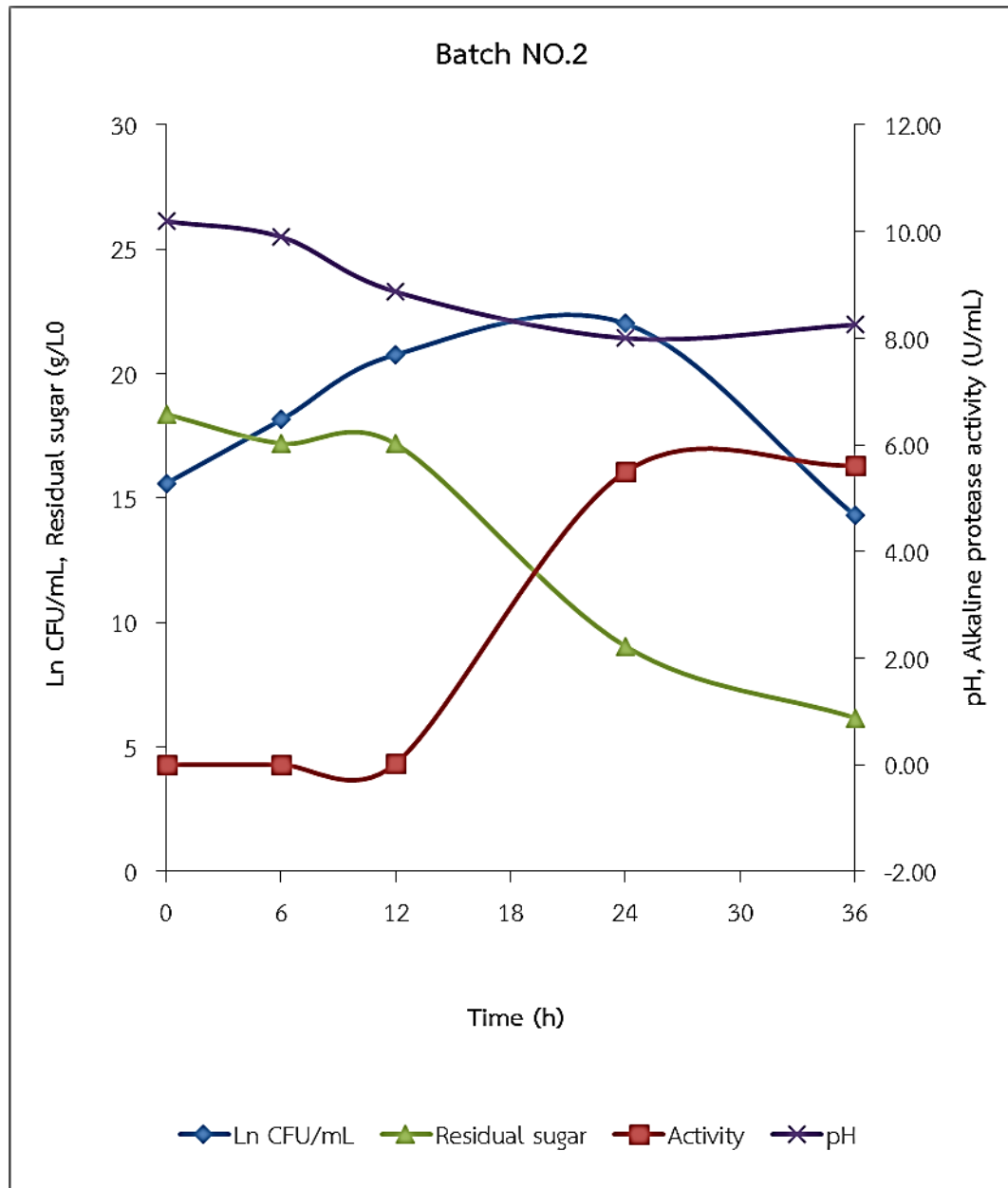
ตารางที่ 14 พารามิเตอร์การเจริญของ *B. cohnii* จากการเพาะเลี้ยงแบบกะ และแบบเติมกะ ในสภาวะต่าง ๆ กัน

NO.	Operation technique	Medium concentration	Substrate adding	pH control	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$q_p$ (unit/h/g cell)	$Y_{x/s}$ (g cell/g glucose)	$Y_{p/s}$ (unit/g glucose)	$Y_{p/x}$ (unit/g cell)	Max. APA (unit/mL)	Max. Productivity (unit/mL/h)
1	Batch	2x	1% skim milk	Yes	0.167	0.011	0.341	0.023	0.067	0.07	0.002
2	Batch	2x	-	No	0.437	1.113	0.231	0.588	2.546	5.61	0.229
3	Batch	4x	-	No	0.496	1.175	0.397	0.940	2.370	5.94	0.247
4	Fed-batch	2x	-	No	0.124	1.785	0.067	1.224	14.395	9.51	0.396

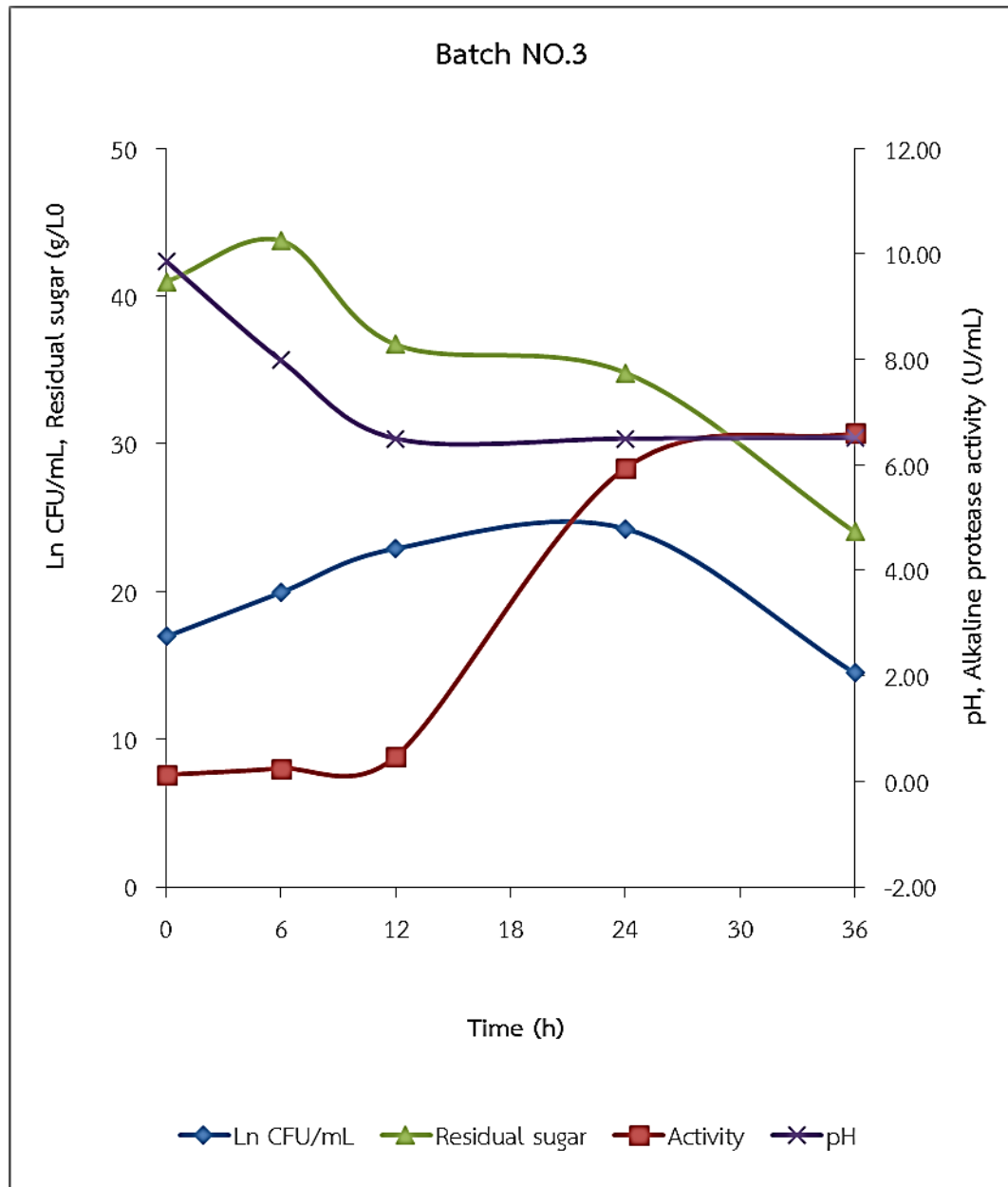
หมายเหตุ	$\mu$	คือ	อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)
	$q_p$	คือ	อัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (ยูนิตต่อชั่วโมงต่อกรัมกลูโคส)
	$Y_{x/s}$	คือ	ผลได้ของเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ (กรัมเซลล์ต่อกรัมกลูโคส)
	$Y_{p/s}$	คือ	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อน้ำตาลที่ใช้ (ยูนิตต่อกรัมกลูโคส)
	$Y_{p/x}$	คือ	ผลได้ผลิตภัณฑ์จำเพาะ (ยูนิตต่อกรัมเซลล์)



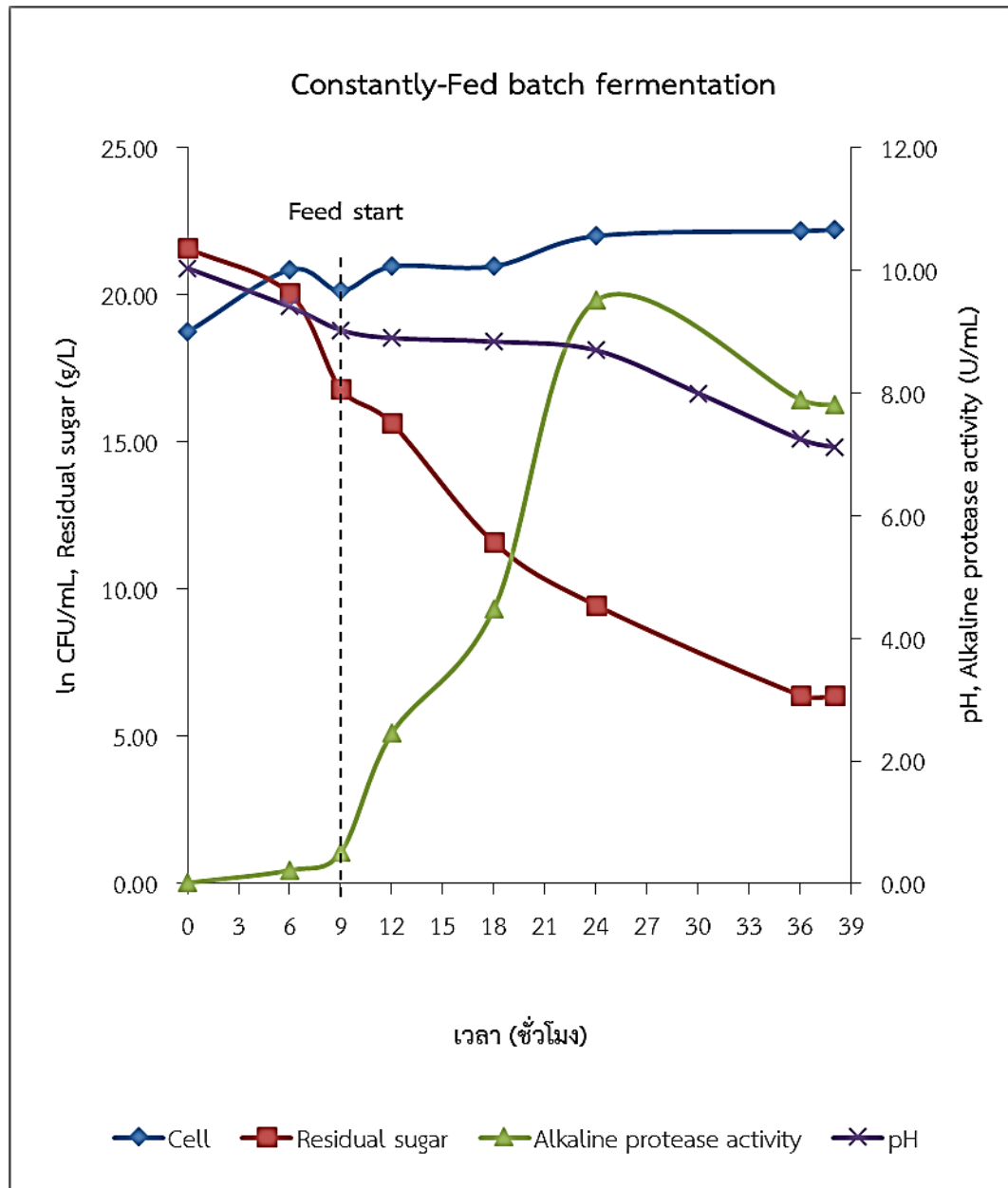
ภาพที่ 25 รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของ *B. cohnii* เมื่อเพาะเลี้ยงแบบกะ โดยใช้อาหาร BPMM เข้มข้น 2 เท่า ใช้หางนมผงเข้มข้น 1% (W/V) เป็นสับสเตรท ควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 10 ตลอดกระบวนการ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 VVM และความเร็วใบกวน 500 rpm (Batch No.1)



ภาพที่ 26 รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของ *B. cohnii* เมื่อเพาะเลี้ยงแบบกะ โดยใช้อาหาร BPMM เข้มข้น 2 เท่า พีเอช 10 ที่ไม่มีการเติมสับสเตรท ไม่มีการควบคุมค่า พีเอช อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 VVM และความเร็วใบกวน 500 rpm (Batch No.2)



ภาพที่ 27 รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของ *B. cohnii* เมื่อเพาะเลี้ยงแบบกะ โดยใช้อาหาร BPMM เข้มข้น 4 เท่า พีเอช 10 ที่ไม่มีการเติมสับสเตรท ไม่มีการควบคุมค่า พีเอช อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 VVM และความเร็วใบกวน 500 rpm (Batch No.3)

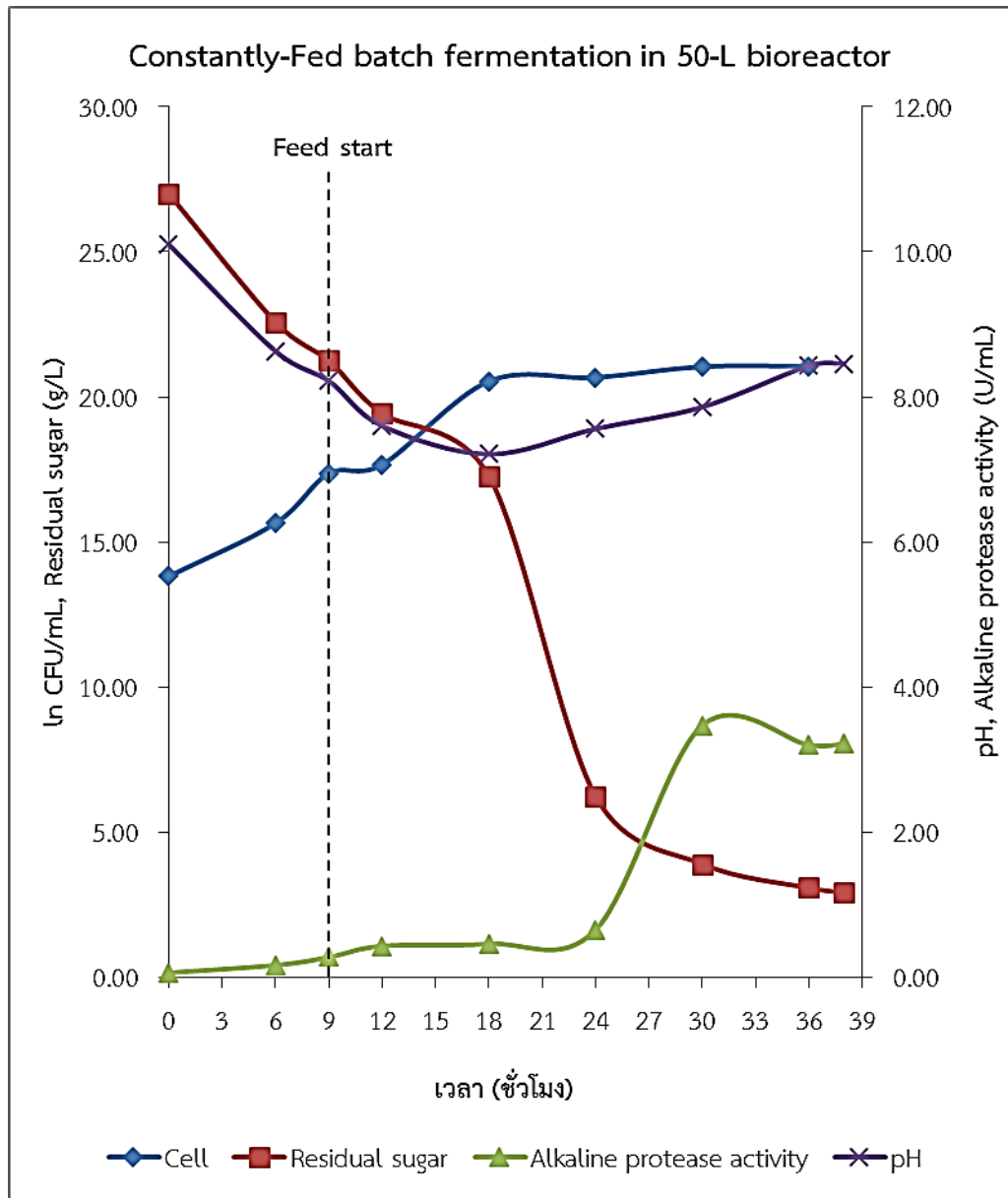


ภาพที่ 28 รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของ *B. cohnii* เมื่อเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ โดยใช้อาหาร BPMM เข้มข้น 2 เท่า พีเอช 10 ที่ไม่มีการเติมสับสเตรท ความเข้มข้นของอาหารที่ใช้เติม 1 เท่า ด้วยอัตราการคงที่ 0.90 L/h ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 VVM และความเร็วใบกวน 500 rpm

#### 4.6 การศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลโนโปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ในถังหมักขนาด 50 ลิตร

จากผลการทดลองในข้อ 4.5 ที่ศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิคในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. cohnii* เพื่อผลิตเอนไซม์อัลคาไลโนโปรตีเอสในถังหมักขนาด 5 ลิตร แสดงให้เห็นว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ (fed-batch fermentation) ช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ได้มากกว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch fermentation) ดังนั้นจึงเลือกใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะและสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างเอนไซม์จากผลการทดลองในถังหมักขนาด 5 ลิตร มาใช้ในการศึกษาการขยายขนาดการผลิตเพื่อขึ้นสู่ระดับอุตสาหกรรมในถังหมักขนาด 50 ลิตร

เมื่อพิจารณาผลการทดลองเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *B. cohnii* เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญและการสร้างเอนไซม์อัลคาไลโนโปรตีเอส หลังจากขยายขนาดกำลังการผลิตเพิ่มขึ้น 10 เท่า จากถังหมักขนาด 5 ลิตร ไปสู่ถังหมักขนาด 50 ลิตร (ตารางที่ 15 และภาพที่ 29) โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture ด้วยอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตรในการทำงาน 18 ลิตร ไม่มีการเติมสับสเตรทและไม่มีการควบคุมค่าพีเอชตลอดการเพาะเลี้ยง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที และความเร็วใบกวนเท่ากับ 320 รอบต่อนาที จากนั้นทำการเติมอาหารที่ระยะ deceleration phase ด้วยอาหารที่มีองค์ประกอบและความเข้มข้นเดียวกันกับในถังหมัก อัตราคงที่ที่ 1.20 ลิตรต่อชั่วโมง พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) ของ *B. cohnii* มีค่าเพิ่มสูงขึ้นจากการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งเดิมเท่ากับ  $0.124 \text{ h}^{-1}$  ไปเป็น  $0.352 \text{ h}^{-1}$  ถ้าพิจารณาจากภาพที่ 29 จะเห็นว่ากราฟการเจริญของเชื้อ *B. cohnii* ( $\text{Ln CFU/mL}$ ) หลังจากเติมอาหารที่เวลา 9 ชั่วโมง ยังมีการเจริญในระยะ Log phase อยู่ จนกระทั่งเข้าสู่ระยะ stationary phase ที่เวลา 18 ชั่วโมง ต่างจากการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่เมื่อทำการเติมอาหารที่ระยะ deceleration phase แล้ว เชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จากนั้นปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียจะคงที่จนถึงสิ้นสุดกระบวนการเพาะเลี้ยง และเมื่อพิจารณาการสร้างอัลคาไลโนโปรตีเอส พบว่าเชื้อแบคทีเรียใช้เวลาเพิ่มขึ้นในการผลิตเอนไซม์เพื่อให้ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุด ซึ่งจากเดิมในถังหมักขนาด 5 ลิตร วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดได้ที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยมีค่าเท่ากับ 9.51 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.396 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และมีค่าเหลือเพียง 3.47 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.096 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 15) เมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมและเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเดียวกันในถังหมักขนาด 50 ลิตร ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ค่าอัตราจำเพาะของการสร้างเอนไซม์ ( $q_p$ ) มีค่าลดลงตามไปด้วย โดยมีค่าเพียง 0.913 ยูนิตต่อชั่วโมงต่อกรัมกลูโคส เท่านั้น



ภาพที่ 29 รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของ *B. cohnii* เมื่อเพาะเลี้ยงแบบเติมกะในถังหมักขนาด 50 ลิตร โดยใช้อาหาร BPMM เข้มข้น 2 เท่า พีเอช 10 ที่ไม่มีการเติมสับสเตรท ความเข้มข้นของอาหารที่ใช้เติม 1 เท่า ด้วยอัตราการคงที่ 1.20 L/h ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 VVM และความเร็วใบกวน 320 rpm



ตารางที่ 15 พารามิเตอร์การเจริญของ *B. cohnii* จากการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร และ 50 ลิตร

NO.	Reactor size	Medium concentration	Substrate adding	pH control	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	$q_p$ (unit/h/g cell)	$Y_{x/s}$ (g cell/g glucose)	$Y_{p/s}$ (unit/g glucose)	$Y_{p/x}$ (unit/g cell)	Max. APA (unit/mL)	Max. Productivity (unit/mL/h)
1	5 L	2x	-	No	0.124	1.785	0.067	1.224	14.395	9.51	0.396
2	50 L	2X	-	No	0.352	0.913	0.071	0.184	2.592	3.47	0.096

หมายเหตุ	$\mu$	คือ	อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)
	$q_p$	คือ	อัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (ยูนิตต่อชั่วโมงต่อกรัมกลูโคส)
	$Y_{x/s}$	คือ	ผลได้ของเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ (กรัมเซลล์ต่อกรัมกลูโคส)
	$Y_{p/s}$	คือ	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อน้ำตาลที่ใช้ (ยูนิตต่อกรัมกลูโคส)
	$Y_{p/x}$	คือ	ผลได้ผลิตภัณฑ์จำเพาะ (ยูนิตต่อกรัมเซลล์)

#### 4.7 ผลการทำให้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอน

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยงอาหารเพาะเลี้ยง (Crude enzyme) มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นอิมัตว์ร้อยละ 0-20, 20-40, 40-60, และ 60-80 พบว่าสามารถตกตะกอนอัลคาไลน์โปรตีเอสได้ทุกความเข้มข้นอิมัตว์ของแอมโมเนียมซัลเฟต วัตถุประสงค์การจำเพาะของเอนไซม์ (Specific activity) ได้เท่ากับ 0.83, 0.97, 1.74 และ 1.93 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ดังตารางที่ 16 โดยที่การตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิมัตว์ร้อยละ 60-80 ทำให้ได้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุด และเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.7 เท่า

ตารางที่ 16 ผลการตกตะกอนอัลคาไลน์โปรตีเอสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิมัตว์ต่าง ๆ กัน

Saturation (%)	Total Protein Content (mg)	Total Protease Activity (Unit)	Specific Activity (Unit/mg)	Activity Yield (%)	Purification (Fold)
Crude enzyme	300.56	341.00	1.13	100.00	1.0
0-20	6.24	5.16	0.83	1.51	0.7
20-40	6.04	5.87	0.97	1.72	0.9
40-60	7.23	12.59	1.74	3.69	1.5
60-80	16.43	31.67	1.93	9.29	1.7

## 4.8 ผลการศึกษาสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

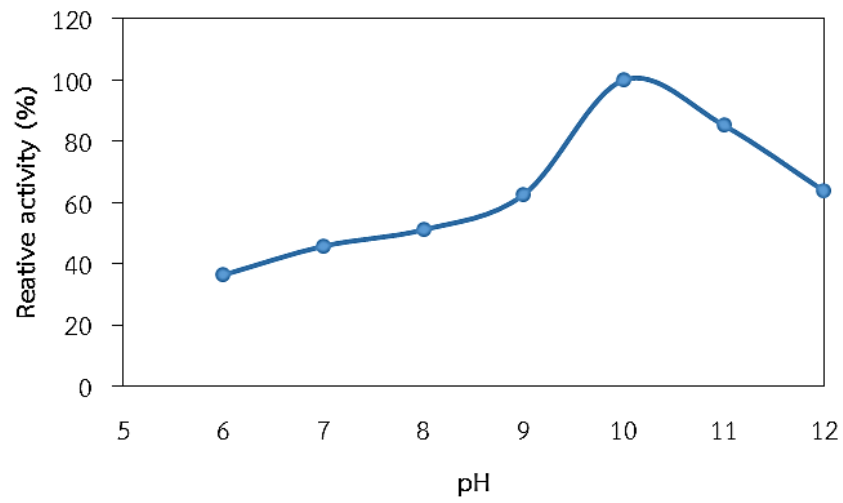
### 4.8.1 สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

#### 4.8.1.1 พีเอช

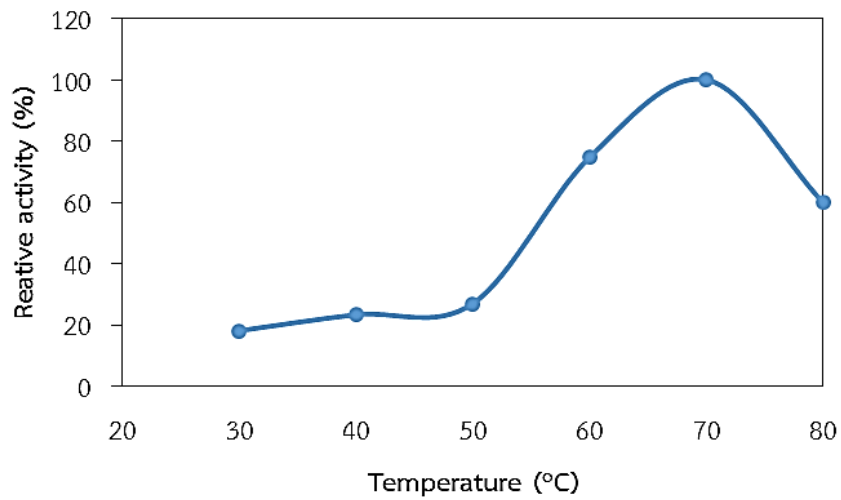
จากการศึกษาผลของค่าพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากแบคทีเรีย *B. cohnii* ที่ค่าพีเอชระหว่าง 6 ถึง 12 (ภาพที่ 30) พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ (Optimum pH) คือ พีเอช 10 ซึ่งมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ (Relative activity) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชประมาณ 9.5 ถึง 11 โดยยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง และเมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์ที่ค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 6 ถึง 10 พบว่าการเพิ่มค่าพีเอชส่งผลให้กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน โดยเพิ่มจาก 36 เปอร์เซ็นต์ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 6 เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 10 แต่ถ้าหากพีเอชมีค่าสูงกว่า 10 คือ ค่าพีเอชตั้งแต่ 10.5 ถึง 12 กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์จะเริ่มลดลงตามลำดับ จนเหลือเท่ากับ 64 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 12

#### 4.8.1.2 อุณหภูมิ

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากแบคทีเรีย *B. cohnii* ที่อุณหภูมิระหว่าง 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพที่ 31 พบว่าในช่วงแรกที่อุณหภูมิในการทดลองอยู่ระหว่าง 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์มีค่าค่อนข้างต่ำ โดยมีค่าเพียง 18, 23 และ 27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เท่านั้น แต่เมื่ออุณหภูมิในการทดลองเพิ่มสูงขึ้น กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ก็เพิ่มสูงตามไปด้วย และที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พบว่าเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (Optimum temperature) โดยเอนไซม์มีกิจกรรมการทำงานและให้ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และหากอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นมากกว่า 70 องศาเซลเซียส กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์จะมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วเหลือเพียง 60 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น



ภาพที่ 30 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลโนโปรตีเอสที่ได้จาก *B. cohnii*



ภาพที่ 31 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลโนโปรตีเอสที่ได้จาก *B. cohnii*

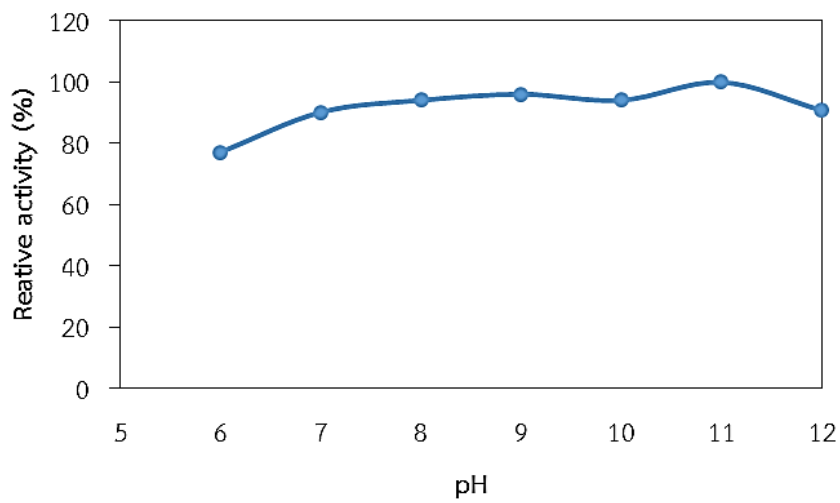
## 4.8.2 เสถียรภาพของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่สภาวะต่าง ๆ

### 4.8.2.1 พีเอช

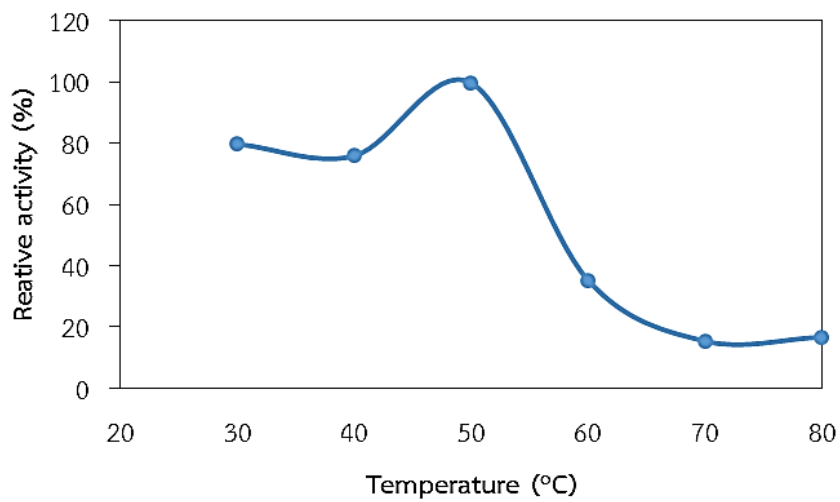
จากผลการศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส (Enzyme stability) ที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *B. cohnii* ที่พีเอชต่าง ๆ กัน โดยบ่มเอนไซม์ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอช 6 ถึง 12 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าเอนไซม์มีเสถียรภาพในช่วงพีเอชที่กว้างและค่อนข้างคงที่ในช่วงที่เป็นด่าง กล่าวคือ ในช่วงพีเอชระหว่าง 7 ถึง 12 ยังคงมีค่ากิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์สูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 11 และมีค่าลดลงเล็กน้อย (91 เปอร์เซ็นต์) ที่ค่าพีเอชเท่ากับ 12 ดังแสดงในภาพที่ 32

### 4.8.2.2 อุณหภูมิ

จากผลการศึกษาเสถียรภาพของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส (Enzyme stability) ที่ได้จากแบคทีเรีย *B. cohnii* ที่อุณหภูมิระหว่าง 30 ถึง 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าเอนไซม์มีเสถียรภาพในช่วงอุณหภูมิ 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส โดยยังมีค่ากิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์สูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงกว่า 55 องศาเซลเซียส เป็นต้นไป ค่ากิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์จะลดลง โดยมีค่า 35, 15 และ 17 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 33 ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *B. cohnii* ทนต่ออุณหภูมิสูงได้น้อยมาก



ภาพที่ 32 ผลของพีเอชต่อเสถียรภาพของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *B. cohnii*

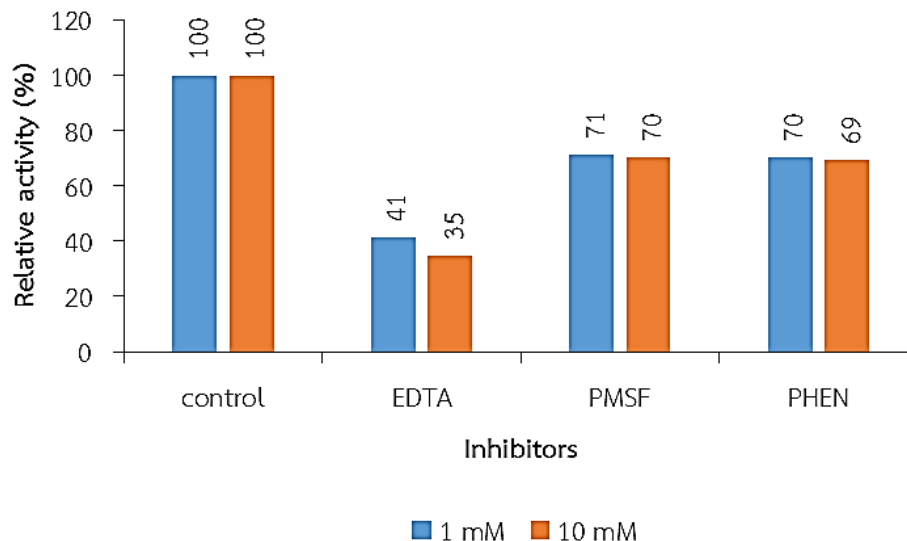


ภาพที่ 33 ผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *B. cohnii*

#### 4.8.3 ผลของสารยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

จากผลการศึกษาอิทธิพลของสารยับยั้ง (Inhibitors) ที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. cohnii* โดยบ่มเอนไซม์กับสารยับยั้งชนิดต่างๆ ได้แก่ ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), และ 1,10-phenantroline (PHEN) ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 34 พบว่าสารยับยั้งทั้ง 3 ชนิด มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ โดยที่สาร EDTA มีผลในการยับยั้งรุนแรงที่สุด โดยกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ ลดลงเหลือ 41 และ 35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งการเพิ่มความเข้มข้นของ EDTA ขึ้น 10 เท่า จากความเข้มข้น 1 เป็น 10 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้มีการลดลงของกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์เพียง 14 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น

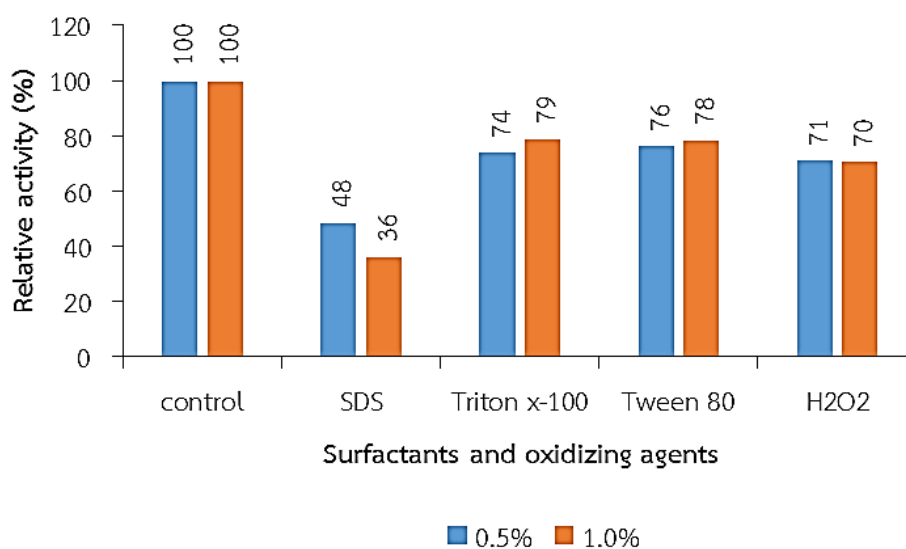
สำหรับสาร PMSF และ PHEN ส่งผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสได้ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ โดยมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์เหลืออยู่ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ แม้ว่า จะมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารยับยั้งทั้งสองชนิดเป็น 10 เท่า ก็ตาม



ภาพที่ 34 ผลของสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *B. cohnii*

#### 4.8.4 ผลของสารลดแรงตึงผิวและสารออกซิไดซ์ ต่อเสถียรภาพของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

จากผลการศึกษาอิทธิพลของสารลดแรงตึงผิวและสารออกซิไดซ์ (Surfactants & oxidizing agents) ที่มีต่อเสถียรภาพของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *B. cohnii* โดยบ่มเอนไซม์กับสาร sodium dodecyl sulfate (SDS), triton x-100, tween 80 และ hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) ความเข้มข้น 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 35 พบว่าเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสยังคงมีเสถียรภาพเมื่อถูกบ่มกับสาร triton x-100, tween 80 และ  $H_2O_2$  โดยมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ในสารทั้งสามชนิด แม้ว่าจะมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารจาก 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็น 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วก็ตาม แต่กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์จะลดลงค่อนข้างมากเหลือเพียง 48 และ 36 เปอร์เซ็นต์ เมื่อถูกบ่มร่วมกับสาร SDS ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *B. cohnii* ไม่มีความเสถียรเมื่อถูกบ่มร่วมกับสารลดแรงตึงผิวชนิดที่มีประจุลบ (Anionic surfactant) ได้แก่ SDS ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ แต่สามารถทนอยู่ได้ในสภาวะที่มีสารลดแรงตึงผิวชนิดที่ไม่มีประจุ (Nonionic surfactant) ได้แก่ triton x-100 และ tween 80 ที่ความเข้มข้นทั้ง 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสยังคงมีเสถียรภาพเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีสารฟอกขาว (Bleaching) ซึ่งก็คือ  $H_2O_2$  ที่ความเข้มข้นทั้งสองระดับ

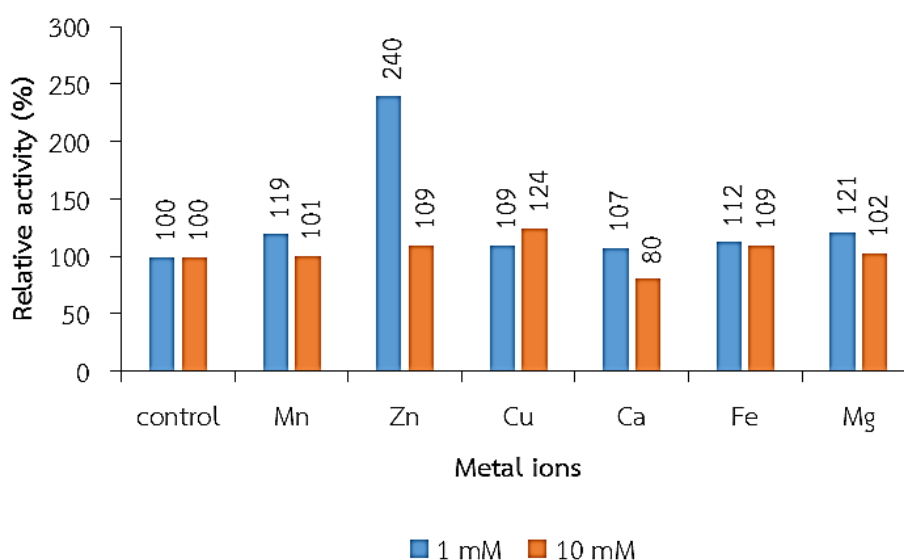


ภาพที่ 35 ผลของสารลดแรงตึงผิวและสารออกซิไดซ์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *B. cohnii*



#### 4.8.5 ผลของไอออนของโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสเฟส

จากผลการศึกษาอิทธิพลของไอออนของโลหะ (Metal ions) ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสเฟสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *B. cohnii* โดยบ่มเอนไซม์กับไอออนของโลหะชนิดต่าง ๆ ได้แก่  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  และ  $Mg^{2+}$  ความเข้มข้นสุดท้าย 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง พบว่าไอออนของโลหะทุกชนิดที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ช่วยกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมสัมพันธ์เพิ่มสูงขึ้นเกิน 100 เปอร์เซ็นต์ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งไอออนของ  $Zn^{2+}$  ที่เป็นตัวกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ที่สำคัญ ที่ทำให้เอนไซม์มีค่ากิจกรรมสัมพันธ์เพิ่มขึ้นถึง 240 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าการทดลองควบคุมที่ไม่ได้บ่มเอนไซม์กับไอออนของโลหะชนิดใด ซึ่งกำหนดให้มีค่ากิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 36 และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไอออนของโลหะชนิดต่างๆ ในการบ่มกับเอนไซม์เป็น 10 มิลลิโมลาร์ พบว่าไอออนของโลหะ  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  และ  $Mg^{2+}$  จะมีผลในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ลดต่ำลง แต่ยังคงมีค่ากิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์สูงกว่าชุดการทดลองควบคุม ยกเว้นไอออนของโลหะ  $Ca^{2+}$  ที่จะส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แทน ทำให้ค่ากิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ลดลงเหลือเพียง 80 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของไอออนของโลหะ  $Zn^{2+}$  ที่เป็นตัวกระตุ้นเอนไซม์ที่สำคัญเมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ กลับมีผลต่อการกระตุ้นเอนไซม์ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 10 เท่า เป็น 10 มิลลิโมลาร์ โดยที่กิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ลดลงถึง 131 เปอร์เซ็นต์ เหลือกิจกรรมเพียง 109 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น



ภาพที่ 36 ผลของไอออนของโลหะต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสเฟสที่ได้จาก *B. cohnii*

## บทที่ 5

### อภิปรายและสรุปผล

#### 5.1 อภิปรายผล

##### 5.1.1 การคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากตัวอย่างดินที่เก็บจากภายในประเทศ ทำได้โดยคัดแยกเชื้อจากดินบริเวณที่คาดว่าจะพบกลุ่มของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ดังกล่าว เช่น ดินจากบริเวณโรงงานนมและผลิตภัณฑ์นม โรงฆ่าสัตว์ และโรงงานฟอกหนัง เป็นต้น ซึ่งดินจากสถานที่เหล่านี้มักจะมีแหล่งของโปรตีนที่เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ และมีสภาวะที่เป็นต่างอันเกิดจากกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์หรือขั้นตอนชำระล้างด้วยสารเคมีที่เป็นต่าง ภายหลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการผลิต จึงทำให้มีสภาพเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่สามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอส จากนั้นนำตัวอย่างดินมาทำการคัดสรรเฉพาะ (Selection method) ด้วยสารอาหารที่จำเพาะต่อการเจริญ เพื่อให้สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ต้องการได้ง่ายขึ้น (ปราณี พัฒนพิพิศไพศาล, 2556) มีงานวิจัยหลายชิ้นที่นำหลักการเหล่านี้ไปใช้ในการคัดแยกหาแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ที่ต้องการ เช่น งานวิจัยของ จุฑาพร แสงแก้ว (2543) ที่ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. จากตัวอย่างน้ำทิ้งภายในตลาดสดของประเทศไทย ที่มีความสามารถในการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงสุดเท่ากับ 334.74 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BMSM พีเอช 11.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ต่อมาในปี 2548 สุธิดา แสงยนต์ ได้คัดแยกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ A39 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* จากตัวอย่างดินสวนลำไยในจังหวัดจันทบุรี ที่สามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงสุดเท่ากับ 233.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหาร BMSM พีเอช 10 นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Ashok and Prabhakar (2012) ที่ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. Agt ที่สามารถสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสได้จากของเสียเหลือทิ้งจากโรงงานฟอกหนัง เช่นเดียวกับงานของ Shrukla and Verma (2014) ที่ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ซึ่งสามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้จากตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณต่าง ๆ ในเมืองอัลลฮาบาด (Allahabad) ของประเทศอินเดีย

จากผลการทดลองสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอส จากตัวอย่างดินภายในประเทศได้ทั้งหมด 157 ไอโซเลท โดยพิจารณาจากการสร้างวงใสรอบโคโลนีเดี่ยว ๆ บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BMSM ที่มีหาปริมาณความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 10 และเมื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิต ด้วยการหาผลต่างของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสกับขนาดของโคโลนี (CZ-CO) พร้อมทั้งจัดกลุ่มตามระดับความสามารถในการสร้างเอนไซม์ เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์สูงภายใต้สภาวะที่เป็นต่าง พบว่าเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดจากทั้ง 4 กลุ่ม (CZ-CO มากกว่า 1.5 ซม.) มีจำนวนทั้งสิ้น 28 ไอโซเลท โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่ในกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียที่ คัดแยกได้จากโรงงานนม

และผลิตภัณฑ์นม จำนวนทั้งหมด 22 ไอโซเลท การที่พบแบคทีเรียจากตัวอย่างดินบริเวณนี้เป็นจำนวนมาก เป็นผลมาจากเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียมักจะมีความจำเพาะต่อสับสเตรทค่อนข้างกว้าง แต่จะมีกิจกรรมการทำงานสูงขึ้นเมื่อใช้เคซีน ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบมากถึงร้อยละ 80 ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำนม เป็นแหล่งของสับสเตรทในอาหารเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมการทำงานสูงขึ้นกว่าการใช้โปรตีนจากแหล่งอื่น เช่น ฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) หรือโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) เป็นต้น (Gupta et al., 2002; Kumar & Takagi, 1999) จึงทำให้พบแบคทีเรียที่ต้องการในตัวอย่างดินจากโรงงานนมและผลิตภัณฑ์นม ที่มีน้ำนมหลงเหลืออยู่ในของเสียเหลือทิ้งมากกว่าสถานที่อื่น ๆ

เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากการคัดเลือกเบื้องต้นบนอาหารแข็งทั้ง 28 ไอโซเลท มาทำการคัดเลือกต่อในอาหารเหลว BMSM ที่มีหางนมความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 10 พบว่าใช้เวลา 48 ชั่วโมง มีเชื้อแบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลท ที่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์สูงโดดเด่นกว่าสายพันธุ์อื่น ได้แก่ ไอโซเลท 032, 013, 012, 071, 053 และ 042 โดยสามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์ได้เท่ากับ 0.667, 0.635, 0.611, 0.555, 0.551 และ 0.549 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียทั้งหมดไอโซเลทเป็นแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างดินจากโรงงานนมและผลิตภัณฑ์นมทั้งหมด

### 5.1.2 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในระดับฟลasks

#### 5.1.2.1 สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

จากการศึกษาอิทธิพลของสูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส โดยใช้สูตรอาหารที่แตกต่างกัน 3 สูตร พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จำนวน 5 ไอโซเลท จากทั้งหมดหกไอโซเลท มีกิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงที่สุด เมื่อใช้อาหารสูตร BPMM เป็นอาหารเพาะเลี้ยง ส่วนแบคทีเรียที่เหลืออีกหนึ่งไอโซเลทนั้น มีกิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร PPMM

การที่อาหารสูตร BPMM และ PPMM ส่งผลให้แบคทีเรียมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงนั้น เป็นผลมาจากการที่อาหารทั้งสองชนิดมีแร่ธาตุและไอออนของโลหะชนิดต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบต่างจากอาหารสูตร BMSM ที่มีเพียงแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และสารเคมีที่ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ควบคุมค่าพีเอชของอาหารเท่านั้นเป็นองค์ประกอบ โดยทั่วไป การผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อจุลินทรีย์ มักจะมีการเติมไอออนของโลหะที่มีวาเลนซ์อิเล็กตรอน 2 อิเล็กตรอน (Divalent metal ions) เช่น ไอออนของแคลเซียม โคบอลต์ คอปเปอร์ โบรอน เหล็ก แมกนีเซียม แมงกานีส และโมลิบดีนัม เป็นต้น ลงในอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งจะไปมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มเสถียรภาพของเอนไซม์ (Enzyme stabilization) และช่วยป้องกันเอนไซม์ไม่ให้เสียสภาพเมื่อผ่านความร้อน โดยการรักษาโครงสร้างของเอนไซม์ (Enzyme conformation) ภายใต้อุณหภูมิสูง แต่การใช้ไอออนของโลหะเหล่านี้ในอาหารเพาะเลี้ยงจำเป็นต้องใช้ในปริมาณที่เหมาะสม หากใช้ในปริมาณมากเกินไปจะส่งผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แทน (Jisha et al., 2013; Bhunia et al., 2012; Kumar and Takagi, 1999)

องค์ประกอบของสูตรอาหารทั้ง BPMM และ PPMM มีการเสริมแร่ธาตุและไอออนของโลหะชนิดต่าง ๆ ดังที่กล่าวข้างต้น แต่ปัจจัยที่ทำให้แบคทีเรียมีกิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ในอาหารสูตร BPMM สูงกว่าอาหาร PPMM เป็นผลมาจากระดับความเข้มข้นและชนิดของแร่ธาตุและไอออนของโลหะในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน โดยที่อาหารสูตร BPMM มีจำนวนชนิดของแร่ธาตุและไอออนของโลหะที่หลากหลายกว่าและมีความเข้มข้นต่ำกว่าอาหารชนิด PPMM ถึง 1000 เท่า ซึ่งความเข้มข้นของแร่ธาตุและไอออนของโลหะที่ค่อนข้างสูงในอาหาร PPMM อาจมีผลยับยั้งการสร้างเอนไซม์แทน ดังนั้นการที่ระดับความเข้มข้นของแร่ธาตุและไอออนของโลหะในอาหาร BPMM ต่ำกว่า จึงอาจเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมและช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังเช่นงานวิจัยของ Ibrahim and Salamah (2009) ที่ทำการศึกษผลของสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรียชนิด *Bacillus halodurans* แล้วพบว่าไอออนของแมกนีเซียม แมงกานีส และแคลเซียมช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ โดยมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 893.75, 905.70 และ 918.54 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ส่วนไอออนของซิงค์ คอปเปอร์ และโคบอลต์ กลับมีผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์เมื่อใส่ลงในอาหารเพาะเลี้ยง และหากใช้ไอออนของแคลเซียม แมกนีเซียม และแมงกานีสรวมกันในอาหารเพาะเลี้ยงที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายผสมเท่ากับ 5 มิลลิโมลาร์ จะทำให้มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 1,381 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งมีค่าสูงกว่าการใช้ไอออนของโลหะชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียว

### 5.1.2.2 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

แหล่งของคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยง เป็นปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่งต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลักของเซลล์ คิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเซลล์แห้ง รวมถึงเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ถึง 53.8 เปอร์เซ็นต์ จึงทำให้ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในอาหารเพาะเลี้ยง มีอิทธิพลต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรียเป็นอย่างมาก ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตเอนไซม์โดยทั่วไป นิยมใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร แต่มักเกิดการยับยั้งการผลิตเอนไซม์เมื่อใช้ที่ระดับความเข้มข้นสูง อันเป็นผลเนื่องมาจากกระบวนการ catabolite repression ด้วยเหตุนี้ การหาแหล่งคาร์บอนทดแทนกลูโคสจึงเป็นทางเลือกหนึ่ง ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งในการทดลองนี้ แหล่งคาร์บอนทดแทนที่สนใจนำมาศึกษา คือ กลูโคส และเด็กซ์ทรีนที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง โดยที่เด็กซ์ทรีนเป็นโอลิโกเมอร์ของน้ำตาล ที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันของโมเลกุลกลูโคสด้วยจำนวนที่ไม่แน่นอนในแต่ละสาย และสามารถถูกย่อยสลายให้ได้เป็นกลูโคส ด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Glucosylase) ซึ่งงานวิจัยของ ขวัญฤทัย มาลัยเรือง (2556) ได้รายงานว่าการใช้ เด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนให้ประสิทธิภาพสูงกว่ากลูโคสทางการค้า เมื่อนำไปใช้ในอาหารเพาะเลี้ยง *E.coli* เพื่อผลิตมวลเซลล์ความเข้มข้นสูง

จากการศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรตีนของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหกไอโซเลท โดยเปรียบเทียบระหว่างแหล่งคาร์บอนที่เป็นกลูโคสทางการค้าและแหล่งคาร์บอนทดแทนดังกล่าว พบว่าแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันทั้ง 3 ชนิด มีประสิทธิภาพสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียส่วนใหญ่เพื่อผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีน ยกเว้นแบคทีเรีย 013 และ 053 ที่กลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังมีประสิทธิภาพสูงกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ๆ อย่างเห็นได้ชัด การที่เชื้อทั้งสองชนิดนี้สามารถใช้เด็กซ์ทรีนได้น้อยเป็นผลมาจากการที่เชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสำหรับใช้ย่อยเด็กซ์ทรีนให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสได้น้อยกว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น ดังนั้น ปริมาณของกลูโคสที่ถูกปล่อยเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ในการเจริญและการผลิตเอนไซม์จึงมีน้อย ทำให้วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ได้น้อยตามไปด้วย

ในบรรดาแหล่งคาร์บอนทดแทนที่นำมาศึกษา เด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนที่มีประสิทธิภาพสูงใกล้เคียงกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น โดยส่งเสริมให้แบคทีเรียมีการสร้างเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดในแบคทีเรียไอโซเลท 012, 032, 042 และ 071 ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ  $0.55 \pm 0.01$ ,  $0.53 \pm 0.01$ ,  $0.48 \pm 0.01$  และ  $0.48 \pm 0.01$  ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และมีอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดคือ  $0.023 \pm 0.001$ ,  $0.022 \pm 0.000$ ,  $0.020 \pm 0.000$  และ  $0.020 \pm 0.000$  ยูนิต์ต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังนั้น เด็กซ์ทรีนจึงเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตอัลคาไลน์โปรตีน เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงและต้นทุนราคาวัตถุดิบต่ำกว่าการใช้กลูโคสทางการค้าและกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง อีกทั้งยังสามารถใช้ที่ระดับความเข้มข้นสูง ๆ ได้ โดยมีความเสี่ยงที่จะถูกยับยั้งการสร้างผลิตภัณฑ์จากการเกิดกระบวนการ catabolite repression น้อยกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ซึ่งการใช้แหล่งคาร์บอนทดแทนที่มีลักษณะเช่นเดียวกันนี้สามารถพบได้ในงานวิจัยหลายชิ้น เช่น งานวิจัยของ Kocher and Joshi (2015) ที่พบว่าการใช้เปลือกมันฝรั่งเหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปมันฝรั่งมาเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนเคซีนในอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนจากเชื้อ *Bacillus circulans* MTCC 7906 ทำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 10.513 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อนาที่ ซึ่งเพิ่มขึ้นจากการใช้เคซีนเป็นแหล่งคาร์บอนถึง 2.4 เท่า ที่เวลา 96 ชั่วโมง ส่วนงานวิจัยของ Rathod and Pathak (2014) ได้ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแหล่งคาร์บอนสังเคราะห์ (Synthetic carbon sources) กับของเสียเหลือทิ้งที่ได้จากการเกษตรกรรมและโรงงานอุตสาหกรรม พบว่าการใช้น้ำตาลโมลาสจากอ้อย (Sugarcane molasses) เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus alcalophilus* LW8 เพื่อผลิตอัลคาไลน์โปรตีน ให้ผลดีกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่น โดยวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดได้เท่ากับ  $564 \pm 1.73$  ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร เป็นต้น

### 5.1.2.3 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

แบคทีเรียสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนทั้งในรูปของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ในการสร้างกรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก โปรตีนต่าง ๆ และองค์ประกอบของผนังเซลล์ เพื่อการเจริญและการผลิตผลิตภัณฑ์ โดยเซลล์ของแบคทีเรียส่วนใหญ่จะมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 14 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และในอัลคาไลน์โปรตีนจะมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณร้อยละ

15.6 ดังนั้นแหล่งของไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตเอนไซม์ การผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสโดยทั่วไป นิยมใช้แหล่งไนโตรเจนร่วมกันหลายชนิด (complex nitrogen source) ซึ่งมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ดังนั้นการศึกษาและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแหล่งไนโตรเจนทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์จึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

การศึกษาประสิทธิภาพของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ในอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหกไอโซเลท พบว่าแหล่งไนโตรเจนชนิดที่เป็นสารอินทรีย์มีประสิทธิภาพสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ โดยที่กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนชนิดสารอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด เนื่องจากให้ค่ากิจกรรมและอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดในเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 013, 032, 042, 053 และ 071 ซึ่งวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดได้ที่เวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ  $1.93 \pm 0.03$ ,  $2.59 \pm 0.26$ ,  $0.54 \pm 0.01$ ,  $1.76 \pm 0.06$  และ  $2.52 \pm 0.09$  ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ  $0.080 \pm 0.001$ ,  $0.108 \pm 0.011$ ,  $0.023 \pm 0.000$ ,  $0.074 \pm 0.002$  และ  $0.105 \pm 0.004$  ยูนิต์ต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากเนื้อวัวและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนชนิดสารอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพดีรองลงมา การที่กากถั่วเหลืองมีประสิทธิภาพช่วยส่งเสริมการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรีย เนื่องจากกากถั่วเหลืองเป็นของเสียเหลือทิ้งของกระบวนการผลิตน้ำมันถั่วเหลือง ที่มีการสกัดเอากรดไขมันไม่อิ่มตัวออกจากเมล็ดถั่วไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ และคงเหลือส่วนที่เป็นโปรตีนทั้งชนิดอินทรีย์และอนินทรีย์ในส่วนที่เป็นกากมากถึง 40 เปอร์เซ็นต์ จึงทำให้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนชั้นดีสำหรับการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส (Kumar, Joo, Koo, & Chang, 2004) นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์ได้น้อย เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดที่เป็นสารอนินทรีย์ ซึ่งเป็นผลจากการที่แบคทีเรียสามารถย่อยสลายแหล่งไนโตรเจนเหล่านี้ เช่น โซเดียมไนเตรท และโพแทสเซียมไนเตรท ได้รวดเร็วกว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ ดังนั้น กรดอะมิโนหรือไอออนของแอมโมเนียมที่ได้จากการย่อยสลายจึงถูกนำไปใช้ในการเจริญและการสร้างมวลเซลล์มากกว่านำไปใช้สร้างเอนไซม์ (Kumar and Takagi, 1999) ซึ่งผลที่ได้เป็นไปทิศทางเดียวกันกับงานวิจัยของ Nadeem, Qazi, Baig, & Syed (2008) ที่ศึกษาอิทธิพลขององค์ประกอบต่าง ๆ ในอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus licheniformis* N-2 และพบว่าการใช้กากถั่วเหลืองในอาหาร ทำให้แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุด ในขณะที่แหล่งไนโตรเจนชนิดที่เป็นสารอนินทรีย์ซึ่งอยู่ในรูปของเกลือแอมโมเนียมมีผลยับยั้งการสร้างเอนไซม์ ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์มีค่าลดลงมากถึง 60 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Saurabh, Jasmine, Pritesh, & Rajendra Kumar (2007) ที่พบว่าการใช้กากถั่วเหลืองความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในอาหารเพาะเลี้ยง ทำให้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. (SBP-29) ที่แยกได้จากตัวอย่างดินของโรงงานแปรรูปสัตว์ปีก มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส สูงสุดเท่ากับ 3,028 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ Joo และ Chang (2005) ได้รายงานว่าการใช้กากถั่วเหลืองความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใน

อาหารเพาะเลี้ยง ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. I-312 ได้เช่นเดียวกัน ซึ่งวัดกิจกรรมของเอนไซม์ได้ 10,520 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

#### 5.1.2.4 ค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

ค่าพีเอชในอาหารเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยสำคัญในการสร้างเอนไซม์และการลำเลียงสารผ่านเข้าออกเซลล์ของแบคทีเรียชนิดต่าง (Alkalophilic bacteria) ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากระบบการขนส่งอิเล็กตรอนเข้าออกเซลล์ของแบคทีเรียชนิดต่างโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มที่เป็น obligate alkalophilic bacteria ต้องอาศัยโซเดียมไอออน ในการช่วยลำเลียงโปรตรอนผ่านเข้าออกเซลล์ด้วยวิธี  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter ที่จะลำเลียงสารทั้งสองชนิดผ่านเมมเบรนแบบสวนทางกัน เกิดเป็นสภาวะ proton gradient ขึ้น ส่งผลให้มีแรง proton motive force ช่วยลำเลียงอิเล็กตรอนผ่านเซลล์และเกิดการสร้าง ATP ขึ้น การลำเลียงผ่านเซลล์ด้วยวิธีนี้ แตกต่างจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่อาศัยความต่างศักย์ระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ จนเกิดแรง proton motive force ช่วยลำเลียงสารจากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์ (Horikoshi, 1999) ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาเพื่อหาค่าพีเอชที่เหมาะสมในอาหารเพาะเลี้ยงที่ช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์จากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดไอโซเลท

จากการศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีต่อการสร้างอัลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดไอโซเลท พบว่าการใช้ค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 10 ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียทุกชนิดมีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์สูงที่สุด โดยแตกต่างจากการใช้ค่าพีเอชอื่น ๆ ในอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสามารถวัดค่ากิจกรรมและอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดได้ที่เวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อแบคทีเรีย 012, 032 และ 042 มีค่าเท่ากับ  $1.95 \pm 0.02$ ,  $3.02 \pm 0.03$ ,  $1.91 \pm 0.13$  ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ  $0.081 \pm 0.001$ ,  $0.126 \pm 0.001$ ,  $0.080 \pm 0.005$  ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และที่เวลา 48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อแบคทีเรีย 013, 053 และ 071 ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $1.47 \pm 0.14$ ,  $2.00 \pm 0.00$ ,  $2.46 \pm 0.15$  ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ  $0.031 \pm 0.003$ ,  $0.042 \pm 0.000$ ,  $0.051 \pm 0.003$  ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยหลายชิ้นที่พบว่า การใช้ค่าพีเอชเท่ากับ 10 ในอาหารเพาะเลี้ยง ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของแบคทีเรีย ดังเช่นงานวิจัยของ Genckal and Tari (2006) ที่รายงานว่า การใช้ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 10 ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. L18 และ L21 ทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงที่สุดเช่นเดียวกับ Smita และคณะ (2012) ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อ *Serratia liquefaciens* และสามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดได้เท่ากับ 66.23 พียูต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีค่าพีเอช 10 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

#### 5.1.2.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่งในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์ และมีความเหมาะสมแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ กลไกที่อุณหภูมิควบคุมการสร้างเอนไซม์ในจุลินทรีย์นั้นยังไม่เป็นที่แน่ชัด แต่งานวิจัยของ Frankena, Koningstein, van Verseveld, &

Stouthamer (1986) แสดงให้เห็นถึงความเกี่ยวเนื่องกันของกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์กับระบบเมตาบอลิซึมของพลังงานในเชื้อบาซิลลัส ซึ่งถูกควบคุมด้วยอุณหภูมิและปริมาณการให้อากาศ

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสของแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท โดยการแปรผันค่าให้แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าสภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำให้เชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์มากกว่าที่สภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยให้ผลดีในแบคทีเรีย 012, 013, 032 และ 042 สามารถวัดค่ากิจกรรมและอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดได้เท่ากับ  $1.81 \pm 0.01$ ,  $0.71 \pm 0.11$ ,  $3.02 \pm 0.03$ ,  $1.68 \pm 0.11$  ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และ  $0.075 \pm 0.001$ ,  $0.029 \pm 0.004$ ,  $0.126 \pm 0.001$ ,  $0.070 \pm 0.005$  ยูนิต์ต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรีย 042 มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน แม้ว่าจะถูกเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างกันก็ตาม ส่วนแบคทีเรียไอโซเลท 053 และ 071 จะมีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์สูงเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิมิค่าเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส แล้วส่งผลให้มีการสร้างเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นนั้น เป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยของ Banerjee, Sami, Azmi, & Soni (1999) ที่พบว่าแบคทีเรีย *B. brevis* สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร complete medium ที่พีเอชเท่ากับ 10 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส รวมถึงงานวิจัยของ Sankareswaran, Anlabagan, & Prabhavathi (2014) ที่พบว่าการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินในสภาวะที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 9 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำให้ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสสูงที่สุด

### 5.1.3 จำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงด้วยวิธี 16S rDNA sequencing

การวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนด้วยวิธี 16S rDNA sequencing เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย เนื่องจากแบคทีเรียจะมี 16S rDNA gene ซึ่งเป็นยีนที่จะถูกถอดรหัสได้เป็น 16S rRNA แล้วประกอบกับ ribosomal protein ชนิดอื่นได้เป็นไรโบโซม ที่มีความแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด และมีบางช่วงในสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene ที่มีความเหมือนกันในแบคทีเรียทุกชนิดด้วยเช่นกัน จึงทำให้สามารถจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้

เมื่อใช้วิธีการ 16S rDNA sequencing ดังกล่าวข้างต้น มาจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียสายพันธุ์ 032 พบว่ามีความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cohnii* ที่ระดับ 98.27 เปอร์เซ็นต์ เชื้อแบคทีเรีย *B. cohnii* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกชนิด obligate alkaliphiles ที่มีการสร้างสปอร์ทรงรี (Oval spores) บริเวณผนังเซลล์พบกรดอนิทีนและกรดแอสปาร์ติกแทนกรดโดอะมิโนไฟเมลิกอย่าง ที่พบในแบคทีเรียบางชนิด เจริญได้ในอุณหภูมิระหว่าง 10 – 47 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์สามารถย่อยแป้ง, pullulan, hippurate, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, เจลาติน และเคซีนได้ (Spanka and Fritze, 1993) มีความปลอดภัยทางชีวภาพระดับ 1 (Biosafety level 1) โดยการรับรองของศูนย์เก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์แห่งชาติ Leibniz Institute DSMZ-German



Collection of Microorganisms and Cell Cultures ประเทศเยอรมนี การใช้แบคทีเรีย *B. cohnii* เพื่อผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส ถูกพบในงานวิจัยของ Tekin และคณะ ในปี 2012 ที่ศึกษาการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรีย *B. cohnii* APT5 ซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณที่ล้างรถในเขตพื้นที่ Besevler ของเมือง Ankara ประเทศตุรกี และพบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 10.0 แต่สามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเคซีนเป็นองค์ประกอบ พีเอชเท่ากับ 11 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยวัฏจักรกรรมของเอนไซม์ได้เท่ากับ 693,318 ยูนิตต่อนาที่ นอกจากนี้ยังพบว่าคุณสมบัติของอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ มีแนวโน้มที่ดีในการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อุตสาหกรรมสารซักล้าง

ด้วยคุณสมบัติที่โดดเด่นของแบคทีเรียจีส *Bacillus* ซึ่งได้แก่ *B. licheniformis*, *Bacillus* sp., *B. subtilis* และ *B. alcalophilus* ในการผลิตเอนไซม์ชนิดหลังออกมาภายนอกเซลล์อย่างมีประสิทธิภาพ และได้รับการรับรองความปลอดภัยเมื่อใช้ในยาและอาหาร (Generally recognized as safe: GRAS) (Jisha et al., 2013) ทำให้แบคทีเรียในกลุ่มนี้เป็นที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอส เห็นได้บริษัทขนาดใหญ่ต่าง ๆ ที่ผลิตเอนไซม์ทางการค้า เช่น Genencor International (สหรัฐอเมริกา), Gist-Brocades (เนเธอร์แลนด์), Solvay Enzymes (เยอรมนี) และ Enzyme Development (สหรัฐอเมริกา) เป็นต้น ใช้แบคทีเรียในสกุล *Bacillus* สำหรับการผลิตเอนไซม์ (Bhunja et al., 2012) ดังนั้น แบคทีเรีย *B. cohnii* ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณโรงงานนมและผลิตภัณฑ์นมภายในประเทศ จึงมีแนวโน้มที่จะสามารถนำไปใช้ในการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสทางอุตสาหกรรมได้ จึงต้องศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์เมื่อมีการขยายกำลังการผลิตต่อไป

#### 5.1.4 ประสิทธิภาพของเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch Fermentation)

เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch fermentation) เป็นเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ โดยจะทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบปิด มีการเติมเชื้อจุลินทรีย์และเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์เสร็จสิ้นในครั้งเดียวตามระยะเวลาที่กำหนด ซึ่งเทคนิคการเพาะเลี้ยงชนิดนี้มีข้อดีคือ การติดตั้งและควบคุมระบบสามารถทำได้ง่าย เหมาะสำหรับการผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites)

การศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ ที่มีต่อการสร้างอัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรีย *B. cohnii* โดยใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมจากผลการทดลองในข้อ 3 และมีการแปรผันปัจจัยอื่น ๆ ในการเพาะเลี้ยง ได้แก่ การควบคุมค่าพีเอชในระหว่างการเพาะเลี้ยง และความเข้มข้นของอาหารที่ใช้ พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของอาหารสูตร BPMM พีเอช 10 ที่ความเข้มข้น 2 เท่า ไม่มีการเติมสับสเตรท และไม่มีการควบคุมค่าพีเอชตลอดการเพาะเลี้ยง ทำให้เชื้อแบคทีเรีย *B. cohnii* มีประสิทธิภาพในการเจริญและการสร้างเอนไซม์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารที่ความเข้มข้นเดียวกัน แต่มีการควบคุมค่าพีเอชในระหว่างการเพาะเลี้ยงให้เท่ากับ 10 ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เห็นได้จากค่าพารามิเตอร์ในการเจริญและการสร้างเอนไซม์

มีค่าเพิ่มสูงขึ้นจากเดิมมาก โดยวัดค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) ได้เท่ากับ  $0.437 \text{ h}^{-1}$  อัตราจำเพาะของการสร้างเอนไซม์ ( $q_p$ ) ได้เท่ากับ  $1.113$  ยูนิตต่อชั่วโมงต่อกรัมกลูโคส และมีกิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ  $5.61$  ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ  $0.229$  ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

ผลการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของอาหารที่เพิ่มขึ้นต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรีย *B. cohnii* ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มความเข้มข้นของอาหารเพาะเลี้ยงจากเดิม 2 เท่า เป็น 4 เท่า ส่งผลให้ *B. cohnii* มีการเจริญและการสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เช่นเดียวกับงานของ กฤษดากร จริโมภาส (2549) ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus* sp. ที่ชอบต่างในอาหารเหลวด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ ภายใต้สภาวะที่ปริมาณของกลูโคสต่างกัน พบว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสในอาหาร 2 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ *Bacillus* sp. มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) และอัตราจำเพาะของการสร้างเอนไซม์ ( $q_p$ ) สูงที่สุด ซึ่งสาเหตุของการลดลงของการเจริญหรือการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรีย อาจเป็นผลมาจากกระบวนการ catabolite repression ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น หรือการขาดสารอาหารบางชนิดที่จำเป็นต่อการสร้างเอนไซม์ โดยเฉพาะแหล่งไนโตรเจน ที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ถึง 15 เปอร์เซ็นต์ แต่เนื่องจากเวลาการทำวิจัยครั้งนี้มีจำกัด การศึกษาอิทธิพลของปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้จึงเป็นแนวทางในการทำวิจัยขั้นถัดไป

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรีย *B. cohnii* เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร ดังแสดงในภาพที่ 4-25-4-27 พบว่ามีแนวโน้มที่จะเป็นไปในลักษณะ growth associated pattern ที่เอนไซม์จะถูกผลิตขึ้นตามการเจริญของจุลินทรีย์ และมีการสร้างเอนไซม์อย่างรวดเร็วในช่วง deceleration phase และ stationary phase เนื่องจากแบคทีเรียจะใช้สารตั้งต้นของกรดนิวคลีอิกเป็นจำนวนมากในระยะ log phase เพื่อสังเคราะห์ Ribosomal RNA หรือ rRNA ที่มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ส่งผลให้ปริมาณกรดนิวคลีอิกใน metabolic pool หลงเหลือสำหรับการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสน้อย แต่เมื่อเข้าสู่ระยะ stationary phase ที่เชื้อหยุดการเจริญ กรดนิวคลีอิกจึงจะถูกนำไปใช้ในการเจริญน้อยลง ทำให้มีปริมาณกรดนิวคลีอิกเหลือพอสำหรับการนำไปใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์มากกว่าในระยะที่เชื้อกำลังมีการเจริญเติบโต (Moon and Parulekar, 1991)

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch fermentation) ที่มีต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรีย *B. cohnii* นั้น แสดงให้เห็นว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยงชนิดนี้ ช่วยส่งเสริมให้เชื้อแบคทีเรียมีการเจริญและการสร้างเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อใช้ความเข้มข้นของอาหารเพาะเลี้ยงหรือความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเพิ่มขึ้นถึงระดับใดระดับหนึ่งเท่านั้น หากความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเกินระดับที่เหมาะสม จะเกิดการยับยั้งการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียด้วยกระบวนการ catabolite repression ซึ่งเป็นการยับยั้งอย่างถาวร ดังนั้นการศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิคการเพาะเลี้ยงชนิดอื่น เช่น การเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ

(Fed-batch fermentation) เพื่อหลีกเลี่ยงข้อจำกัดดังกล่าว แล้วทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์จึงเป็นสิ่งจำเป็น

### 5.1.5 ประสิทธิภาพของเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ (Fed-batch Fermentation)

เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ นิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นการผลิตเซลล์จุลินทรีย์ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมถึงเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ การเพาะเลี้ยงด้วยวิธีนี้จะมีการเติมสารอาหารลงไปจนถึงหมักระหว่างการเพาะเลี้ยง และเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์เพียงครั้งเดียวเมื่อสิ้นสุดกระบวนการเพาะเลี้ยง

จากการศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะที่มีต่อการสร้างอัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรีย *B. cohnii* โดยใช้อาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนและกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตรในการทำงานเริ่มต้น 1.5 ลิตร ไม่มีเติมสับสเตรทและไม่มีการควบคุมพีเอชตลอดการเพาะเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที และความเร็วใบกวน 500 รอบต่อนาที จากนั้นทำการเติมอาหารที่ระยะ deceleration phase ด้วยอาหารที่มีองค์ประกอบและความเข้มข้นเดียวกันกับในถังหมัก อัตราค่าที่ 0.90 ลิตรต่อชั่วโมง พบว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *B. cohnii* ได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะเห็นได้จากอัตราจำเพาะของการสร้างเอนไซม์ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ อัตราการสร้างเอนไซม์ รวมไปถึงค่าผลได้เอนไซม์จำเพาะ เพิ่มขึ้นสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะที่ความเข้มข้นของอาหารเท่ากันค่อนข้างมาก ซึ่งผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยของ Radha และคณะ (2014) ที่พบว่าการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ ทำให้เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas putida* และ *Staphylococcus aureus* มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะ โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 1.81 เท่า การที่เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ เป็นผลเนื่องมาจากการจำกัดปริมาณของสารอาหารให้เป็นไปตามลักษณะการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ แต่เมื่อพิจารณาปริมาณคงเหลือของน้ำตาลในอาหารพบว่า แบคทีเรียยังไม่สามารถใช้น้ำตาลได้จนหมด ซึ่งอาจเกิดจากการ Overfeeding การขาดสารอาหารบางชนิด หรืออัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนในสูตรอาหารที่ไม่เหมาะสม ซึ่งทำให้การเจริญและการสร้างเอนไซม์เกิดขึ้นน้อยกว่าที่ควรจะเป็น ดังนั้นหากมีการทดลองศึกษาปัจจัยอื่น ๆ เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าวในการทดลองต่อไป อาจส่งผลให้ประสิทธิภาพในการเจริญและการสร้างเอนไซม์ดีขึ้น

### 5.1.6 การศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลโนโปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

#### ในถังหมักขนาด 50 ลิตร

จากการศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลโนโปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรีย *B. cohnii* เมื่อมีการขยายขนาดกำลังการผลิตเพิ่มขึ้น 10 เท่า จากถังหมักขนาด 5 ลิตร ไปสู่ระดับถังหมักขนาด 50 ลิตร โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงและสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากผลการทดลองในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งเริ่มจากการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture ด้วยอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตรในการทำงาน 18 ลิตร ไม่มีการเติมสับสเตรทและไม่มีการควบคุมค่าพีเอชตลอดการเพาะเลี้ยง อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความเร็วใบกวนเท่ากับ 320 รอบต่อนาที ทำการเติมอาหารที่ระยะ deceleration phase (ชั่วโมงที่ 9) ด้วยอาหารที่มีองค์ประกอบและความเข้มข้นเดียวกันกับในถังหมัก อัตราคงที่ที่ 1.20 ลิตรต่อชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียมีอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) เพิ่มสูงขึ้นจากการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งเดิมมีค่าเท่ากับ  $0.124 \text{ h}^{-1}$  ไปเป็น  $0.352 \text{ h}^{-1}$  ในระดับถังหมักขนาด 50 ลิตร อีกทั้งภายหลังการเติมอาหารที่เวลา 9 ชั่วโมง เชื้อยังคงมีการเจริญในระยะ log phase อยู่ ต่างจากการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่แบคทีเรียมีการเจริญเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และเข้าสู่ระยะ stationary phase ที่เวลา 12 ชั่วโมง แต่สำหรับถังหมักขนาด 50 ลิตร เชื้อใช้เวลานานขึ้นกว่าจะเข้าสู่ระยะ stationary phase ที่เวลา 18 ชั่วโมง จึงทำให้แบคทีเรียใช้เวลานานขึ้นในการผลิตเอนไซม์เพื่อให้ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดที่เวลา 30 ชั่วโมง อีกทั้งกิจกรรมและอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดที่วัดได้ยังมีค่าลดลงเหลือเพียง 3.47 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.096 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง จากเดิมที่วัดได้ในการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร มีค่าเท่ากับ 9.51 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.396 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ที่เวลาเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ด้วยเหตุนี้ จึงทำให้ค่าอัตราจำเพาะของการสร้างเอนไซม์ ( $q_p$ ) มีค่าลดลงตามไปด้วย โดยมีค่าเพียง 0.913 ยูนิตต่อชั่วโมงต่อกรัมกลูโคส เท่านั้น สาเหตุที่ทำให้การเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตอัลคาไลโนโปรตีเอสในถังหมักขนาด 50 ลิตร มีประสิทธิภาพน้อยกว่าถังหมักขนาดเล็กนั้น อาจเป็นผลมาจากการที่ถังหมักมีขนาดใหญ่ขึ้น 10 เท่า ซึ่งการควบคุมทั้งสภาวะของการเพาะเลี้ยง การทำงานของเครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ให้ยังคงความเหมือนกันกับในถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นไปได้ยากมาก อีกทั้งระบบของถังหมักที่ใช้เป็นแบบกึ่ง manual จึงอาจมีการผันแปรของค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ และพีเอช เป็นต้น ไปจากค่าที่กำหนดไว้บ้างเล็กน้อย จึงทำให้เชื้อแบคทีเรียเจริญได้ช้ากว่าการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร และเมื่อเริ่มเติมอาหารที่เวลา 9 ชั่วโมงเท่ากัน เชื้อแบคทีเรียที่เจริญอยู่ในถังหมักขนาด 50 ลิตร ยังไม่เข้าสู่ระยะ deceleration phase เหมือนเช่นในถังหมักขนาด 5 ลิตร จึงทำให้แบคทีเรียนำสารอาหารต่าง ๆ ที่ได้เติมลงไป ไปใช้ในการเจริญเพื่อสร้างมวลเซลล์แทนการสร้างเอนไซม์ตามที่คาดไว้ จึงทำให้แบคทีเรียเข้าสู่ระยะ stationary phase ช้าลง และมีปริมาณสารอาหารสำหรับการสร้างเอนไซม์น้อยลงด้วยเช่นกัน ส่งผลให้ค่าพารามิเตอร์ในการสร้างเอนไซม์ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 15 มีค่าลดลงตามไปด้วย ซึ่งในการศึกษา

วิจัยครั้งต่อไป จึงควรมีการหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมอาหาร เพื่อให้ได้กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นกว่าเดิม

### 5.1.7 การทำให้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอน

การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ที่ผลิตได้ซึ่งละลายอยู่ในน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเบื้องต้นนิยมใช้วิธีการตกตะกอนด้วยเกลือ เนื่องจากเป็นวิธีสามารถใช้ตกตะกอนเอนไซม์ออกจากน้ำหมักได้โดยที่เอนไซม์ไม่เกิดการเสียสภาพไปอย่างถาวร สารละลายเกลือที่นิยมใช้กันคือ แอมโมเนียมซัลเฟต  $[(NH_4)_2SO_4]$  เพราะมีข้อดีคือ มีความบริสุทธิ์สูง ราคาไม่แพง ละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ และไม่ทำให้เอนไซม์เสียสภาพ ดังนั้นในการทำบริสุทธิ์ของอัลคาไลน์โปรตีเอสบางส่วน ที่ได้จากเชื้อ *B. cohnii* จึงเลือกใช้วิธีดังกล่าวข้างต้นมาทำการศึกษาวิจัย และที่ความเข้มข้นอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับร้อยละ 60-80 ทำให้ได้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุด มีค่าเท่ากับ 1.93 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.7 เท่า ซึ่งมีรายงานวิจัยหลายชิ้นที่เลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟตมาทำการตกตะกอนโปรตีนและให้ผลดี เช่น งานวิจัยของ Saminathan and Narayanan (2015) ที่ตกตะกอนอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *Bacillus subtilis* IAS 01 ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 70 แล้วทำให้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก crude enzyme ที่มีค่าเท่ากับ 121.74 เป็น 198.34 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.5 เท่า ส่วนงานวิจัยของ Lakshmi and Prasad (2015) ตกตะกอนอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* กลายพันธุ์ strain B18 ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 70 ทำให้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก crude enzyme ที่มีค่าเท่ากับ 0.81 เป็น 2.55 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.15 เท่า

### 5.1.8 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

#### 5.1.8.1 สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

##### 1) พีเอช

อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากแบคทีเรีย *B. cohnii* สามารถทำงานได้ในทุกช่วงค่าพีเอชที่ทำการศึกษา โดยมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 10 และสามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชระหว่าง 9.5 ถึง 11 กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์จะลดลงต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อค่าพีเอชน้อยกว่า 9.5 และมากกว่า 11 การที่ค่าพีเอชบางช่วงไม่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ อาจเป็นผลมาจากการแตกตัวของไอออน (ionization) ของ prototropic group ที่อยู่ตรงบริเวณเร่งของเอนไซม์ เช่น หมู่ sulfydryl ของกรดอะมิโนซิสเตอีน หรือหมู่ imidazolium ของกรดอะมิโนฮิสทีดีน ได้รับผลกระทบจากพีเอชในช่วงดังกล่าว แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงของไอออนต่าง ๆ เหล่านี้ จนไม่

เหมาะที่เข้าจับและทำปฏิกิริยากับสับสเตรท หรือพีเอชไปมีผลกับการแตกไอออนของสับสเตรทหรือโคแฟกเตอร์ ทำให้การเข้าจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทเกิดการเปลี่ยนแปลงไปหรือไม่สามารถจับกันได้ แล้วส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง (สุคติดา แสงยนต์, 2548)

จากรายงานการศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรตีเอสพบว่า เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์ที่ได้จากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* B18 (Lakshmi & Prasad, 2015) และ *Bacillus pseudofirmus* (Gupta et al., 2005) มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 10 ส่วนเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากแบคทีเรีย *Brevibacillus* sp. PLI-1 (Shuai et al., 2012) เกิดกิจกรรมการทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 8.0 ถึง 9.0 ในขณะที่เอนไซม์ที่ได้จาก *Bacillus licheniformis* MIR 29 (Ferrero et al., 1996) มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการทำงานเท่ากับ 12

## 2) อุณหภูมิ

เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากแบคทีเรีย *B. cohnii* สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 ถึงประมาณ 75 องศาเซลเซียส โดยที่ยังคงมีกิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 70 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิลดต่ำลงอยู่ในช่วง 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส กิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์จะมีค่าลดลงเหลือประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น การที่เอนไซม์มีกิจกรรมการทำงานสูงเมื่ออยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิเท่ากับ 70 องศาเซลเซียส เป็นผลมาจากอุณหภูมิที่สูงจะทำให้พลังงานจลน์ของสับสเตรทเพิ่มขึ้น โอกาสในการที่จะวิ่งเข้าชนกันและจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรทมีมากขึ้น ดังนั้นโอกาสในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์จึงเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย อย่างไรก็ตาม การเพิ่มอัตราเร็วในการเข้าทำปฏิกิริยาด้วยการเพิ่มอุณหภูมินั้นมีขีดจำกัด การที่อุณหภูมิเพิ่มสูงมากเกินไปจะทำให้เอนไซม์สูญเสียสภาพตามธรรมชาติและไม่สามารถเข้าจับกับสับสเตรทและทำปฏิกิริยาได้อีกต่อไป ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเกินระดับที่เหมาะสม (ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล, 2556; สุคติดา แสงยนต์, 2548)

รายงานการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของอัลคาไลน์โปรตีเอสพบว่า เอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. RGR-14 (Oberoi et al., 2001) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการทำงานที่ 45-70 องศาเซลเซียส ขณะที่เอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* IAS 01 (Saminathan & Sriman Narayanan, 2015) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 55 องศาเซลเซียส ส่วนเอนไซม์ที่ได้จาก *Bacillus licheniformis* MIR 29 (Ferrero et al., 1996) และ *Bacillus* sp. L21 (Genckal & Tari, 2006) มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

### 5.1.8.2 เสถียรภาพของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่สภาวะต่าง ๆ

#### 1) พีเอช

อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *B. cohnii* มีเสถียรภาพในช่วงค่าพีเอชที่ค่อนข้างกว้างค่อนข้างมาทางค่าพีเอชในช่วงที่เป็นด่าง โดยมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์สูงกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงพีเอชระหว่าง 7 ถึง 12 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่มีรายงานมาก่อนหน้า พบว่าเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสมักจะมีกิจกรรมในตัวในช่วงพีเอชที่เป็นด่างและค่อนข้างกว้าง เช่น อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อ *Bacillus clausii* (Kumar et al., 2004) และ *Bacillus* sp. (SBP-29) (Saurabh, Pritesh, & Rajendra Kumar, 2007) ที่มีเสถียรภาพในช่วงพีเอชระหว่าง 6 ถึง 12 ส่วนเอนไซม์ที่ได้จาก *Bacillus* sp. SSR1 (Singh et al., 2001) มีความคงตัวที่พีเอช 8 ถึง 11 เป็นต้น ด้วยคุณสมบัติความเสถียรภาพในช่วงพีเอชที่ค่อนข้างกว้างและค่อนข้างเป็นด่างสูงนี้ ทำให้อัลคาไลน์โปรตีเอสมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ที่ต้องการเอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาภายใต้สภาวะที่เป็นด่างสูง เช่น อุตสาหกรรมฟอกหนัง เป็นต้น (สุดธิดา แสงยนต์, 2548)

#### 2) อุณหภูมิ

อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *B. cohnii* มีเสถียรภาพในช่วงอุณหภูมิ 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส โดยที่ยังมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์สูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจากรายงานของ Otroschi และคณะ (2014) พบว่าอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *Bacillus* sp. ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่เป็นลักษณะ saline-alkaline soil มีความเสถียรที่อุณหภูมิระหว่าง 40-60 องศาเซลเซียส ส่วนเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* KBDL4 ที่คัดแยกได้จาก Lonar soda lake ของประเทศอินเดีย สร้างเอนไซม์ที่มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ได้นาน 60 นาที โดยที่ยังมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่ 40 และ 82 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้สภาวะที่ไม่มี  $\text{CaCl}_2$  และมี  $\text{CaCl}_2$  เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (Pathak & Dechmukh, 2012)

### 5.1.8.3 อิทธิพลของสารยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

การศึกษาอิทธิพลของสารยับยั้ง (Inhibitors) ต่อการทำงานของอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *B. cohnii* พบว่า EDTA มีผลในการยับยั้งรุนแรงที่สุด โดยกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ ลดลงเหลือ 41 และ 35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งการเพิ่มความเข้มข้นของ EDTA ขึ้น 10 เท่า จากความเข้มข้น 1 เป็น 10 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงเหลือเพียง 14 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสาร PMSF และ 1,10-phenantroline มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสได้ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ โดยที่เอนไซม์ยังคงมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เหลืออยู่ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ แม้ว่าจะมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารยับยั้งทั้งสองชนิดเป็น 10 เท่า ก็ตาม การที่ EDTA และ 1,10 phenantroline สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้ บ่งชี้ว่าอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *B. cohnii* ซึ่งผ่านขั้นตอนการทำบริสุทธิ์

บางส่วนด้วยวิธีการตกตะกอนโปรตีนนั้น จัดอยู่ในกลุ่มของ metalloprotease เนื่องจาก EDTA และ 1,10-phenantroline เป็นสาร chelating agents ที่สามารถจับกับไอออนของโลหะพวกไดวาเลนต์ หรือที่มีเลขออกซิเดชันสูงกว่าสองได้ ทำให้ไอออนของโลหะ  $Zn^{2+}$  ที่ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ และอยู่ตรงบริเวณเร่งของเอนไซม์ metalloprotease ถูกเข้าจับโดยสารจับไอออนของโลหะจาก metal-chelating agents เอนไซม์จึงไม่สามารถนำไอออนนั้นมาใช้งานได้ กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์จึงถูกยับยั้งตามไปด้วย นอกจากนี้ การที่เอนไซม์ยังคงสามารถทำงานได้ในสภาวะที่มี PMSF ซึ่งเป็นสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่ม serine protease โดยที่ยังมีกิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ อาจเป็นผลมาจากเอนไซม์มีหมู่อนุพลเซอร์ลอยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ด้วยเช่นกัน ทำให้ถูกยับยั้งการทำงานบางส่วนโดยสาร PMSF (สุทธิดา แสงยนต์, 2548) ซึ่งจากการศึกษาอิทธิพลของสารยับยั้งทั้งสามชนิดต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *B. cohnii* แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรียชนิดนี้มีลักษณะเป็น serine alkaline metalloprotease เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Olajuyigbe และ Falade (2014) ที่ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus brevis* MWB-01 พบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้จากแบคทีเรียดังกล่าวสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 8.0 ถูกยับยั้งการทำงานเกือบสมบูรณ์ได้โดยสาร PMSF และ EDTA ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ โดยมีกิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์เท่ากับ  $8.3 \pm 0.5$  และ  $7.5 \pm 0.5$  เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทำให้บ่งชี้ได้ว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้เป็น serine alkaline metalloprotease

#### 5.1.8.4 อิทธิพลของสารลดแรงตึงผิวและสารออกซิไดซ์ ต่อเสถียรภาพของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *B. cohnii* ไม่มีความเสถียรเมื่อถูกบ่มร่วมกับสารลดแรงตึงผิวชนิดที่มีประจุลบ (Anionic surfactant) ซึ่งได้แก่ SDS ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ แต่มีความคงตัวอยู่ในสภาวะที่มีสารลดแรงตึงผิวชนิดที่ไม่มีประจุ (Nonionic surfactant) ได้แก่ triton x-100 และ tween 80 ที่ความเข้มข้นทั้ง 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ อัลคาไลน์โปรตีเอสยังคงมีเสถียรภาพเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีสารฟอกขาว (Bleaching) คือ  $H_2O_2$  ที่ความเข้มข้นทั้งสองระดับ การที่เอนไซม์ไม่มีเสถียรภาพเมื่ออยู่ในสภาวะที่มี SDS เนื่องจาก SDS ที่ความเข้มข้นสูงเกินไป จะเข้าไปจับกับสายโพลีเปปไทด์ของโปรตีน แล้วเกิดการคลายม้วนของสายทำให้โครงสร้างตามธรรมชาติของเอนไซม์เสียหายไป กลายเป็นโครงสร้างแบบแท่งและมีประจุลบ ที่เรียกว่า SDS-polypeptide complex เอนไซม์จึงไม่สามารถเข้าจับกับสับสเตรทและทำปฏิกิริยาได้ (พิมล จำนงค์, 2545) ซึ่งงานวิจัยมีความสอดคล้องกับงานของ Olivera และคณะ (2006) ที่พบว่า SDS ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสที่ได้จากแบคทีเรีย *Bacillus patagoniensis* โดยมีกิจกรรมเอนไซม์คงเหลือเท่ากับ 27 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในสภาวะที่มี triton x-100 และ tween 80 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดที่ไม่มีประจุนั้น เอนไซม์มีความคงตัว และมีแนวโน้มที่จะมี



กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสารทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้น เป็นผลมาจากการที่สารเหล่านี้ จะไปมีผลทำให้โครงสร้างของเคซีนที่เป็นสับสเตรทเกิดการคลายตัวเพิ่มมากขึ้น เอนไซม์จึงสามารถเข้าจับและทำปฏิกิริยาได้ง่ายขึ้น (พิมล จำนงค์, 2545)

#### 5.1.8.5 อิทธิพลของไอออนของโลหะต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์

##### โปรตีเอส

เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *B. cohnii* มีกิจกรรมการทำงานเพิ่มสูงขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีไอออนของโลหะ  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  และ  $Mg^{2+}$  ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งจะทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมสัมพันธ์เพิ่มสูงขึ้นเกิน 100 เปอร์เซ็นต์ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งไอออนของ  $Zn^{2+}$  ที่เป็นตัวกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ที่สำคัญ ที่ทำให้เอนไซม์มีค่ากิจกรรมสัมพันธ์เพิ่มขึ้นถึง 240 เปอร์เซ็นต์ แต่จะให้ผลในทางกันข้ามเมื่อความเข้มข้นของไอออนของโลหะ  $Zn^{2+}$  เพิ่มขึ้น 10 เท่า เป็น 10 มิลลิโมลาร์ โดยที่กิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ลดลงถึง 131 เปอร์เซ็นต์ เหลือกิจกรรมเพียง 109 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอออนของโลหะชนิดอื่น ยกเว้น  $Cu^{2+}$  จะมีผลไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ลดลงเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไอออนของโลหะเหล่านี้ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม อาจช่วยกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ให้เพิ่มสูงขึ้นกว่าเดิมได้ ผลการทดลองที่ได้นี้มีความใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Rathod and Pathak (2014) ที่ศึกษาอิทธิพลของไอออนโลหะ ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus alcalophilus* LW8 และพบว่าไอออนของโลหะ  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  และ  $Mn^{2+}$  ช่วยเพิ่มกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ และหากเพิ่มความเข้มข้นของไอออนโลหะ จะส่งผลให้เกิดการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แทน ส่วนงานวิจัยของ Cui และคณะ (2015) พบว่าเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *Halobacterium salinarum* SD11 ที่คัดแยกได้จากโคลนทะเล (Halophilic strain of SD11 marine bacteria) มีกิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์สูงกว่า 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีไอออนของโลหะ  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Na^{+}$  และ  $K^{+}$  ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5 มิลลิโมลาร์

## 5.2 สรุปผล

5.2.1 แบคทีเรีย *Bacillus cohnii* เป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินภายในประเทศทั้งหมด 157 ไอโซเลท และมีแนวโน้มที่จะนำไปใช้ผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้

5.2.2 สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสคือ สูตรอาหาร BPMM ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 10 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

5.2.3 การเพาะเลี้ยง *B. cohnii* ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ มีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อใช้อาหารเพาะเลี้ยง BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้น 2 เท่า โดยไม่มีการเติมสับสเตรทและไม่มีการควบคุมค่าพีเอชตลอดทั้งกระบวนการ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ความเร็วใบกวน 500 รอบต่อนาที

5.2.4 เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะจะช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียมีการเจริญและการสร้างเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อใช้ความเข้มข้นของอาหารเพาะเลี้ยงหรือความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเพิ่มขึ้นถึงระดับใดระดับหนึ่งเท่านั้น หากความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเกินระดับที่เหมาะสม จะเกิดการยับยั้งการเจริญและการสร้างเอนไซม์ด้วยกระบวนการ catabolite repression ซึ่งเป็นการยับยั้งอย่างถาวร

5.2.5 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *B. cohnii* ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ มีประสิทธิภาพสูงสุด เมื่อใช้อาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตรในการทำงานเริ่มต้น 1.5 ลิตร ไม่มีเติมสับสเตรทและไม่มีการควบคุมพีเอชตลอดการเพาะเลี้ยง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที และความเร็วใบกวน 500 รอบต่อนาที จากนั้นทำการเติมอาหารที่ระยะ deceleration phase ด้วยอาหารที่มีองค์ประกอบและความเข้มข้นเดียวกันกับในถังหมัก อัตราคางที่ 0.90 ลิตรต่อชั่วโมง

5.2.6 การเพาะเลี้ยงแบบเติมกะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรีย *B. cohnii* ได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะถึง 1.6 เท่า เนื่องจากการจำกัดปริมาณสารอาหารให้เป็นไปตามลักษณะการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิด over feeding แล้วทำให้แบคทีเรียถูกยับยั้งการเจริญหรือการสร้างเอนไซม์จากกระบวนการ catabolite repression

5.2.7 การขยายขนาดกำลังการผลิตเพิ่มขึ้น 10 เท่า จากถังหมักขนาด 5 ลิตร ไปสู่ระดับถังหมักขนาด 50 ลิตร โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงและสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากผลการทดลองในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบคทีเรียมีอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) เพิ่มสูงขึ้นจากการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร อีกทั้งภายหลังการเติมอาหารที่เวลา 9 ชั่วโมง เชื้อยังคงมีการเจริญในระยะ log phase อยู่ ต่างจากการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่แบคทีเรียมีการเจริญเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และเชื้อใช้ระยะเวลานานขึ้นกว่าจะเข้าสู่ระยะ stationary phase (ที่เวลา 18 ชั่วโมง) ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เชื้อมีการสร้างเอนไซม์สูงสุด จึงทำให้แบคทีเรียใช้เวลานานขึ้นในการผลิตเอนไซม์เพื่อให้ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดที่เวลา 30 ชั่วโมง อีกทั้งกิจกรรมและอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดที่วัดได้ยังมีค่าลดลงเหลือเพียง 3.47 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.096 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง

จากเดิมที่วัดได้ในการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร มีค่าเท่ากับ 9.51 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และ 0.396 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ที่เวลาเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ด้วยเหตุนี้ จึงทำให้ค่าอัตราจำเพาะของการสร้างเอนไซม์ ( $q_p$ ) มีค่าลดลงตามไปด้วย โดยมีค่าเพียง 0.913 ยูนิต์ต่อชั่วโมงต่อกรัมกลูโคส เท่านั้น สาเหตุที่ค่าพารามิเตอร์ของการสร้างเอนไซม์ลดลง เป็นผลมาจากการที่ถังหมักมีขนาดใหญ่ขึ้น 10 เท่า การควบคุมสภาวะต่าง ๆ ให้ยังคงเหมือนในถังหมัก 5 ลิตร จึงทำได้ยาก ทำให้เชื้อแบคทีเรียเจริญได้ช้ากว่า และเมื่อเริ่มเติมอาหารที่เวลา 9 ชั่วโมงเท่านั้น เชื้อแบคทีเรียที่เจริญอยู่ในถัง ยังไม่เข้าสู่ระยะ deceleration phase แบคทีเรียจึงนำสารอาหารต่าง ๆ ที่เติมลงไป ไปใช้ในการเจริญเพื่อสร้างมวลเซลล์แทนการสร้างเอนไซม์ ปริมาณสารอาหารสำหรับการสร้างเอนไซม์จึงน้อยลงด้วยเช่นกัน ส่งผลให้ค่าพารามิเตอร์ในการสร้างเอนไซม์มีค่าลดลงตามไปด้วย

5.2.8. การตกตะกอนเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *B. cohnii* ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 60-80 ทำให้ได้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุดมีค่าเท่ากับ 1.93 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน และเอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.7 เท่า

5.2.9 การศึกษาสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอนโปรตีน พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชประมาณ 9.5 ถึง 11 โดยมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ (Optimum pH) ที่พีเอช 10 และเอนไซม์มีเสถียรภาพในช่วงพีเอชที่กว้าง และค่อนข้างทนต่อค่าพีเอชในช่วงที่เป็นด่าง ในช่วงพีเอชระหว่าง 7 ถึง 12 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (Optimum temperature) คือ 70 องศาเซลเซียส และมีเสถียรภาพต่ออุณหภูมิในช่วง 30 ถึง 50 องศาเซลเซียส

5.2.9 สาร EDTA มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์สูงสุด โดยกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิโมลาร์ ลดลงเหลือ 41 และ 35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งการเพิ่มความเข้มข้นของ EDTA ขึ้น 10 เท่า จากความเข้มข้น 1 เป็น 10 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ลดลงเหลือเพียง 14 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสาร PMSF และ 1,10-phenantroline มีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสได้ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ โดยที่เอนไซม์ยังคงมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เหลืออยู่ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์

5.2.10 เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *B. cohnii* ไม่มีความเสถียรเมื่อถูกบ่มร่วมกับสารลดแรงตึงผิวชนิดที่มีประจุลบ (Anionic surfactant) ซึ่งได้แก่ SDS ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ แต่มีความคงตัวอยู่ในสถานะที่มีสารลดแรงตึงผิวชนิดที่ไม่มีประจุ (Nonionic surfactant) ได้แก่ triton x-100 และ tween 80 ที่ความเข้มข้นทั้ง 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ อัลคาไลน์โปรตีเอสยังคงมีเสถียรภาพเมื่ออยู่ในสถานะที่มีสารฟอกขาว (Bleaching)

5.2.11 เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรีย *B. cohnii* มีกิจกรรมการทำงานเพิ่มสูงขึ้นเมื่ออยู่ในสถานะที่มีไอออนของโลหะ  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  และ  $Mg^{2+}$  ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งจะทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมสัมพันธ์เพิ่มสูงขึ้นเกิน 100 เปอร์เซ็นต์ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งไอออนของ  $Zn^{2+}$  ที่เป็นตัวกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ที่สำคัญ ที่ทำให้เอนไซม์มีค่ากิจกรรมสัมพันธ์เพิ่มขึ้นถึง 240 เปอร์เซ็นต์ แต่จะให้ผลในทางกันข้ามเมื่อความเข้มข้นของไอออนของโลหะ  $Zn^{2+}$  เพิ่มขึ้น 10 เท่า เป็น 10 มิลลิโมลาร์ โดยที่กิจกรรมสัมพันธ์ของเอนไซม์ลดลงถึง 131 เปอร์เซ็นต์ เหลือกิจกรรมเพียง 109 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไอออนของโลหะชนิดอื่น ยกเว้น  $Cu^{2+}$  จะมีผลไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ลดลงเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น

### 5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 ควรมีการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจนของอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรีย

5.3.2 ควรมีการศึกษาลักษณะการเติมอาหารรูปแบบต่างๆ สำหรับการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ เช่น การเติมอาหารแบบ exponential fed-batch ที่สามารถควบคุมอัตราการเจริญจำเพาะ และส่งผลให้สามารถควบคุมอัตราการสร้างเอนไซม์ได้ หรือศึกษาวิธีการเติมอาหารแบบ intermittent addition ที่มีการเติมอาหารเป็นระยะ ๆ เป็นต้น

5.3.3 ศึกษาการใช้สารชนิดอื่น ๆ ในการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรีย และ ความเข้มข้นของสารต่าง ๆ เหล่านั้น สำหรับกระบวนการผลิตเอนไซม์ในถังหมัก

5.3.4 ควรมีการศึกษาอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนผสมภายในถังหมักระหว่างการเพาะเลี้ยง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรีย

5.3.5 ควรมีการศึกษาการทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ผลิตได้ด้วยวิธีการอื่น ๆ เพื่อให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น เช่น การทำโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ หรือการทำโครมาโตกราฟีแบบเจลฟิวเตรชัน เป็นต้น

5.3.6. ควรมีการหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเติมอาหาร เมื่อมีการขยายขนาดกำลังการผลิตขึ้นสู่ระดับอุตสาหกรรม เพื่อให้ได้กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นกว่าเดิม

#### 5.4 ผลผลิต (Output)

Kukam., K., Chamsart, S., & Ratanapradit, K., (2017). The screening and optimization of alkaline protease production using *Bacillus cohnii* isolated from soil in Thailand. *The 6<sup>th</sup> Burapha University International Conferences 2017*, 529-536.

## บรรณานุกรม

- กฤษฎากร จริโมภาส. (2549). การผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสโดย *Bacillus* sp. ที่ชอบด่างในอาหารเหลว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาจุลชีววิทยา, บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ขวัญฤทัย มาลัยเรือง. (2556). การผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะโดยใช้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้นสูง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- จุฑาทพร แสงแก้ว. (2543). การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาจุลชีววิทยา, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ฉวีวรรณ สว่างวัน. (2548). การสลายแป้งมันให้เป็นน้ำตาลในปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ปราณี พัฒนพิพิธไพศาล. (2556). เอนไซม์เทคโนโลยี. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พิมล จำนงค์. (2545). การทำให้อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตจาก *Alkalotolerant Bacillus* sp. 12 บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติต่างๆ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีชีวเคมี, คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยีชีวเคมี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- วรรณวิมล ททรัพย์ดี. (2540). การผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ, บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุดธิดา แสงยนต์. (2548). สมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Agarwal, B., & Katiyar, B.S., (2013). Isolation of enriched-yielders and fed-batch production of alkaline protease from the newly isolated *Bacillus* sp. BHA. *Natural Science*, 5, 1-9.
- Ahmed, S.A., & Abdel-Fattah, A.F., (2010). Production of *Bacillus licheniformis* ATCC 21415 alkaline protease in batch, repeated batch and continuous culture. *Malays J Microbiol*, 6(2), 156-160.
- Anwar, A., & Saleemuddin, M., (1998). Alkaline proteases: A review. *Bioresour Technol*, 64, 175-183.
- Ashok, R. C., & Prabhakar, C., (2012). Screening and optimization of alkaline protease productivity from *Bacillus* sp. Agt from tannery effluent. *Int J Pharm Biol Sci Arch*, 3(1), 244-248.

- Banerjee, U.C., Sami, R.K., Azmi, W., & Soni, R., (1999). Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochem*, 35, 213-219.
- Bhunja, B., Basak, B., & Dey, B.B., (2012). A review on production of serine alkaline protease by *Bacillus spp.*. *J Biochem Tech*, 3(4), 448-457.
- Cui, H., Wang, L., & Yu, Y., (2015). Production and characterization of alkaline protease from a high yielding and moderately halophilic strain of SD11 marine bacteria. *J Chem.*, 2015, 1-8.
- Fauziah, R.R., (2010). *The production of alkaline protease by Aspergillus oryzae 3087 under fed-batch fermentation*. Master of Science Thesis, Biotechnology Program, King Mongkut's University of Technology Thonburi.
- Ferrero, M.A., Castro, G.R., Abate, C.M., Baigori, M.D., & Sineriz, F., (1996). Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. *Appl Microbiol Biotechnol*, 45, 327-332.
- Frankena, J., Koningstein, G.M., van Verseveld, H.W., & Stouthamer, A.H., (1986) Effect of different limitations in chemostat cultures on growth and production of exocellular protease by *Bacillus licheniformis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 24, 106-112.
- Genckal, H., & Tari, C., (2006). Alkaline protease production from alkalophilic *bacillus* sp. isolated from natural habitats. *Enzyme Microb Technol*. 39, 703-710.
- Gupta, A., Roy, I., Patel, R.K., Singh, S.P., Khare, S.K., & Gupta, M.N., (2005). One-step purification and characterization of an alkaline protease from haloalkalophilic *Bacillus* sp.. *J Chromatogr A*, 1075, 103-108.
- Gupta, R., Beg, Q.K., Khan, S., & Chauhan, B., (2002). An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline protease. *Appl Microbiol Biotechnol*. 60, 381-395.
- Gupta, R., Beg, Q.K., & Lorenz, P., (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 59, 15-32.
- Horikoshi, K., 1999. Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63(4), 735-750.
- Ibrahim, A.S.S., & Al-Salamah, A.A., (2009). Optimisation of media and cultivation conditions for alkaline protease production by alkaliphilic *Bacillus halodurans*. *Res J Microbiol*, 4, 251-259.

- Jisha, V.N., Smitha, R.B., Pradeep, S., Sreedevi, S., Unni, K.N., Sajith, S., Priji, P., Josh, M.S., & Benjamin, S., (2013). Versatility of microbial proteases. *Advances in Enzyme Research*, 1 (3), 39-51.
- Joo, H.S., & Chang, C.S., (2005). Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochem*, 40, 1263-1270.
- Joo, H.S., Kumar, C.G., Park, G.C., Kim, K.T., Paik, S.R., & Chang, C.S., (2002). Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Process Biochem*, 38, 155-159.
- Kamran, A., Bibi, A., & Kamal, M., (2015). Purification and molecular weight estimation of protease from a thermophilic *Bacillus* species. *Pak J Biochem Mol Biol.*, 47(3-4), 155-157.
- Kocher, G.S., & Joshi, N., (2015). Production of partial purification of alkaline protease from *Bacillus circulans* MTCC 7906 using potato peel as substrate. *Indian J Microbiol Res*, 2(1), 7-13.
- Kumar, C.G., Joo, H.S., Koo, Y.M., & Chang, C.S., (2004). Thermostable alkaline protease from a novel marine haloalkalophilic *Bacillus clausii* isolate. *World J Microbiol Biotechnol*, 20(4), 351-357.
- Kumar, C.G., & Takagi, H., (1999). Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol Adv.* 17, 561-594.
- Kumar, D.J., Venkatachalam, P., Govindarajan, N., Balakumaran, M.D., & Kalaichelvan, P.T., (2012). Production and purification of alkaline protease from *Bacillus* sp. MPTK 712 isolated from dairy sludge. *Glob Vet*, 8 (5), 433-439.
- Lakshmi, G., & Prasad, N.N., (2015). Purification and characterization of alkaline protease from a mutant *Bacillus licheniformis* B18. *Advan Biol Res*, 9(1), 15-23.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J., (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-75.
- Mehrotra, S., Pandey, P.K., Gaur, R., & Darmwal, N.S., (1999). The production of alkaline protease by a *Bacillus* species isolate. *Bioresour Technol*, 67, 201-203.
- Miller, G.L., (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 31, 426-428.
- Moon, S.H. & Parulekar, S.J., (1991). A parametric study of protease production in batch and fed-batch culture of *Bacillus firmus*. *Biotechnol Bioeng*, 37, 467-483.



- Nadeem, M., Qazi, J.I., Baig, S., & Syed, Q.A., (2008). Effect of medium composition on commercially important alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* N-2. *Food Technol Biotechnol*, 46(4), 388-394.
- Oberoi, R., Beg, Q.K., Puri, S., Saxena, R.K., & Gupta, R., (2001). Characterization and wash performance of an SDS-stable alkaline protease from a *Bacillus* sp.. *World J Microbiol Biotechnol*, 17, 493-497.
- Oda, K., Kakizono, D., Yamada, O., Iefuji, H., & Iwashita, K., (2006). Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Appl Environ Microbiol*, 72(5), 3448-57.
- Olajuyigbe, F.M., & Falade, A.M., (2014). Purification and partial characterization of serine alkaline metalloprotease from *Bacillus brevis* MWB-01. *Bioresour Bioprocess*, 1(8), 1-10.
- Olivera, N., Sequeiros, C., Sineriz, F., & Breccia, J.D., (2006). Characterization of alkaline proteases from a novel alkali-tolerant bacterium *Bacillus patagoniensis*. *World J Microbiol Biotechnol.*, 22, 737-743.
- Otroshi, B., Anvari, M., & Shariarinnour, M., (2014). Study on activity and stability of protease from *Bacillus* sp. produced by submerged fermentation. *Int J Adv Biol Biom Res*, 2(7), 2283-2287.
- Pathak, A.P., & Deshmukh, K.B., (2012). Alkaline protease production, extraction and characterization from alkaliphilic *Bacillus licheniformis* KBDL4: A Lonar soda lake isolate. *Indian J Exp Biol*, 50, 569-576.
- Patrick, S.M., & Finn, B., (2008). *Modes of fermentor operation*. Practical Fermentation Technology, Mcneil, B. & Harvey, L.M. (EDs.) (pp.69-86). West Sussex, John Wiley and Sons Ltd.
- Potumarthi, R., Subhakar, Ch., & Jetty, A., (2007). Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2402: Effect of aeration and agitation regimes. *Biochem Eng J*, 34, 185-192.
- Radha, S., Prasad T.H., Devi, N.S., & Mamata, S., (2014). Fed batch and batch submerged fermentation for alkaline protease production from mixed consortium of *Pseudomonas putida* and *Staphylococcus aureus*. *Adv Appl Sci Res*, 5(3), 315-324.

- Rathod, M.G., & Pathak, A.P., (2014). Wealth from waste: Optimized alkaline protease production from agro-industrial residues by *Bacillus alcalophilus* LW8 and its biotechnological applications. *J Taibah Univ Sci*, 8(4), 307-314.
- Saeki, K., Ozaki, K., Kobayashi, T., & Ito, S., (2007). Detergent alkaline proteases: Enzymatic properties, genes, and crystal structures. *J Biosci Bioeng*, 103(6), 501-508.
- Saminathan, D., & Narayanan, J., (2015). Purification and characterization of blood stain decolorizing alkaline metalloprotease from *Bacillus subtilis* IAS 01 for promising bio-detergent. *Int J Recent Sci Res*, 6(3), 3010-3015.
- Sankareswaran, M., Anbalagan, S., & Prabhavathi, P., (2014). Optimization of production of an extracellular alkaline protease by soil isolated *Bacillus* species using submerged and solid-state fermentation with agricultural wastes. *Afr J Microbiol Res*, 8(9), 872-877.
- Saurabh, S., Jasmine, I., Pritesh, G., & Rajendra Kumar, S., (2007). Enhanced productivity of serine alkaline protease by *Bacillus* sp. Using soybean as substrate. *Malays J microbiol*, 3(1), 1-6.
- Sevinc, N., & Demirkan, E., (2011). Production of protease by *Bacillus* sp. N-40 isolated from soil and its enzymatic properties. *J Biol Environ Sci*, 5 (14), 95-103.
- Shuai, W., Xuezheng, L., Xiaohang, H., Li, Z., & Zilda, D.S., (2012). Screening and characterization of the alkaline protease isolated from PLI-1, a strain of *Brevibacillus* sp. collected from Indonesia's hot springs. *J Ocean Univ China*, 11(2), 213-218.
- Shrukla, S., & Verma, O. P., (2014). Isolation, identification, partial purification, optimization and characterization of alkaline protease from *Bacillus subtilis*. *Int J Adv Biotechnol Res*, 5(4), 665-670.
- Singh, J., Vohra, R.M., & Sahoo, D.K., (2004). Enhanced production of alkaline proteases by *Bacillus sphaericus* using fed-batch culture. *Process Biochem*, 39, 1093-1101.
- Smita, G.S., Ray, P., & Mohapatra, S., (2012). Quantification and optimization of bacterial isolates For production of alkaline protease. *Asian J Biol Sci*, 3(1), 180-186.
- Spanka, R. & Fritze, D. (1993). *Bacillus cohnii* sp. Nov., a new, obligately alkaliphilic, oval-spore-forming *Bacillus* species with ornithine and aspartic acid instead of diaminopimelic acid in the cell wall. *Int J Syst Bacteriol*, 43(1), 150-156.

- Tabandeh, F., Hosseinian, M.H.R., Hemed, M.M., & Yakhchali, B., (2006). Fed-batch fermentation of *Bacillus sp.* L2 for alkaline protease production using different feeding strategies. *The 11<sup>th</sup> Iranian Chemical Engineering Congress*, Tehran, Iran. Nov. 2006.
- Tabadeh, F., Hosseinian Moghaddam, H.R., Yakchali, B., Shariati, P., Hamed Mousavian, M.T., & Ghasemi, F., (2011). Fed-batch fermentation of *Bacillus clausii* for efficient production of alkaline protease using different feeding strategies. *Chem Eng Comm*, 198, 1063-1074.
- Tekin, N., Cihan, A.c., Takac, Z.S., Tuzan, C.Y., Tunc, K., & Cokmus, C., (2012). Alkaline protease production of *Bacillus cohnii* APT5. *Turk J Biol*, 36, 430-440.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก  
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

## การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

### 1. Nutrient Broth (NB)

ส่วนประกอบ

Peptone	5	กรัมต่อลิตร
Beef extract	3	กรัมต่อลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

### 2. Basal Medium Agar (BMSM agar) (สุดธิดา แสงยนต์, 2548)

ส่วนประกอบ

Glucose	10	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	กรัมต่อลิตร
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2	กรัมต่อลิตร
Skim milk	10	กรัมต่อลิตร
Agar	15	กรัมต่อลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรเป็น 972 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 10 ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 28 มิลลิลิตร

### 3. Basal Medium Broth (BMSM broth) (สุดธิดา แสงยนต์, 2548)

ส่วนประกอบ

Glucose	10	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	กรัมต่อลิตร
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2	กรัมต่อลิตร
Skim milk	10	กรัมต่อลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรเป็น 972 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 10 ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 28 มิลลิลิตร

#### 4. Batch Production Medium with 1% skim milk (BPMM)

(ดัดแปลงจาก ขวัญฤทัย มาลัยเรือง, 2556)

ส่วนประกอบ

Carbon source	10	กรัมต่อลิตร
Skim milk	10	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.10	กรัมต่อลิตร
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.75	กรัมต่อลิตร
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.90	กรัมต่อลิตร
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.10	กรัมต่อลิตร
Trace element solution	1.0	มิลลิลิตรต่อลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

#### 5. การเตรียม Trace element solution สำหรับอาหาร BPMM

ส่วนประกอบ

Calcium chloride	0.01	กรัมต่อลิตร
Ammonium ferric citrate	0.006	กรัมต่อลิตร
Cobalt chloride	0.0002	กรัมต่อลิตร
Boric acid	0.0003	กรัมต่อลิตร
Zinc sulfate	0.0001	กรัมต่อลิตร
Manganese chloride	0.00003	กรัมต่อลิตร
Sodium molybdate	0.00003	กรัมต่อลิตร
Niggle sulfate	0.00002	กรัมต่อลิตร
Copper sulfate	0.00001	กรัมต่อลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดมาแยกละลายในน้ำกลั่น เมื่อสารแต่ละตัวละลายดีแล้ว นำมาผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แช่เย็นจนกว่าจะนำไปใช้

## 6. Protease Production Medium with 1% skim milk (PPMM)

(ดัดแปลงจาก Tabandeh et al., 2011)

ส่วนประกอบ

Carbon source	10	กรัมต่อลิตร
Skim milk	10	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	กรัมต่อลิตร
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2	กรัมต่อลิตร
Trace element solution	10	มิลลิลิตรต่อลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

## 7. การเตรียม Trace element solution สำหรับอาหาร PPMM

ส่วนประกอบ

Sodium citrate	5	กรัมต่อลิตร
Ferrous sulfate heptahydrate	1	กรัมต่อลิตร
Copper sulfate pentahydrate	0.1	กรัมต่อลิตร
Zinc chloride	0.1	กรัมต่อลิตร
Ammonium molybdate	0.05	กรัมต่อลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดมาแยกละลายในน้ำกลั่น เมื่อสารแต่ละตัวละลายดีแล้ว มาผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แช่เย็นจนกว่าจะนำไปใช้

## 8. การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์

ส่วนประกอบ

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	200	กรัมต่อลิตร
---------------------------------	-----	-------------

ชั่ง Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> หนัก 200 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร



## 9. การย่อยเด็กซ์ทรีนจากแป้งมันสำปะหลัง (ขวัญฤทัย มาลัยเรือง, 2556)

7.1 เตรียมอุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการย่อยแป้ง ได้แก่ ถังย่อยแป้งขนาด 5 ลิตรที่มี Jacket เพื่อควบคุมอุณหภูมิ ป้อน สายยางซิลิโคน อ่างควบคุมอุณหภูมิ มอเตอร์และใบพัดสำหรับการกวนผสม

7.2 ติดตั้งอุปกรณ์ต่างๆ ตั้งค่าอุณหภูมิของอ่างควบคุมอุณหภูมิให้เท่ากับ 95 องศาเซลเซียส แล้วต่อเข้ากับ Jacket ของถังย่อยแป้ง ใช้อัตราการกวนผสมเท่ากับ 400 รอบต่อนาที

7.3 เติมน้ำในถังย่อยแป้งส่วนหนึ่ง รอกะทั่งอุณหภูมิในถังประมาณ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ( $\alpha$ -amylase) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ค่อยๆ เติมแป้งมันสำปะหลังที่ละนิดจนหมด (ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์) ปรับปริมาตรจนครบตามต้องการ

7.4 รอกวนกะทั่งอุณหภูมิเท่ากับ 95 องศาเซลเซียส แล้วจับเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้น จะได้สารละลายเด็กซ์ทรีนที่มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดเล็กน้อย และมีสีส้มขุ่น

## 10. การย่อยกลูโคสจากแป้งมันสำปะหลัง (ขวัญฤทัย มาลัยเรือง, 2556)

การย่อยกลูโคสจากแป้งมันสำปะหลัง เป็นกระบวนการที่ต่อเนื่องจากการย่อยเด็กซ์ทรีน

8.1 หลังจากได้สารละลายเด็กซ์ทรีนจากการย่อยแป้งในข้อ 9 แล้ว จะทำการลดอุณหภูมิภายในถังย่อยแป้งลงให้เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส

8.2 เติมน้ำเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์

8.3 กวนผสมนาน 24 ชั่วโมง จะได้สารละลายกลูโคสที่มีลักษณะหนืดเล็กน้อย สีเหลืองใส

## ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์และการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

## วิธีการวิเคราะห์และการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

### 1. การวัดค่าความขุ่น (Optical density)

นำตัวอย่างอาหารเพาะเลี้ยงที่ต้องการวิเคราะห์ใส่ลงในหลอดทดลอง ผสมให้ตัวอย่างเข้ากัน นำไปวัดค่าความขุ่นโดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในกรณีที่ตัวอย่างมีความเข้มข้นสูงมาก ให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยมีค่าความขุ่นประมาณ 0.1-0.8 แล้วจึงคำนวณค่าความขุ่นที่แท้จริง ดังสมการ

$$\text{ค่าความขุ่น} = \text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร} \times \text{อัตราการเจือจาง}$$

### 2. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสเฟส (พิมล จำนวนค์, 2545)

#### หลักการ

วัดปริมาณของกรดอะมิโนที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อยสลายโปรตีน

#### การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์

1. สารละลาย Trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์  
เตรียมโดยชั่งกรดไตรคลอโรอะซิติกหนัก 16.35 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร
2. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์  
เตรียมโดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนตหนัก 10.60 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร
3. สารละลายบัฟเฟอร์ คาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 10
  - 3.1 เตรียมสารละลาย Sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ โดยชั่ง โซเดียมคาร์บอเนตหนัก 1.32 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร
  - 3.2 เตรียมสารละลาย Sodium hydrogen carbonate ( $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ ) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ โดยชั่งโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตหนัก 1.05 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร
  - 3.3 ผสมสารละลายในข้อ 3.1 ปริมาตร 27.5 มิลลิลิตร กับสารละลายในข้อ 3.2 ปริมาตร 22.5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายบัฟเฟอร์ คาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 10 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
4. สารละลายเคซีน (Casein) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์  
เตรียมโดยชั่งเคซีน 0.5 กรัม ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ คาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 10 แล้วอุ่นด้วยความร้อน พร้อมทั้งคนให้เคซีนละลาย จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

## 5. สารฟอลินรีเอเจนต์ (Folin-ciocalteu reagent)

นำสารฟอลินรีเอเจนต์ มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1

## 6. สารละลาย L-Tyrosine ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่ง L-Tyrosine 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 7-8 มิลลิลิตร จากนั้นค่อยๆเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล กวนจนไทโรซีนละลายหมด แล้วจึงปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร แล้วเจือจางให้ความลดลง 10 เท่าด้วยน้ำกลั่น

**วิธีการทดลอง****1. การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลาย L-Tyrosine**

1.1 เตรียมสารละลาย L-Tyrosine ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ตั้งแต่ 0 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายแต่ละความเข้มข้นลงในหลอดทดลอง หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

1.2 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.3 เติมสารฟอลินรีเอเจนต์ (1:1) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที

1.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นของสารละลาย L-Tyrosine

**2. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในสารละลายตัวอย่าง**

2.1 ดูดสารละลายเคซีน (Casein) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 2.5 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

2.2 เติมสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบในหลอดทดลอง หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มต่อในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

2.3 เติมสารละลาย Trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที

2.4 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

2.5 ดูดเอาเฉพาะส่วนใส (Supernatant) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

2.6 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.7 เติมสารฟอลินรีเอเจนต์ (1:1) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที

2.8 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

### 3. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในชุดควบคุม

- 3.1 ดูดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบในหลอดทดลอง หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร
- 3.2 เติมสารละลาย Trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา ผสมให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที
- 3.3 เติมสารละลายเคซีน (Casein) ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที
- 3.4 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที
- 3.5 ดูดเอาเฉพาะส่วนใส (Supernatant) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
- 3.6 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- 3.7 เติมสารโพลินรีเอเจนต์ (1:1) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที
- 3.8 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

#### การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{(\text{OD1}-\text{OD2}) \times \text{Total volume} \times \text{Dilution factor}}{\text{MW of Tyrosine} \times \text{Slope} \times \text{Enzyme volume} \times \text{Reaction time}}$$

เมื่อ OD1	=	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่าง
OD2	=	ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม
Total volume	=	ปริมาตรรวมทั้งหมด (5.5 มิลลิลิตร)
MW of Tyrosine	=	น้ำหนักโมเลกุลของไทโรซีน (181.2)
Enzyme volume	=	ปริมาตรของเอนไซม์ที่ใช้ (0.5 มิลลิลิตร)
Reaction time	=	เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (10 นาที)
Slope	=	ค่าความชันจากกราฟมาตรฐาน

### 3. การวัดน้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry cell weight)

5.1 ดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดปั่นเหวี่ยงที่ผ่านการอบแห้งและชั่งน้ำหนักแล้ว

5.2 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ เติส่วนใส (Supernatant) ทิ้ง แล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง (Resuspension)

5.3 นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก

5.4 นำค่าน้ำหนักที่ได้ มาคำนวณมวลเซลล์แห้งตามสูตรดังต่อไปนี้

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\{[\text{น้ำหนักเซลล์ (กรัม)} + \text{น้ำหนักหลอด (กรัม)}] - \text{น้ำหนักหลอด (กรัม)}\} \times 1000}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง (ลิตร)}}$$

### 4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีการ DNS assay (Miller, 1959)

#### การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 200 มิลลิลิตร
2. สารละลายกรดไดไนโตรซาลิซิลิก (Dinitrosalicylic acid : DNS) เตรียมโดยชั่ง DNS (3,5 dinitrosalicylic acid) หนัก 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ทีละน้อย คนให้เข้ากันจนสารละลายใสโดยให้ความร้อน จากนั้นเติมโพแทสเซียมทาร์เทรต 300 กรัม ตามลำดับ คนให้ละลาย รอให้เย็นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดสีชาที่อุณหภูมิห้องไว้ข้ามคืนก่อนใช้งาน
3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร เตรียมโดยชั่งกลูโคส 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

#### วิธีการทดลอง

##### 1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

1.1 เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆกัน โดยนำสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ให้มีความเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1 กรัมต่อลิตร ให้มีปริมาตรสุทธิเท่ากับ 1 มิลลิลิตร

1.2 เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที

1.3 เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร และนำไปสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคส

## 2 การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารละลายตัวอย่าง

2.1 นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงอาหารเลี้ยงเชื้อ มาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม

2.2 จากนั้นเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่น้ำเย็น เป็นเวลา 5 นาที

2.3 เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยค่าการดูดกลืนแสงกับสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ซึ่งคำนวณจากสูตรต่อไปนี้

$$\text{ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐานกลูโคส}}$$

## 5. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ดัดแปลงจาก ฉวีวรรณ สว่างวัน, 2548)

1. ปั่นเหวี่ยงอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ด้วยความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาเฉพาะส่วนใสใส่หลอดทดลองปริมาตร 2 มิลลิลิตร
2. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (Sulfuric acid) ] ปริมาตร 0.11 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นผสมให้เข้ากัน
3. นำไปต้มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
4. ปรับให้มีค่าพีเอชเป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
5. ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ซ้ำอีกครั้ง เพื่อแยกตะกอนที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาในการย่อยสลายออก ดูดเอาเฉพาะส่วนใสไปวัดปริมาณน้ำตาล
6. วัดปริมาณน้ำตาลที่ได้ด้วยวิธี DNS Assay (ข้อ 4)

## 6. การนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Total plate count

1. นำตัวอย่างอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย มาทำการเจือจางด้วยวิธี 10-fold serial dilution โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ จนกระทั่งมีความเข้มข้นที่เหมาะสม ผสมให้ตัวอย่างเข้ากันดี
2. ดูดตัวอย่างที่เจือจางแล้วแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงกลางอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแข็ง BSMF พีเอช 10 ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ (Aseptic technique)
3. ใช้ที่เขี่ยเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เกลี่ยเชื้อให้ทั่วทั้งเพลท จนกระทั่งผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง จึงนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
4. นับจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าของอาหาร โดยจำนวนโคโลนี (CFU) ที่จัดว่านับแล้วได้ผลแม่นยำที่สุด คือ 30-300 โคโลนีต่อเพลท จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างได้ จากสมการดังนี้

$$\text{จำนวนแบคทีเรีย (CFU/mL)} = \text{จำนวนโคโลนีที่นับได้ต่อเพลท} \times \text{อัตราการเจือจาง} \times 10$$



**ภาคผนวก ค**

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ

## การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่าง ๆ

### 1. สารละลายบัฟเฟอร์ Sodium phosphate (พีเอช 6.5 ถึง 8.0)

สารละลาย A: สารละลาย Sodium dihydrogen phosphate ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

เตรียมโดยชั่ง Sodium dihydrogen phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) หนัก 217.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

สารละลาย B: สารละลาย Disodium hydrogen phosphate ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

เตรียมโดยชั่ง Disodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) หนัก 53.65 กรัม หรือ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  หนัก 71.7 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

เตรียมโดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ตามค่าพีเอชที่ต้องการจากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 200 มิลลิลิตร

A (มล.)	B (มล.)	พีเอช	A (มล.)	B (มล.)	พีเอช
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

## 2. สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl (พีเอช 7.2 ถึง 9.0)

สารละลาย A: สารละลาย Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)

ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

เตรียมโดยชั่ง Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) หนัก 24.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

สารละลาย B: สารละลาย Hydrochloric acid (HCl) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

เตรียมโดยผสมสารละลาย A ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กับสารละลาย B ตามค่าพีเอชที่ต้องการจากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 200 มิลลิลิตร

B (มล.)	พีเอช
5.0	9.0
8.1	8.8
12.2	8.6
16.5	8.4
21.9	8.2
26.8	8.0
32.5	7.8
38.4	7.6
41.4	7.4
44.2	7.2

### 3. สารละลายบัฟเฟอร์ Sodium carbonate-bicarbonate (พีเอช 9.2 ถึง 10.7)

สารละลาย A: สารละลาย Sodium carbonate ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

เตรียมโดยชั่ง Sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) หนัก 21.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

สารละลาย B: สารละลาย Sodium hydrogen carbonate ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

เตรียมโดยชั่ง Sodium hydrogen carbonate ( $\text{NaHCO}_3$ ) หนัก 16.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

เตรียมโดยผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ตามค่าพีเอชที่ต้องการจากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 200 มิลลิลิตร

A (มล.)	B (มล.)	พีเอช
4.0	46.0	9.2
7.5	42.5	9.3
9.5	40.5	9.4
13.0	37.0	9.5
16.0	34.0	9.6
19.5	30.5	9.7
22.0	28.0	9.8
25.0	25.0	9.9
27.5	22.5	10.0
30.0	20.0	10.1
33.0	17.0	10.2
35.5	14.5	10.3
38.5	11.5	10.4
40.5	9.5	10.5
42.5	7.5	10.6
45.0	5.0	10.7

#### 4. สารละลายบัฟเฟอร์ Phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaOH}$ ) (พีเอช 11.0 ถึง 11.9)

สารละลาย A: สารละลาย Disodium hydrogen phosphate ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

เตรียมโดยชั่ง Disodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) หนัก 7.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

สารละลาย B: สารละลาย Sodium hydroxide ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

เตรียมโดยชั่ง Sodium hydroxide ( $\text{NaOH}$ ) หนัก 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

เตรียมโดยผสมสารละลาย A ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กับสารละลาย B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ

B (มล.)	พีเอช	B (มล.)	พีเอช
4.1	11.0	11.1	11.50
5.1	11.10	13.5	11.60
6.3	11.20	16.2	11.70
7.6	11.30	19.4	11.80
9.1	11.40	23.0	11.90

### 5. สารละลายบัฟเฟอร์ Hydroxide-chloride (พีเอช 12 ถึง 13.9)

สารละลาย A: สารละลาย Potassium chloride ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์

เตรียมโดยชั่ง Potassium chloride (KCl) หนัก 14.91 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

สารละลาย B: สารละลาย Sodium hydroxide ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

เตรียมโดยชั่ง Sodium hydroxide (NaOH) หนัก 8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

เตรียมโดยผสมสารละลาย A ปริมาตร 25 มิลลิลิตร กับสารละลาย B ตามค่าพีเอชที่ต้องการ

B (มล.)	พีเอช	B (มล.)	พีเอช
6.0	12.0	25.6	12.6
8.0	12.1	32.2	12.7
10.2	12.2	41.2	12.8
12.8	12.3	53.0	12.9
16.2	12.4	66.0	13.9
20.4	12.5		

**ภาคผนวก ง**

ตารางผลการทดลองและผลการวิเคราะห์ชิ้นส่วนยีน  
ด้วยวิธี 16S rDNA sequencing

### ตารางผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ ง-1 ประสิทธิภาพของเอนไซม์ย่อยโปรตีนภายใต้สภาวะที่เป็นต่างของเชื้อ  
แบคทีเรียที่คัดแยกได้ บนอาหารแข็ง BMSM พีเอช 10

รหัสเชื้อ	24 ชั่วโมง			48 ชั่วโมง		
	CZ (cm)	CO (cm)	CZ-CO (cm)	CZ (cm)	CO (cm)	CZ-CO (cm)
001	1.05	0.38	0.67	1.83	0.53	1.30
002	0.93	0.33	0.60	1.55	0.48	1.07
003	1.33	0.40	0.93	1.85	0.50	1.35
004	1.43	0.43	1.00	2.08	0.55	1.53
005	1.20	0.35	0.85	2.00	0.58	1.42
006	1.08	0.40	0.68	1.58	0.60	0.98
007	0.53	0.33	0.20	1.05	0.48	0.57
008	1.18	0.30	0.88	1.70	0.45	1.25
009	1.40	0.45	0.95	2.13	0.70	1.43
010	1.55	0.45	1.10	2.33	0.63	1.70
011	1.50	0.43	1.07	2.23	0.63	1.60
012	1.45	0.43	1.02	2.10	0.58	1.52
013	1.28	0.30	0.98	2.05	0.50	1.55
014	1.23	0.38	0.85	2.00	0.60	1.40
015	1.15	0.33	0.82	1.83	0.58	1.25
016	1.10	0.38	0.72	1.80	0.55	1.25
017	1.18	0.33	0.85	1.88	0.65	1.23
018	1.28	0.40	0.88	2.00	0.60	1.40
019	1.00	0.40	0.60	1.78	0.60	1.18
020	1.28	0.38	0.90	1.93	0.50	1.43
021	0.75	0.35	0.40	1.48	0.53	0.95



ตารางภาคผนวกที่ ง-1 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	24 ชั่วโมง			48 ชั่วโมง		
	CZ (cm)	CO (cm)	CZ-CO (cm)	CZ (cm)	CO (cm)	CZ-CO (cm)
022	0.93	0.33	0.60	1.55	0.50	1.05
023	0.50	0.25	0.25	0.75	0.40	0.35
024	1.20	0.38	0.83	1.30	0.48	0.82
025	-	-	-	-	-	-
026	1.25	0.40	0.85	2.10	0.60	1.50
027	1.00	0.45	0.55	1.80	0.80	1.00
028	-	-	-	-	-	-
029	-	-	-	-	-	-
030	-	-	-	-	-	-
031	-	-	-	-	-	-
032	1.40	0.38	1.03	2.20	0.63	1.57
033	-	0.40	-	-	0.55	-
034	1.38	0.35	1.03	2.00	0.50	1.50
035	0.50	0.28	0.23	0.68	0.38	0.30
036	0.48	0.28	0.20	0.68	0.38	0.30
037	0.48	0.25	0.23	0.48	0.20	0.28
038	0.45	0.25	0.20	0.63	0.30	0.33
039	0.55	0.25	0.30	0.95	0.38	0.57
040	1.35	0.45	0.90	1.98	0.65	1.33
041	1.25	0.35	0.90	1.95	0.50	1.45
042	1.48	0.48	1.00	2.30	0.75	1.55
043	-	-	-	-	-	-
044	0.50	0.25	0.25	0.70	0.35	0.35
045	0.95	0.33	0.62	1.68	0.50	1.18

ตารางภาคผนวกที่ ง-1 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	24 ชั่วโมง			48 ชั่วโมง		
	CZ (cm)	CO (cm)	CZ-CO (cm)	CZ (cm)	CO (cm)	CZ-CO (cm)
046	1.73	0.33	1.40	2.50	0.45	2.05
047	1.45	0.38	1.07	2.23	0.55	1.68
048	1.38	0.38	1.00	2.00	0.53	1.47
049	1.18	0.35	0.83	1.93	0.50	1.43
050	0.98	0.33	0.65	1.45	0.48	0.97
051	1.10	0.38	0.72	1.73	0.53	1.20
052	1.58	0.30	1.28	2.23	0.48	1.75
053	1.30	0.30	1.00	2.03	0.43	1.60
054	0.85	0.25	0.60	1.23	0.40	0.83
055	-	-	-	-	-	-
056	1.73	0.48	1.25	2.43	0.58	1.85
057	1.30	0.40	0.90	2.00	0.58	1.42
058	0.98	0.28	0.70	1.65	0.43	1.22
059	1.10	0.40	0.70	1.90	0.50	1.40
060	1.00	0.35	0.65	1.58	0.45	1.13
061	1.60	0.25	1.35	2.30	0.33	1.97
062	1.10	0.35	0.75	1.68	0.45	1.23
063	1.05	0.33	0.72	1.50	0.48	1.02
064	1.70	0.33	1.37	2.53	0.50	2.03
065	1.00	0.33	0.67	1.63	0.53	1.10
066	1.30	0.35	0.95	1.80	0.50	1.30
067	-	-	-	-	-	-
068	1.05	0.38	0.67	1.80	0.50	1.30
069	0.95	0.33	0.62	1.48	0.40	1.08

ตารางภาคผนวกที่ ง-1 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	24 ชั่วโมง			48 ชั่วโมง		
	CZ (cm)	CO (cm)	CZ-CO (cm)	CZ (cm)	CO (cm)	CZ-CO (cm)
070	1.40	0.38	1.02	2.10	0.50	1.60
071	1.30	0.35	0.95	2.05	0.50	1.55
072	1.13	0.33	0.80	1.65	0.48	1.17
073	1.40	0.40	1.00	2.15	0.63	1.52
074	1.43	0.33	1.10	2.08	0.43	1.65
075	0.95	0.25	0.70	1.48	0.38	1.10
076	1.30	0.50	0.80	2.03	0.70	1.33
077	0.83	0.30	0.53	1.35	0.43	0.92
078	1.05	0.33	0.72	1.65	0.50	1.15
079	1.20	0.28	0.92	1.83	0.40	1.43
080	1.20	0.30	0.90	1.88	0.55	1.33
081	1.28	0.35	0.93	1.98	0.50	1.48
082	1.00	0.20	0.80	1.30	0.28	1.02
083	1.20	0.20	1.00	1.58	0.28	1.30
084	-	-	-	-	-	-
085	0.98	0.20	0.78	1.15	0.25	0.90
086	-	-	-	-	-	-
087	1.13	0.20	0.93	1.50	0.30	1.20
088	1.38	0.43	0.95	2.20	0.75	1.45
089	1.28	0.45	0.83	2.10	0.70	1.40
090	1.40	0.48	0.92	2.15	0.65	1.50
091	1.58	0.45	1.13	2.33	0.73	1.60
092	1.28	0.45	0.83	2.15	0.65	1.50
093	1.20	0.43	0.77	2.08	0.70	1.38

ตารางภาคผนวกที่ ง-1 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	24 ชั่วโมง			48 ชั่วโมง		
	CZ (cm)	CO (cm)	CZ-CO (cm)	CZ (cm)	CO (cm)	CZ-CO (cm)
094	1.30	0.40	0.90	2.15	0.68	1.47
095	1.28	0.43	0.85	2.00	0.70	1.30
096	-	0.15	-	-	0.15	-
097	1.33	0.45	0.88	2.18	0.73	1.45
098	1.10	0.43	0.67	1.85	0.75	1.10
099	0.35	0.25	0.10	0.63	0.35	0.28
100	0.48	0.20	0.28	0.63	0.30	0.33
101	1.15	0.35	0.80	1.75	0.53	1.22
102	0.98	0.45	0.53	1.70	0.73	0.97
103	1.00	0.50	0.50	1.88	1.05	0.83
104	1.03	0.45	0.58	1.80	0.78	1.02
105	0.98	0.38	0.60	1.58	0.53	1.05
106	1.10	0.33	0.77	1.78	0.48	1.30
107	1.05	0.48	0.57	1.55	1.05	0.50
108	1.10	0.40	0.70	1.65	0.63	1.02
109	0.98	0.35	0.63	1.63	0.50	1.13
110	1.03	0.40	0.63	1.73	0.50	1.23
111	0.60	0.23	0.37	0.75	0.30	0.45
112	0.53	0.18	0.35	0.65	0.28	0.37
113	0.50	0.20	0.30	0.70	0.25	0.45
114	0.40	0.15	0.25	0.80	0.23	0.57
115	0.93	0.33	0.60	1.85	0.58	1.27
116	-	0.35	-	-	0.50	-
117	0.40	0.35	0.05	0.55	0.45	0.10

ตารางภาคผนวกที่ ง-1 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	24 ชั่วโมง			48 ชั่วโมง		
	CZ (cm)	CO (cm)	CZ-CO (cm)	CZ (cm)	CO (cm)	CZ-CO (cm)
118	0.53	0.45	0.08	0.75	0.60	0.15
119	1.58	0.25	1.33	2.43	0.30	2.13
120	-	-	-	-	-	-
121	1.28	0.38	0.90	1.98	0.55	1.43
122	0.48	0.35	0.13	0.78	0.60	0.18
123	1.33	0.35	0.98	1.98	0.50	1.48
124	1.38	0.38	1.00	2.08	0.53	1.55
125	0.48	0.35	0.13	0.65	0.55	0.10
126	0.63	0.20	0.43	0.90	0.33	0.57
127	1.33	0.30	1.03	1.98	0.48	1.50
128	-	-	-	-	-	-
129	0.48	0.23	0.25	0.58	0.35	0.23
130	1.20	0.48	0.72	2.08	0.80	1.28
131	1.08	0.50	0.58	1.98	0.93	1.05
132	1.20	0.48	0.72	2.05	0.90	1.15
133	1.30	0.43	0.87	2.18	0.73	1.45
134	1.10	0.43	0.67	1.98	0.75	1.23
135	1.13	0.48	0.65	2.00	0.85	1.15
136	0.95	0.25	0.70	1.40	0.40	1.00
137	1.05	0.48	0.57	1.75	0.95	0.80
138	0.83	0.25	0.58	1.65	0.30	1.35
139	1.10	0.20	0.90	1.80	0.28	1.52
140	0.70	0.23	0.47	1.10	0.28	0.82
141	0.93	0.50	0.43	1.55	0.93	0.62

ตารางภาคผนวกที่ ง-1 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	24 ชั่วโมง			48 ชั่วโมง		
	CZ (cm)	CO (cm)	CZ-CO (cm)	CZ (cm)	CO (cm)	CZ-CO (cm)
142	1.00	0.20	0.80	1.45	0.25	1.20
143	0.55	0.20	0.35	1.13	0.25	0.88
144	1.15	0.28	0.87	1.73	0.35	1.38
145	0.73	0.20	0.53	1.30	0.25	1.05
146	0.95	0.40	0.55	1.70	0.88	0.82
147	0.75	0.20	0.55	1.25	0.25	1.00
148	0.95	0.45	0.50	1.60	0.95	0.65
149	0.50	0.43	0.07	0.78	0.58	0.20
150	1.43	0.40	1.03	2.33	0.63	1.70
151	-	-	-	-	-	-
152	0.60	0.40	0.20	0.98	0.70	0.28
153	0.50	0.33	0.17	0.85	0.60	0.25
154	0.50	0.35	0.15	0.95	0.68	0.27
155	0.55	0.40	0.15	0.90	0.68	0.22
156	0.45	0.35	0.10	0.68	0.55	0.13
157	0.50	0.35	0.15	0.70	0.53	0.17
หมายเหตุ	CO	คือ	เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี			
	CZ	คือ	ขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรีย			
	-	คือ	ไม่มีการเจริญของเชื้อ และ/หรือ ไม่เกิดวงใส			

ตารางผนวกที่ ง-2 กิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรีย  
 ที่คัดเลือกได้จำนวน 28 สายพันธุ์ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BMSM  
 พีเอช 10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ  
 200 รอบต่อนาที

NO.	สายพันธุ์	กิจกรรมเอนไซม์ (U/mL)		อัตราการสร้างเอนไซม์ (U/mL/h)	
		24 h	48 h	24 h	48 h
1	004	0.508	0.471	0.021	0.010
2	010	0.468	0.501	0.019	0.010
3	011	0.471	0.463	0.020	0.010
4	012	0.300	0.611	0.013	0.013
5	013	0.454	0.635	0.019	0.013
6	026	0.469	0.457	0.020	0.010
7	032	0.475	0.667	0.020	0.014
8	034	0.503	0.535	0.021	0.011
9	042	0.458	0.549	0.019	0.011
10	046	0.363	0.501	0.015	0.010
11	047	0.457	0.531	0.019	0.011
12	052	0.116	0.401	0.005	0.008
13	053	0.363	0.551	0.015	0.011
14	056	0.369	0.516	0.015	0.011
15	061	0.171	0.393	0.007	0.008
16	064	0.513	0.520	0.021	0.011
17	070	0.494	0.459	0.021	0.010
18	071	0.340	0.555	0.014	0.012
19	073	0.419	0.461	0.017	0.010

ตารางผนวกที่ ง-2 (ต่อ)

NO.	สายพันธุ์	กิจกรรมเอนไซม์ (U/mL)		อัตราการสร้างเอนไซม์ (U/mL/h)	
		24 h	48 h	24 h	48 h
20	074	0.472	0.461	0.020	0.010
21	090	0.093	0.482	0.004	0.010
22	091	0.203	0.467	0.008	0.010
23	092	0.062	0.434	0.003	0.009
24	119	0.000	0.011	0.000	0.000
25	124	0.159	0.464	0.007	0.010
26	127	0.189	0.288	0.008	0.006
27	139	0.000	0.010	0.000	0.000
28	150	0.485	0.522	0.020	0.011





คำขอบริการที่ 2559/3-119

ที่ ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

รายงานผลการทดสอบและวิเคราะห์  
ให้แก่  
นางสาวกัญญาวีร์ คำคำ

การทดสอบ / วิเคราะห์ การพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA  
 วิธีทดสอบ / วิเคราะห์ การวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วน 16S rDNA  
 ภาวะการทดสอบ / วิเคราะห์ : อุณหภูมิ ..... °C ความชื้นสัมพัทธ์ ..... %  
 วันที่ทดสอบ / วิเคราะห์ 16 สิงหาคม 2559

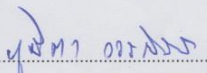
## ผลการทดสอบ / วิเคราะห์

การพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA ของเชื้อแบคทีเรีย 1 สายพันธุ์ พบว่า ตัวอย่างเชื้อรหัส Isolate 032 มีความคล้ายคลึงกับ *Bacillus cohnii* ที่ระดับ 98.27%

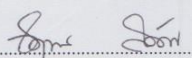
## ผู้ทดสอบ / วิเคราะห์

นางสาวธันท์พร ภูน้ำทอง

## ผู้ตรวจสอบ (2)

  
(ดร. ภูชิตา วรรณนิสสร)

## ผู้ตรวจสอบ (1)

  
(ดร. จารุวรรณ สิทธิพล)

## ผู้รับรอง

  
(ดร. บันชิต ผึ้งสินธุ์)  
ผู้อำนวยการฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ  
วันที่..... วว-TISTR

ผลการทดสอบ หรือ วิเคราะห์นี้ รับรองเฉพาะตัวอย่าง หรือ รายการที่ได้ระบุไว้เท่านั้น การแก้ไขรายงานนี้ถือเป็นความผิดทางกฎหมาย  
 การนำรายงานนี้ไปโฆษณา คัดถ่ายหรือการนำผลบางส่วน ไปเผยแพร่ต่อสาธารณะต้องได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากผู้ว่ากร วว.

แก้ไขครั้งที่ : 1

แบบฟอร์มประกาศใช้วันที่ 22 ตุลาคม 2555

FM-BSD-WI-10-02 (ไทย)

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

๓๕ หมู่ ๓ เทคโนโลยีธานี ต.คลองห้า อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี ๑๒๑๒๐

โทร.(๖๖) ๐ ๒๕๖๗ ๕๐๐ โทรสาร ๐ ๒๕๖๗ ๕๐๐๕

E-mail : tistr@tistr.or.th Website : www.tistr.or.th

วิสัยทัศน์ : เป็นองค์กรชั้นนำระดับอาเซียนในด้านวิจัย พัฒนา และบริการด้านวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและนวัตกรรม

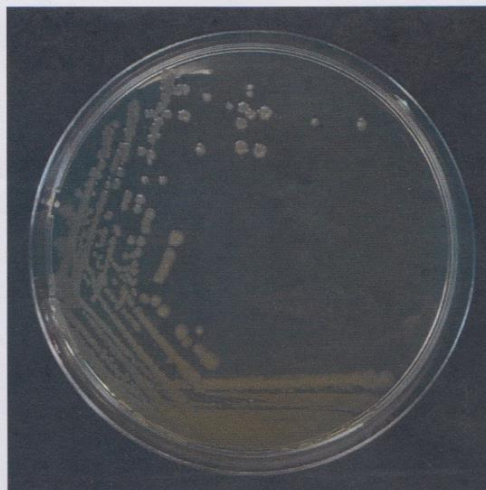
คำขอบริการที่: I\_091/59



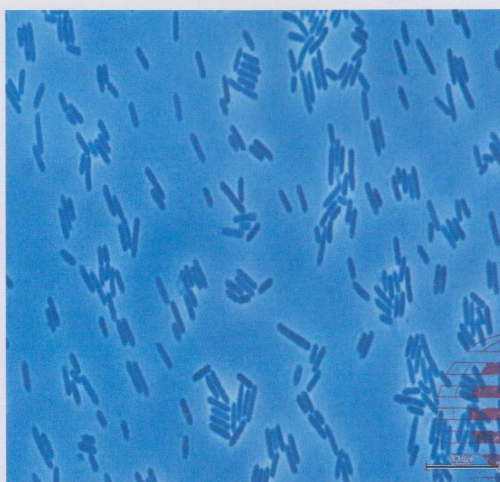
วว-TISTR

หน้า 1 ของ 1

### รายละเอียดการตรวจวิเคราะห์



ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนีสายพันธุ์ 032 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar  
ที่ 37 องศาเซลเซียส อายุ 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 2 ลักษณะเซลล์สายพันธุ์ 032 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar  
ที่ 37 °C อายุ 24 ชั่วโมง (100X)

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย(วว.)

35 หมู่ 3 เทคโนโลยีธานี อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120

โทร. (๐๖) 0 2577 9000 อัดใหม่ดี ๑๐ สาย

โทรสาร (๐๖) 0 2577 9009 E - Mail : tistr.or.th Website : www.tistr.or.th

วิสัยทัศน์ : เป็นองค์กรชั้นนำระดับอาเซียนในด้านวิจัย พัฒนา และบริการด้านวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและนวัตกรรม