

การผลิตอัลคาไลน์โปรตีนจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน
โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะ

กัญญาวีร์ คำคำ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สิงหาคม 2561

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ กัญญาวีร์ ชูคำ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคณะ
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สรนัฐ วัชร นำศาสตร์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรองจันทร์ รัตนประติษฐ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธาน

(รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอษฐ์กุด)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สรนัฐ วัชร นำศาสตร์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กรองจันทร์ รัตนประติษฐ์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริโฉม หุ่นแก้ว)

.....กรรมการ

(ดร.กาญจนา หริ่มเพ็ง)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคณะ
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกวิฑู ศรีสุข)

วันที่ 3 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2561

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความกรุณา ความช่วยเหลือดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างดีจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เศรษฐวัชร น้าศาสตร์ อาจารย์ ที่ปรึกษาหลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณา ให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตรวจสอบแก้ไข ให้ข้อเสนอแนะ และติดตามความก้าวหน้า ในการดำเนินงานวิจัย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริ โฉม ทุงแก้ว กรรมการสอบเค้าโครงวิทยานิพนธ์ กรรมการสอบปากเปล่า และผู้ทรงคุณวุฒิ ผู้เชี่ยวชาญทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์สละเวลาตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่อง และให้แนวคิดต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ให้มีความถูกต้องเหมาะสม และสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณพ่อประชา คุณแม่วัฒนา คุณคำ ครอบครัวและญาติพี่น้องทุกท่าน ที่ให้กำลังใจ คอยช่วยเหลือให้การสนับสนุนในการทำวิจัยด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณ คุณมรกต กระจ่าง คุณขวัญฤทัย มาลัยเรือง คุณอรไพลิน ใจประเสริฐ คุณอัจฉรา แสงจันทร์ และเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ทุกคน ที่ให้กำลังใจและคอยช่วยเหลือสนับสนุน ทั้งร่างกายแรงใจในระหว่างการทำวิจัยด้วยดีเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ทั้งหลายอันเกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญู กตเวทิตาแด่บุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ประสิทธิ์ประสาท วิชาความรู้ และวางรากฐานการศึกษาแก่ผู้วิจัย

กัญญาวิวี คุณคำ

56910027:สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์ชีวภาพ; วท.ม. (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ)

คำสำคัญ: อัลคาไลน์โปรตีเอส/ การเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะ

กัญญาวิรี คุณา: การผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะ (THE PRODUCTION OF ALKALINE PROTEASE BY BACTERIA ISOLATED FROM SOIL USING FED-BATCH CULTIVATION TECHNIQUE) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: เศรษฐวัชร น้าศาสตร์, Ph.D., กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์, Ph.D. 141 หน้า. ปี พ.ศ. 2561.

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินภายในประเทศ ด้วยการสังเกตวงใสรอบโคโลนีเคียวบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BSM 10 และเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว BSM 10 ที่อุณหภูมิ 37 °C พบว่าเชื้อแบคทีเรียจำนวนหกไอโซเลทได้แก่ 012, 013, 032, 042, 053 และ 071 มีแนวโน้มในการสร้างเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินทั้งหมด 157 ไอโซเลท และเมื่อนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท 032 มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ดีที่สุด เมื่อใช้อาหารสูตร BPMM 10 ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ภายใต้อุณหภูมิ 37 °C ซึ่งการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธี 16S rDNA sequencing พบว่ามีความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cohnii* ที่ระดับ 98.27 % เมื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเทคนิคในการเพาะเลี้ยง *B. cohnii* สำหรับการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าการผลิตเอนไซม์ของ *B. cohnii* มีประสิทธิภาพสูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะ โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยง BPMM 10 ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอนและกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้น 2 เท่า ไม่มีการเติมสับสเตรทและไม่มีการควบคุมค่าพีเอช ที่อุณหภูมิ 37 °C อัตราการให้อากาศ 1 vvm ความเร็วใบกวน 500 rpm เติมน้ำที่ระยะ deceleration phase ด้วยอาหารที่มีองค์ประกอบและความเข้มข้นเดียวกันกับในถังหมัก อัตราคงที่ที่ 0.90 L/h ทำให้สามารถวัดค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ได้ 0.124 h⁻¹ อัตราการจำเพาะของการสร้างเอนไซม์ (q_p) ได้ 1.785 U/g cell.h ค่ากิจกรรมเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 9.51 U/mL และ 0.396 U/mL/h ตามลำดับ โดยค่าที่วัดได้สูงกว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะถึง 1.6 เท่า

56910027: MAJOR: BIOLOGICAL SCIENCE; M.Sc. (BIOLOGICAL SCIENCE)

KEYWORDS: ALKALINE PROTEASE/ FED-BATCH CULTIVATION

KANYAWE KUKAM: THE PRODUCTION OF ALKALINE PROTEASE BY BACTERIA ISOLATED FROM SOIL USING FED-BATCH CULTIVATION TECHNIQUE.

ADVISORY COMMITTEE: SEATHAWAT CHAMSART, Ph.D., KRONGCHAN RATANAPHADIT, Ph.D. 141 P. 2018.

This research was to study the alkaline protease production from bacteria isolated from soil in Thailand by observation the appearances of clear zone around bacterial colony on BMSM agar, pH 10, and comparing the crude enzyme activity obtained from culture broth of BMSM, pH 10, at 37 °C. The results indicated that six bacterial isolates including of 012, 013, 032, 042, 053, and 071 showed the highest alkaline protease activity at 48 h. After the optimization of enzyme production in 500 mL-baffle flask, bacteria isolate 032 produced the highest activity when cultivated in BPMM medium, pH 10, with dextrin and soybean meal as carbon and nitrogen source at 37 °C. The strain was identified by 16S rDNA sequencing analysis as *Bacillus cohnii* at 98.27 % similarity. The efficiency of various cultivation techniques for alkaline protease production from *B. cohnii* were 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 (μ) and specific alkaline protease production rate (q_p) of 0.124 h⁻¹ 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.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของโครงการวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
เอนไซม์โปรตีเอส.....	4
คุณสมบัติและการจำแนกเอนไซม์โปรตีเอส.....	4
แหล่งที่มาของเอนไซม์โปรตีเอส.....	9
อัลคาไลน์โปรตีเอส.....	11
การผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากแบคทีเรีย.....	13
เทคนิคในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส.....	19
การนำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ.....	22
งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอส.....	23
3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย.....	30
วัสดุ และอุปกรณ์.....	30
สารเคมี.....	31
สูตรอาหาร.....	32
เชื้อจุลินทรีย์.....	32
วิธีดำเนินการวิจัย.....	33

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการวิจัย.....	43
ผลการเก็บตัวอย่างดินและการคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์.....	43
ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส.....	44
ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส ในระดับฟลาสก์.....	55
ผลการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูง โดยการวิเคราะห์ลำดับเบส ของชิ้นส่วนยีนด้วยวิธี 16S rDNA sequencing.....	92
ผลการศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอส จากเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus cohnii</i> ในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	94
5 อภิปรายและสรุปผล.....	103
อภิปรายผล.....	103
สรุปผล.....	114
ข้อเสนอแนะ.....	115
บรรณานุกรม.....	117
ภาคผนวก.....	123
ภาคผนวก ก.....	124
ภาคผนวก ข.....	129
ภาคผนวก ค.....	136
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	141

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1 การจัดกลุ่มของเอนไซม์โปรตีเอส.....	5
2-2 อัลคาไลน์โปรตีเอสที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม.....	11
2-3 สารอาหารประเภท Macronutrients ที่จำเป็นและหน้าที่.....	14
2-4 แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรม.....	15
2-5 อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ทำให้ผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสสูงที่สุด.....	18
2-6 ข้อดีและข้อเสียของการหมักในอาหารเหลวแต่ละวิธี.....	21
3-1 สภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย <i>Bacillus cohnii</i> เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะ.....	38
4-1 แหล่งของตัวอย่างดินและจำนวนโคโลนีที่สร้างวงใสบนอาหาร BSMM พีเอช 10.....	43
4-2 ประสิทธิภาพของเอนไซม์ย่อยโปรตีนภายใต้สภาวะที่เป็นต่างของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ บนอาหารแข็ง BSMM พีเอช 10.....	45
4-3 กลุ่มของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ตามความสามารถในการสร้างเอนไซม์.....	52
4-4 กิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหกไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกันทั้ง 3 สูตร.....	56
4-5 กิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหกไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด.....	63
4-6 กิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหกไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 5 ชนิด.....	70
4-7 อัตราการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหกไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 5 ชนิด.....	71
4-8 กิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหกไอโซเลทเมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ.....	79
4-9 อัตราการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหกไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ.....	80
4-10 กิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหกไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิที่แตกต่างกันทั้ง 3 ระดับ.....	87

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4-11เปรียบเทียบของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ทั้งหมดไอโซเลท ในสถานะที่มีค่าพีเอชของอาหารเท่ากับ 10 และอุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียส.....	92
4-12พารามิเตอร์การเจริญของ <i>B. cohnii</i> จากการเพาะเลี้ยงแบบกะ ในสถานะต่าง ๆ กัน.....	98
ค-1 กิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ จำนวน 28 ไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BMSM พีเอช 10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที.....	137

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
4-1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสบนอาหารแข็ง	44
4-2 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ในอาหารเหลวBMSM พีเอช 10.....	54
4-3 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน 3 สูตร	57
4-4 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร ที่แตกต่างกัน3 สูตร	58
4-5 ปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร ที่แตกต่างกัน3 สูตร	59
4-6 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหก ไอโซเลทในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน3 สูตร	60
4-7 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีแหล่ง คาร์บอนแตกต่างกัน3 ชนิด	64
4-8 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด	65
4-9 ปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด	66
4-10กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหก ไอโซเลทในสูตรอาหารBPMM พีเอช 10 ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด	67
4-11การเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท ในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน5 ชนิด	72
4-12การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 5 ชนิด	73
4-13ปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 5 ชนิด	74

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-14กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสเฟสในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และมี แหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 5 ชนิด	75
4-15การเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท ในสูตรอาหาร BPMM ที่มีเด็กซ์ทรีน เป็นแหล่งคาร์บอน มีกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน และมีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหาร แตกต่างกัน 4 ระดับ	81
4-16การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน มีกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน และมีค่า พีเอชเริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ	82
4-17ปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน มีกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน และมีค่า พีเอชเริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ	83
4-18กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสเฟสในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหก ไอโซเลทในสูตรอาหารBPMM ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน มีกากถั่วเหลือง เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ.....	84
4-19การเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท ในสูตรอาหาร BPMM โดยใช้เด็กซ์ทรีนเป็น แหล่งคาร์บอน ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 10 และเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ	88
4-20การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM โดยใช้เด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 10 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 ระดับ	89
4-21ปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM โดยใช้เด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 10 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 ระดับ	90

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-22กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหก ไอโซเลทในสูตรอาหารBPMM พีเอช 10 โดยใช้เด็กซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 10 ภายใต้อุณหภูมิ ที่แตกต่างกัน 3 ระดับ	91
4-23ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย 032 (<i>B. cohnii</i>) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar ที่ 37 องศาเซลเซียส อายุ 48 ชั่วโมง	93
4-24ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรีย 032 (<i>B. cohnii</i>) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar ที่ 37 องศาเซลเซียส อายุ 24 ชั่วโมง กำลังขยาย)100 เท่า.....(93
4-25รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของ <i>B. cohnii</i> เมื่อเพาะเลี้ยง แบบกะ โดยใช้อาหารBPMM เข้มข้น 2 เท่า ใช้หางนมผงเข้มข้น 1%(W/V) เป็น สับสเตรท ควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 10 ตลอดกระบวนการ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 VVM และความเร็วใบกวน 500 rpm (Batch No.1)	99
4-26รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของ <i>B. cohnii</i> เมื่อเพาะเลี้ยง แบบกะ โดยใช้อาหารBPMM เข้มข้น 2 เท่า พีเอช 10 ที่ไม่มีการเติมสับสเตรท ไม่มีการ ควบคุมค่าพีเอช อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 VVM และความเร็ว ใบกวน 500 rpm (Batch No.2)	(100
4-27รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของ <i>B. cohnii</i> เมื่อเพาะเลี้ยง แบบกะ โดยใช้อาหารBPMM เข้มข้น 4 เท่า พีเอช 10 ที่ไม่มีการเติมสับสเตรท ไม่มีการ ควบคุมค่าพีเอช อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 VVM และความเร็ว ใบกวน 500 rpm (Batch No.3)	101
4-28รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของ <i>B. cohnii</i> เมื่อเพาะเลี้ยง แบบเติมกะ โดยใช้อาหารBPMM เข้มข้น 2 เท่า พีเอช 10 ที่ไม่มีการเติมสับสเตรท ความเข้มข้นของอาหารที่ใช้เติม 1 เท่า ด้วยอัตรา 0.5 L/h ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 VVM และความเร็วใบกวน 500 rpm..	102

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส (Alkalline protease) (E.C. 3.4.21-24) จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์โปรตีเอสที่สามารถสลายพันธะเปปไทด์ของสายโพลีเปปไทด์ซึ่งเกิดจากหน่วยย่อยของกรดอะมิโนที่เชื่อมต่อกัน ให้ได้สายเปปไทด์ที่มีขนาดสั้นลง ภายใต้สภาวะที่พีเอชเป็นกลางไปจนถึงเป็นด่าง (Gupta, Beg, & Chauhan, 2002) ด้วยคุณสมบัติที่มีกิจกรรมและความเสถียรภายใต้สภาวะดังกล่าว ทำให้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสถูกนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม โดยเริ่มจากการนำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากแบคทีเรียมาเป็นส่วนประกอบในผงซักฟอกเป็นครั้งแรกในปี 1960 (Saeki, Ozaki, Kobayashi, & Ito, 2007) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสิ่งสกปรกบนเนื้อผ้า หลังจากนั้นจึงแพร่หลายไปยังอุตสาหกรรมอื่น ๆ ไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมฟอกหนัง ที่นำอัลคาไลน์โปรตีเอส ไปใช้ในการย่อยกำจัดเส้นขนออกจากหนังสัตว์ รวมไปถึงการนำไปใช้อุตสาหกรรมอาหาร การแพทย์ และการกำจัดของเสียจากอุตสาหกรรม เป็นต้น (Kumar & Takagi, 1999) จากประโยชน์ดังกล่าวจึงทำให้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสมีมูลค่าส่วนแบ่งทางการตลาดมากที่สุด คิดเป็นร้อยละประมาณ 60 ถึง 65 ของตลาดการค้าเอนไซม์ทุกชนิดทั่วโลก (Genckal & Tari, 2006)

ส่วนใหญ่ เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรมจะผลิตมาจากจุลินทรีย์จำพวกกรามและแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* ที่เป็นแบคทีเรียกลุ่มสำคัญในการผลิตเอนไซม์ อัลคาไลน์โปรตีเอสชนิดหลังออกมาภายนอกเซลล์ (Kumar, Venkatachalam, Govindarajan, Balakumaran, & Kalaichelvan, 2012) ซึ่งการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์เหล่านี้ในระดับอุตสาหกรรม นิยมใช้กระบวนการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (Submerged fermentation) ที่ต้องมีการควบคุมสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ในการเพาะเลี้ยงอย่างเหมาะสม เช่น สูตรอาหารเพาะเลี้ยงพีเอช อุณหภูมิ อัตราการให้อากาศและการกวนผสม เป็นต้น รวมไปถึง การเลือกใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งจะช่วยส่งเสริมการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์

จะเห็นได้ว่า เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสมีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมต่าง ๆ เป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมผงซักฟอก แต่เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่นำมาใช้ประโยชน์เกือบทั้งหมดนั้น ต้องนำเข้าจากต่างประเทศทั้งสิ้น คิดเป็นมูลค่าหลายพันล้านบาทต่อปี ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อ

แบคทีเรียที่คัดแยกและคัดเลือกได้จากตัวอย่างดินภายในประเทศไทย โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ (Fed-batch fermentation) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อเป็นแนวทางหนึ่งในการประยุกต์ใช้และขยายกำลังการผลิตไปสู่ระดับอุตสาหกรรม ซึ่งจะช่วยประหยัดเงินตราของประเทศจากการลดปริมาณการนำเข้าของเอนไซม์

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อคัดแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากตัวอย่างดินภายในประเทศ และจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ได้
2. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้
3. เพื่อศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. คัดแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากตัวอย่างดินภายในประเทศ และจัดจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย
2. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ได้แก่ สูตรอาหารสำหรับเพาะเลี้ยง แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน พีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสม
3. ศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยเปรียบเทียบระหว่างการหมักแบบกะ (Batch fermentation) และการหมักแบบเติมกะ (Fed-batch fermentation) และใช้สภาวะในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 2 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส ได้มีประสิทธิภาพสูง
2. ทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

3. ทราบเทคนิคในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

4. สามารถนำข้อมูลพื้นฐานต่าง ๆ ที่ได้จากงานวิจัยไปพัฒนาเพื่อเป็นแนวทางในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในระดับอุตสาหกรรม

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอนไซม์โปรตีเอส

เอนไซม์โปรตีเอส (EC. 3:4, 11-19, 20-24, 99) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ (Peptide bond) ของโปรตีน ให้ได้เป็นกรดอะมิโนและเปปไทด์สายสั้น ๆ ด้วยคุณสมบัติดังกล่าว ปัจจุบันจึงมีการนำเอนไซม์โปรตีเอสมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมประเภทต่าง ๆ มากมาย เช่น อุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมสิ่งทอ การบำบัดของเสีย และโดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมสารซักล้าง (Jisha et al., 2013) โดยแหล่งที่มาของโปรตีเอสที่นำมาใช้ประโยชน์นั้น มีทั้งจากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ แต่โปรตีเอสที่มีบทบาทสำคัญที่สุดในอุตสาหกรรมนั้น เป็นโปรตีเอสที่ได้จากจุลินทรีย์ ทั้งจากธรรมชาติและที่เรื้อย โดยมีปริมาณการผลิตคิดเป็นสองในสามส่วนของตลาดการค้าเอนไซม์ทุกชนิดทั่วโลก (Gupta, Beg, & Lorenz, 2002)

คุณสมบัติและการจำแนกเอนไซม์โปรตีเอส

เอนไซม์ในปัจจุบันนั้น สามารถแบ่งได้เป็น 6 หมวดหมู่ (Class) ตามการจัดกลุ่มของ International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) โดยแบ่งตามลักษณะการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์กับสับสเตรท ได้แก่ 1) ออกซิโดรีดักเตส (Oxidoreductase) 2) ทรานสเฟอร์ส (Transferase) 3) ไฮโดรเลส (Hydrolase) 4) ไลเอส (Lyase) 5) ไอโซเมอเรส (Isomerase) และ 6) ไลเกส (Ligase) ส่วนเอนไซม์โปรตีเอสนั้นถูกจัดอยู่ในหมวดหมู่ (Class) ที่ 3 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolytic enzyme) และถูกจัดอยู่ในกลุ่มย่อย (Subclass) ตามลักษณะเฉพาะของการเร่งปฏิกิริยาบนพันธะเปปไทด์ได้เป็น 3.4 ซึ่งเป็นการแบ่งตามระบบ Enzyme Classification (EC) นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งโปรตีเอส ออกเป็นกลุ่มย่อยของตัวเลขชุดที่ 2 (Sub-subclass) ได้อีก 2 กลุ่ม คือ Exopeptidases และ Endopeptidases ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 การจัดกลุ่มของเอนไซม์โปรตีเอส (Rao, Tanksale, Ghatge, & Deshpande, 1998)

Protease	Mode of action	EC no.
Exopeptidases		
Aminopeptidases	● -○ -○ -○ -○ -○ ↓	3.4.11
Dipeptidyl peptidase	● -● -○ -○ -○ -○ ↓	3.4.14
Tripeptidyl peptidase	● -● -● -○ -○ -○ ↓	3.4.14
Carboxypeptidase	-----○ -○ -○ -○ -○ -○ ↓ ●	3.4.16-3.4.18
Serine type protease		3.4.16
Metalloprotease		3.4.18
Cysteine type protease		3.4.15
Peptidyl dipeptidase	-----○ -○ -○ -○ -○ ↓ ● ●	3.4.13
Dipeptidases	● -● ↓	3.4.19
Omega peptidase	*-● -○ -○ -○ ↓	3.4.19
	---○ -○ -○ -○ ↓ ●*	
Endopeptidases		
	---○ -○ -○ -○ ↓	3.4.21-3.4.34
Serine protease		3.4.21
Cysteine protease		3.4.22
Aspartic protease		3.4.23
Metalloprotease		3.4.24
Endopeptidases of unknown		3.4.99
Catalytic mechanism		

หมายเหตุ วงกลมสีขาวแทน Amino acid residues ในสายโพลีเปปไทด์
 วงกลมสีดำแทน Terminal amino acid
 เครื่องหมายดอกจันแทน Blocked termini
 ลูกศรแทนตำแหน่งที่เกิดการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

1. Exopeptidases

Exopeptidases เป็นกลุ่มของเอนไซม์โปรตีเอส ที่ทำหน้าที่ตัดพันธะเปปไทด์จากปลายสายของเปปไทด์หรือโปรตีนเข้าด้านใน ซึ่งอาจเป็นได้ทั้งปลาย C-terminus หรือ N-terminus ขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ กลไกและตัวอย่างของเอนไซม์ Exopeptidases ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2-1

1.1 Aminopeptidases

Aminopeptidases จะทำหน้าที่ตัดพันธะเปปไทด์บริเวณปลาย N-terminus โดยตัดเข้าไปทีละหนึ่งหน่วย มักพบเอนไซม์ชนิดนี้ในจุลินทรีย์หลากหลายชนิด ทั้งราและแบคทีเรีย ทำให้เอนไซม์ชนิดนี้มีความจำเพาะต่อลำดับสเตรทแตกต่างกันอย่างชัดเจนในราและแบคทีเรีย ดังนั้นจึงสามารถจำแนกชนิดของเอนไซม์ได้จากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นภายหลังกระบวนการไฮโดรไลซิส (Hydrolysis)

1.1.1 Dipeptidyl peptidase

เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อพันธะเปปไทด์ของโปรตีน โดยตัดจากปลายสายบริเวณ N-terminus ของโปรตีนเข้าด้านในทีละ 2 หน่วย

1.1.2 Tripeptidyl peptidase

เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อพันธะเปปไทด์ของโปรตีน โดยตัดจากปลายสายบริเวณ N-terminus ของโปรตีนเข้าด้านในทีละ 3 หน่วย

1.2 Carboxypeptidases

Carboxypeptidases จะทำหน้าที่ตัดพันธะเปปไทด์บริเวณปลาย C-terminus แล้วปลดปล่อยกรดอะมิโนหนึ่งหน่วยหรือไดเปปไทด์ (Dipeptide) ออกมา เอนไซม์โปรตีเอสในกลุ่มนี้สามารถแบ่งออกได้อีกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ Serine carboxypeptidase, Metallo-carboxypeptidases และ Cysteine carboxypeptidase ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโนตรงบริเวณเร่งของเอนไซม์

1.2.1 Peptidyl dipeptidase

เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อพันธะเปปไทด์ของโปรตีน โดยตัดจากปลายสายบริเวณ C-terminus ของโปรตีนเข้าด้านในทีละ 2 หน่วย

1.2.2 Dipeptidases

เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อสเตรทที่เป็นไดเปปไทด์ (Dipeptide) ตรงตำแหน่งพันธะเปปไทด์บริเวณปลายสายของโปรตีน

1.3 Omega peptidase

Omega peptidase เป็นเอนไซม์ที่สามารถตัดพันธะเปปไทด์ได้ทั้งบริเวณปลาย N- และ C-terminus ของสายโพลีเปปไทด์

2. Endopeptidases

Endopeptidases เป็นกลุ่มของเอนไซม์โปรติเอสที่ทำหน้าที่ตัดพันธะเปปไทด์ภายในสายโพลีเปปไทด์ของโปรตีน แบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มย่อย ตามลักษณะของกลไกในการเร่งปฏิกิริยา คือ Serine proteases, Aspartic proteases, Cysteine proteases และ Metalloproteases

2.1 Serine protease (E.C. 3.4.21)

เป็นเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโนเซรีนอยู่ตรงบริเวณเร่งของเอนไซม์ พบอย่างแพร่หลายทั้งในไวรัส แบคทีเรีย และยูคาริโอต เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิต Serine protease สามารถถูกยับยั้งแบบไม่ผันกลับ (Irreversible Inhibition) ได้ โดย Diisopropyl fluorophosphate (DFP) และ Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) โดยทั่วไปสามารถทำงานได้ที่สภาวะเป็นกลางจนถึงด่าง ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ระหว่าง 7 - 11 น้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 18 - 35 กิโลดาลตัน สามารถแบ่งออกได้เป็น 6 กลุ่มย่อย (Gupta et al., 2002) ดังนี้

2.1.1 Chymotrypsin-like protease

เป็นเอนไซม์ที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ Trypsin, Elastase และ Thrombin มีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่เป็นกรดอะมิโนพื้นฐานชนิดต่าง ๆ ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 8.0 สามารถถูกยับยั้งการทำงานได้โดยสารพวก *N*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone, L-1-tosylamide-2-phenylethyl chloromethyl ketone, Diisopropyl fluorophosphate และ Soyabean trypsin inhibitor

2.1.2 Subtilisin-like protease หรือ subtilase

เป็นเอนไซม์ที่มีจุดกำเนิดมาจากแบคทีเรีย ซึ่งจะถูกล้างออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลายสารอาหาร มีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่เป็นวงแหวนและมีคุณสมบัติไฮโดรโฟบิก ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 10.0 สามารถถูกยับยั้งปฏิกิริยาได้โดยสาร PMSF, Diisopropyl fluorophosphates (DFP) และ Potato inhibitor

2.1.3 Wheat serine carboxypeptidase II-like protease

เป็นเอนไซม์ที่มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 4.5-5.5 นั้นแสดงให้เห็นว่าฮิสทีดีน (Histidine) ที่อยู่ตรงบริเวณเร่งมีค่า pK_a ต่ำกว่าปกติ

2.1.4 Prolyl oligopeptidase-like serine protease

เป็นเอนไซม์กลุ่มที่ยังไม่ค่อยทราบคุณสมบัติมากนัก แต่สามารถใช้เทคนิค Sequence homology มาอธิบายได้

2.1.5 Myxobacter α -lytic protease

เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนที่เป็นกลางและมีโครงสร้างเป็นสาย มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 9.0 และสามารถถูกยับยั้งปฏิกิริยาได้โดยสารจำพวก Diisopropyl fluorophosphates (DFP)

2.1.6 Staphylococcal protease

ถูกสร้างจากแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 4.0-7.8 มีความจำเพาะต่อพันธะเปปไทด์ตรงหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนที่เป็นกรด และถูกยับยั้งปฏิกิริยาได้โดยสาร Diisopropyl fluorophosphates (DFP)

2.2 Aspartic proteases (E.C. 3.4.23)

Aspartic protease หรือที่รู้จักกันในชื่อ Acidic protease เป็นเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโนแอสปาร์ติกอยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ ส่วนใหญ่ได้จากราและยีสต์ แต่ก็มีแบคทีเรียบางจำพวกที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วง 2.0-4.0 สารที่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้ เช่น Pepstatin, Dansyl-pepstatin และ Diazoketone แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วยสารจำพวก EDTA และ Diisopropyl fluorophosphates (DFP) มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 30 - 45 กิโลดาลตัน

2.3 Cysteine protease (E.C. 3.4.22)

Cysteine protease หรือที่เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Sulphydryl protease เป็นเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโนซิสเทอีนอยู่ตรงบริเวณเร่งหรืออีกนัยหนึ่งคือมีหมู่ -SH ตรงบริเวณเร่ง ทำงานได้ดีในสภาวะที่มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.0-7.5 และจะทำงานได้ดีเมื่อมีสารรีดิวซ์ สามารถถูกยับยั้งการทำงานได้โดยสารจำพวก Sulphydryl reagents หรือ Sulphydryl group (-SH) หรือกลุ่มไทออล ซึ่งจะทำให้หมู่ซัลไฟไพลิดที่บริเวณเร่งได้รับความกระทบกระเทือนและสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ในที่สุด

2.4 Metalloprotease (E.C. 3.4.24)

Metalloprotease เป็นเอนไซม์โปรตีนที่มีไอออนของโลหะเป็นตัวกระตุ้นการทำงาน และพบไอออนของโลหะที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ในลักษณะของโคแฟกเตอร์ หรือเข้าร่วมในปฏิกิริยาการย่อยสลายของเอนไซม์ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

2.4.1 Neutral protease

เป็นเอนไซม์ที่มีอะตอมของสังกะสี (Zn) อยู่ตรงบริเวณเร่ง โดยมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ระหว่าง 6.5-7.0 และสามารถถูกยับยั้งการทำงานได้ด้วยสารจำพวก Chelating agent

2.4.2 Alkaline-metalloprotease

เป็นเอนไซม์ที่มีโลหะอยู่ตรงบริเวณเร่ง ทำงานได้ดีเมื่อค่าพีเอชอยู่ในช่วง 7.0-9.0 และต้องใช้ EDTA ที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 0.1 โมลาร์ จึงจะสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้

แหล่งที่มาของเอนไซม์โปรตีเอส

เนื่องจากเอนไซม์โปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด จึงทำให้สามารถพบเอนไซม์ชนิดนี้ได้หลาย ๆ แหล่ง ทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์

โปรตีเอสจากพืช

การใช้เอนไซม์โปรตีเอสจากพืชนั้น เกิดขึ้นด้วยเหตุผลหลายประการ เช่น การมีพื้นที่ที่เหมาะสมต่อการเพาะปลูก และภูมิอากาศที่เหมาะสมแก่การเจริญของพืช เป็นต้น โปรตีเอสจากพืชที่รู้จักกันดีนั้น ได้แก่ Papain จากยางมะละกอ Bromelain จากสับปะรด และ Keratinase จากพืชสมุนไพรบางชนิด เป็นต้น ปัญหาหลักของการใช้เอนไซม์โปรตีเอสจากพืช คือ ต้องเพาะปลูกพืชในบริเวณที่มีสภาพภูมิอากาศเหมาะสมเท่านั้น ทำให้ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากพืชได้เพียงบางพื้นที่ นอกจากนี้ เอนไซม์ที่ได้จากพืชนั้นยังมีความเข้มข้นต่ำ จึงต้องใช้วัตถุดิบในปริมาณมากเพื่อผลิตเอนไซม์ให้ได้ ตามความต้องการ

โปรตีเอสจากสัตว์

โปรตีเอสจากสัตว์ที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ Chymotrypsin, Trypsin, Pepsin และ Renin เอนไซม์เหล่านี้สามารถผลิตให้อยู่ในรูปของเอนไซม์บริสุทธิ์ในปริมาณที่มากได้ แต่อย่างไรก็ตาม การผลิตเอนไซม์เหล่านี้ขึ้นขึ้นอยู่กับการเลี้ยงสัตว์เพื่อบริโภค จึงมักถูกควบคุมด้วยนโยบายทางการเมืองและเกษตรกรรม

โปรตีเอสจากจุลินทรีย์

แม้ว่าจะมีการใช้ประโยชน์เอนไซม์โปรตีเอสจากพืชและสัตว์กันอย่างแพร่หลายทั่วโลก แต่ในระดับอุตสาหกรรม มักเลือกที่จะผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากเชื้อจุลินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากจุลินทรีย์เติบโตได้อย่างรวดเร็ว และง่ายต่อการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการได้ ดังนั้นเอนไซม์โปรตีเอสจากจุลินทรีย์จึงสามารถครอง

ส่วนแบ่งในตลาดการค้าเอนไซม์ทั่วโลกถึงสองในสามส่วน โดยถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมสารซักล้าง อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมอาหาร และ อุตสาหกรรมกระดาษ เป็นต้น เอนไซม์โปรตีเอสจากจุลินทรีย์นั้น สามารถผลิตได้จากทั้งราและแบคทีเรีย

1. โปรตีเอสจากรา

โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อรานั้นได้รับความสนใจในการศึกษาวิจัยเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีความหลากหลายสูง มีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่ค่อนข้างหลากหลาย อีกทั้งยังมีความเสถียรภายใต้สภาวะที่รุนแรง จึงมีข้อดีคือ ทำให้สามารถแยกเอนไซม์ออกจากเส้นใยไมซีเลียม (Mycelium) ได้โดยการกรอง (Filtration) โดยทั่วไปเอนไซม์โปรตีเอสจากเชื้อรามักจะผลิตด้วยวิธีการหมักบนอาหารแข็ง (Solid-state fermentation) และมักนำไปใช้ในการแปรรูปอาหารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ

2. โปรตีเอสจากแบคทีเรีย

เอนไซม์โปรตีเอสในอุตสาหกรรมที่สำคัญนั้นมักผลิตจากแบคทีเรีย โดยเฉพาะที่ได้จากแบคทีเรียในสกุล (Genus) *Bacillus* เนื่องจากสามารถผลิตได้ในปริมาณมากและมีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์สูง โปรตีเอสที่ผลิตจากแบคทีเรีย สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน ความคงตัว และลักษณะโครงสร้างของบริเวณเร่ง ได้แก่

2.1 Neutral bacterial protease

Neutral bacterial protease ได้แก่ Metalloenzymes (CAS number: 9068-59-1) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ต้องการไอออนของโลหะในการทำงาน สามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชระหว่าง 6-9 เช่น เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis*, *B. thermoproteolyticus* และ *Streptomyces griseus* ซึ่งมีการผลิตทั้งในรูปแบบผงและสารละลายที่มีความคงตัว (Stabilized solutions) มักถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรม ฟอกหนัง อุตสาหกรรมเบียร์ และการผลิต Protein hydrolysate

2.2 Alkaline bacterial protease

Alkaline bacterial protease ได้แก่ Subtilisin (CAS number: 9014-01-1) เป็นเอนไซม์ที่มีบริเวณเร่งปฏิกิริยาเป็นกรดอะมิโนเซรีน สามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชระหว่าง 7 - 11 และสามารถทำงานได้ดีที่สุดในช่วงพีเอชระหว่าง 7.5 - 9.5 ถูกยับยั้งการทำงานแบบไม่ผันกลับได้ด้วยสารจำพวก Chelating agent

อัลคาไลน์โปรตีเอส (Alkaline protease)

อัลคาไลน์โปรตีเอส (E.C. 3.4.21-24) จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์โปรตีเอสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของสายโพลีเปปไทด์ ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่มีค่าพีเอชเป็นกลางไปจนถึงด่างได้ จึงถูกนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อุตสาหกรรมซักล้าง เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมแสดงไว้ในตารางที่ 2-2 โดยทั่วไปแล้ว อัลคาไลน์โปรตีเอสสามารถทำงานได้ในสภาวะที่มีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 8-12 และอุณหภูมิในช่วง 50-70 องศาเซลเซียส แต่ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ระหว่าง 9-11 และมีส่วนน้อยที่สามารถทำงานได้ดีเมื่อค่าพีเอชสูงขึ้นไปถึง 12 และ 13 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานนั้นอยู่ระหว่าง 50-70 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่อัลคาไลน์โปรตีเอสมักต้องการไอออนของโลหะเพื่อให้มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด ซึ่งไอออนของโลหะที่นิยมนำมาใช้ ได้แก่ Ca^{2+} , Mg^{2+} และ Mn^{2+} โดยที่ Ca^{2+} จะมีบทบาทสำคัญต่อความเสถียรของเอนไซม์ เนื่องจากช่วยเพิ่มกิจกรรมและความทนต่อความร้อน (Thermal stability) ของอัลคาไลน์โปรตีเอสเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง นอกจากนี้ไอออนของโลหะชนิดอื่น เช่น Ba^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , และ Zn^{2+} ก็มักถูกนำมาใช้ในการคงสภาพ (Stabilization) ของเอนไซม์ด้วยเช่นกัน ส่วนไอออนของโลหะจำพวก Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ag^{2+} , Fe^{2+} และ Zn^{2+} มักถูกพบว่ายับยั้งการทำงานของอัลคาไลน์โปรตีเอสเป็นส่วนมาก (Jisha et al., 2013)

ตารางที่ 2-2 อัลคาไลน์โปรตีเอสที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม (Anwar & 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
<i>Conidiobolus coronatus</i> (alkaline proteinase B)	Fungal	9-7	Resolution of racemic mixtures of D, L phenyl alanine and glycine

ตารางที่ 2-2 (ต่อ)

Species	Source	pH Optimum	Industrial applications
<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 industry
<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>Thermus</i> Rt 41A	Bacterial	11.0	?
<i>Bacillus</i> sp. (Savinase/ Durazym)	Bacterial	9.0-11.0	Detergent formulations
<i>Bacillus licheniformis</i> (Alcalase)	Bacterial	8.2	Synthesis of biologically active peptides
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacterial	8.5	Bating agent in leather industry
<i>Bacillus</i> sp.	Bacterial	8.5	industry
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacterial	-	?
<i>Amycolata/ Amycolatopsis</i>	-	8-11.0	Contact lens cleansing agent
<i>Spilosoma obliqua</i> (Lepidoptera)	Insect larvae	11.0	Cheese and detergents Commercial detergents and stain remover formulations

การผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากแบคทีเรีย

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้ส่วนใหญ่ มักผลิตเอนไซม์ออกมาในปริมาณน้อย ดังนั้น การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เหล่านี้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม เพื่อเพิ่มการผลิตเอนไซม์จึงเป็นสิ่งสำคัญ สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์มักมีความแตกต่างจากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมมักจะใช้แหล่งคาร์บอน โปรตีน และองค์ประกอบอื่น ที่ความเข้มข้นสูงประมาณ 100 - 150 กรัม/น้ำหนักแห้งต่อลิตร ดังนั้น ในการที่จะพัฒนาเทคโนโลยีในการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสให้สามารถใช้จริงในระดับอุตสาหกรรมได้ จะต้องคำนึงถึง การเพิ่มผลผลิต (Yield) ของเอนไซม์ การหาสูตรอาหาร และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต (Kumar & Takagi, 1999)

สูตรอาหารในการเพาะเลี้ยง (Fermentation medium) (Bhunja, Basak, & Dey, 2012)

การออกแบบสูตรอาหาร (Medium design)

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จะต้องมีสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต โดยทั่วไปจุลินทรีย์สามารถสังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ได้จากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหาร อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ก็ยังคงต้องการสารอาหารชนิดอื่นๆ อีก เช่น กรดอะมิโน แร่ธาตุ และวิตามิน เป็นต้น เพื่อใช้ในการเจริญ นอกจากนี้ สภาวะที่ใช้ในการเจริญและการผลิตเอนไซม์มักมีความแตกต่างกัน ดังนั้น การปรับปรุงสูตรอาหารให้มีความเหมาะสมจึงจำเป็นต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์

องค์ประกอบของเซลล์ (Cell composition)

เซลล์ของแบคทีเรียประกอบด้วยสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น โปรตีน กรดนิวคลีอิก โพลีแซ็กคาไรด์ ลิพิด และสารอื่น ๆ การสร้างสารโมเลกุลขนาดใหญ่ที่เป็นองค์ประกอบหลักของเซลล์เหล่านี้ เกิดขึ้นจากกระบวนการ Polymerization ของหน่วยย่อย (Building blocks) ต่าง ๆ ที่จำเป็น และนอกจากองค์ประกอบเหล่านี้แล้ว เซลล์ยังประกอบด้วยสารเมตาบอไลต์ต่าง ๆ ในรูปของเกลืออินทรีย์ สารตัวกลางของวิถีเมตาบอลิซึม และวิตามินอีกด้วย โดยทั่วไป เซลล์แบคทีเรียมักจะประกอบด้วยคาร์บอน 50 เปอร์เซ็นต์ ออกซิเจน 20 เปอร์เซ็นต์ ไนโตรเจน 14 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจน 8 เปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัส 3 เปอร์เซ็นต์ และซัลเฟอร์ 1 เปอร์เซ็นต์

เอนไซม์จากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ถูกสร้างขึ้นเนื่องจากการตอบสนองต่อองค์ประกอบต่าง ๆ ภายในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น สารอาหาร ฮอร์โมน และไอออนต่าง ๆ ดังนั้น การที่จะปรับปรุงสูตรอาหารให้เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์นั้น ต้องพิจารณาถึง

ความต้องการสารอาหารของเซลล์ทั้งในด้านปริมาณ (Quantitative) และด้านคุณภาพ (Qualitative) ควบคู่กัน สารอาหารที่เซลล์ต้องการนั้น สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. Macronutrients

เป็นสารอาหารที่เซลล์ต้องการที่ความเข้มข้นมากกว่า 10^{-4} โมลาร์ เช่น คาร์บอน ไนโตรเจน ออกซิเจน ไฮโดรเจน ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส Mg^{2+} และ K^+ ตารางที่ 2-3 จะแสดง สารอาหารประเภท Macronutrients หลัก ๆ ที่เซลล์ต้องการ

2. Micronutrient

เป็นสารอาหารที่เซลล์ต้องการที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 10^{-4} โมลาร์ เช่น MO^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Na^{2+} วิตามิน ฮอร์โมนและสารตั้งต้นสำหรับกระบวนการเมแทบอลิซึม เป็นต้น

ตารางที่ 2-3 สารอาหารประเภท Macronutrients ที่จำเป็นและหน้าที่ (Bhunja et al., 2012)

Element	Physiological Function	Required Concentration (mol/L)
Carbon	Constituents of organic cellular material. Often the energy source.	$>10^{-2}$
Nitrogen	Constituents of proteins, nucleic acids, and coenzymes.	10^{-3}
Hydrogen	Organic cellular material and water.	-
Oxygen	Organic cellular material and water. Required for aerobic respiration.	-
Sulfur	Constituents of proteins and certain coenzymes.	10^{-4}
Phosphorus	Constituents of nucleic acid, phospholipids, nucleotides, and certain coenzymes.	$10^{-4} - 10^{-3}$
Potassium	Principle inorganic cation in the cell and cofactor for some enzymes.	$10^{-4} - 10^{-3}$
Magnesium	Cofactor for many enzymes and chlorophylls and present in cell walls and membranes.	$10^{-4} - 10^{-3}$

อัลคาไลน์โปรตีนเอสประกอบด้วยคาร์บอน 53.8 เปอร์เซ็นต์ และไนโตรเจน 15.6 เปอร์เซ็นต์ (Bhunia et al., 2012) การผลิตอัลคาไลน์โปรตีนขึ้นอยู่กับทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรคาริโอตหากมีปริมาณของคาร์บอนและไนโตรเจนไม่เพียงพอ จะเกิดการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ได้ แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมแสดงไว้ในตารางที่ 2-4

ตารางที่ 2-4 แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรม (Bhunia et al., 2012)

Carbon Sources	Nitrogen Sources
Starch waste (maize and potato)	Soybean meal
Molasses (cane and beer)	Yeast extract
Whey	Distillers soluble
n-Alkanes	Cottonseed extract
Gas oil	Dried blood
Sulfite waste liquor	Corn steep liquor
Domestic sewage	Fish solubles and meal
Cellulose waste	Groundnut meal
Carbon bean	Casein

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Type of media)

แบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงเพื่อจุดประสงค์ต่าง ๆ จะต้องอยู่ในสภาวะที่มีความเหมาะสมทั้งทางชีวเคมีและทางกายภาพ สภาวะทางชีวเคมีหรือความต้องการสารอาหารที่เหมาะสมนั้นพิจารณาได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากความต้องการสารอาหารชนิดพิเศษที่แตกต่างกันของแบคทีเรีย จึงทำให้มีการพัฒนาคิดค้นสูตรอาหารเพื่อใช้ในงานต่าง ๆ เป็นจำนวนมาก และสามารถจัดกลุ่มของอาหารเลี้ยงเชื้อได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ อาหารชนิด Chemically defined medium หรือ Synthetic medium ซึ่งเป็นอาหารที่ทราบองค์ประกอบที่แน่นอน และ Complex medium หรือ Undefined medium ซึ่งเป็นอาหารที่ทราบองค์ประกอบที่แน่นอนเพียงบางส่วนเท่านั้น

การปรับปรุงสูตรอาหารที่เหมาะสม (Optimization of media component)

ในทางอุตสาหกรรม การปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อมักมีวัตถุประสงค์เพื่อรักษาความสมดุลของแต่ละองค์ประกอบภายในอาหาร ซึ่งการปรับปรุงสูตรอาหารนั้นจะช่วยลดการเหลืออยู่ขององค์ประกอบต่าง ๆ หลังเสร็จสิ้นการเพาะเลี้ยง การที่จะปรับปรุงสูตรอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพต้องคำนึงถึงสิ่งต่าง ๆ เหล่านี้

1. ต้องมีการประเมินอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในทางเศรษฐศาสตร์ เปรียบเทียบกับผลผลิตที่ได้ (Yield)
2. จำเป็นต้องใส่ไอออนของโลหะบางชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ
3. ต้องมีการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงและปัจจัยที่สำคัญต่าง ๆ ในการหมัก ได้แก่ ค่าพีเอช อุณหภูมิ การให้อากาศ (Aeration) และการกวนผสม (Agitation)

อิทธิพลขององค์ประกอบต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ
จุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถใช้ไนโตรเจนทั้งที่อยู่ในรูปสารอินทรีย์และอนินทรีย์แล้วสร้างเป็นกรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก โพรตีน และองค์ประกอบของผนังเซลล์ได้ โดยทั่วไป เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจะมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 15.6 เปอร์เซ็นต์ และการผลิตเอนไซม์นั้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ มีการรายงานว่าเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นสารอนินทรีย์ จะทำให้อัตราการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสลดลง และพบว่าการสังเคราะห์เอนไซม์จะถูกยับยั้งเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนที่ถูกเมทาบอลิซึมได้ง่าย เช่น กรดอะมิโนและไอออนของแอมโมเนียม อย่างไรก็ตาม มิงานวิจัยของ Nehete, Shah, and Kotari (1986) ที่ผลแสดงให้เห็นว่า การใช้เกลือของแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนไม่มีผลไปยับยั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์
2. อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ
การผลิตเอนไซม์โดยวิธีการทางกระบวนการชีวภาพนิยมใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่จากการศึกษาพบว่า การใช้กลูโคสสามารถทำให้เกิดกระบวนการ catabolite repression ซึ่งจะส่งผลให้อัตราการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสลดลง (Priest, 1977) และพบว่าการลดลงของค่าพีเอชในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงอันเนื่องมาจากการเจริญอย่างรวดเร็วของจุลินทรีย์ก็จะส่งผลให้การผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสลดลงด้วยเช่นกัน สำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม มักใช้คาร์โบไฮเดรตที่ความเข้มข้นสูงซึ่งจะไปยับยั้งการผลิตเอนไซม์ ดังนั้นจึงต้องใช้วิธีการเติมคาร์โบไฮเดรตลงในอาหารอย่างต่อเนื่อง หรือเติมเป็นชุด ๆ ตลอดกระบวนการหมักเพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดการยับยั้ง โดยควบคุมให้ปริมาณของสารอาหารอยู่ในสภาวะจำกัดอยู่เสมอ

และยังเป็นการลดการให้พลังงานแก่กระบวนการผลิตอีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า การเติมกรดอินทรีย์ต่าง ๆ เช่น Acetic acid, Methyl acetate และ Citric acid หรือ Sodium citrate ลงในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถช่วยเพิ่มอัตราการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสได้

3. ความต้องการไอออนของโลหะ

กระบวนการในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส จะต้องมีการเติมไอออนของโลหะเช่น แคลเซียม โคบอลต์ คอปเปอร์ โบรอน เหล็ก แมกนีเซียม แมงกานีส และ โมลิบดีนัม เป็นต้น ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มอัตราการผลิต อย่างไรก็ตาม การให้ไอออนของโลหะที่จำเพาะบางอย่างขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ด้วย ในงานวิจัยส่วนใหญ่มักจะนิยมใช้โพแทสเซียมฟอสเฟตเป็นแหล่งของฟอสเฟตไอออนในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อรักษาค่าพีเอชให้คงที่ ความเข้มข้นที่เหมาะสมของฟอสเฟตที่ช่วยส่งเสริมอัตราการผลิตเอนไซม์นั้นอยู่ที่ 2 กรัมต่อลิตร แต่หากใช้ความเข้มข้นสูงกว่า 4 กรัมต่อลิตร จะทำให้เกิดการตกตะกอนของอาหารในระหว่างการนั่งมาเชื้อ ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยการเติม disodium salt ของ EDTA ลงในอาหารเพาะเลี้ยง โดยที่เกลือชนิดนี้จะไม่ส่งผลกระทบต่อปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิตได้

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

สภาวะต่าง ๆ ในการดำเนินการภายในถังหมัก เช่น อัตราการให้ออกซิเจน (Oxygen transfer rate) ค่าพีเอช และอุณหภูมิ จะส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์เมื่ออยู่ในสภาวะการหมักแบบใช้ออกซิเจน (Aerobic fermentation) ในรูปแบบที่แตกต่างกัน เนื่องมาจากอิทธิพลของวิถีเมตาบอลิซึมและการเปลี่ยนแปลงของ metabolic fluxes

อิทธิพลของพีเอชและอุณหภูมิ

คุณสมบัติที่สำคัญของจุลินทรีย์ที่ชอบสภาวะด่าง (Alkalophilic organisms) คือ สามารถเจริญเติบโตและสร้างเอนไซม์ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่มีความเป็นด่างได้ ดังนั้นการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจากจุลินทรีย์เหล่านี้ จำเป็นที่จะต้องรักษาค่าพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงให้สูงกว่า 7.5 ไปตลอดกระบวนการหมัก ซึ่งการใช้คาร์บอนเตในการปรับพีเอชของอาหารจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตได้

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่งที่ต้องควบคุมในระหว่างกระบวนการผลิตเอนไซม์ ซึ่งจะมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต แม้ว่ากลไกการควบคุมอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่อย่างไรก็ตาม มีงานวิจัยที่พบว่า การสังเคราะห์เอนไซม์และการเผาผลาญพลังงานใน Bacilli มีความสัมพันธ์กัน อุณหภูมิ

ที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แต่ละชนิด เพื่อให้สามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีนเอสสูงที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 2-5

ตารางที่ 2-5 อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ทำให้ผลิตอัลคาไลน์โปรตีนเอสสูงที่สุด (Kumar et al., 1999)

Optimum temperature (°C)	Organisms
28	<i>Penicillium griscofulvin</i>
30	<i>Bacillus</i> sp. <i>Streptomyces diastaticus</i>
32	<i>Aspergillus flavus</i>
35	<i>Bacillus</i> sp. Y <i>Bacillus</i> sp. MK5-6
36	<i>B. licheniformis</i> <i>Bacillus</i> sp. Strain GX6638 <i>Bacillus</i> sp. No. AH-101
37	<i>B. alcalophilus</i> subsp. <i>halodurans</i> KP1239 <i>B. firmus</i>
39.5	<i>B. licheniformis</i>
40	<i>Bacillus</i> sp. strain B18'
45	<i>B. thermoruber</i> BT2T <i>B. licheniformis</i>
52	<i>Thermoactinomyces</i> sp. HS682
55	<i>B. stearothermophilus</i> A.P-4
60	<i>B. stearothermophilus</i> F1

อิทธิพลของการให้อากาศและการกวน

ในระหว่างการหมัก อัตราการให้อากาศจะเป็นตัวบ่งบอกระดับของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยง เนื่องจากออกซิเจนจะถูกนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ เพื่อสนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์ ดังนั้นปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารจึงมีความสัมพันธ์กับการเจริญของจุลินทรีย์ หากความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเพียงพอ เชื่อสามารถดูดซึมออกซิเจนได้สูง ก็จะทำให้มีการสร้างมวลเซลล์และเอนไซม์สูงตาม ด้วยเหตุนี้ การกวนและการให้อากาศจึงมีผลต่อการส่งผ่านออกซิเจนจากอาหารเพาะเลี้ยงไปยังเซลล์เป็นอย่างมาก

เทคนิคในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

การหมักด้วยอาหารแข็ง (Solid-state fermentation)

เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารแข็งที่ไม่ละลายน้ำ จะมีการเติมน้ำหรือให้ความชื้นในอาหารเพียงแค่นี้ให้เหมาะสมต่อการเจริญเท่านั้น อาหารจึงมีความชื้นต่ำเหมาะสำหรับการเจริญและการสร้างเอนไซม์เท่านั้น ทำให้วิธีการนี้เหมาะสำหรับใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สร้างเส้นใย (Filamentous organisms) ที่สามารถเจริญเติบโตบริเวณผิวหน้าของอาหารได้ ข้อดีของวิธีการนี้คือสามารถทำได้ง่าย ต้นทุนในการผลิตต่ำ และได้ผลผลิตของเอนไซม์สูง

จากการศึกษาของ Oda, Kakizono, Yamada, Iefuji, and Iwashita (2006) พบว่าระดับการแสดงออกของกิจกรรมของเอนไซม์ ภายใต้สภาวะการหมักด้วยอาหารแข็งมีค่าสูงกว่าการหมักในอาหารเหลว ซึ่งเป็นผลมาจากการสภาวะการหมักด้วยอาหารแข็งมีความใกล้เคียงกับลักษณะการสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์ในธรรมชาติ

การหมักด้วยอาหารเหลว (Submerged fermentation)

เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการผลิตเอนไซม์และสารเมตาบอไลต์ต่าง ๆ ในระดับอุตสาหกรรมมากที่สุด วิธีการนี้จะทำการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเหลวซึ่งง่ายต่อการเตรียม การควบคุมอุณหภูมิและพีเอช และการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ การหมักแบบเหลวสามารถแบ่งตามลักษณะของการดำเนินการ ได้ดังนี้

1. การหมักแบบกะ (Batch fermentation)

การหมักแบบกะเป็นการเพาะเลี้ยงในระบบปิด โดยความเข้มข้นของสารอาหารในอาหารเพาะเลี้ยงจะสูงในช่วงเริ่มต้นของกระบวนการ จากนั้นจะค่อย ๆ ลดลงจนกระทั่งถูกใช้หมดไปหรือเหลือน้อยที่สุด และจะได้ผลิตภัณฑ์ในช่วงสุดท้ายของกระบวนการ การเพาะเลี้ยงด้วยวิธีนี้แบคทีเรียจะมีการเจริญเติบโตหลายช่วง โดยที่แต่ละช่วงของการเจริญจะแตกต่างกันอย่างชัดเจน

ในระยะแรกของการเพาะเลี้ยง แบคทีเรียจะยังไม่มีการเพิ่มจำนวน เนื่องจากกำลังปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมและสังเคราะห์เอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต เรียกระยะนี้ว่า ระยะพักตัว (lag phase) จากนั้นเชื้อจะเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงระยะเร่ง (log phase หรือ exponential phase) และการเจริญจะคงที่เมื่อเข้าสู่ระยะ stationary phase ซึ่งเป็นระยะที่แบคทีเรียมีจำนวนเซลล์สูงสุด และมีอัตราการเจริญเท่ากับอัตราการตาย หลังจากนั้นเชื้อจะเข้าสู่ระยะ dead phase ที่อัตราการเจริญของเชื้อจะลดลง เนื่องจากสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญหมดลง

2. การหมักแบบเติมกะ (Fed-batch fermentation)

การหมักแบบเติมกะ จะต้องทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแบบกะก่อน แล้วจึงเติมอาหารเข้าไปในถังหมักเป็นช่วงหรืออย่างต่อเนื่อง โดยที่ไม่มีการดึงเอาอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากระบบ การหมักด้วยวิธีนี้เป็นการค่อย ๆ เติมสารอาหารให้พอดีกับความต้องการในการเจริญของแบคทีเรียเพื่อไม่ให้เกิดการขาดแคลนออกซิเจนอันเนื่องมาจากการเจริญอย่างรวดเร็ว ซึ่งหากปริมาณของออกซิเจนไม่เพียงพอกับปริมาณของสารอาหารในอาหารเพาะเลี้ยง จะทำให้แบคทีเรียนำสารอาหารไปใช้ในการสร้างสารอื่นที่เป็นพิษ เช่น กรดอะซิติก แทนการนำไปใช้สร้างพลังงานในกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจนเรียกปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นนี้ว่า แครบตรีเอฟเฟก (Crabtree effect) วิธีการหมักแบบเติมกะนี้ นอกจากจะทำให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์สูงแล้ว ยังช่วยลดการเกิดการยับยั้งการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์จากการที่มีความเข้มข้นของสับสเตรทที่สูงได้อีกด้วย ดังนั้น การเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ จึงเป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุดในระดับอุตสาหกรรมเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบอื่น ๆ ข้อดีและข้อเสียของการหมักในอาหารเหลวแต่ละวิธี แสดงไว้ในตารางที่ 2-6

ตารางที่ 2-6 ข้อดีข้อเสียของการหมักในอาหารเหลวแต่ละวิธี (Patrick & Finn, 2008)

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

การนำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ

อุตสาหกรรมผงซักฟอก

การเติมเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในผงซักฟอกช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดคราบโปรตีนที่ติดอยู่บนเนื้อผ้าได้ดี การนำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสไปใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายในการผลิตผงซักฟอก เป็นผลมาจากการที่เอนไซม์มีคุณสมบัติในการทำควมสะอาดและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดคราบสกปรกอีกด้วย ทำให้สามารถทำความสะอาดเสื้อผ้าได้ที่อุณหภูมิต่ำและใช้ระยะเวลาในการปั่นผ้าสั้นลง ภายหลังจากขั้นตอนการแช่ผ้า

อุตสาหกรรมฟอกหนัง

เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสมีคุณสมบัติที่สามารถย่อยอีลาสติน (Elastin) และเคราติน (Keratin) ได้ จึงถูกนำมาใช้ในขั้นตอน Biotreatment ของอุตสาหกรรมฟอกหนัง เพื่อกำจัดเส้นขนและเศษเนื้อเยื่อที่ติดอยู่บนหนังสัตว์ให้หลุดออกไป ภายใต้อุณหภูมิที่เป็นค่าปานกลาง โดยธรรมชาติบนหนังสัตว์จะเกิดการขยาย เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจึงสามารถเข้าไปย่อยโปรตีนบริเวณรูขุมขนได้ ทำให้ง่ายต่อการกำจัดเส้นขน เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่เป็นค่าสูงซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้กันมาก่อน การใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจึงเป็นที่ยอมรับและปลอดภัยกว่าการใช้โซเดียมซัลไฟด์ (Sodium sulfide) ในการกำจัดเส้นขน ซึ่งก่อให้เกิดซัลไฟด์ 100 เปอร์เซ็นต์ และมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของซัลไฟด์ที่เกิดขึ้นมักปนเปื้อนไปกับของเสียจากโรงงานฟอกหนัง นอกจากนี้หนังสัตว์ที่ผ่านการฟอกโดยใช้อัลคาไลน์โปรตีเอสนั้น จะมีคุณภาพดีกว่าหนังสัตว์ที่ได้จากการฟอกแบบเก่า

อุตสาหกรรมอาหาร

อัลคาไลน์โปรตีเอสสามารถย่อยสลายโปรตีนทั้งจากพืชและสัตว์ได้ อัลคาเลส (Alcalase) เป็นเอนไซม์ทางการค้าที่มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนประเภทไฮโดรโฟบิกค่อนข้างกว้าง จึงมีการนำเอนไซม์ชนิดนี้ไปใช้ย่อยโปรตีน เพื่อให้ได้เป็น hydrolysate ที่มีความขมลดลง นอกจากเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสตัวนี้แล้ว ยังมีเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสชนิดอื่น ๆ ที่ถูกนำไปใช้เป็นส่วนผสมในน้ำผลไม้ หรือผลิตอาหาร โปรตีนสูงสำหรับผู้ที่ต้องการลดน้ำหนัก รวมทั้งนำไปใช้ในการทำให้เนื้อสัตว์อ่อนนุ่มอีกด้วย

อุตสาหกรรมเคมี

การเติมเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในสารละลายอินทรีย์ สามารถใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพในทางเคมีสังเคราะห์ได้ แต่มีข้อเสียคือกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเป็นอย่างมาก เมื่ออยู่

ในสภาวะที่ไม่มีน้ำ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาวิจัยเพื่อหาวิธีการในการที่จะเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในสารละลายอินทรีย์ให้ได้

การบำบัดของเสีย

อัลคาไลน์โปรตีนเอสถูกนำไปใช้ในการจัดการของเสียจากอุตสาหกรรมอาหารและชุมชน โดยอัลคาไลน์โปรตีนเอสเหล่านี้สามารถย่อยสลายโปรตีนที่อยู่ในของเสียจำนวนหลายขั้นตอน เพื่อให้ได้อาหารเหลวหรืออาหารแห้งที่มีความเข้มข้นของสารอาหารสูง สำหรับใช้ในการเลี้ยงสัตว์ (Kumar & Takagi, 1999)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอัลคาไลน์โปรตีนเอส

วรรณวิมล ทรัพย์ดี (2540) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch fermentation) พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนเอสได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย KH_2PO_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 แป้งมันสำปะหลัง 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 ยูนิต์ต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

สุดธิดา แสงยนต์ (2548) ทำการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนเอสที่ได้จากเชื้อ *Bacillus* ที่คัดแยกได้จากดิน พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว BMSM ที่มียีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร และ หางนมผง (Skim milk) 10 กรัมต่อลิตร จะทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดเท่ากับ 233.5 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อลดปริมาณหางนมผงลงเหลือ 2.5 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีนเอสได้สูงขึ้น โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 467.2 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร จึงสันนิษฐานว่าเคซีนที่เป็นโปรตีนหลักในหางนมผงเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เชื้อมีการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนเอสออกมา

กฤษฎากร จริโมภาส (2549) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนเอสโดยใช้เชื้อ *Bacillus* sp. ในอาหารเหลว BMSM ภายในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยวิธีการหมักแบบเดิมกะที่มีการเติมอาหารอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราคงที่ (Constantly fed-batch fermentation) พบว่าภายใต้สภาวะ

การเพาะเลี้ยงที่ใช้อาหาร BSM ที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่า และมีกลูโคส 4 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ได้ อัตราการผลิตเอนไซม์จำเพาะสูงที่สุดเท่ากับ 28,484 หน่วยต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง

Ferrero, Castro, Abate, Baigori, and Sineriz (1996) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* MIR 29 ที่คัดแยกได้ พบว่าเชื้อ สามารถเจริญได้ดีที่พีเอช 9.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยมีเคซินเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด และเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์ ทำให้มีการหลั่งเอนไซม์ชนิดหลั่งออกมา ภายนอกเซลล์ (Extracellular enzyme) ได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ โดยระดับการสังเคราะห์เอนไซม์ จะขึ้นกับชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ใช้ สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ คือพีเอช 12 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

Mehrotra, Pandey, Gaur, and Darmwal (1999) ทำการศึกษาการผลิตอัลคาไลน์ โปรตีเอสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดิน โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยง Milk agar medium พบว่า แบคทีเรียที่มีแนวโน้มสามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงที่สุด จากแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ทั้งหมดจำนวน 52 ไอโซเลท คือ *Bacillus* sp. ที่มีลักษณะเป็น Saline-alkali และเมื่อเพาะเลี้ยง ในอาหารที่มีกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 10.5 และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะทำให้ได้กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด

Joo et al. (Joo et al., 2002) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus horikoshii* ซึ่งคัดแยกได้จากสารเหลวภายในร่างกายของไส้เดือนทะเล ที่เจริญอยู่ในโคลนบริเวณชายฝั่งทะเลเหลืองของประเทศเกาหลี พบว่าการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *B. horikoshii* ในอาหารที่ประกอบด้วย กากถั่วเหลือง 1.5 เปอร์เซ็นต์ และเคซิน 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส พีเอช 9 เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ทำให้ได้กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด และเอนไซม์ที่ผลิตได้สามารถทำงานได้ที่พีเอชระหว่าง 5.5-12 แต่สามารถทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช ประมาณ 9 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 45 องศาเซลเซียส นอกจากนี้กิจกรรมของ เอนไซม์ยังสามารถถูกยับยั้งได้โดยสาร PMSF เนื่องจากเอนไซม์ที่ผลิตได้อยู่ในกลุ่มของ serine protease

Singh, Vohra, and Sahoo (2004) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ อัลคาไลน์โปรตีเอส จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus sphaericus* โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ พบว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นมากกว่า 3.3 กรัมต่อลิตร ไม่มีผลต่อการเจริญ ของแบคทีเรียอย่างไรก็ตามกิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์มีค่าสูงสุดเมื่อใช้ กลูโคสที่ความเข้มข้น 10.4 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะที่มีการเติม

อาหารที่ประกอบด้วยกลูโคสและสารอาหารความเข้มข้นสูง จะส่งผลให้การหลั่งเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียลดลง

Joo and Chang (2005) ศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่มีความเสถียรต่อสาร SDS จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. I-132 ซึ่งคัดแยกได้จากดินโคลนบริเวณหาดที่มีการปนเปื้อนของสารเคมี และตัวอย่างน้ำทะเลบริเวณใกล้เขตของโด 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, and Jetty (2007) ทำการศึกษาอิทธิพลของการให้อากาศและการกวนผสมภายในถังหมักแบบ stirred tank-reactor สำหรับการเพาะเลี้ยง *Bacillus licheniformis* NCIM-2042 เพื่อผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ที่มีการผันแปรอัตราการให้อากาศอยู่ระหว่าง 1-3 ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของของเหลวต่อนาที และอัตราการกวนผสมระหว่าง 200-400 รอบต่อนาที พบว่าในทุกรอบของการเพาะเลี้ยงแบบกะนั้น การสร้างเอนไซม์จะเกิดขึ้นสูงสุดในวันที่สามของการเพาะเลี้ยง (72 ชั่วโมง) จากนั้นจะลดลงในช่วงวันที่สี่และห้า และเมื่อใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 3 ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของของเหลวต่อนาที ร่วมกับอัตราการกวนผสม 200 รอบต่อนาที จะได้อัตราการสร้างเอนไซม์จำเพาะสูงสุดเท่ากับ 102 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของ DC นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้เคซินที่ระดับความเข้มข้นสูง จะทำให้อาหารเพาะเลี้ยงมีความหนืดขึ้น ส่งผลให้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงยาวนานขึ้นตามไปด้วย ซึ่งเป็นผลมาจากอัตราการส่งผ่านก๊าซออกซิเจน (Oxygen transfer rate) ภายในถังหมักลดลง

Ahmed and Abdel-Fattah (2010) ทำการศึกษาการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อ *Bacillus licheniformis* ATCC 21415 แบบเซลล์อิสระ เปรียบเทียบกับแบคทีเรียชนิดเดียวกันที่ผ่านการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการต่าง ๆ โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงต่างกัน ได้แก่ การเพาะเลี้ยงแบบกะแบบ repeated batch และแบบต่อเนื่อง พบว่าการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *B. licheniformis* ATCC 21415 ที่ถูกตรึงเซลล์ด้วยการเกาะบนผ้าขนสัตว์โดยใช้พันธะโควาเลนต์ด้วยกลูตารอลดีไฮด์

(Glutaraldehyde) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบ repeated batch มีประสิทธิภาพสูงกว่าการใช้เซลล์อิสระ เห็นได้จากกิจกรรมเอนไซม์คิงเหลือที่มีอยู่ถึง 57 เปอร์เซ็นต์ หลังการเพาะเลี้ยงผ่านไป 5 รอบ (เป็นเวลา 480 ชั่วโมง) ในขณะที่กิจกรรมเอนไซม์ของเซลล์อิสระ คิงเหลือเพียง 35 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงได้เพียง 2 รอบ ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องทำให้ได้ผลผลิตของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 763.6 หน่วยต่อชั่วโมง เมื่อใช้อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.1 ต่อชั่วโมง และอัตราการผลิตเอนไซม์ของถังหมักจะมีค่าสูงสุดเท่ากับ 3.32 หน่วยต่อมิลลิลิตร ต่อชั่วโมง เมื่อใช้อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.4 ต่อชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าถังหมักชนิด Packed-bed reactor มีความเหมาะสมสำหรับการใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์ โปรตีเอส ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่มีการใช้เวลานาน (168 ชั่วโมง) มากที่สุด โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพันธ์เท่ากับ 53 เปอร์เซ็นต์

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

Tabandeh et al. (Tabandeh et al., 2011) ศึกษาการอิทธิพลของวิธีการเติมอาหารแบบต่าง ๆ ในการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus clausii* โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ พบว่าวิธีการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะที่มีการเติมอาหารเพาะเลี้ยงที่ประกอบด้วยเกลือแร่ ยีสต์สกัด และปราศจากกลูโคส ด้วยอัตราคงที่ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *B. clausii* ทำให้สามารถวัดกิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์ได้เท่ากับ $2,430 \pm 67$ หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งเพิ่มขึ้นจากการใช้วิธีการเพาะเลี้ยงแบบกะ ($1,800 \pm 14$ หน่วยต่อมิลลิลิตร) ถึง 35 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่าผลผลิตของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ของวิธีการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะที่ทำกับ 121,500 หน่วยต่อกรัม และ 71,470 หน่วยต่อลิตร ตามลำดับ ยังมีค่าสูงกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบกะ (90,000 หน่วยต่อกรัม และ 64,285 หน่วย

ต่อลิตร) อีกด้วย ดังนั้น แนวโน้มในการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะดักกล่าวข้างต้น ไปใช้ในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสสำหรับใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมซักล้างจึงมีความเป็นไปได้สูง

Kumar et al. (Kumar et al., 2012) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อ *Bacillus* sp. MPTK 712 ที่คัดแยกได้จากกากตะกอนของโรงงานนม โดยใช้ Modified production medium ที่มีกากตะกอนจากโรงงานนมเป็นสับสเตรท พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ควบคุมพีเอชเท่ากับ 9.0 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และมีความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากแบคทีเรียชนิดนี้สามารถถูกยับยั้งการทำงานได้โดย Cetrimide, Tween-80, SDS และ Tween-20 และมีความเสถียรที่พีเอช 9 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

Smita, Ray, and Mohapatra (2012) ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ *Serratia liquefaciens* ที่คัดแยกได้จากบริเวณเขตเมืองโอริสสา (Orissa) ประเทศอินเดีย พบว่าได้ผลผลิตเอนไซม์สูงสุด (74.3 พียูต่อมิลลิลิตร) เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะพีเอชเท่ากับ 9 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

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

Agarwal and Katiyar (2013) ทำการศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากแบคทีเรียที่ชอบด่างและทนร้อน *Bacillus* sp. BHA ซึ่งคัดแยกได้สับสเตรทที่เป็นโปรตีนที่ผ่านการย่อยแล้ว (Decaying protein substrate) ซึ่งสามารถเจริญได้ในสภาวะที่ค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 7-11 แต่สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่พีเอช 9.0 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้เท่ากับ 68.98 เอพียูต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่วัดได้จากเชื้อมาตรฐานที่นำมาเปรียบเทียบคือ *Bacillus amyloliquefaciens* MTCC 610 (8.98 เอพียู

ต่อมิลลิลิตร) และ *Bacillus subtilis* MTCC 8349 (12.14 เอพียูต่อมิลลิลิตร) นอกจากนี้ยังพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์จากเชื้อที่คัดแยกได้ (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 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจากการเพาะเลี้ยงแบบกะถึง 36.84 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้อาหารเพาะเลี้ยง Basal medium ที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนการใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ เคซีน เปปโทน และสารสกัดจากเนื้อวัว ที่ความเข้มข้น 1-4 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จะส่งผลยับยั้งการสร้างเอนไซม์ในช่วงแรก แต่การยับยั้งนี้จะลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของซูโครส

Radah, Prasad, Devi, and Mamata (2014) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส โดยใช้เชื้อ *Pseudomonas putida* ร่วมกับ *Staphylococcus aureus* ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะและแบบเติมกะ พบว่าการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบกะของเชื้อทั้งสองชนิดในอาหารสังเคราะห์ (Synthetic medium) ที่ใช้เปลือกกล้วยแห้งบดเป็นแหล่งคาร์บอน ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ และใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 72 ชั่วโมง พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 8 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ทำให้ได้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ $1,443.67 \pm 5.6$ ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่การใช้เปลือกกล้วยแห้งบดและกากถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นสูงขึ้นจะทำให้อัตราการสร้างเอนไซม์ลดลง ซึ่งสามารถแก้ปัญหาได้โดยการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ ที่มีการเติมอาหารที่มีเปลือกกล้วยแห้งบด ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ กากถั่วเหลือง ความเข้มข้น 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 และเมื่อนำเอนไซม์ที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและโครมาโตกราฟีด้วย DEAE คอลัมน์ จะทำให้ได้กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 18.761 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ที่ระดับความบริสุทธิ์ 6.185 เท่า และภายหลังจากการทำให้เอนไซม์เข้มข้นขึ้นด้วย PEG ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเป็น 69.332 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ที่ระดับความบริสุทธิ์ 22.859 เท่า นอกจากนี้ เมื่อนำเอนไซม์บริสุทธิ์เข้มข้นไปทำการแยกโปรตีนด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS PAGE) เทียบกับเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากการใช้เคซีนเป็นสับสเตรท พบว่าแถบโปรตีนของเอนไซม์ทั้งสองชนิดปรากฏที่บริเวณ 40 กิโลดาลตัน เท่ากัน จึงสามารถบ่งชี้ได้ว่าเปลือกมันฝรั่งสามารถใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อ *Bacillus circulans* MTCC 7906 ได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกับการใช้เคซีน

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุ และอุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง 2 และ 4 ตำแหน่ง (Digital Balances) รุ่น Sartorius cp 224s บริษัท Sartorius Mechanics ประเทศเยอรมนี
2. ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator Shaker) รุ่น C25 KC Classic Incubator Shaker บริษัท New Brunswick Scientific ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) รุ่น Memmert BE 200 บริษัท Memmert GmbH & Co. ประเทศ เยอรมนี
4. ตู้อบแห้ง (Oven) รุ่น Memmert model 500 บริษัท Memmert GmbH & Co. ประเทศ เยอรมนี
5. อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) รุ่น Julabo TW20 บริษัท Julabo ประเทศ สหรัฐอเมริกา
6. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-Visible Spectrophotometer) รุ่น GVC Cinta 40 บริษัท GBC Scientific Equipment ประเทศออสเตรเลีย
7. เครื่องปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Micro centrifuge (MSE) บริษัท Sanyo ประเทศญี่ปุ่น
8. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH Meter) รุ่น Basic บริษัท Denver Instrument ประเทศ สหรัฐอเมริกา
9. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น WEST 4100+ บริษัท Astoll Scientific ประเทศ สหรัฐอเมริกา
10. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน บริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น
11. ถังหมัก (Fermenter) ขนาด 5 ลิตรพร้อมชุดควบคุม รุ่น Biostat B บริษัท B. Braun Biotech International ประเทศเยอรมนี
12. เครื่องปั่นผสม (Vortex Mixer)
13. หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge Tube) ขนาดบรรจุ 1.5 15 และ 50 มิลลิลิตร
14. ปิเปต (Auto Pipette) ขนาด 200 ไมโครลิตร 1000 ไมโครลิตร และ 10 มิลลิลิตร
15. เครื่องแก้วที่จำเป็นในการวิเคราะห์

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid)
2. กรดไดไนโตรซาลิซิลิก (3,5-Dinitrosalicylic acid: DNS)
3. กรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid: TCA)
4. กรดบอริก (Boric acid)
5. กลูโคส (Glucose)
6. กากถั่วเหลือง (Soybean meal)
7. คอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4)
8. เคซีน (Casein)
9. แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2)
10. โคบอลต์คลอไรด์ (CoCl_2)
11. ซิงค์คลอไรด์ (ZnCl_2)
12. ซิงค์ซัลเฟต (ZnSO_4)
13. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)
14. โซเดียมไนเตรท (NaNO_3)
15. โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3)
16. โซเดียมโมลิบเดต (Na_2MoO_4)
17. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
18. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)
19. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)
20. ไตรโซเดียมซีเตรท ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)
21. นิกเกิลซัลเฟต (NiSO_4)
22. เปปโตน (Peptone)
23. พงวุ้น (Agar)
24. โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรต ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
25. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
26. โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3)
27. เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
28. โฟลินรีเอเจนต์ (Folin-ciocalteu reagent)
29. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

30. แมงกานีสคลอไรด์ (MnCl_2)
31. สารละลายกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก)
32. สารละลายเด็กซ์ทรินที่ได้จากการย่อยสลายแป้งมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก)
33. สารสกัดจากเนื้อวัว (Beef extract)
34. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)
35. หางนมผง (Skim milk)
36. แอมโมเนียมซัลเฟต $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$
37. แอมโมเนียมเฟอร์ริกซิเตรท $\{(\text{NH}_4)_3[\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7)_2]\}$
38. แอมโมเนียมเฮปตะโมลิบเดต $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}]$
39. แอล-ไทโรซีน (L-tyrosine)

สูตรอาหาร (ภาคผนวก ก)

1. สูตรอาหาร NB (Nutrient Broth)
2. สูตรอาหาร BMSM (Basal Medium ที่มีหางนม 1 เปอร์เซ็นต์) (สุดริคา แสงยนต์, 2548)
3. สูตรอาหาร BPMM (Batch Production Medium ที่มีหางนม 1 เปอร์เซ็นต์) (ขวัญฤทัย ชาติเรือง, 2556)
4. สูตรอาหาร PPMM (Protease Production Medium ที่มีหางนม 1 เปอร์เซ็นต์) (ดัดแปลงจาก Tabandeh et al., 2011)

เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณบ่อพักน้ำและบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงงานนมและผลิตภัณฑ์นม โรงฆ่าสัตว์ และโรงงานฟอกหนัง ภายในประเทศ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างดินและการคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

เก็บตัวอย่างดินบริเวณผิวหน้าของดิน ระดับความลึกไม่เกิน 5 เซนติเมตร ประมาณ 50 กรัม ใส่ในภาชนะที่ปลอดเชื้อ แล้วเก็บไว้ในที่เย็นจนกว่าจะทำการวิเคราะห์ โดยสถานที่ในการเก็บตัวอย่างคือบริเวณที่คาดว่าจะพบแบคทีเรียที่มีการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส เนื่องจากมีการปนเปื้อนของโปรตีนที่เป็นสับสตรัทของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส ซึ่งได้แก่ ดินบริเวณบ่อบำบัดน้ำเสียและบ่อพักน้ำของโรงงานอุตสาหกรรมนมและผลิตภัณฑ์นม โรงฆ่าสัตว์ และโรงงานฟอกหนัง

2. การเพิ่มปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ (Enrichment) ในตัวอย่างดิน

เพิ่มปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ (Enrichment) ในตัวอย่างดินที่เก็บได้จากแหล่งต่าง ๆ โดยชั่งตัวอย่างดิน 0.5 กรัม ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 10 ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้อยู่ในช่วง 10^{-1} ถึง 10^{-9} เท่า แล้วดูตัวอย่างจากแต่ละความเข้มข้นปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร มากระจายเชื้อ (Spread plate) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BMSM (ภาคผนวก ก) ที่ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 10 ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คัดเลือกเฉพาะเชื้อที่สร้างวงใส (Clear zone) รอบโคโลนีเดี่ยว ๆ แล้วทำให้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธีขีดเชื้อบนอาหารแข็ง (Cross streak technique) จากนั้นเก็บเชื้อที่บริสุทธิ์ไว้ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อผิวเอียง BMSM slant

3. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

แบ่งวิธีการในการคัดเลือกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

3.1 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสบนอาหารแข็ง

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงด้วยวิธีแตะเชื้อ (Point inoculation) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BMSM พีเอช 10 ที่มีการขีดเส้นแบ่งได้งานเพาะเชื้อออกเป็นสี่ส่วน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส โดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (CO) และวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี (CZ) บันทึกผลที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นเปรียบเทียบค่าผลต่างระหว่าง CZ กับ CO

(CZ-CO) แล้วแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียที่เรียงตามความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน โดยพิจารณาจากค่าผลต่าง 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 ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์สูงที่สุด ไปทำการคัดเลือกต่อในขั้นตอนต่อไป

3.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในอาหารเหลว

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้จากข้อ 2.1 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BSM ฟีเอส 10 บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ปริมาตรครั้งละ 3 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ออก แล้วนำส่วนใสไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส (ภาคผนวก ข) และเปรียบเทียบความสามารถในสร้างของเชื้อแบคทีเรีย จากนั้นจึงคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสได้ดีที่สุด

4. การเก็บเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีกลีเซอรอล

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว BSM broth ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 10 นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเติมกลีเซอรอลที่ปลอดเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ (Aseptic technique) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ ผสมให้เข้ากัน แล้วดูอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ในหลอดเก็บรักษาเชื้อ จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5. การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อจลินทรีย์ที่ถูกระงับรักษาในหลอดอาหารวุ้นเลี้ยงประมาณ 1-2 loops ลงในอาหารเหลว BSM ฟีเอส 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

6. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในระดับฟลาสก์

6.1 สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ในอาหารเหลว 3 สูตร ที่แตกต่างกัน คือ อาหาร BMSM ซึ่งเป็นอาหารชนิด Complex medium อาหาร BPMM และ PPMM ซึ่งเป็นอาหารชนิด Semi-defined medium (ภาคผนวก ก) ที่มีการปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 10 แล้วนำไปหมักในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และค่าพีเอช อีกส่วนนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลคงเหลือด้วยวิธีการ DNS assay ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และกิจกรรมของเอนไซม์ (ภาคผนวก ข) ที่เวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

6.2 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ในอาหารเหลว BPMM ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนในอาหารที่แตกต่างกัน ได้แก่ กลูโคส สารละลายกลูโคส (Glucose hydrolysate) และสารละลายเด็กซ์ทริน (Dextrin) ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง โดยปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 10 นำไปหมักในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 0, 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และค่าพีเอช อีกส่วนนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลคงเหลือด้วยวิธีการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (DNS assay) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และกิจกรรมของเอนไซม์ที่เวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

6.3 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ในอาหารเหลว BPMM ที่มีสารละลายเด็กซ์ทรินที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แหล่งไนโตรเจนในอาหารที่แตกต่างกัน ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) สารสกัดจากเนื้อวัว (Beef extract) กากถั่วเหลือง (Soybean meal) โซเดียมไนเตรท (NaNO_3) และโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) ที่ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 10 บ่มเชื้อด้วยอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และค่าพีเอช อีกส่วนนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลคงเหลือด้วยวิธีวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (DNS assay) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และกิจกรรมของเอนไซม์ที่เวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

6.4 ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ในอาหารเหลว BPMM ที่ใช้สารละลายเด็กซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่มีค่าปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้แตกต่างกันคือ 7, 8, 9 และ 10 ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และค่าพีเอช อีกส่วนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลคงเหลือด้วยวิธีวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (DNS assay) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และกิจกรรมของเอนไซม์ที่เวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

6.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ในอาหารเหลว BPMM ที่ใช้สารละลายเด็กซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน และปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 10 ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อุณหภูมิแตกต่างกัน คือ 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6,

12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และค่าพีเอช อีกส่วนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบ ต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล คงเหลือด้วยวิธีวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (DNS assay) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และกิจกรรมของ เอนไซม์ที่เวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

7. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

จำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธี 16s rDNA sequence analysis โดยส่งวิเคราะห์ที่ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

8. การศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

การทดลองนี้จะทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของ แบคทีเรียที่คัดเลือกได้เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่ต่างกัน 2 วิธี คือ เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch fermentation) และเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ (Fed-batch fermentation) รายละเอียดดังต่อไปนี้

8.1 ศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ

ทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่ คัดเลือกได้เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ ที่สภาวะการ เพาะเลี้ยงแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3-1 โดยขั้นตอนในการทดลองมีดังนี้

8.1.1 เตรียมอาหารเพาะเลี้ยง BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน และกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ให้มีปริมาตรในการทำงาน รวมทั้งหมด 3 ลิตร จากนั้นทำการปรับเทียบ (Calibration) อุปกรณ์วัดค่าพีเอช พร้อมทั้งตั้งค่า สภาวะการทำงานต่าง ๆ ของถังหมัก ตามสภาวะที่ต้องการศึกษา

8.1.2 นำถังหมักที่บรรจุอาหารเพาะเลี้ยงแล้ว ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีที่อาหารเพาะเลี้ยงที่ศึกษามีการใช้ skim milk ให้แยกนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

8.1.3 ตัดตั้งถังหมักบรรจุอาหารเพาะเลี้ยงที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเข้ากับชุด ควบคุม และปรับตั้งค่าปริมาณการเติมอากาศและความเร็วของใบพัดในการกวนผสม

8.1.4 เติมสารอาหารต่าง ๆ ที่แยกนำมาเชื้อไว้ลงในถังหมัก เปิดใบกวนกวนผสมสารอาหารในถังหมัก เป็นเวลาประมาณ 5 นาที เพื่อให้สารอาหารต่าง ๆ ผสมเข้ากันดี

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

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

ตารางที่ 3-1 สภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ

Batch NO.	อาหารเพาะเลี้ยง	สับสเตรท	พีเอช	อุณหภูมิ (°C)	อัตราการให้อากาศ (vvm)	ความเร็วใบกวน (rpm)
1	อาหารในข้อ 8.1.1 ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 2 เท่า	หางนมผง เข้มข้น 1% (w/v)	ควบคุมค่า pH = 10 ด้วย 20% Na ₂ CO ₃ ตลอดการเพาะเลี้ยง	37	1	500
2	อาหารในข้อ 8.1.1 ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 2 เท่า	-	ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช	37	1	500
3	อาหารในข้อ 8.1.1 ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 4 เท่า	-	ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช	37	1	500

หมายเหตุ vvm = หน่วย ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

rpm = หน่วย รอบต่อนาที (revolutions per min)

8.2 ศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ

การทดลองนี้จะทำการศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เมื่อเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบ constantly fed-batch fermentation โดยจะทำการเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch culture) ในระยะแรกก่อน จากนั้นจึงทำการเติมอาหารลงในถังหมักด้วยอัตราเร็วคงที่ ซึ่งอัตราการเติมอาหารจะคำนวณจากสูตรอัตราการเจือจางที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบบ continuous culture ดังนี้

$$D = F/V \quad \text{เมื่อ}$$

D คือ อัตราการเจือจาง (ต่อชั่วโมง)

F คือ อัตราการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ (ลิตรต่อชั่วโมง)

V คือ ปริมาตรของเหลวในถังหมักก่อนเติมอาหาร (ลิตร)

สำหรับวิธีการทดลองศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบ constantly fed-batch fermentation เพื่อผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส จากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

8.2.1 ในขั้นแรก จะทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch culture) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ด้วยปริมาตรในการทำงาน 1.5 ลิตร โดยใช้อาหารสูตร BPMM พีเอช 10 ที่มีเค็ซท์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนและกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้น 2 เท่า หัวเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีการเติมสับสเตรทและไม่มีการควบคุมค่าพีเอชตลอดทั้งกระบวนการ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ความเร็วใบกวน 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 ชั่วโมง

8.2.2 เมื่อครบเวลา 9 ชั่วโมง จะทำการเติมอาหารที่มีองค์ประกอบเช่นเดียวกับอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบบกะ ด้วยอัตราการเติมอาหาร 0.90 ลิตรต่อชั่วโมง และกำหนดให้เวลานี้เท่ากับเวลาเริ่มต้นใหม่ 0 ชั่วโมง ซึ่งการเติมอาหารจะดำเนินไปด้วยอัตราคงที่ เป็นระยะเวลา 29 ชั่วโมง

8.2.3 เก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ เพื่อนำไปตรวจนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี Total viable count ปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร และกิจกรรมของเอนไซม์ พร้อมทั้งบันทึกผลการทดลอง

9. การคำนวณค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ของจุลินทรีย์

9.1. อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, μ)

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

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

เมื่อ x = ความเข้มข้นของมวลเซลล์ (กรัมเซลล์ต่อลิตร)
 N = จำนวนเซลล์ (จำนวนเซลล์ต่อลิตร)
 t = เวลา (ชั่วโมง)
 μ = อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate) มีหน่วยเป็นชั่วโมง

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

ในระหว่างการเจริญแบบทวีคูณ อัตราการเจริญจำเพาะหรือ μ มีค่าคงที่ สามารถอินทิเกรตโดยตรงต่อสภาวะเริ่มต้นโดย $x = x_0$ ที่ $t = 0$ จากสมการ (1) จะได้

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

เมื่อ x_0 = ความเข้มข้นของมวลเซลล์เริ่มต้น
 x = ความเข้มข้นของมวลเซลล์หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา t ชั่วโมง
 e = ฐานของ natural logarithm

เมื่อใส่ natural logarithm ในสมการ (3) จะได้

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

9.2 ผลได้ของมวลเซลล์จูลินทรีย์จากมวลสับสเตรท

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

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

9.3 ผลได้ของผลผลิตต่อมวลสับสเตรท

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

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

9.4 ผลได้ผลิตภัณฑ์จำเพาะ

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

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

9.5 อัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (Specific rate of product formation)

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

ค่า q_p เป็นค่าทางจลนพลศาสตร์ที่สำคัญ ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์กับมวลเซลล์และเวลา เมื่อผลผลิตที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สัมพันธ์กับการเจริญ (Growth associated product)

10. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

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

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. ผลการเก็บตัวอย่างดินและการคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์

จากการคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในตัวอย่างดิน จำนวน 28 ตัวอย่าง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BSM ฟีเอช 10 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อยโปรตีนในอาหารเพาะเลี้ยงและสร้างวงใสรอบโคโลนี (Clear zone) ได้ทั้งหมด 157 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 แหล่งของตัวอย่างดินและจำนวนโคโลนีที่สร้างวงใสบนอาหาร BSM ฟีเอช 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 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินที่คาดว่า จะพบกลุ่มของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส เช่น ดินจากบริเวณบ่อน้ำเสีย และบ่อพักน้ำจากโรงงานนมและผลิตภัณฑ์นม โรงฆ่าสัตว์ และ โรงงานฟอกหนัง เป็นต้น ซึ่งเมื่อนำ ตัวอย่างดินจากสถานที่ดังกล่าวมาทำการเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (Enrichment) แล้วเจือจางด้วย น้ำกลั่นปลอดเชื้อกระทั่งมีความเข้มข้นที่เหมาะสม นำไปกระจายเชื้อด้วยวิธี Spread plate technique ลงบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแข็ง Basal medium agar ที่มีหางนม ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (BSM) ฟีเอช 10 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว

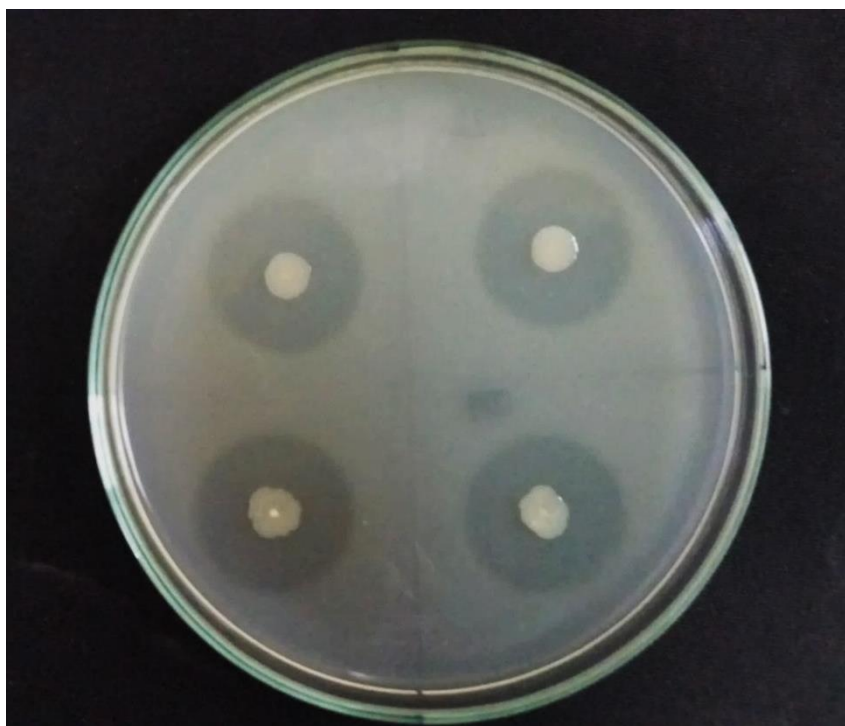
มีการสร้างวงใสรอบโคโลนีที่อยู่บนผิวหน้าของอาหาร ซึ่งเป็นผลมาจากการที่แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่อยู่ภายในอาหารภายใต้สภาวะที่เป็นด่างได้ จึงมีความเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียทั้ง 157 ไอโซเลทนี้ สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องนำแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวไปทำการคัดเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์สูงในขั้นตอนต่อไป

2. ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

2.1 ผลการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสบนอาหารแข็ง

จากการนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินจำนวน 157 ไอโซเลท

มาทำการศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ด้วยวิธี Point inoculation บนอาหารแข็ง BMSM พีเอช 10 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (CO) ที่เจริญบนผิวหน้าของอาหาร เทียบกับขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี (CZ) ของเชื้อแบคทีเรีย ดังแสดงในตารางที่ 4-2 และภาพที่ 4-1



ภาพที่ 4-1 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสบนอาหารแข็ง

ตารางที่ 4-2 ประสิทธิภาพของเอนไซม์ย่อยโปรตีนภายใต้สภาวะที่เป็นค่าของเชื้อแบคทีเรีย
ที่คัดแยกได้ บนอาหารแข็ง BMSM พีเอช 10

รหัสเชื้อ	24 ชั่วโมง			48 ชั่วโมง		
	CZ	CO	CZ-CO	CZ	CO	CZ-CO
	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(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
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

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	24 ชั่วโมง			48 ชั่วโมง		
	CZ	CO	CZ-CO	CZ	CO	CZ-CO
	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)
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
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

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	24 ชั่วโมง			48 ชั่วโมง		
	CZ	CO	CZ-CO	CZ	CO	CZ-CO
	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)
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
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

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	24 ชั่วโมง			48 ชั่วโมง		
	CZ	CO	CZ-CO	CZ	CO	CZ-CO
	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)
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
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

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	24 ชั่วโมง			48 ชั่วโมง		
	CZ	CO	CZ-CO	CZ	CO	CZ-CO
	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)
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
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

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	24 ชั่วโมง			48 ชั่วโมง		
	CZ	CO	CZ-CO	CZ	CO	CZ-CO
	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)
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
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

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	24 ชั่วโมง			48 ชั่วโมง		
	CZ	CO	CZ-CO	CZ	CO	CZ-CO
	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)	(cm)
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

จากผลการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 4-2 เห็นได้ว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินส่วนใหญ่ สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนภายใต้สภาวะที่เป็นด่างได้ เมื่อทำการตรวจวัดประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลท โดยการเปรียบเทียบขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (CO) กับขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนี (CZ) แล้วจัดกลุ่มของแบคทีเรียตามระดับความสามารถในการสร้างเอนไซม์โดยพิจารณาจากค่า CZ-CO ออกเป็น 4 กลุ่มได้แก่

- 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.

ซึ่งผลการจัดกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียตามความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนดังแสดงในตารางที่ 4-3

ตารางที่ 4-3 กลุ่มของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ตามความสามารถในการสร้างเอนไซม์

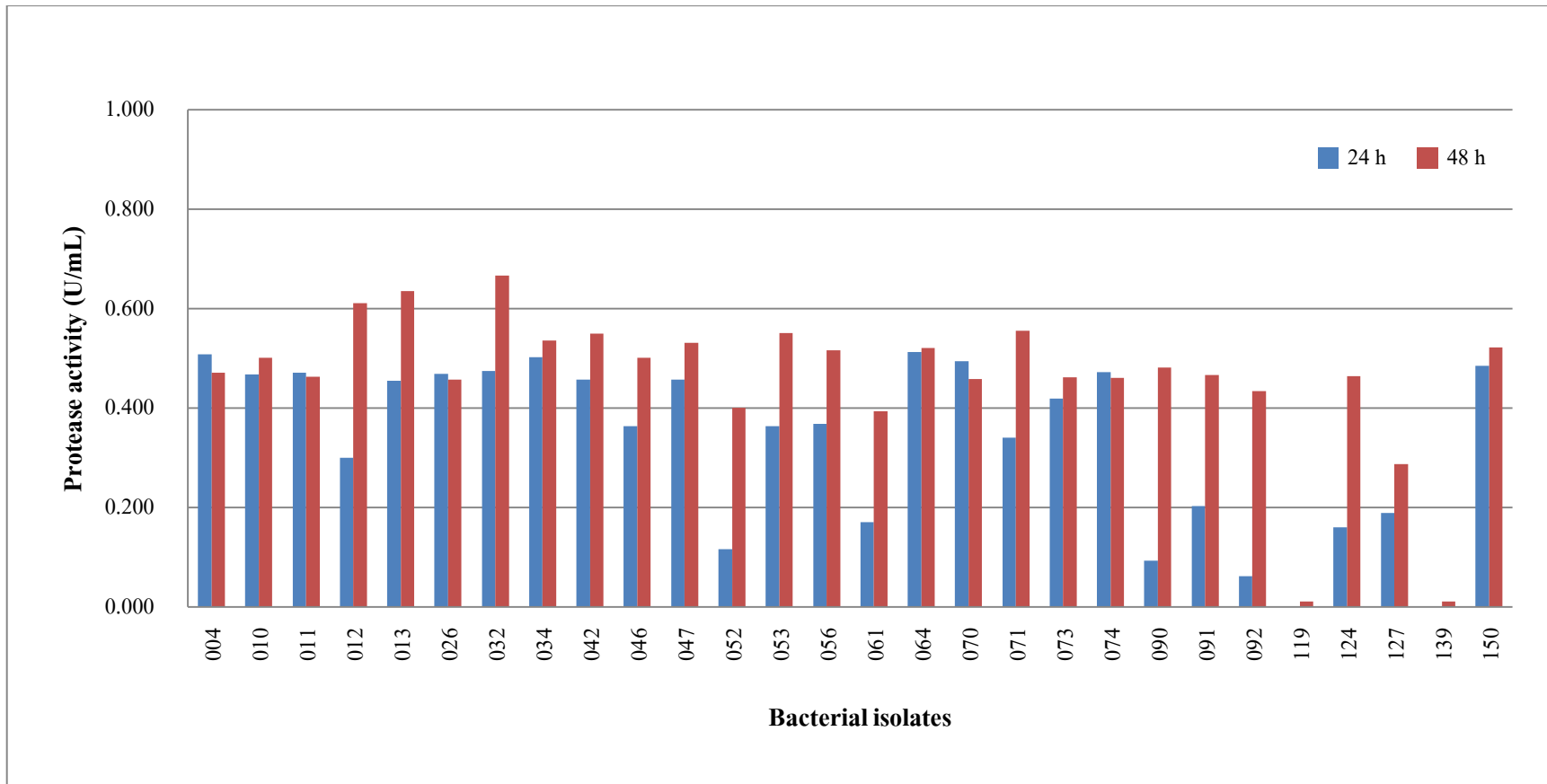
กลุ่มของแบคทีเรีย	กลุ่มที่ 1	กลุ่มที่ 2	กลุ่มที่ 3	กลุ่มที่ 4
ค่า CZ-CO (cm)	ไม่มีการสร้างเอนไซม์	≥ 1.50	อยู่ระหว่าง 1.00 – 1.49	< 1.00
รหัสเชื้อ	025, 028, 029, 031, 030, 033, 043, 055, 067, 084, 086, 096, 116, 120, 128, 151	004, 010, 011, 012, 013, 026, 032, 034, 042, 046, 047, 052, 053, 056, 061, 064, 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 4-3 เมื่อจัดแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียตามความสามารถในการสร้างเอนไซม์ พบว่ามีจำนวนของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์สูงที่สุดจากทั้ง 4 กลุ่ม จำนวนทั้งสิ้น 28 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 17.8 ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินทั้งหมด และแบคทีเรียในกลุ่มนี้โดยส่วนใหญ่ เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินจากโรงงานนมและผลิตภัณฑ์นม คิดเป็นจำนวนทั้งสิ้น 22 ไอโซเลท รองลงมา คือ ตัวอย่างดินจากโรงงานฟอกหนัง จำนวน 3 ไอโซเลท และตัวอย่างดินจากโรงฆ่าสัตว์ จำนวน 3 ไอโซเลท ตามลำดับ เนื่องจากกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่มีแนวโน้มในการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง จึงจะนำแบคทีเรียในกลุ่มนี้ไปตรวจสอบประสิทธิภาพของเชื้อในการสร้างเอนไซม์ในอาหารเหลวต่อไป

2.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสในอาหารเหลว

เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.1 จำนวน 28 ไอโซเลท มาศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสในอาหารเหลว BMSM พีเอช 10 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่า ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วตรวจวัดความสามารถในการสร้างเอนไซม์ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4-2

จากภาพที่ 4-2 เมื่อพิจารณาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ในอาหารเหลว 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 ยูนิต ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางภาคผนวก ก-1) และเนื่องจากแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทนี้สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสได้อย่างใกล้เคียงกัน ดังนั้น ผู้วิจัยจึงนำแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทไปทำการเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ แล้วเปรียบเทียบความสามารถในการสร้างเอนไซม์อีกครั้ง ก่อนที่จะคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพที่สุดสำหรับการทดสอบผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรมในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 4-2 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก ในอาหารเหลว BMSM พีเอช 10

3. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส ในระดับฟลาสก์

3.1 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในข้อ 2.2 โดยใช้สูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน 3 สูตร คือ BPMM, BMSM และ PPMM ที่ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 10 ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4-4 และภาพที่ 4-3 – 4-6

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

เมื่อพิจารณาปริมาณการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหารเพาะเลี้ยงทั้ง 3 สูตร ดังแสดงในภาพที่ 4-4 พบว่าค่าพีเอชของอาหารจะลดลงในช่วง 6 ชั่วโมงแรก ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อแบคทีเรียทั้งหมดไอโซเลทมีการเจริญในช่วง log phase จากนั้นค่าพีเอชจะคงที่อยู่ที่ประมาณ 8 ไปจนกระทั่งเสร็จสิ้นกระบวนการเพาะเลี้ยง และเมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร (ภาพที่ 4-5) พบว่าปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหารเพาะเลี้ยงทั้งสามสูตรมีการลดลงอย่างต่อเนื่องไปจนถึงสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง แต่เชื้อแบคทีเรียทุกชนิดไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสที่เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารได้หมด โดยมีน้ำตาลคงเหลือในอาหารเพาะเลี้ยงทุกชนิดอยู่ประมาณ 5-10 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ส่วนมากสามารถใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BMSM และ BPMM เห็นได้จากปริมาณน้ำตาลที่คงเหลือเมื่อสิ้นสุดกระบวนการเพาะเลี้ยงที่เวลา 48 ชั่วโมง มีปริมาณน้อยกว่าเมื่อเทียบกับสูตรอาหาร PPMM

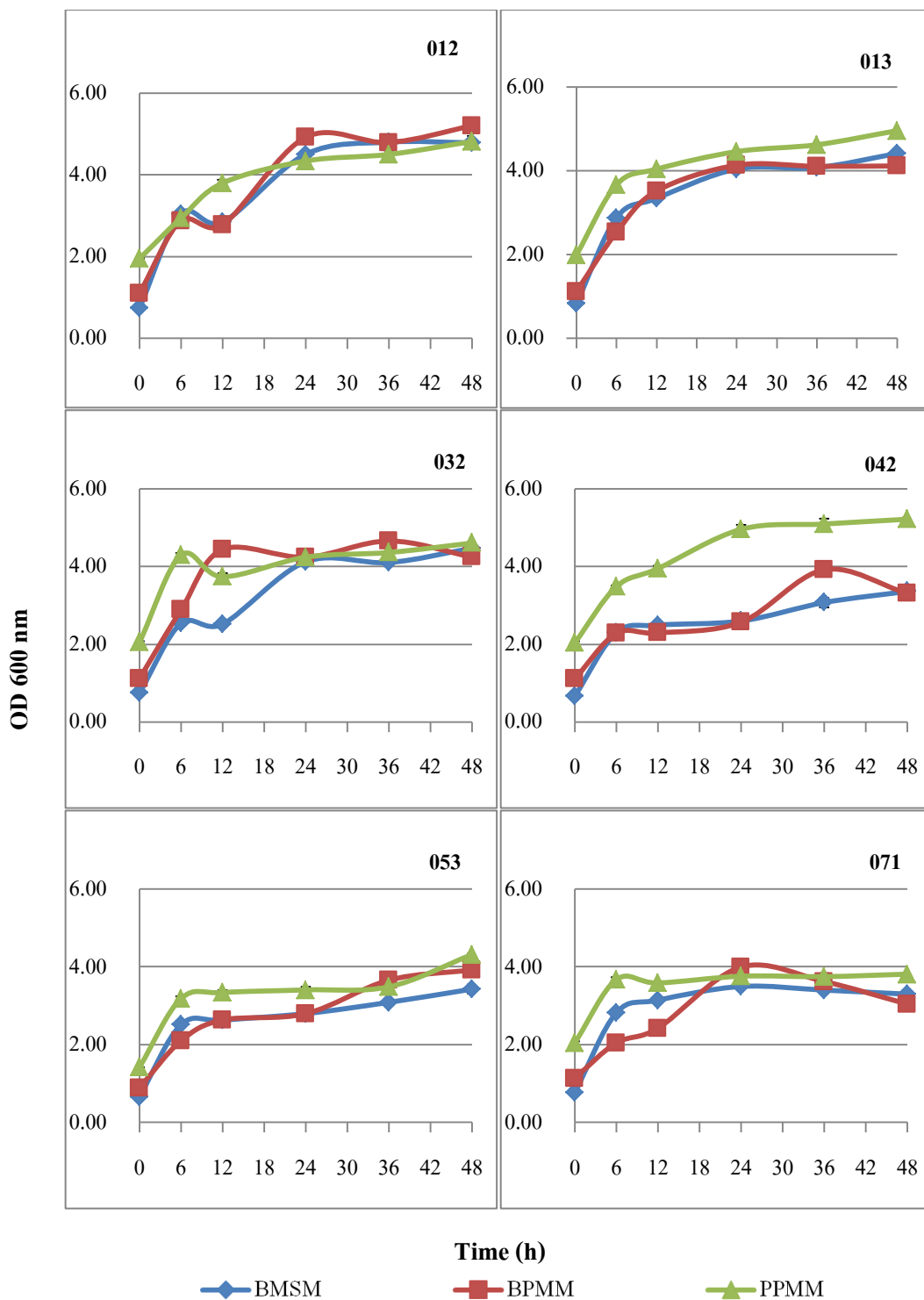
เมื่อพิจารณาการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดไอโซเลทในอาหารทั้งสามสูตร ดังแสดงในตารางที่ 4-4 และภาพที่ 4-6 พบว่า เชื้อแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 012, 013, 032, 042 และ 071 มีกิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร BPMM ซึ่งสามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์ได้ 0.59, 0.38, 0.63, 0.61 และ 0.60 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และมีอัตราการสร้างเอนไซม์เท่ากับ 0.023, 0.016, 0.024, 0.013 และ 0.024 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 053 นั้น พบว่ามี

กิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร PPMM โดยวัดค่ากิจกรรมได้ 0.50 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และมีอัตราการสร้างเอนไซม์เท่ากับ 0.014 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง จากผลการทดลองจะเห็นว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ BPMM มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าสูตรอาหาร BMSM และ PPMM ในการนำไปใช้เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส เห็นได้จากกิจกรรมของเอนไซม์ที่มีค่าสูง ดังนั้นในการทดลองต่อจากนี้จะใช้สูตรอาหาร BPMM เป็นอาหารในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมด ไอโซเลท

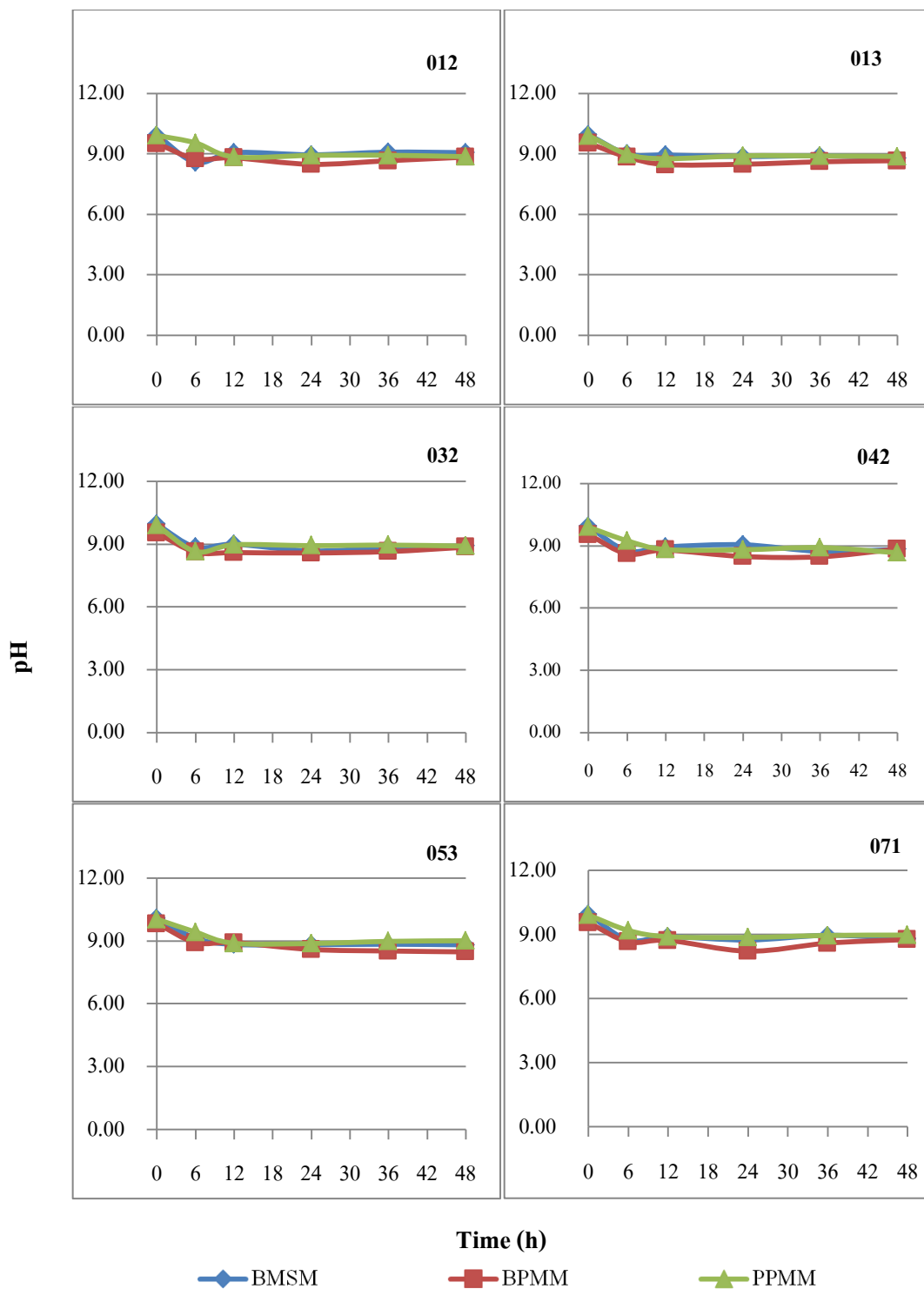
ตารางที่ 4-4 กิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมด ไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่แตกต่างกันทั้ง 3 สูตร

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

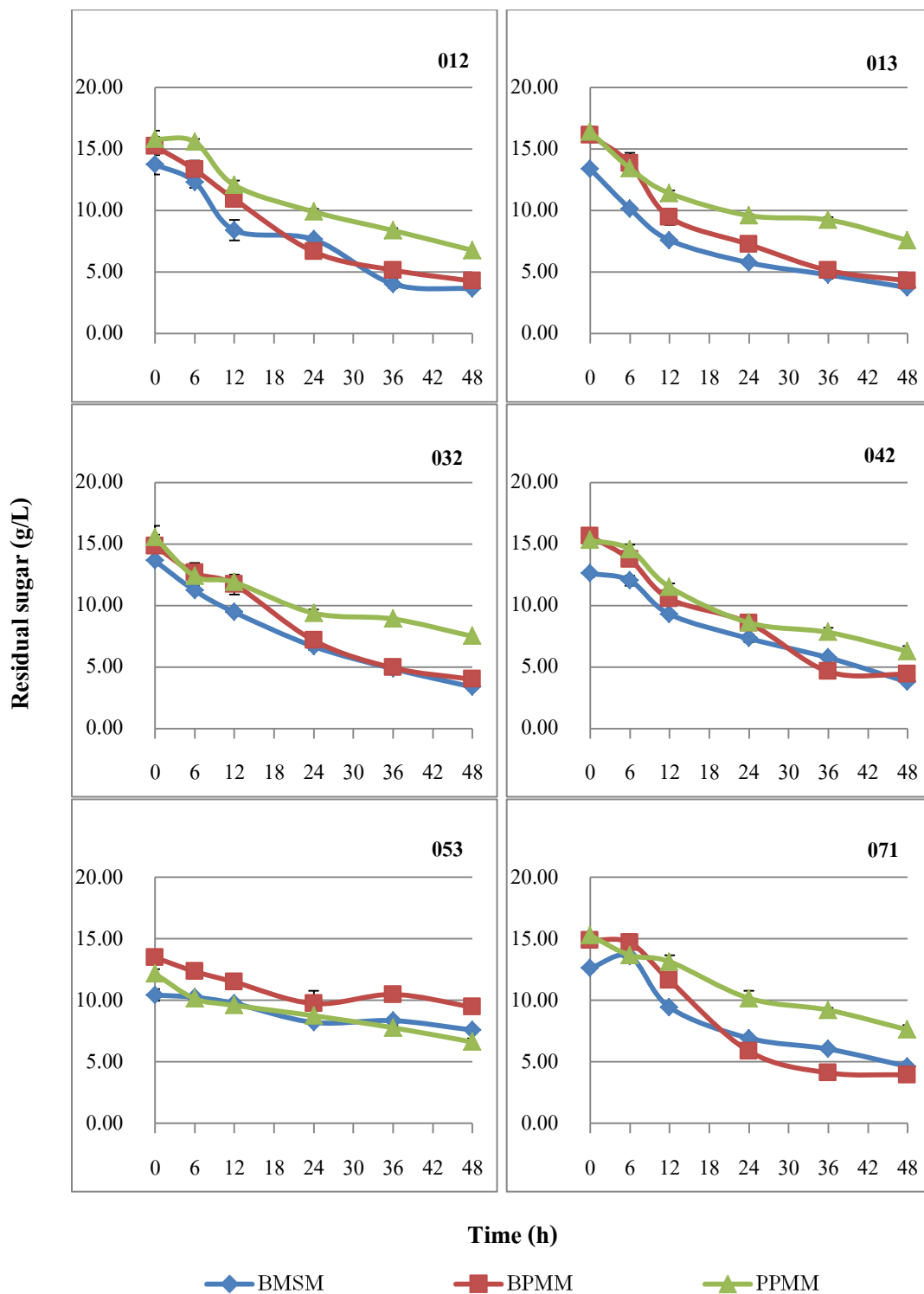
หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ ในอาหารแต่ละสูตร ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)



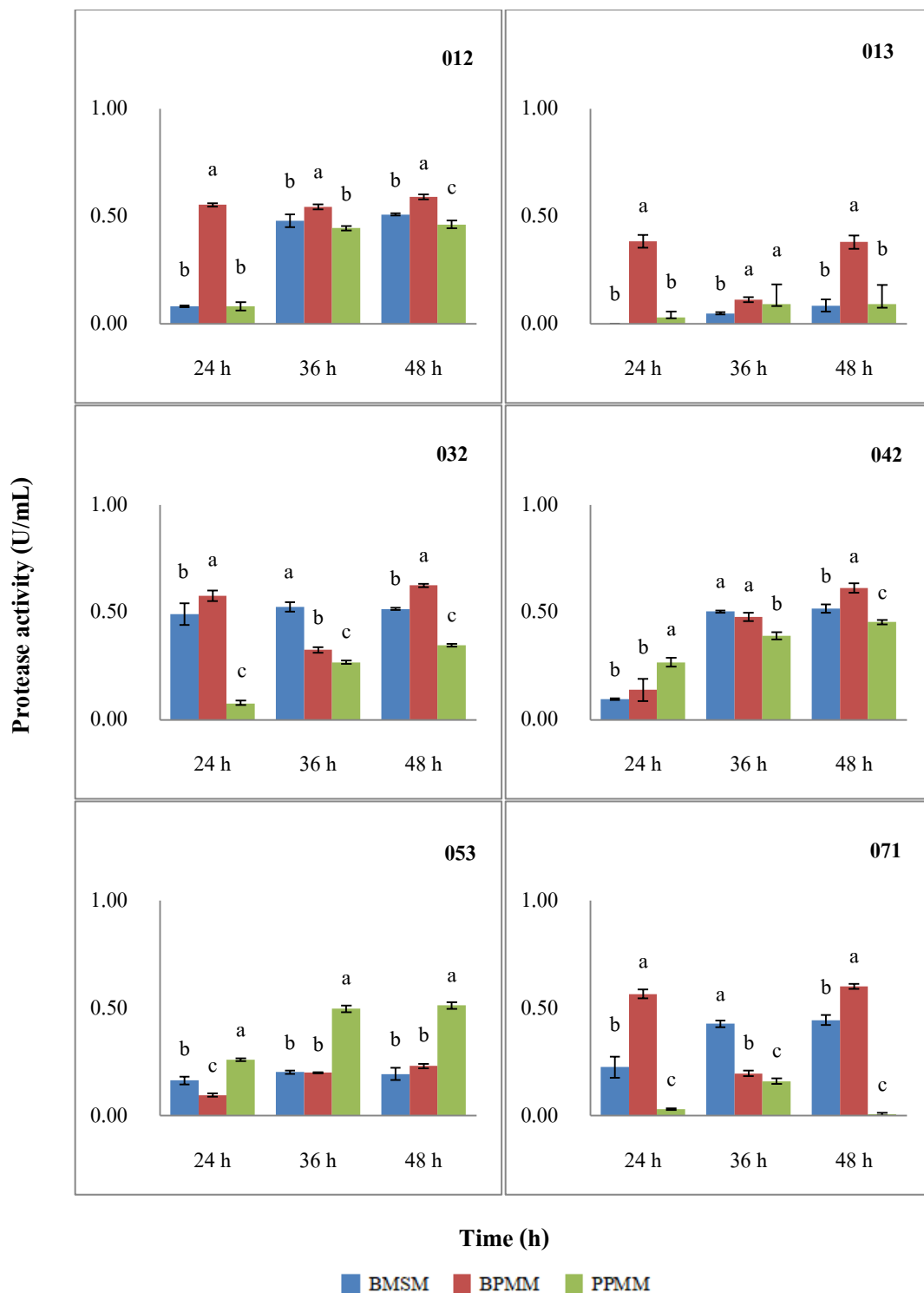
ภาพที่ 4-3 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน 3 สูตร
(bar = SD)



ภาพที่ 4-4 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหก ไอโซเลท ในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน 3 สูตร (bar = SD)



ภาพที่ 4-5 ปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน 3 สูตร (bar = SD)



ภาพที่ 4-6 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหก ไอโซเลทในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน 3 สูตร ตัวอักษรยกกำลังที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

3.2 ผลการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในข้อ 2.2 โดยใช้สูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ กลูโคส (Glucose) ที่เป็นแหล่งคาร์บอนทางการค้า และกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (Glucose Hydrolysate) กับ เด็กซ์ทริน (Dextrin) ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4-7 – 4-10

เมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดไอโซเลทในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด ดังแสดงในภาพที่ 4-7 พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 012, 032, 053, และ 071 มีการเจริญเข้าสู่ระยะ log phase ในช่วง 0 ถึง 12 ชั่วโมงแรก โดยไม่มีระยะ lag phase เหมือนกัน ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนทั้ง 3 ชนิด แต่ค่าความขุ่นของอาหารที่ใช้กลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังและเด็กซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน ในระยะ late log phase (ที่เวลา 12 ชั่วโมง) มีค่าสูงกว่าอาหารที่ใช้กลูโคสทางการค้าเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งบ่งชี้ว่าเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ไอโซเลทนั้นสามารถเจริญได้ดีกว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนทดแทน เช่นเดียวกับเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 042 ที่เจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนทดแทน เนื่องจากที่ระยะ late log phase สามารถวัดค่าความขุ่นของอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนทดแทนได้สูงกว่าอาหารที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่แบคทีเรียไอโซเลท 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 4-8 พบว่าค่าพีเอชในอาหารทั้ง 3 ชนิด ของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดไอโซเลท มีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะเดียวกันคือ ค่าพีเอชของอาหารจะลดลงจาก 10 ที่เวลา 0 ชั่วโมง จนมีค่าประมาณ 8 ที่เวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อแบคทีเรียทั้งหมดไอโซเลทมีการเจริญในช่วง log phase จากนั้นค่าพีเอชในอาหารจะค่อนข้างคงที่จนเสร็จสิ้นกระบวนการเพาะเลี้ยงที่เวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหาร (ภาพที่ 4-9) พบว่า การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหารที่แตกต่างกันทั้ง 3 ชนิด ของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดไอโซเลท มี

แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางเดียวกันคือ ปริมาณของน้ำตาลในอาหารมีการลดลงอย่างต่อเนื่องไปจนถึงสูงสุดกระบวนการเพาะเลี้ยง ซึ่งจะมีปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหารเพาะเลี้ยงทุกชนิดอยู่ประมาณ 4-8 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทสามารถใช้แหล่งคาร์บอนทดแทนได้อย่างมีประสิทธิภาพไม่ต่างจากแหล่งกลูโคสทางการค้า

เมื่อพิจารณาการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท ในอาหาร BPMM ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกันทั้ง 3 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 4-5 และภาพที่ 4-10 พบว่า เชื้อแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 012, 032 และ 042 มีกิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันทั้ง 3 ชนิด ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ได้สูงที่สุดในอาหารทั้ง 3 ชนิด (ตารางที่ 4-5) ส่วนเชื้อไอโซเลท 071 มีกิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงที่สุดที่เวลา 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกัน แต่สามารถสร้างเอนไซม์ได้ดีกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้กลูโคสทางการค้าและกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียที่เหลืออีกสองไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท 013 และ 053 สามารถใช้แหล่งคาร์บอนทดแทนแล้วสร้างเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกับเชื้อชนิดอื่น ต่างกันตรงที่ไอโซเลท 013 สามารถสร้างเอนไซม์ได้สูงสุดเมื่อใช้กลูโคสที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ที่เวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 053 สามารถสร้างเอนไซม์ได้มีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อใช้เด็กซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน ที่เวลา 36 ชั่วโมง จากการทดลองจะเห็นว่าแหล่งคาร์บอนทดแทนทั้งสองชนิด สามารถส่งเสริมประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทได้อย่างไม่แตกต่างกันเท่าใดนัก แต่เนื่องจากต้นทุนในการผลิตเด็กซ์ทรินนั้นต่ำกว่ากลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมัน (มรกด กระจ่าง, 2558) จึงเลือกใช้เด็กซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยงสำหรับการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4-5 กิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้
ทั้งหกไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด

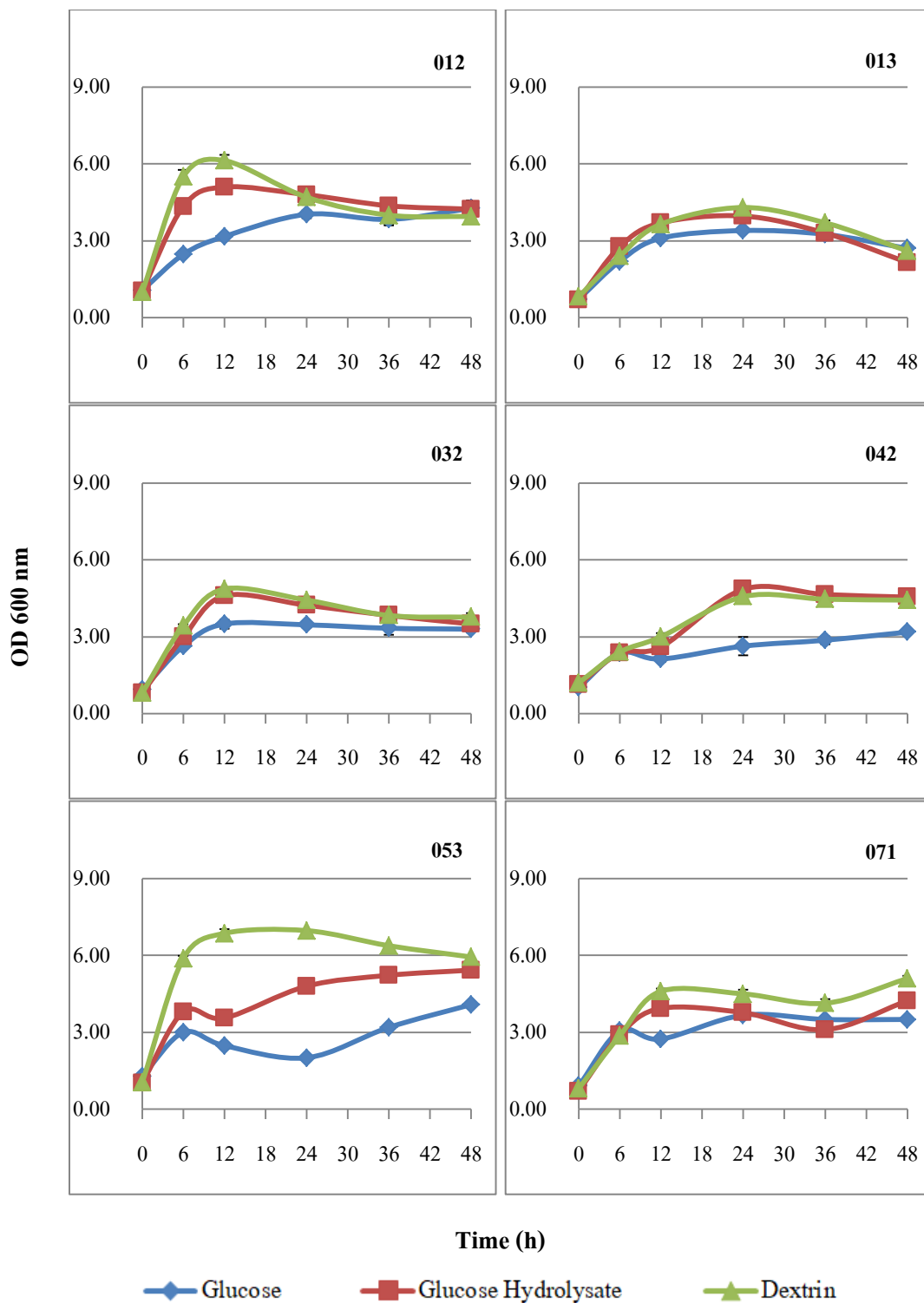
ไอโซเลท	เวลา (ชม.)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/mL)			อัตราการสร้างเอนไซม์ (U/mL/h)		
		G	GH	D	G	GH	D
012	24	0.51±0.01 ^a	0.52±0.02 ^a	0.55±0.01 ^a	0.021±0.000 ^a	0.022±0.001 ^a	0.023±0.001 ^a
	36	0.51±0.01 ^{ab}	0.54±0.02 ^a	0.49±0.03 ^b	0.014±0.000 ^b	0.015±0.000 ^a	0.014±0.001 ^b
	48	0.50±0.05 ^a	0.53±0.03 ^a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

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

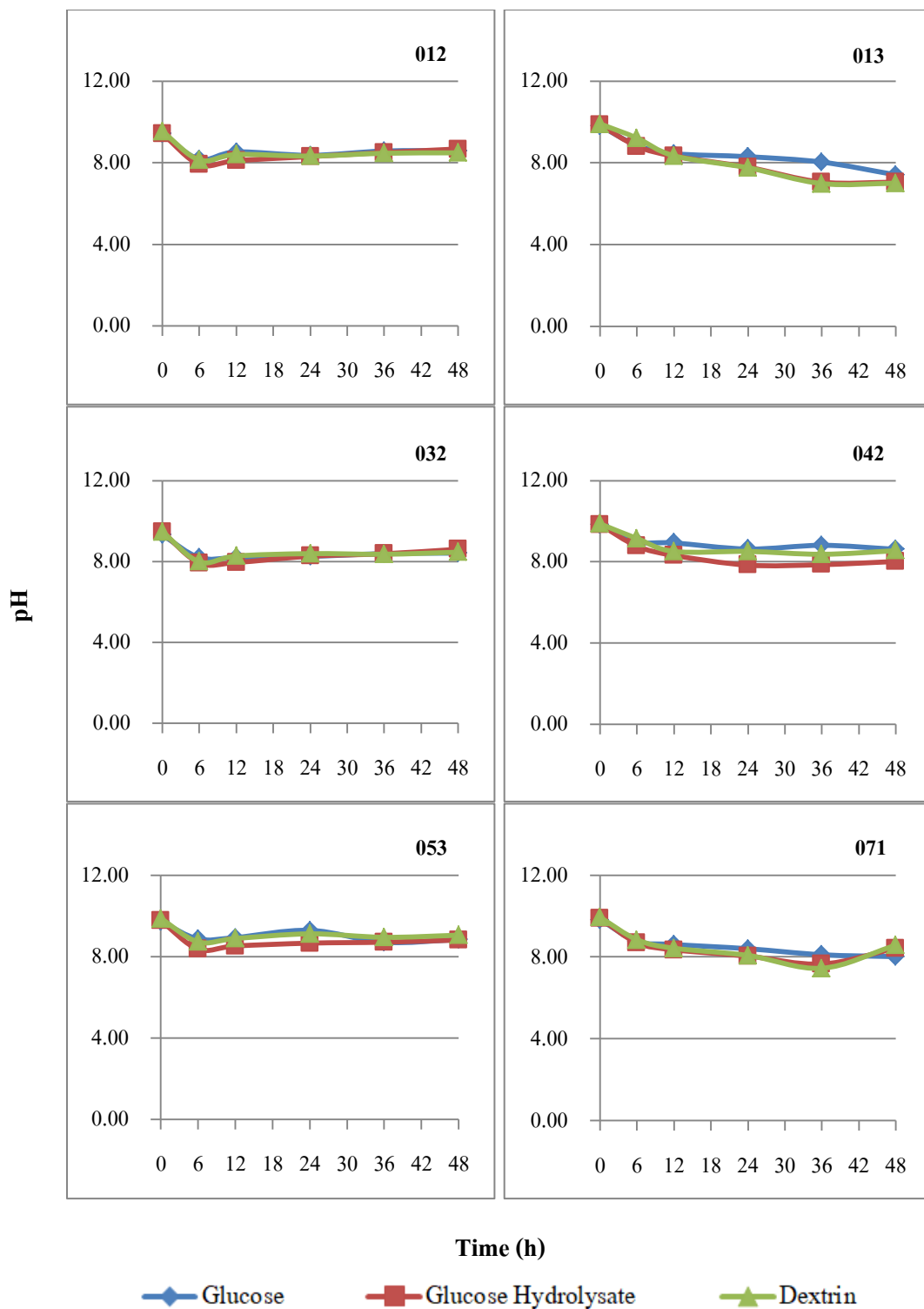
G คือ กลูโคสทางการค้า

GH คือ กลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

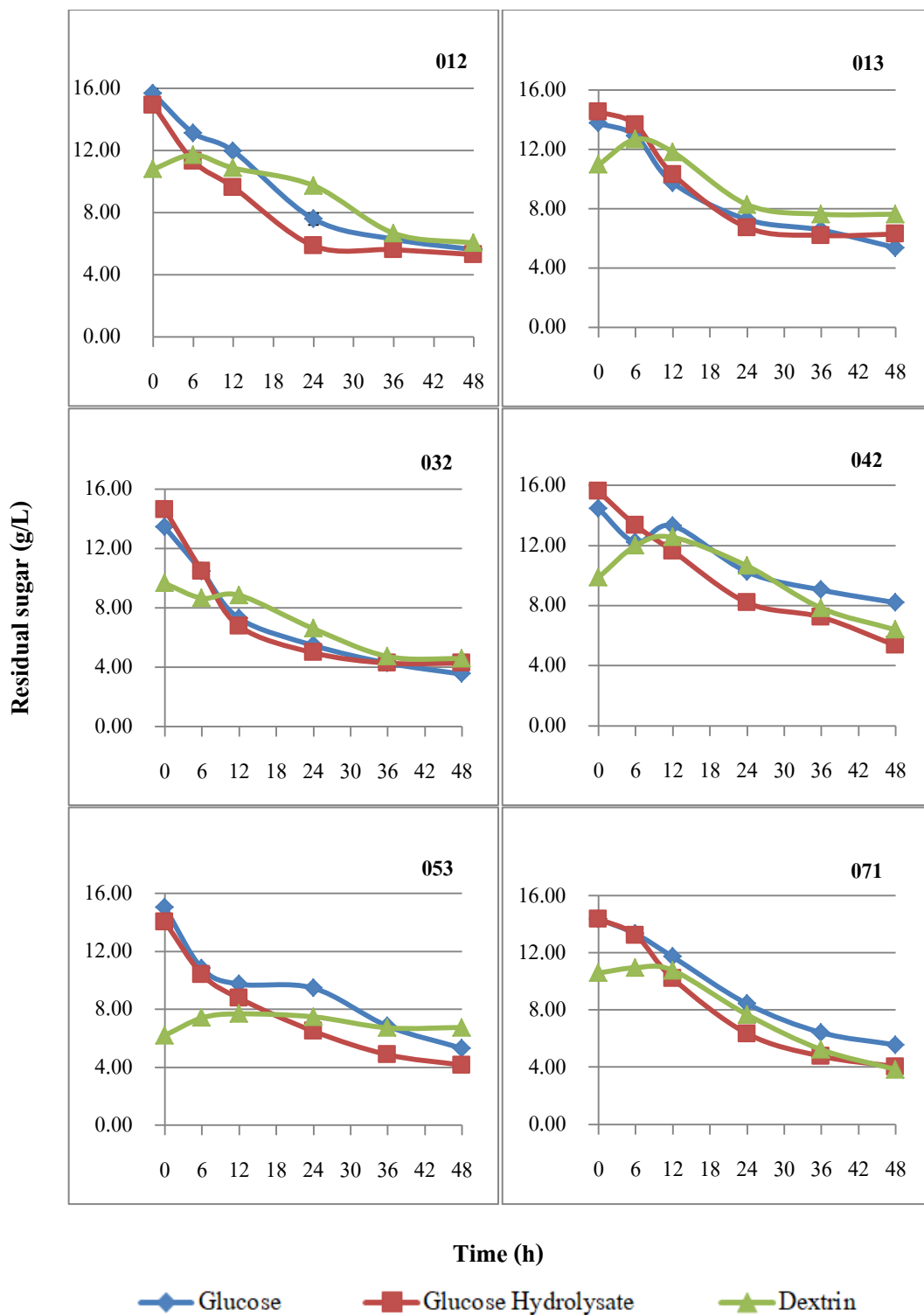
D คือ เด็กซ์ทริน



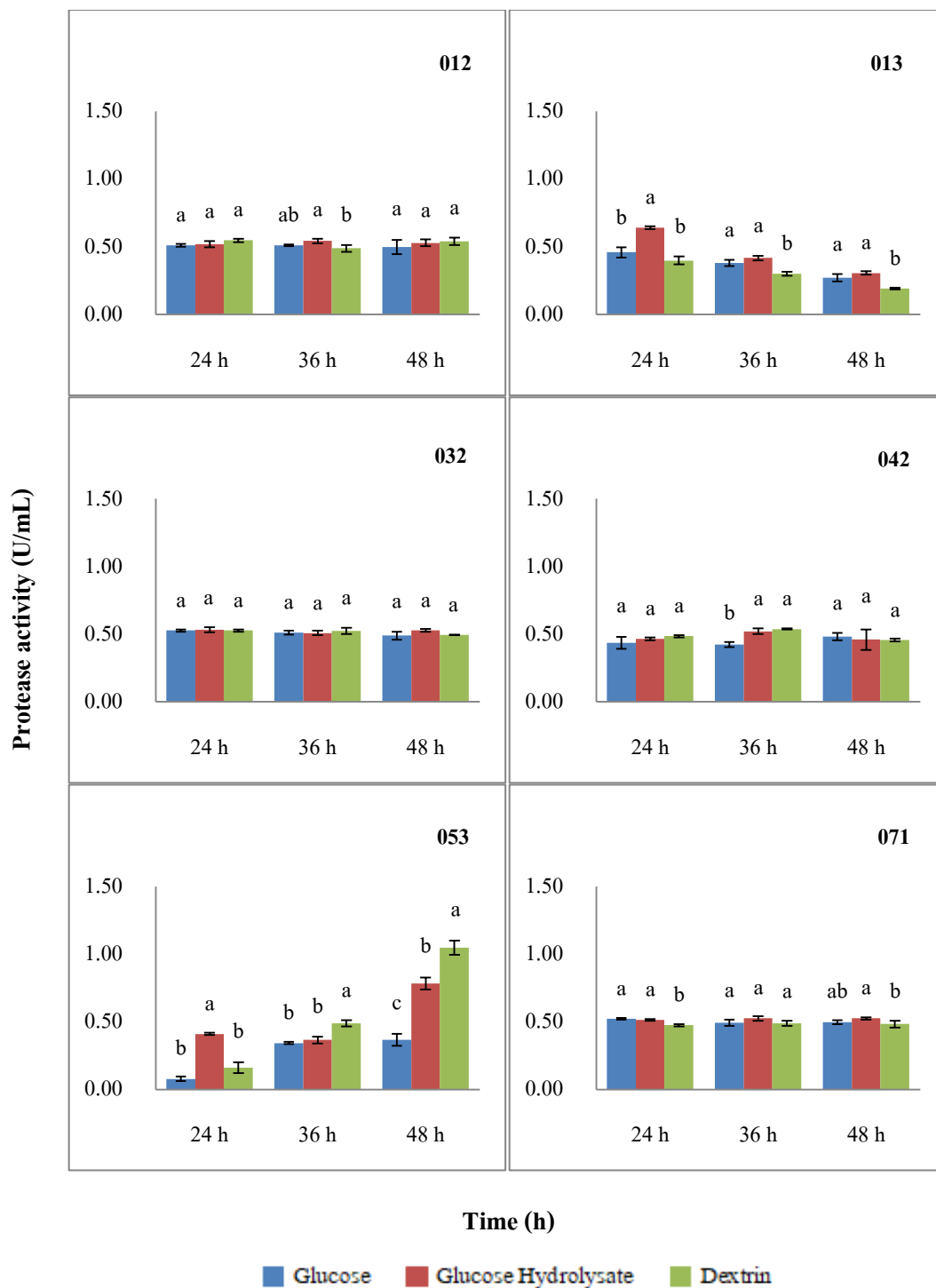
ภาพที่ 4-7 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด (bar = SD)



ภาพที่ 4-8 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด (bar = SD)



ภาพที่ 4-9 ปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด (bar = SD)



ภาพที่ 4-10 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหก ไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 3 ชนิด ตัวอักษรยกกำลังที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

3.3 ผลการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมด ไอโซเลท โดยใช้สูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แหล่งของไนโตรเจนแตกต่างกัน 5 ชนิด ได้แก่ ยีสต์สกัด (Yeast extract) สารสกัดจากเนื้อวัว (Beef extract) กากถั่วเหลือง (Soybean meal) โซเดียมไนเตรท (NaNO_3) และโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4-11 – 4-14 และตารางที่ 4-6 – 4-7

เมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันทั้ง 5 ชนิด ดังแสดงในภาพที่ 4-11 พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 013, 032 และ 071 มีการเจริญเติบโตเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนที่สูงแตกต่างจากการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ๆ อย่างเห็นได้ชัด ซึ่งในกรณีที่ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อแบคทีเรีย 013 และ 071 จะเจริญเข้าสู่ระยะ log phase โดยไม่มีระยะ lag phase ที่เวลา 0 - 12 ชั่วโมง และมีค่าความขุ่นสูงสุดของอาหารที่ความยาวคลื่น 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 4-12 พบว่า ค่าพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกันทั้ง 5 ชนิด ของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทนั้น มีการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางเดียวกัน โดยค่าพีเอชจะลดลงจาก 10 ที่เวลา 0 ชั่วโมง ไปจนกระทั่งเหลือค่าพีเอชประมาณ 7-8 ที่เวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นค่าพีเอชจะค่อนข้างคงที่ไปจนกระทั่งเสร็จสิ้นกระบวนการเพาะเลี้ยงที่เวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร ดังแสดงในภาพที่ 4-13 พบว่า การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน 5 ชนิด ของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทมีแนวโน้มเช่นเดียวกัน โดยในอาหารที่ใช้ไซโตเดียมไนเตรทและโพแทสเซียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจน จะมีการลดลงของปริมาณน้ำตาลน้อยกว่าอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์เล็กน้อย และในอาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 012, 032 และ 053 จะมีการลดลงของปริมาณน้ำตาลอย่างรวดเร็วในช่วง 0-12 ชั่วโมง จากนั้นจะมีค่าคงที่ตลอดทั้งกระบวนการ

เมื่อพิจารณาการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสและอัตราการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน 5 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 4-6 – 4-7 และภาพที่ 4-14 พบว่า แบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทมีค่ากิจกรรมเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งการใช้กากถั่วเหลืองซึ่งเป็นสารอินทรีย์ชนิดหนึ่งในอาหาร จะทำให้ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการผลิตเอนไซม์สูงสุดในเชื้อแบคทีเรียจำนวน 4 ไอโซเลท ได้แก่ 013, 032, 053 และ 071 ยกเว้นเชื้อแบคทีเรีย 012 ที่มีกิจกรรมเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้ยีสต์สกัดและสารสกัดจากเนื้อวัว ส่วนเชื้อแบคทีเรีย 042 มีการสร้างเอนไซม์ใกล้เคียงกันในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกันทั้ง 5 ชนิด เนื่องจากผลการทดลองบ่งชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่มีการสร้างเอนไซม์อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยง ไม่ต่างจากการใช้สารอินทรีย์ชนิดอื่น อีกทั้งยังเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูกกว่าสารอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่นำมาใช้ในการทดลอง จึงเลือกใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงสำหรับการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4-6 กิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหกไอโซเลท
เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 5 ชนิด

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

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

YE คือ ยีสต์สกัด

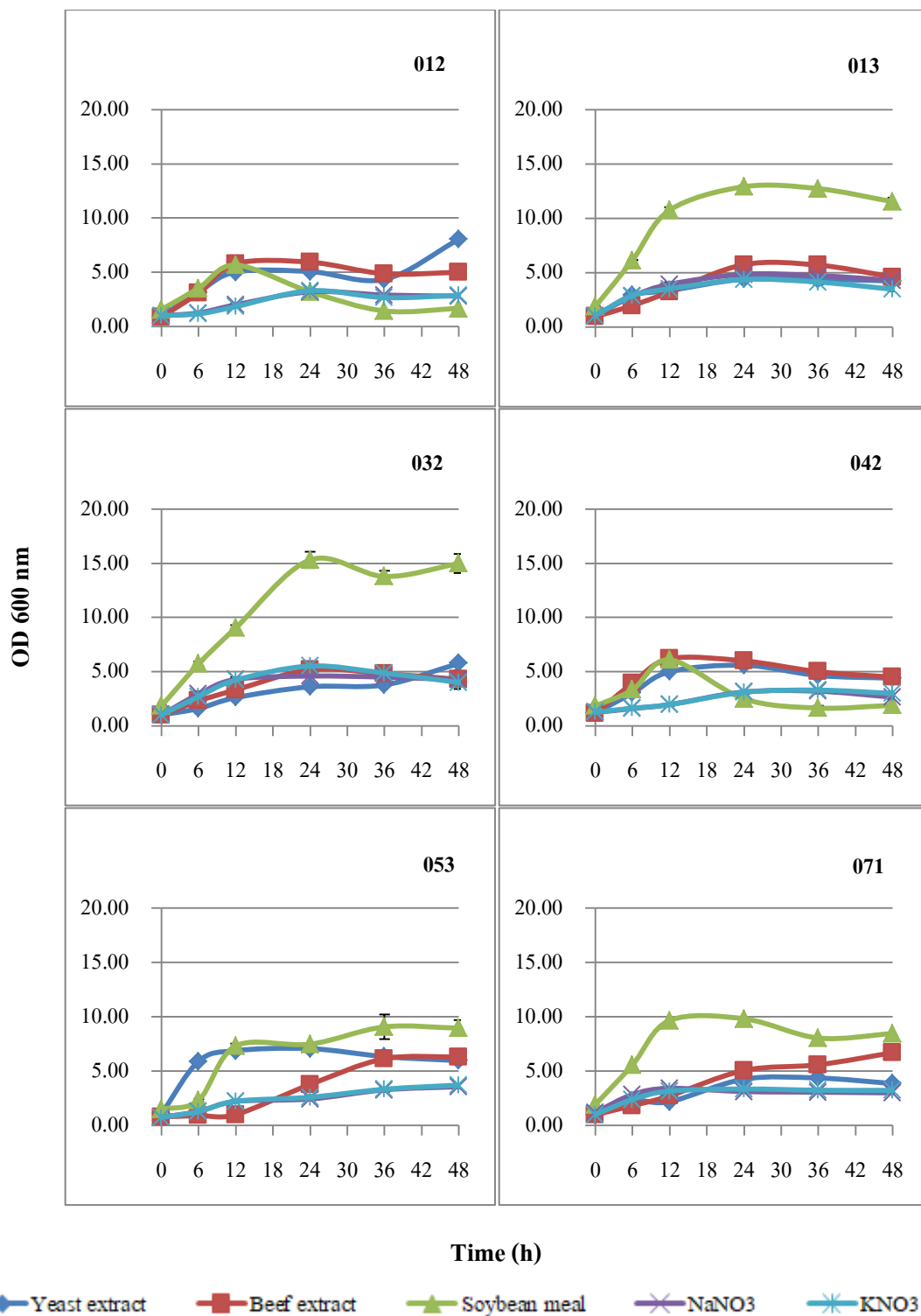
BE คือ สารสกัดจากเนื้อวัว

SB คือ กากถั่วเหลือง

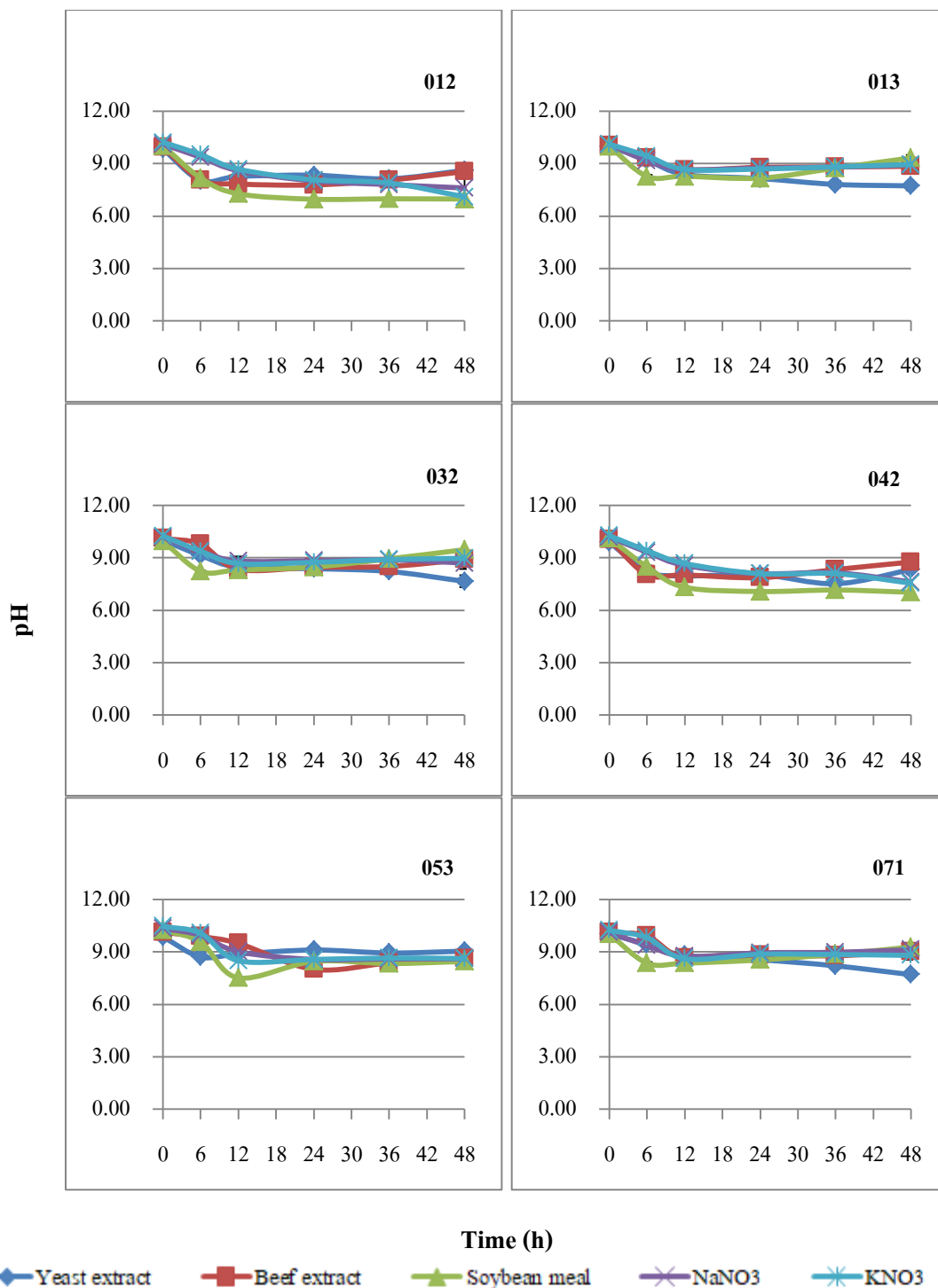
ตารางที่ 4-7 อัตราการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดไอโซเลท
เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 5 ชนิด

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

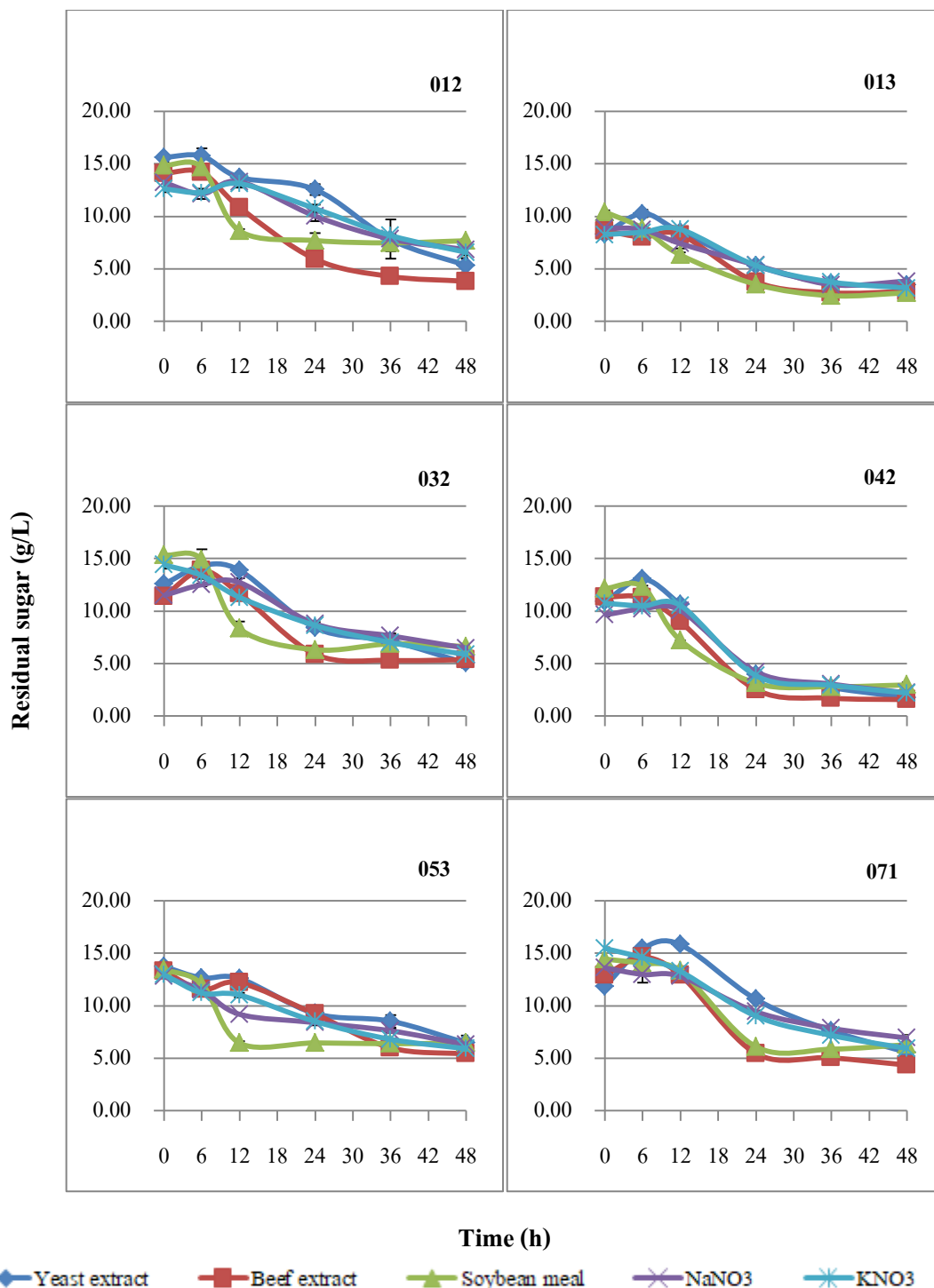
หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอัตราการสร้างเอนไซม์ในแหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิด ที่
ระยะเวลาต่าง ๆ กัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)
YE คือ ยีสต์สกัด
BE คือ สารสกัดจากเนื้อวัว
SB คือ กากถั่วเหลือง



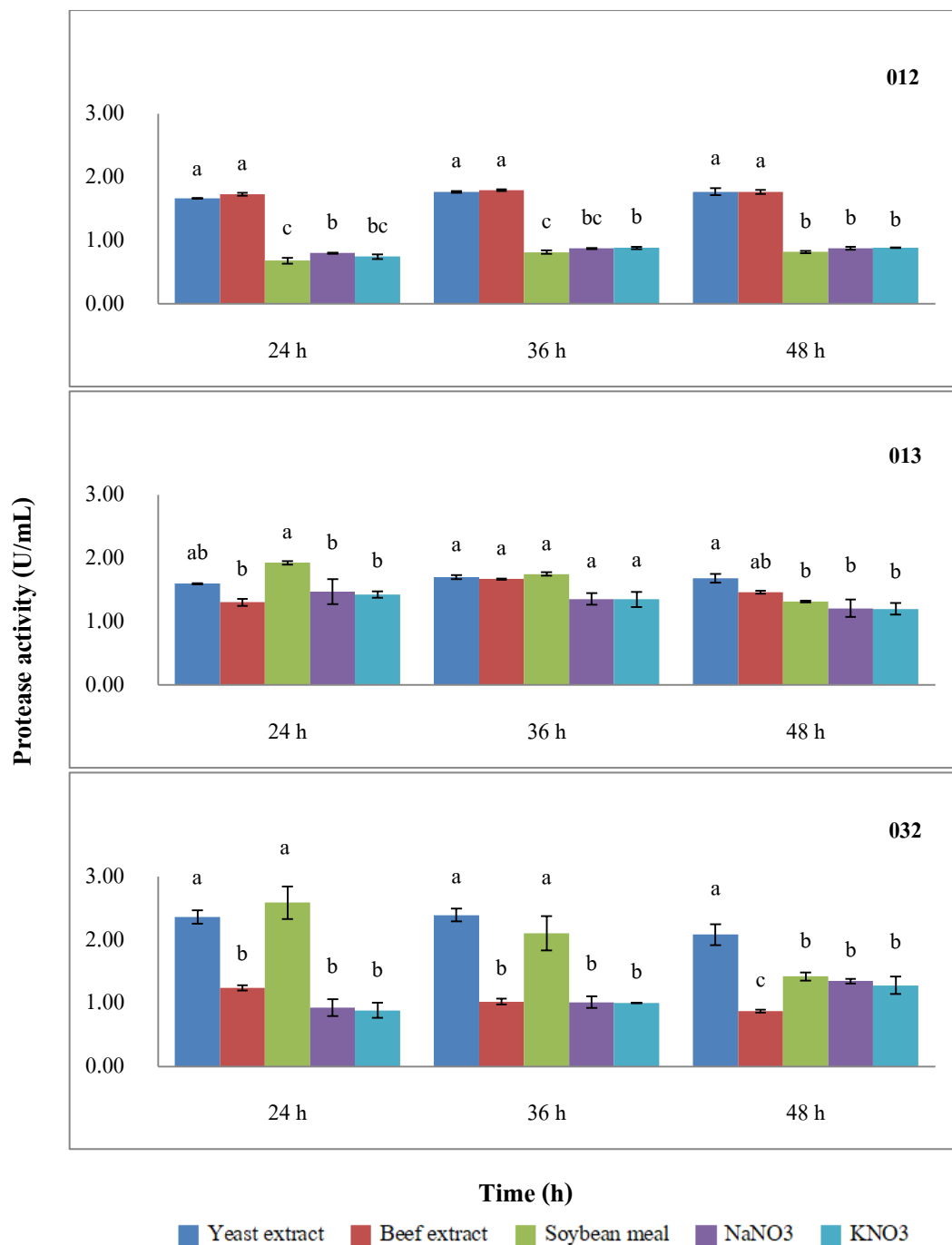
ภาพที่ 4-11 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลต ในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 5 ชนิด (bar =SD)



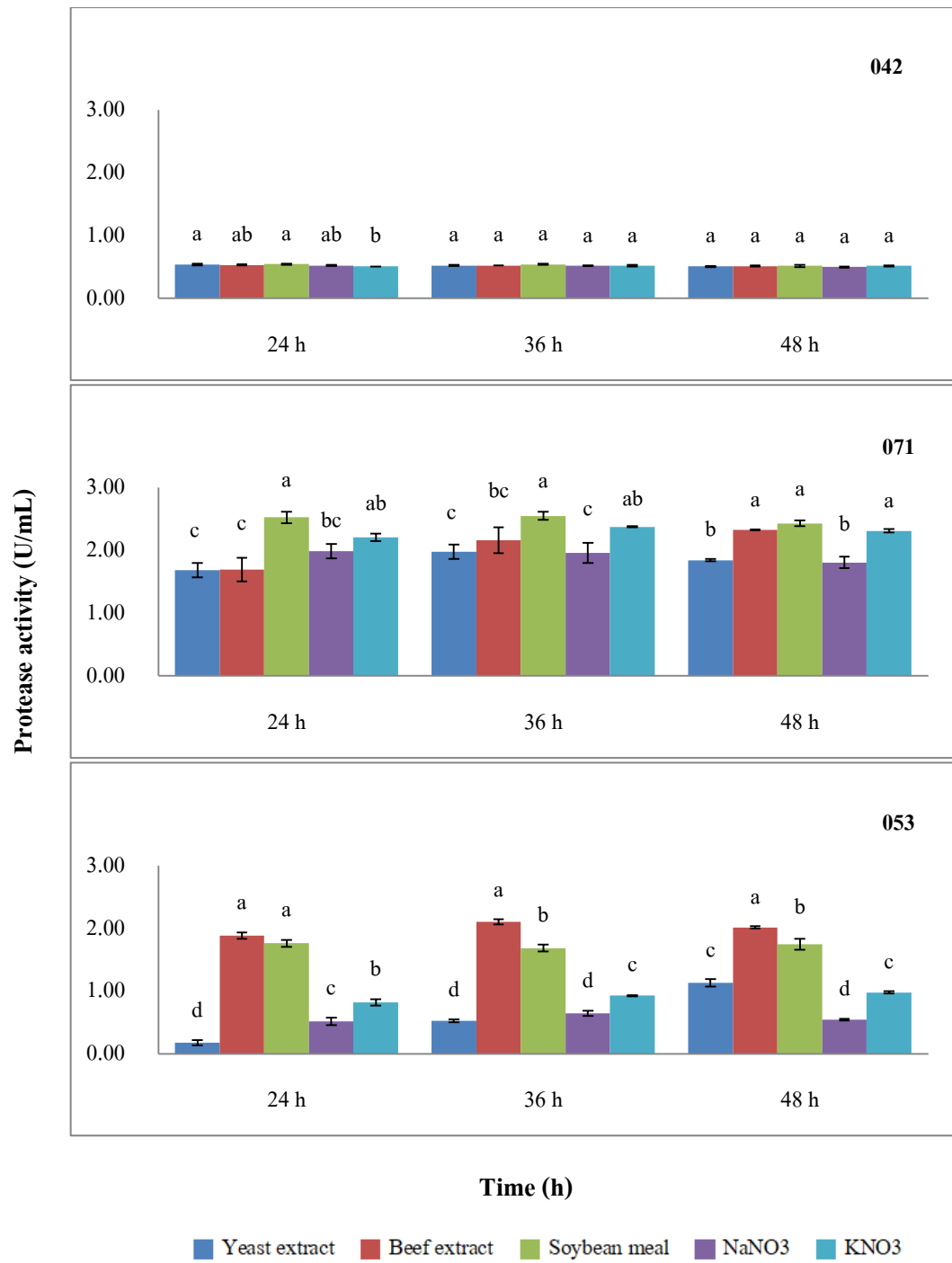
ภาพที่ 4-12 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 5 ชนิด (bar = SD)



ภาพที่ 4-13 ปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 5 ชนิด (bar = SD)



ภาพที่ 4-14 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหก ไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีเค็ซท์รินเป็นแหล่งคาร์บอน และมีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน 5 ชนิด ตัวอักษรยกกำลังที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 4-14 (ต่อ)

3.4 ผลการศึกษาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร BPMM ที่มีเค็ซท์รินเป็นแหล่งคาร์บอน มีกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน และปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ให้แตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 7, 8, 9 และ 10 บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4-15 – 4-18 และตารางที่ 4-8 – 4-9

เมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในอาหารที่มีค่าพีเอชแตกต่างกัน 4 ระดับ ดังแสดงในภาพที่ 4-15 พบว่าค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่ทำให้เชื้อแบคทีเรียมีการเจริญดีที่สุดคือ 9 โดยให้ผลดีในเชื้อ ไอโซเลท 013, 032, และ 042 ซึ่งแบคทีเรีย ไอโซเลท 042 นั้น ยังมีการเจริญที่ดีในอาหารที่มีค่าพีเอช 8 อีกด้วย ส่วนค่าพีเอชในอาหารที่ทำให้แบคทีเรียเจริญได้ดีรองลงมาคือ 7 ที่ให้ผลดีในเชื้อ ไอโซเลท 012 และ 053 และค่าพีเอช 8 ที่ให้ผลดีในเชื้อ ไอโซเลท 042 และ 071 นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อทั้งหกไอโซเลทเจริญได้น้อยที่สุดเมื่อค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 10

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารที่มีค่าต่างกันทั้ง 4 ระดับ พบว่าค่าพีเอชของอาหารทั้ง 4 ชนิด ที่ใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท มีการลดลงจากค่าเริ่มต้นในช่วงที่เชื้อแบคทีเรียมีการเจริญระยะ log phase หลังจากนั้นค่าพีเอชจะค่อนข้างคงที่หรือมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยในระยะ stationary phase จนกระทั่งเสร็จสิ้นกระบวนการเพาะเลี้ยง

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลในอาหาร ดังแสดงในภาพที่ 4-17 พบว่าปริมาณน้ำตาลในอาหารเกือบทุกชนิดจะลดลงเมื่อแบคทีเรียมีการเจริญในระยะ log phase จากนั้นจะค่อนข้างคงที่เมื่อเชื้อเข้าสู่ระยะ stationary phase โดยเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท 042 และ 071 มีการลดลงของปริมาณน้ำตาลอย่างใกล้เคียงกันในอาหารที่มีค่าพีเอชแตกต่างกันทั้ง 4 ค่า ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการเจริญที่ใกล้เคียงกันในอาหารทั้ง 4 ชนิด และเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงที่เวลา 48 ชั่วโมง สามารถวัดปริมาณน้ำตาลคงเหลือได้ประมาณ 3-5 กรัมต่อลิตร ส่วนเชื้อแบคทีเรีย ไอโซเลท 012 มีการใช้ปริมาณน้ำตาลน้อยมากหรือแทบไม่ได้ใช้เลยในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 8 เห็นได้จากปริมาณน้ำตาลคงเหลือที่เวลา 48 ชั่วโมง ใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลตอนเริ่มต้นการเพาะเลี้ยง ส่วนอาหารที่มีค่าพีเอชอื่น ๆ มีการใช้น้ำตาลมากกว่าและคงเหลือในอาหารในปริมาณที่น้อยกว่าเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง เช่นเดียวกับแบคทีเรีย 032 ที่มีการใช้น้ำตาลในรูปแบบเดียวกันกับแบคทีเรีย ไอโซเลท 012 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 8 แต่แบคทีเรีย 032

นั้น ยังมีการใช้น้ำตาลน้อยในอาหารที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 7 ด้วย และมีการใช้น้ำตาลจนเกือบหมดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 9 ส่วนเชื้อแบคทีเรีย 013 มีการใช้น้ำตาลมากที่สุดในอาหารที่มีค่าพีเอช 8 รองลงมาคือ พีเอช 10, 7 และ 9 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากแบคทีเรีย 053 ที่มีการใช้น้ำตาลในอาหารที่มีค่าพีเอช 7, 8 และ 9 อย่างใกล้เคียงกัน และมีการใช้น้ำตาลน้อยสุดหรือแทบไม่ใช้เลยในอาหารที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 10

เมื่อพิจารณาค่ากิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียทั้งหก ไอโซเลท ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารต่างกัน 4 ระดับ ดังแสดงในภาพที่ 4-18 และตารางที่ 4-8 – 4-9 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 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 071 มีกิจกรรมและอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 10 เช่นเดียวกัน ต่างกันที่ต้องใช้ระยะเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ค่าสูงสุดดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้ค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ 7 ให้ผลดีในเชื้อแบคทีเรีย 053 โดยสามารถวัดกิจกรรมและอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดได้ที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยมีค่าเท่ากับ 1.68 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ 0.070 หน่วยต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เนื่องจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การใช้ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 10 ส่งผลให้แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้ค่าพีเอชอื่น ๆ จึงเลือกใช้ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 10 ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 4-8 กิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหกไอโซเลท
เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ

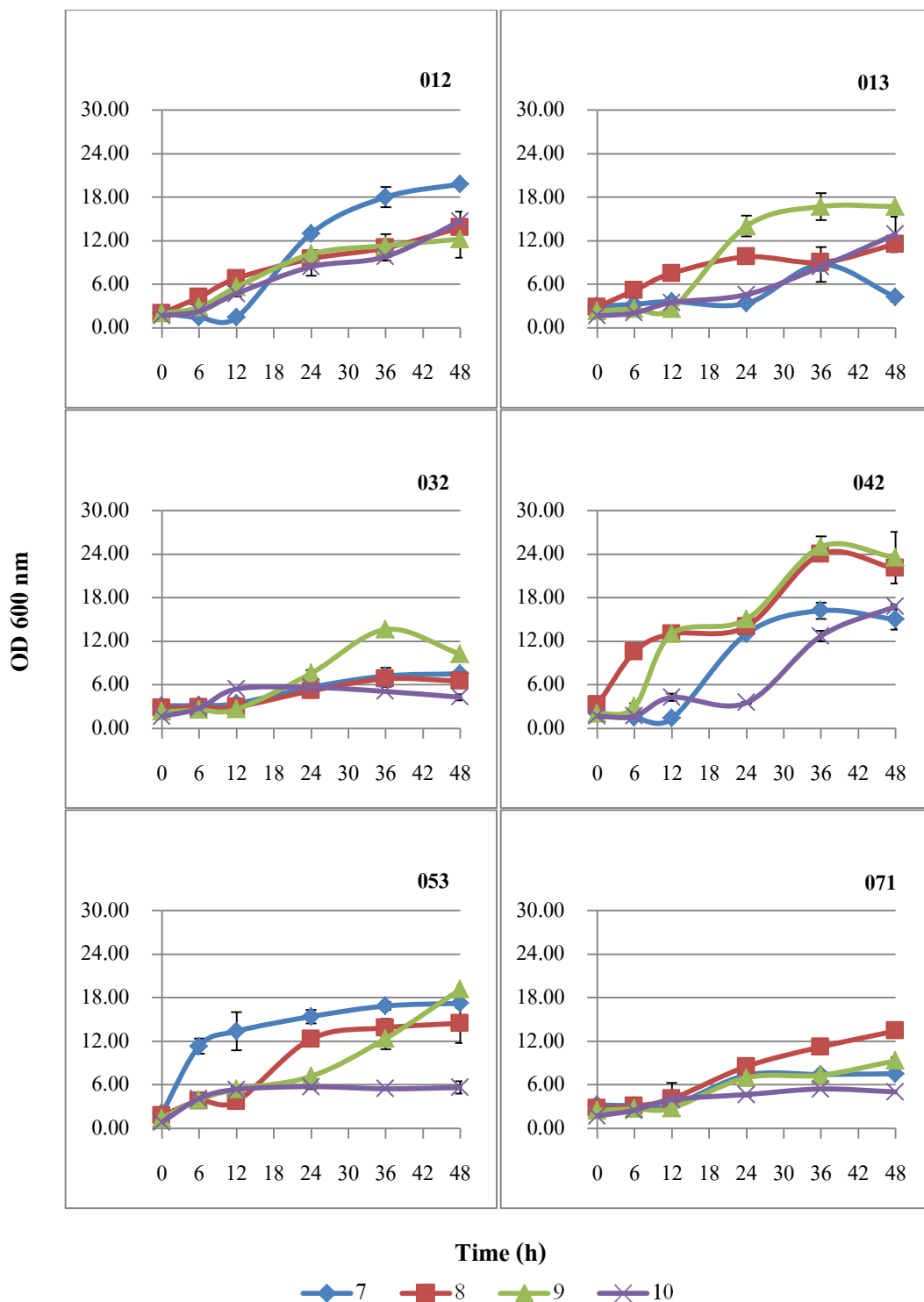
ไอโซเลท	เวลา (ชม.)	กิจกรรมเอนไซม์ (U/mL)			
		7	8	9	10
012	24	0.38±0.05 ^b	0.28±0.00 ^{bc}	0.23±0.03 ^c	1.95±0.02 ^a
	36	0.47±0.07 ^b	0.13±0.00 ^c	0.26±0.06 ^c	1.92±0.04 ^a
	48	0.41±0.07 ^b	0.12±0.00 ^c	0.20±0.05 ^{bc}	1.58±0.10 ^a
013	24	0.12±0.04 ^b	0.13±0.03 ^b	0.09±0.05 ^b	1.16±0.18 ^a
	36	0.02±0.02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

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

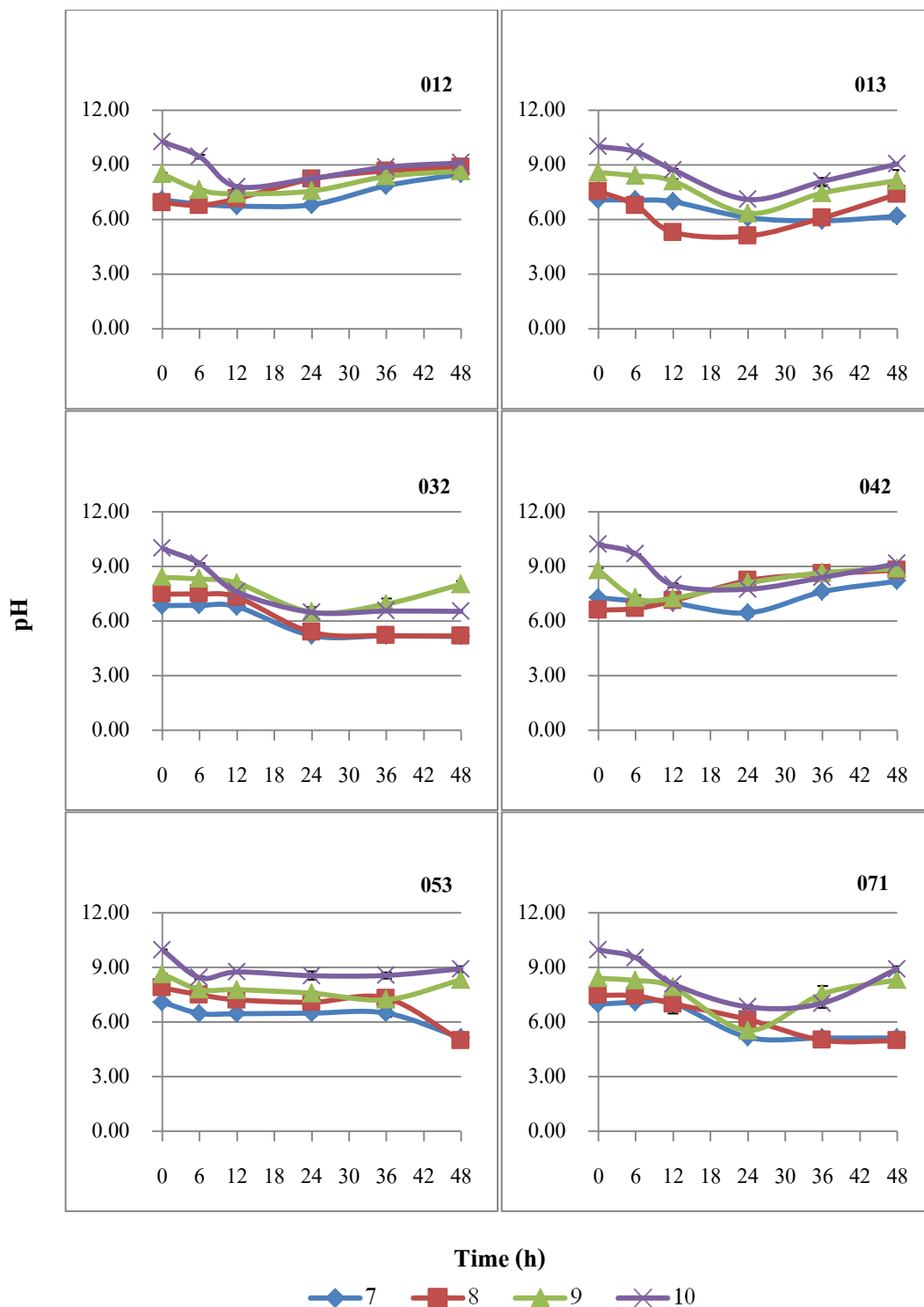
ตารางที่ 4-9 อัตราการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดไอโซเลท
เมื่อเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ

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

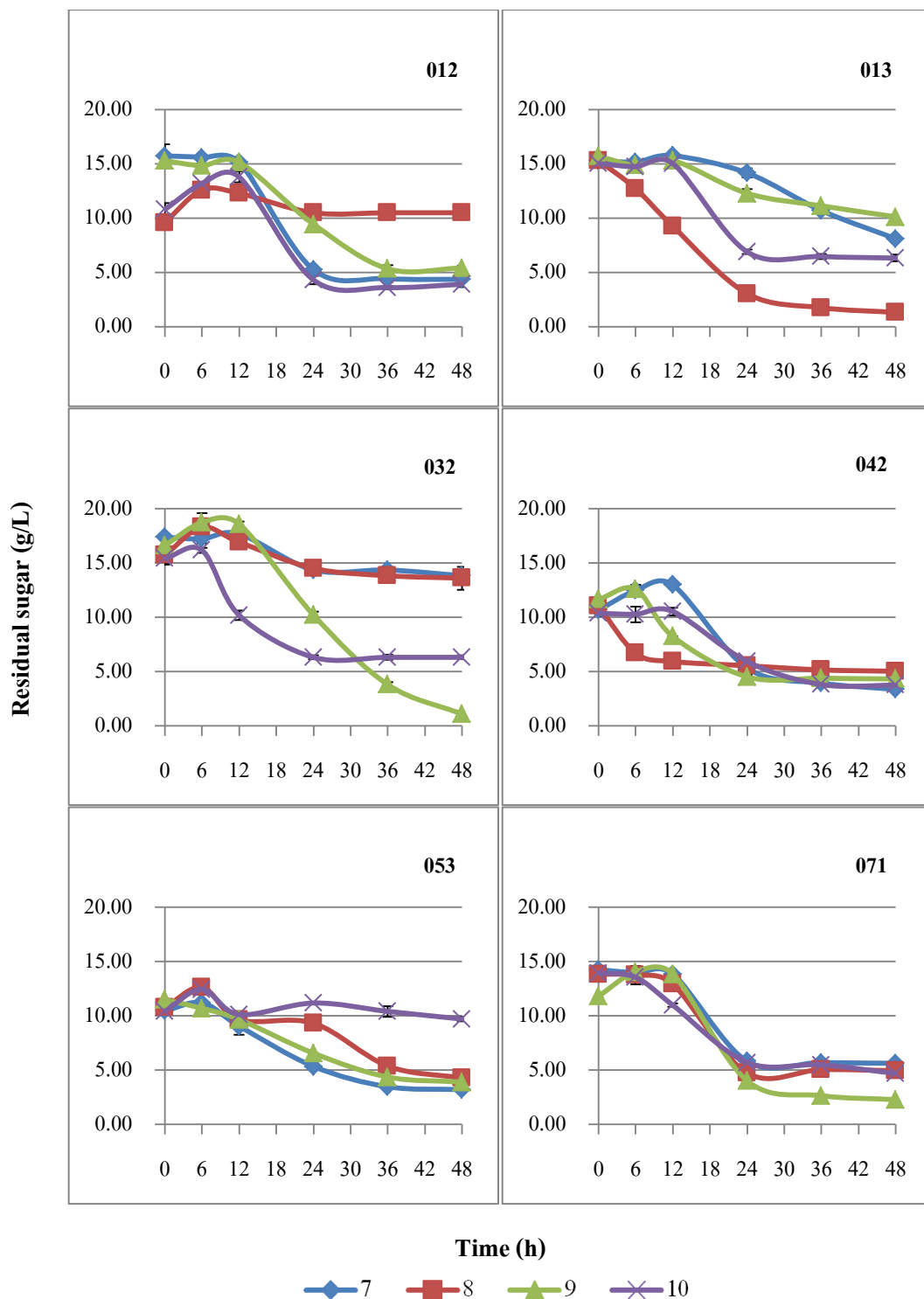
หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอัตราการสร้างเอนไซม์ ที่ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน
ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)



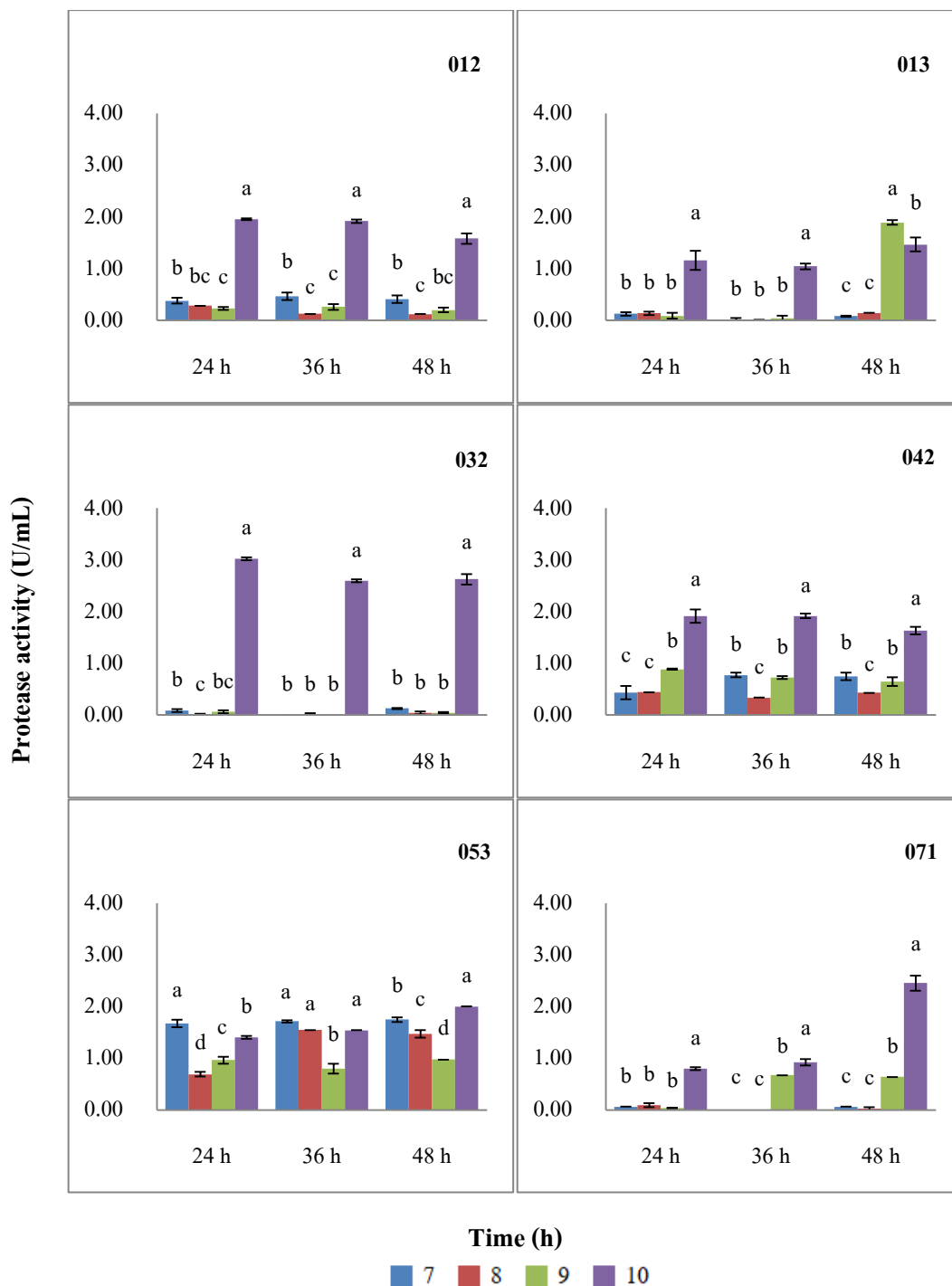
ภาพที่ 4-15 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท ในสูตรอาหาร BPMM ที่มีเด็กซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน มีกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน และมีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ (bar = SD)



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



ภาพที่ 4-17 ปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทสูตรอาหาร BPMM ที่มีเด็กซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน มีกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน และมีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ (bar = SD)



ภาพที่ 4-18 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหก ไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM ที่มีเด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน มีกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน และมีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน 4 ระดับ ตัวอักษร ยกกำลังที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

3.5 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้สูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน มีกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน บ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิต่างกันคือ 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4-19 – 4-22 และตารางที่ 4-10

เมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่างกัน 3 ระดับ แสดงในภาพที่ 4-19 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

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหาร ภายใต้สภาวะที่ใช้อุณหภูมิตำหรับการเพาะเลี้ยงแตกต่างกัน 3 ระดับ ดังแสดงในภาพที่ 4-20 พบว่า การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารทั้งหมดมีความใกล้เคียงกัน แม้ว่าจะทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทภายใต้อุณหภูมิต่างกันก็ตาม โดยค่าพีเอชของอาหารที่แต่ละอุณหภูมิของแบคทีเรียไอโซเลท 012, 013, 032, 042 และ 071 จะลดลงจาก 10 ที่เวลา 0 ชั่วโมง จนเหลือค่าประมาณ 7 ที่เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นค่าพีเอชจะคงที่หรือมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยจนกระทั่งสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง ส่วนแบคทีเรียไอโซเลท 053 พบว่าการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับเชื้อชนิดอื่นนั่นคือ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารในแต่ละอุณหภูมิไม่มีความแตกต่างกัน แต่ค่าพีเอชของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย 053 ลดลงจากตอนเริ่มต้นไม่มากนัก โดยค่าพีเอชจะลดลงเหลือประมาณ 9 ที่เวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นจะค่อนข้างคงที่ตลอดทั้งกระบวนการ

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลในอาหาร ดังแสดงในภาพที่ 4-21 พบว่าการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงของเชื้อแบคทีเรีย 012, 013, 032, 042 และ 071 เป็นไปในทิศทางเดียวกันคือ ปริมาณน้ำตาลมีการลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 0 ถึง 24 ชั่วโมง จากนั้นจะค่อนข้างคงที่หรือมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย โดยสามารถวัดปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงในทุกสภาวะของเชื้อแบคทีเรียทั้งห้าไอโซเลทได้ประมาณ 3-6 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง และพบว่าปริมาณน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ของเชื้อแบคทีเรียทั้งห้าไอโซเลท มีปริมาณคงเหลือน้อยกว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำกว่า ส่วนเชื้อ

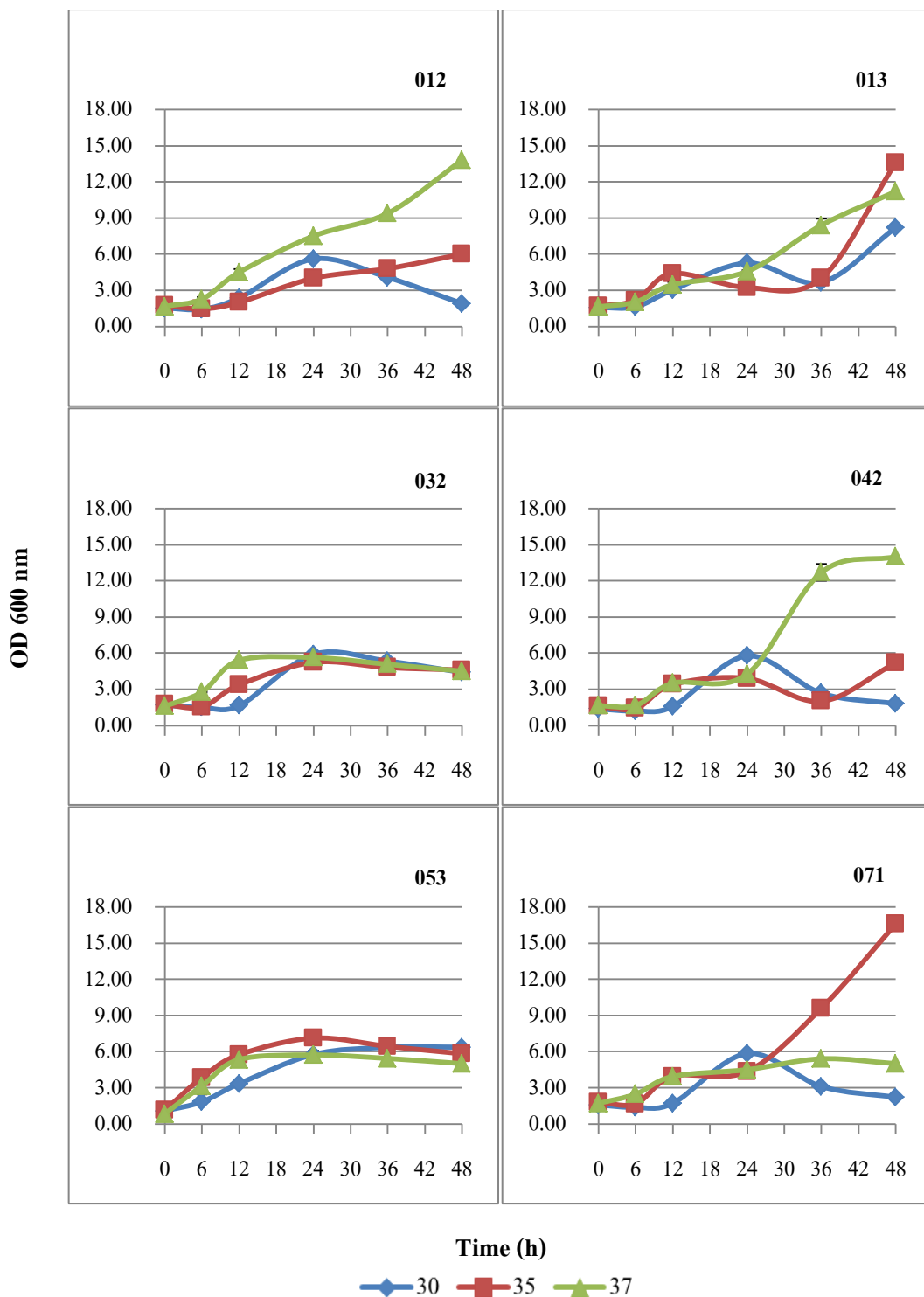
แบคทีเรียไอโซเลท 053 ปริมาณน้ำตาลในอาหารเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส มีการลดลงอย่างช้า ๆ จนกระทั่งเสร็จสิ้นกระบวนการ ซึ่งสามารถวัดปริมาณน้ำตาลคงเหลือได้ ประมาณ 6 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง ในอาหารเพาะเลี้ยงทั้งสอง ส่วนอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีการลดลงของปริมาณน้ำตาลน้อยมากหรือแทบไม่ลดลงจากตอนเริ่ม การเพาะเลี้ยง โดยสามารถวัดปริมาณหลังสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงได้ประมาณ 9.5 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ในอาหารเพาะเลี้ยง ดัง แสดงในภาพที่ 4-22 และตารางที่ 10 พบว่าเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่มีกิจกรรมและอัตราการสร้าง เอนไซม์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยให้ผลดีที่สุดแตกต่างจากสภาวะอื่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 012, 013 และ 032 ซึ่งสามารถวัดค่ากิจกรรม ของเอนไซม์ได้เท่ากับ 1.81, 1.25 และ 3.02 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดได้ เท่ากับ 0.075, 0.029 และ 0.126 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ผลดีที่สุดในการเชื้อไอโซเลท 071 โดยวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์และ อัตราการสร้างเอนไซม์ได้เท่ากับ 1.64 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.068 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 042 ที่อุณหภูมิต่างกันทั้ง 3 ระดับนั้น ไม่ส่งผลให้เกิดการผลิตเอนไซม์ที่แตกต่างกัน เห็นได้จากกิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้าง เอนไซม์ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่มียุติกิจกรรมและอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุด มีค่า ใกล้เคียงกันในทั้ง 3 สภาวะ ดังตารางที่ 4-10 ส่วนเชื้อแบคทีเรีย 053 นั้น สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดี เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส และเชื้อจะสร้างเอนไซม์ได้น้อยลงเมื่อ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองดังกล่าว จะเห็นว่าอุณหภูมิที่ส่งผลให้เชื้อมี การสร้างเอนไซม์ได้ดีที่สุด คือ 37 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงเลือกใช้เป็นอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเพื่อ ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรียในการทดลองขั้นต่อไป

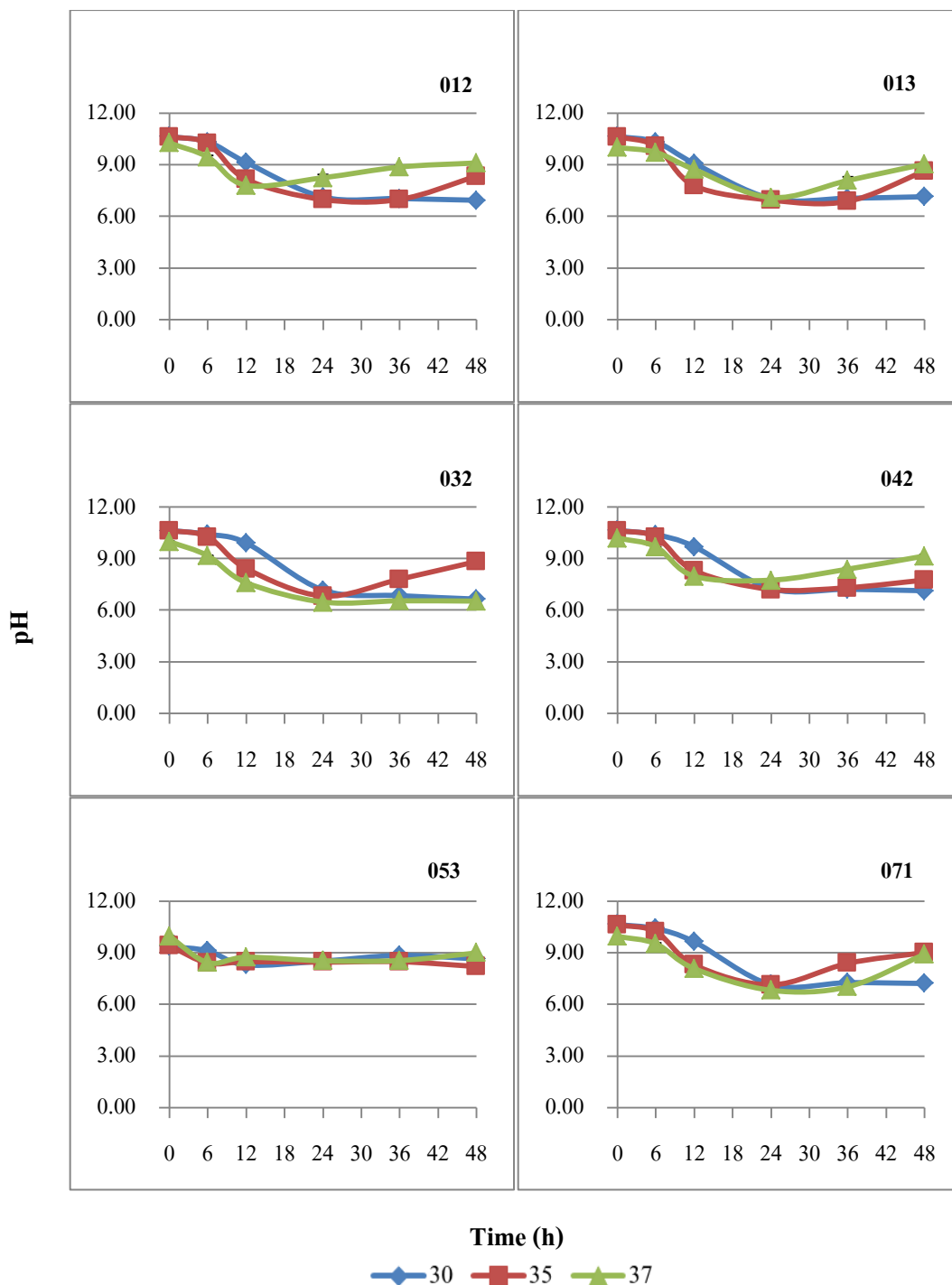
ตารางที่ 4-10 กิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้
 ทั้งหมดไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในอุณหภูมิที่แตกต่างกันทั้ง 3 ระดับ

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

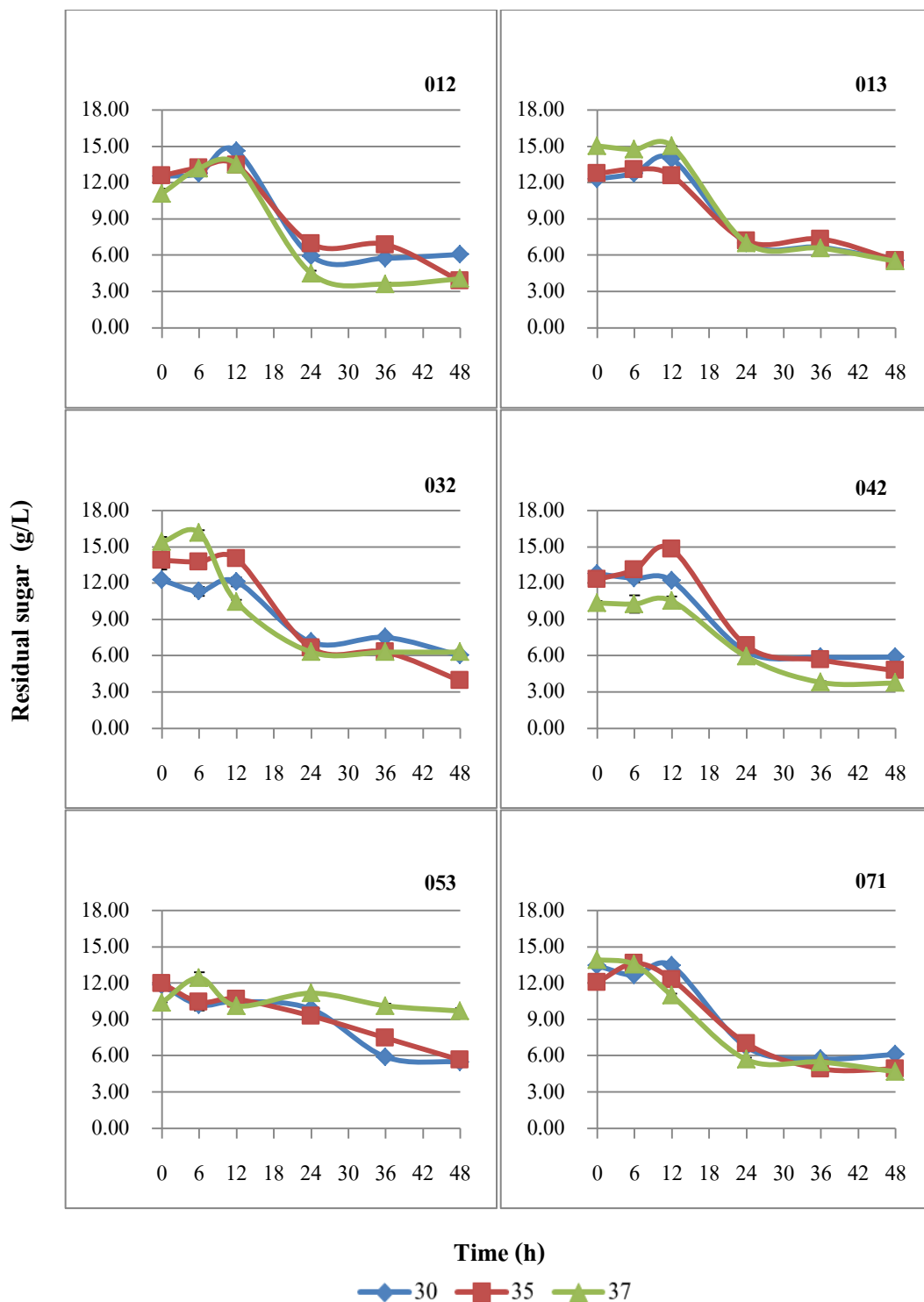
หมายเหตุ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ในอุณหภูมิต่าง ๆ
 ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)



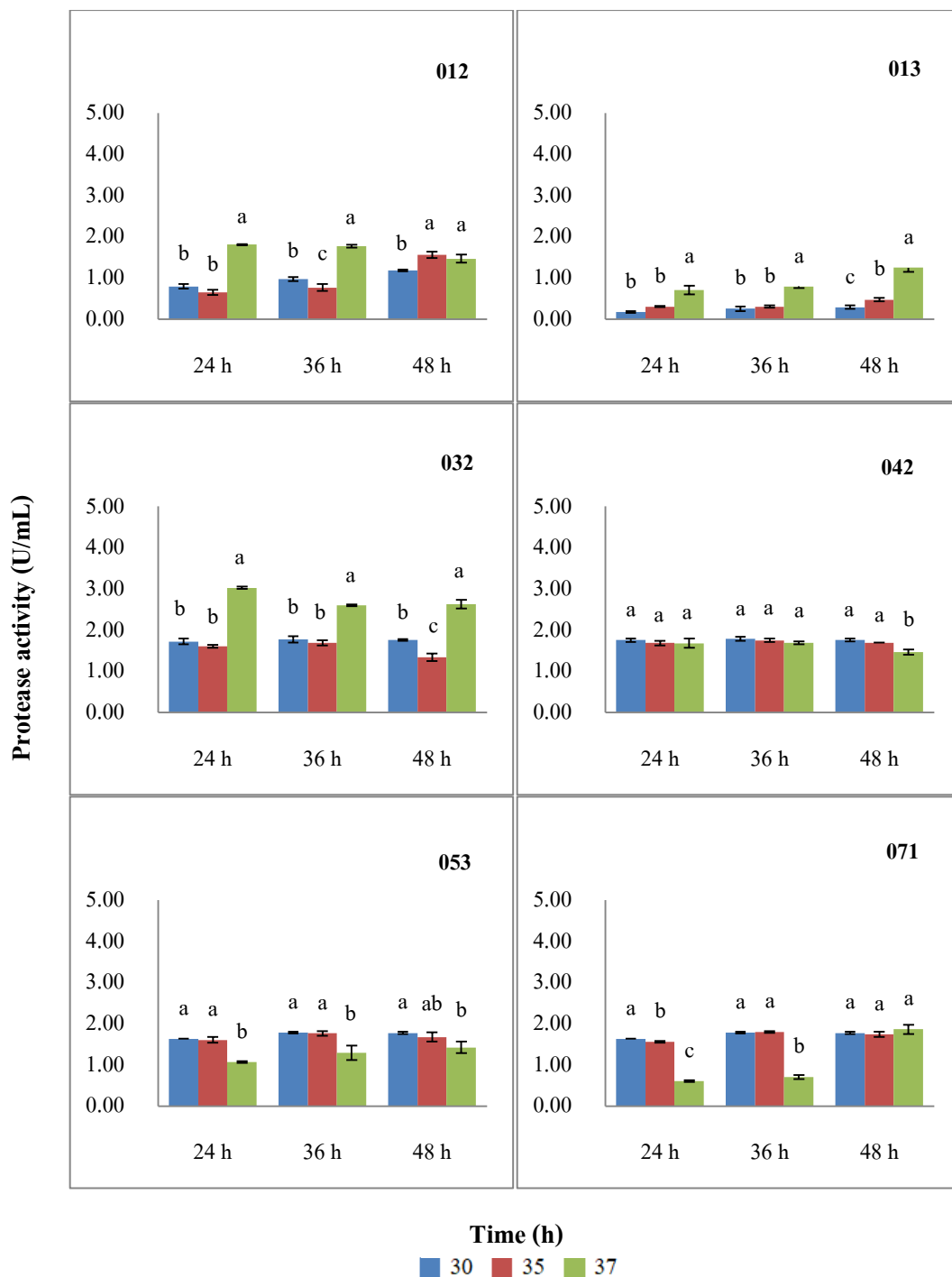
ภาพที่ 4-19 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท ในสูตรอาหาร BPMM โดยใช้เด็กซ์ทรีน เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหาร เท่ากับ 10 และเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ (bar = SD)



ภาพที่ 4-20 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM โดยใช้เด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 10 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 ระดับ (bar = SD)



ภาพที่ 4-21 ปริมาณน้ำตาลคงเหลือในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM โดยใช้เด็กซ์ทรีนเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 10 ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 ระดับ



ภาพที่ 4-22 กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในอาหาร เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้งหก ไอโซเลทในสูตรอาหาร BPMM พีเอช 10 โดยใช้เด็กซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ภายใต้อุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 ระดับ ตัวอักษรยกกำลังที่ต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4. ผลการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูง โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนด้วยวิธี 16S rDNA sequencing

จากผลการทดลองในข้อ 3.1 – 3.5 ที่ต้องการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อผลิตเอนไซม์ และคัดเลือกชนิดของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์สูงสุดจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมด พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์สูงสุดแตกต่างจากเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น $p > 0.05$ คือแบคทีเรียไอโซเลท 032 โดยสามารถวัดกิจกรรมและอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดได้เท่ากับ 3.02 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.126 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-11 จึงนำเชื้อแบคทีเรีย 032 ไปจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนด้วยวิธี 16S rDNA sequencing analysis พบว่ามีความคล้ายคลึงกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cohnii* ที่ระดับ 98.27 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) โดยมีลักษณะโคโลนีเมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดังภาพที่ 4-23 และลักษณะของเซลล์แบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า ดังภาพที่ 4-24

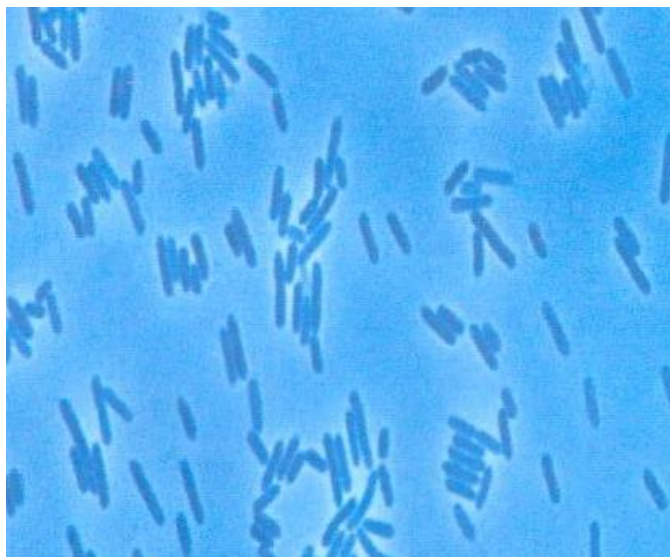
ตารางที่ 4-11 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดไอโซเลท ในสภาวะที่มีค่าพีเอชของอาหารเท่ากับ 10 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

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

$p > 0.05$



ภาพที่ 4-23 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย 032 (*B. cohnii*) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar ที่ 37 องศาเซลเซียส อายุ 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 4-24 ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรีย 032 (*B. cohnii*) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar ที่ 37 องศาเซลเซียส อายุ 24 ชั่วโมง (กำลังขยาย 1000 เท่า)

5. ผลการศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตอัลคาไลน์โปรตีนเอส

จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cohnii* ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

5.1 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus cohnii* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินภายในประเทศ สำหรับนำไปใช้ในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนเอส ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมซึ่งได้จากผลการทดลองในข้อ 3 ที่มีการแปรผันปัจจัยในการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ กัน ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 4-25 – 4-27 และตารางที่ 12

เมื่อพิจารณาการทดลองเพาะเลี้ยง *B. cohnii* แบบกะในการสภาวะการทดลองที่ 1 (ภาพที่ 4-25) ซึ่งเป็นการขยายขนาดการเพาะเลี้ยงจากระดับฟลาสก์ เป็นการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้อาหาร BPMM ที่มีเด็กซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนและกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 2 เท่า เพื่อศึกษาการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียเมื่อมีปริมาณของสารอาหารในอาหารเพาะเลี้ยงเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยดังกล่าว ไม่สามารถทดลองได้ในการเพาะเลี้ยงระดับฟลาสก์ เนื่องจากการเจริญของเชื้อในอาหารความเข้มข้นสูงจะถูกจำกัดโดยปริมาณของอากาศที่มีอยู่เพียงในฟลาสก์เท่านั้น ทำให้ผลได้ไม่เป็นไปตามลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอย่างแท้จริง จึงจำเป็นต้องทำการศึกษาปัจจัยนี้ภายในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีการควบคุมการให้อากาศและการกวนอย่างเหมาะสม เพื่อหลีกเลี่ยงข้อจำกัดดังกล่าว นอกจากนี้ในการทดลองมีการเติมสับสเตรทที่เป็นหางนมผง เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และควบคุมพีเอชในระหว่างการเพาะเลี้ยงให้เท่ากับ 10 ตลอดกระบวนการ โดยใช้สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่ออนาที และความเร็วใบกวนเท่ากับ 500 รอบต่ออนาที พบว่า ภายใต้สภาวะดังกล่าว แบคทีเรีย *B. cohnii* มีการเจริญที่ต่ำมาก เห็นได้จากอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ที่มีค่าเพียง 0.167 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 ดังนั้น อัตราจำเพาะของการสร้างเอนไซม์ (q_p) เท่ากับ 0.011

ยูนิตต่อชั่วโมงต่อกรัมเซลล์ ผลได้ของเอนไซม์ต่อน้ำตาลที่ใช้ (Y_p/s) เท่ากับ 0.023 ยูนิตต่อกรัม กลูโคส และผลได้เอนไซม์จำเพาะ (Y_p/x) เท่ากับ 0.067 ยูนิตต่อกรัมเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่า การควบคุมเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *B. cohnii* ภายใต้สภาวะการทดลองนี้ทำได้ยาก เนื่องจากปริมาณของ โปรตีนในอาหารที่มาก และการควบคุมค่าพีเอชค่าพีเอชภายในถังหมักให้อยู่ในระดับที่สูง ตลอดเวลา ทำให้มีฟองเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากภายในถังหมัก ปริมาณของสารลดการเกิดฟอง (antifoam) ที่ใช้จึงมากตามไปด้วย ส่งผลให้การเจริญและการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียลดลง ดังนั้นในการทดลองถัดไปจึงเพาะเลี้ยง *B. cohnii* โดยกำหนดค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 10 ไม่มีการเติมสับสเตรท และไม่มีการควบคุมค่าพีเอชของอาหารในระหว่างการเพาะเลี้ยง

เมื่อพิจารณาผลการทดลองเพาะเลี้ยง *B. cohnii* แบบกะในการสภาวะการทดลองที่ 2 (ภาพที่ 4-26) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้อาหาร BPMM พีเอช 10 ความเข้มข้น 2 เท่า ไม่มีการเติมหางนมผงเพื่อใช้เป็นสับสเตรท และไม่มีการควบคุมค่าพีเอชในระหว่างการเพาะเลี้ยง ภายใต้ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที และ ความเร็วใบกวนเท่ากับ 500 รอบต่อนาที พบว่า ภายใต้สภาวะดังกล่าว แบคทีเรีย *B. cohnii* มีการเจริญที่ดีขึ้นจากการทดลองที่ 1 เห็นได้จากค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ที่เพิ่มขึ้นจาก 0.167 เป็น 0.437 h^{-1} แต่ค่าผลได้ของเซลล์ต่อกลูโคสที่ใช้กลับลดลงจาก 0.341 เป็น 0.231 กรัมเซลล์ต่อกรัม กลูโคส เป็นผลมาจากการที่แบคทีเรียนำกลูโคสไปใช้ในการสร้างเอนไซม์มากกว่าการสร้างเซลล์ เห็นได้จากค่ากิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการผลิตเอนไซม์สูงสุดที่เพิ่มขึ้นจากการทดลองที่ 1 ถึง 80 และ 110 เท่า ลำดับ ทำให้ค่าพารามิเตอร์ต่างในการสร้างเอนไซม์มีค่าสูงขึ้นด้วย โดยวัดค่าได้ ดังนี้ อัตราจำเพาะของการสร้างเอนไซม์ (q_p) เท่ากับ 1.113 ยูนิตต่อชั่วโมงต่อกรัมกลูโคส ผลได้ของ เอนไซม์ต่อกลูโคสที่ใช้ (Y_p/s) เท่ากับ 0.588 ยูนิตต่อกรัมกลูโคส และผลได้เอนไซม์จำเพาะ (Y_p/x) เท่ากับ 2.546 ยูนิตต่อกรัมเซลล์ (ตารางที่ 12) จากผลการทดลองข้างต้น ในการทดลองถัดไปจะทำการเพาะเลี้ยง *B. cohnii* ในอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเติมสับสเตรทใด ๆ และไม่มีการควบคุมค่า พีเอชในระหว่างการเพาะเลี้ยง เนื่องจากเป็นวิธีการที่ให้ประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์สูงกว่า และการควบคุมการเพาะเลี้ยงทำได้ง่ายกว่ามาก

เมื่อพิจารณาผลการทดลองเพาะเลี้ยง *B. cohnii* แบบกะในการสภาวะการทดลองที่ 3 (ภาพที่ 4-27) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อเปรียบเทียบอิทธิพลของความเข้มข้นของอาหารเพาะเลี้ยง ที่มีต่อการสร้างเอนไซม์ โดยใช้อาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีความความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 4 เท่า ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 พบว่า ลักษณะการเจริญของ *B. cohnii* ที่ สภาวะนี้มีรูปแบบเช่นเดียวกับการทดลองที่ 2 กล่าวคือ แบคทีเรียมีการเจริญในระยะ log phase ที่ 0-12 ชั่วโมง โดยไม่มีระยะ lag phase แล้วเข้าสู่ระยะ stationary phase ที่เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง

และการเพิ่มความเข้มข้นของอาหารเพาะเลี้ยงเป็น 4 เท่า ทำให้แบคทีเรีย *B. cohnii* มีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และค่าผลได้ของเซลล์ต่อกลูโคสที่ใช้ ($Y_{x/s}$) เพิ่มขึ้นจากการใช้ความเข้มข้นของอาหารเพาะเลี้ยง 2 เท่า เล็กน้อย โดยมีค่าเท่ากับ 0.496 h^{-1} และ 0.397 กรัมเซลล์ต่อกรัมกลูโคส และเมื่อพิจารณาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของ *B. cohnii* เมื่อเพาะเลี้ยงที่สภาวะนี้พบว่า อัตราจำเพาะของการสร้างเอนไซม์ (q_p) มีค่าสูงขึ้นจากเดิมเล็กน้อย วัดค่าได้เท่ากับ 1.175 ยูนิตต่อชั่วโมงต่อกรัมเซลล์ แต่ค่าผลได้ของเอนไซม์ต่อกลูโคสที่ใช้ ($Y_{p/s}$) มีค่าเพิ่มขึ้นค่อนข้างสูง จากเดิม 0.588 เป็น 0.940 ยูนิตต่อกรัมกลูโคส ส่วนค่าผลได้เอนไซม์จำเพาะ ($Y_{p/x}$) กลับมีค่าลดลงเล็กน้อย โดยมีค่าเท่ากับ 2.370 ยูนิตต่อกรัมเซลล์ และที่เวลา 24 ชั่วโมงสามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดได้เท่ากับ 5.94 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.247 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการทดลองที่ 2 ที่ใช้ความเข้มข้นของอาหาร 2 เท่า จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น สรุปได้ว่าการใช้ความเข้มข้นของอาหารเพิ่มขึ้นเป็น 4 เท่า ไม่มีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรีย *B. cohnii* เท่าใดนัก เห็นได้จากค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ของการเจริญและการสร้างเอนไซม์ ที่มีค่าใกล้เคียงกับการใช้ความเข้มข้นของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 2 เท่า และเนื่องจากการทดลองมุ่งเน้นไปที่การผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส และให้ความสำคัญกับค่า q_p ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงอัตราการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับมวลเซลล์และเวลา จึงใช้ค่าดังกล่าวในการพิจารณาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการนำไปศึกษาเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเดิมๆ ดังนั้นจึงเลือกสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2 ที่เป็นสภาวะที่มีค่า q_p สูง และต้นทุนราคาในการผลิตต่ำกว่าสภาวะอื่น ไปใช้เป็นสภาวะในการเพาะเลี้ยงแบบเดิมๆ สำหรับขั้นตอนต่อไป

5.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเดิมๆ

เมื่อพิจารณาผลการทดลองเพาะเลี้ยง *B. cohnii* แบบเดิมๆ (ภาพที่ 4-28 และตารางที่ 12) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงแบบ 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 (μ) ของ *B. cohnii* เท่ากับ 0.124 h^{-1} และอัตราการจำเพาะของการสร้างเอนไซม์

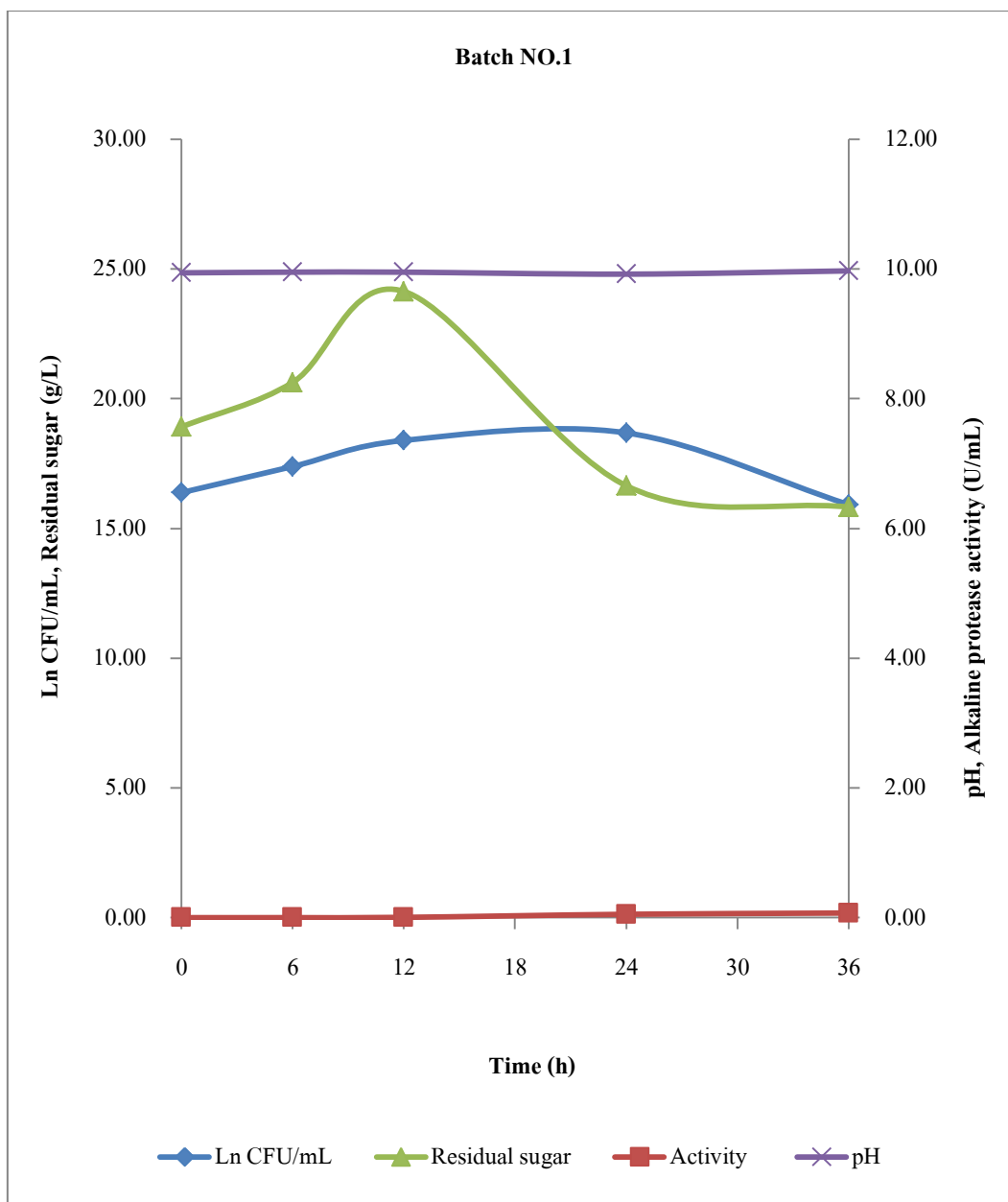
(q_p) เท่ากับ 1.785 ยูนิตต่อชั่วโมงต่อกรัมกลูโคส ถ้าพิจารณาจากภาพที่ 4-28 จะเห็นว่าภายหลังจากการเติมอาหารกราฟการเจริญของเชื้อ (\ln CFU/mL) จะมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เนื่องจากยังคงหลงเหลือปริมาณน้ำตาลในอาหาร ทำให้เชื้อสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตเพื่อเพิ่มมวลเซลล์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการสร้างเอนไซม์ของเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากที่มีการเติมอาหารลงในถังหมัก จนกระทั่งที่เวลาในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 24 ชั่วโมง อัตราการสร้างเอนไซม์จึงลดลง ซึ่งการเพาะเลี้ยง *B. cohnii* ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเช่นนี้ ทำให้อัตราจำเพาะของการสร้างเอนไซม์และกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเพิ่มสูงขึ้นจากการเพาะเลี้ยงแบบกะ ที่ความเข้มข้นของอาหารเท่ากับ 1.6 เท่า และสามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดได้เท่ากับ 9.51 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.396 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

ตารางที่ 4-12 พารามิเตอร์การเจริญของ *B. cohnii* จากการเพาะเลี้ยงแบบกะ ในสภาวะต่าง ๆ กัน

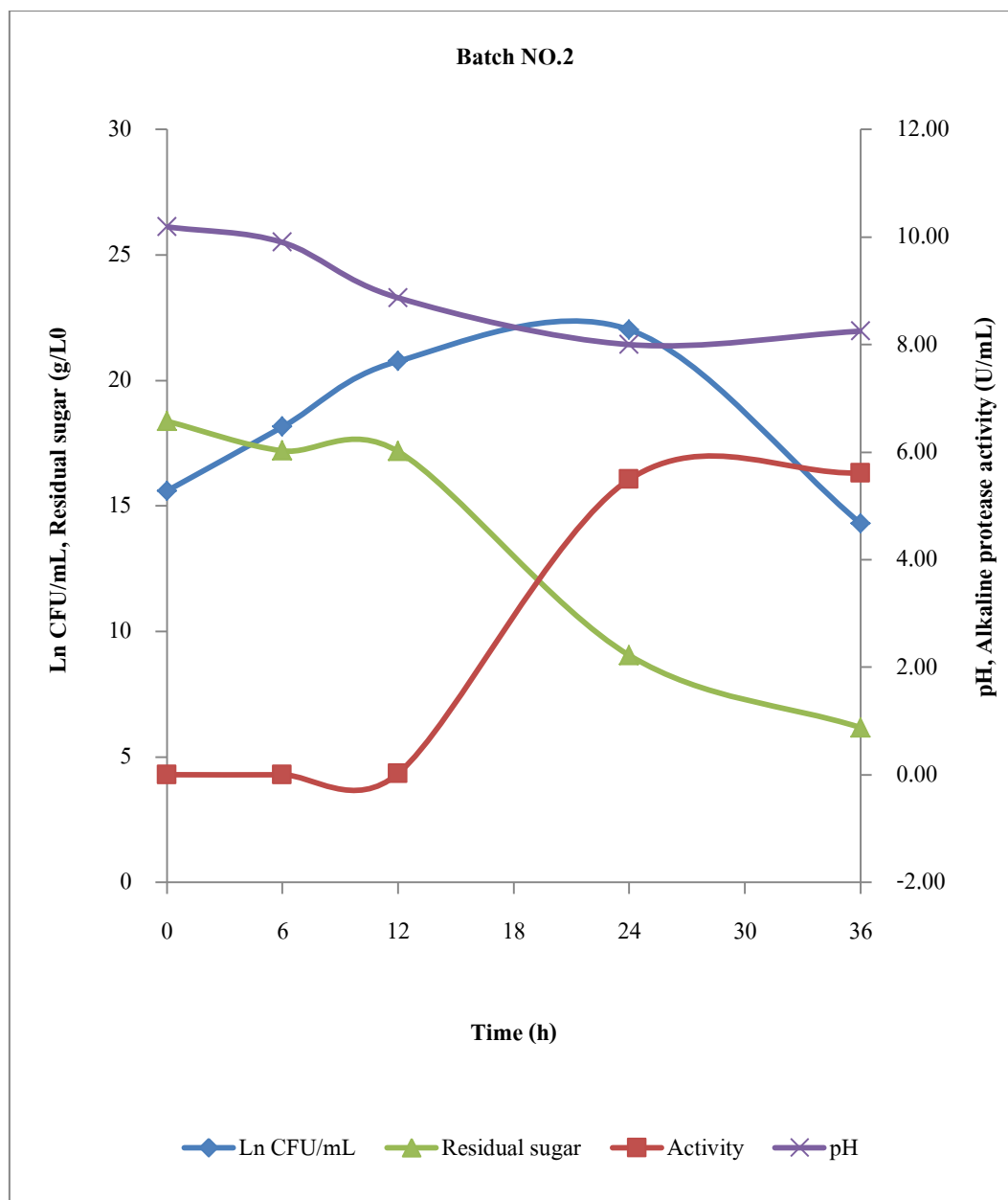
NO.	Operation technique	Medium concentration	Substrate adding	pH control	μ (h^{-1})	q_p (unit/h/g cell)	$Y_{x/s}$ (g cell/g glucose)	$Y_{p/s}$ (unit/g glucose)	$Y_{p/x}$ (unit/g cell)	Max. APA (unit/mL)	Max. Productivity (unit/mL/h)
1	Batch	2x	1% skim milk	Yes	0.167	0.011	0.341	0.023	0.067	0.07	0.002
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

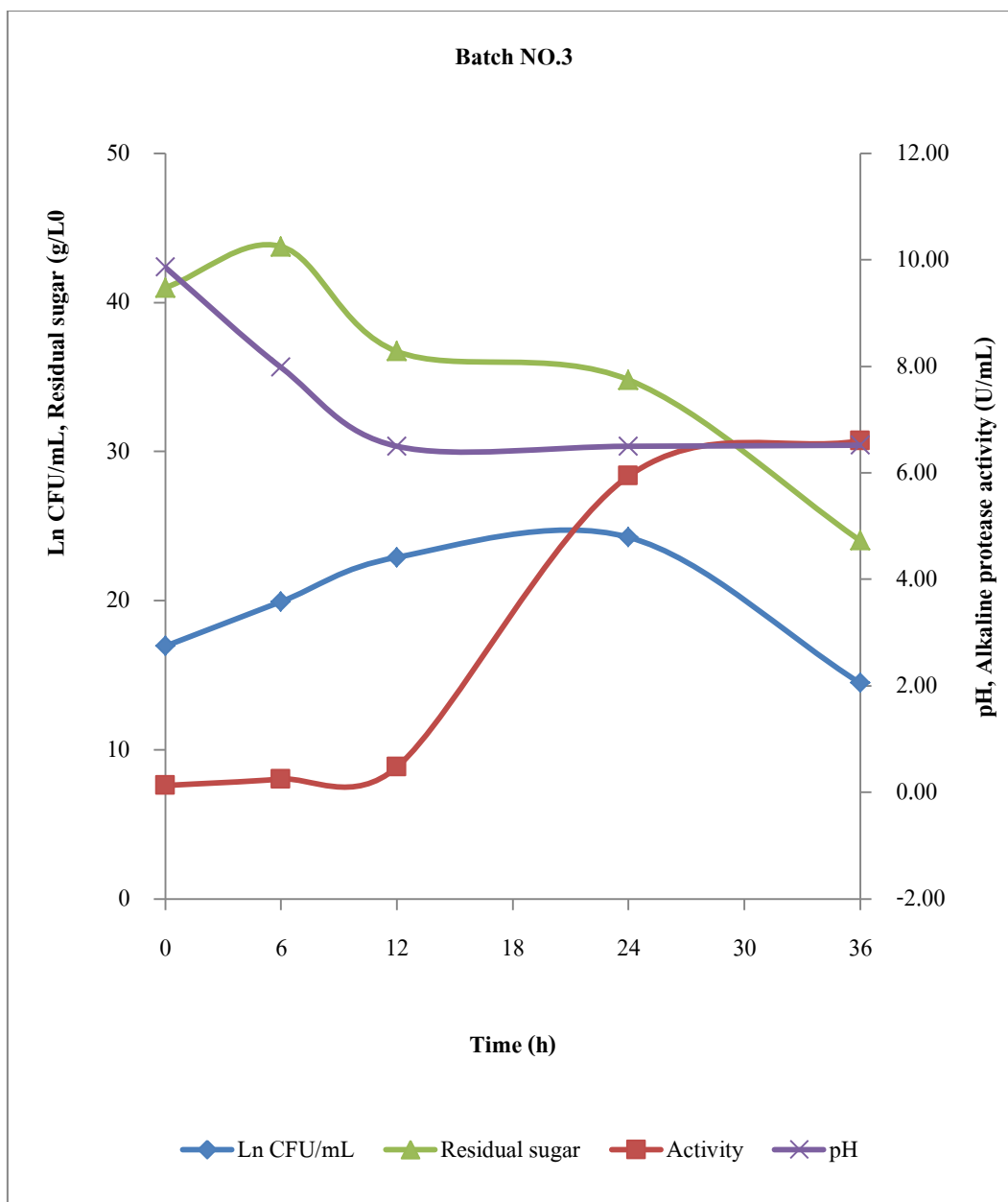
- μ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)
- q_p คือ อัตราจำเพาะของการเกิดผลิตภัณฑ์ (ยูนิตต่อชั่วโมงต่อกรัมกลูโคส)
- $Y_{x/s}$ คือ ผลได้ของเซลล์ต่อน้ำตาลที่ใช้ (กรัมเซลล์ต่อกรัมกลูโคส)
- $Y_{p/s}$ คือ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อน้ำตาลที่ใช้ (ยูนิตต่อกรัมกลูโคส)
- $Y_{p/x}$ คือ ผลได้ผลิตภัณฑ์จำเพาะ (ยูนิตต่อกรัมเซลล์)



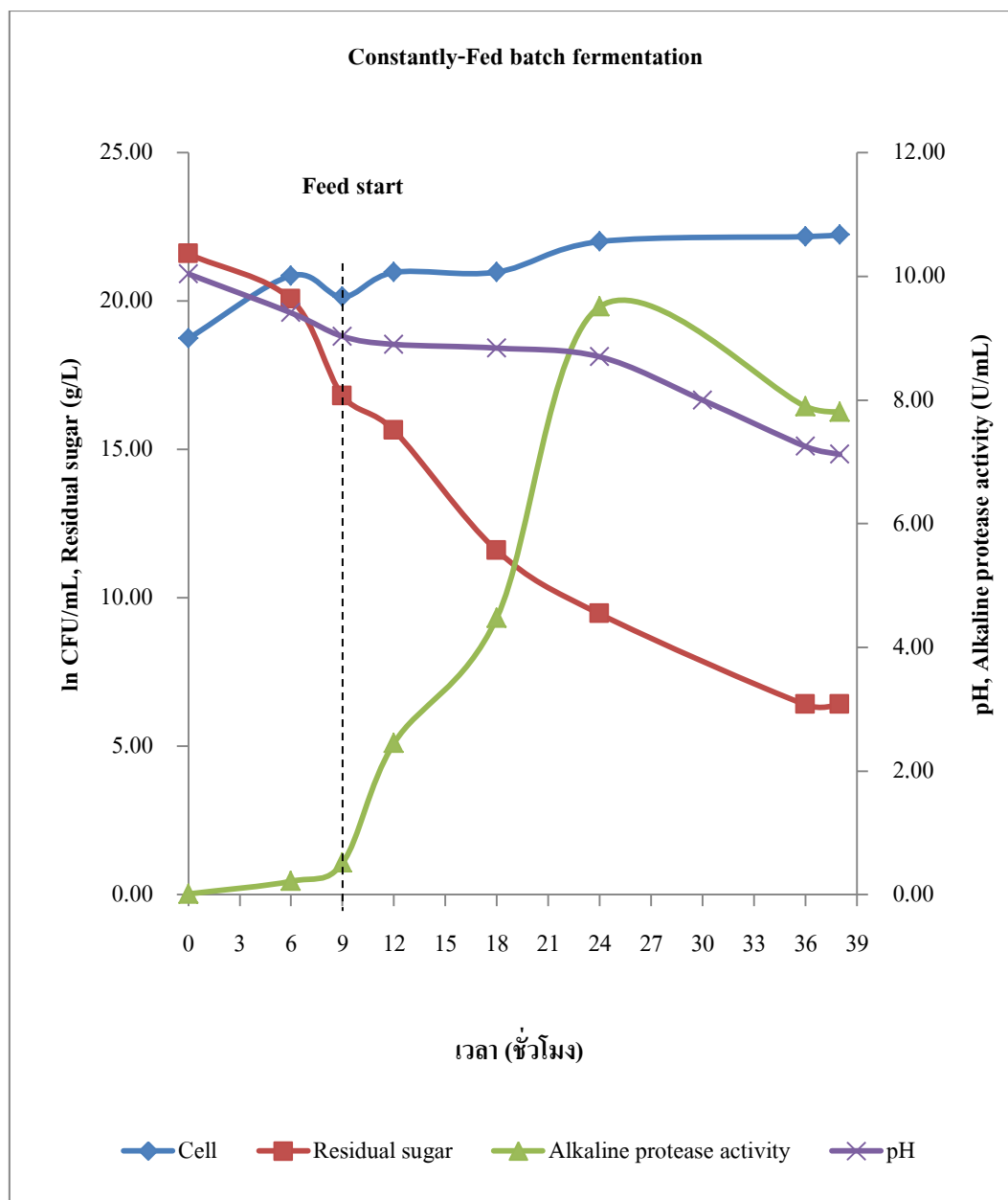
ภาพที่ 4-25 รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของ *B. cohnii* เมื่อเพาะเลี้ยงแบบกะ โดยใช้อาหาร BPMM เข้มข้น 2 เท่า ใช้หางนมผงเข้มข้น 1% (W/V) เป็นสับสเตรท ควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 10 ตลอดกระบวนการ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 VVM และความเร็วใบกวน 500 rpm (Batch No.1)



ภาพที่ 4-26 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 4-27 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 4-28 รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของ *B. cohnii* 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

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผล

อภิปรายผล

การคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากตัวอย่างดินภายในประเทศ สามารถทำได้โดยทำการคัดแยกเชื้อจากบริเวณที่คาดว่าจะพบกลุ่มของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ดังกล่าว เช่น ดินจากบริเวณ โรงงานนมและผลิตภัณฑ์นม โรงฆ่าสัตว์ และ โรงงานฟอกหนัง เป็นต้น ซึ่งดินจากสถานที่เหล่านี้มักจะมีแหล่งของโปรตีนที่เป็นสับสเตรทของเอนไซม์ และมีสภาพเป็นด่างอันเกิดจากกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์หรือเกิดในขั้นตอนชำระล้างด้วยสารเคมีที่เป็นด่างหลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการผลิต จึงทำให้มีสภาพเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส จากนั้นนำตัวอย่างดินมาทำการคัดสรรเฉพาะ (Selection method) ด้วยสารอาหารที่มีความจำเพาะต่อการเจริญ เพื่อให้สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ต้องการได้ง่ายขึ้น (ปราณี พัฒนพิพิช ไพศาล, 2556) มีงานวิจัยจำนวนมากที่นำหลักการนี้ไปใช้ในการคัดแยกหาแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ที่ต้องการ เช่น งานวิจัยของ จุฑาทพร แสงแก้ว (2543) ที่ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. จากตัวอย่างน้ำทิ้งภายในตลาดสดของประเทศไทย ที่มีความสามารถในการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงสุดเท่ากับ 334.74 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BMSM พีเอช 11.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ต่อมาในปี 2548 สุทธิดา แสงยนต์ ได้คัดแยกเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ A39 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียในจีส *Bacillus* จากตัวอย่างดินสวนลำไยในจังหวัดจันทบุรี ที่สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงสุดเท่ากับ 233.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหาร BMSM พีเอช 10 นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Ashok and Prabhakar (2012) ที่ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. Agt ที่สามารถสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสได้จากของเสียเหลือทิ้งจาก โรงงานฟอกหนัง เช่นเดียวกับ Shukla and Verma (2014) ที่ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสได้จากตัวอย่างดินที่เก็บจากบริเวณต่าง ๆ ในเมืองอัลลฮาบาด (Allahabad) ของประเทศอินเดีย

จากผลการทดลอง สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจากตัวอย่างดินภายในประเทศได้ทั้งหมด 157 ไอโซเลท โดยพิจารณาจากการสร้างวงใสรอบโคโลนี

เดี่ยว ๆ บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง BMSM ที่มีหางนมความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 10 และเมื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตด้วยการหาผลต่างของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส กับขนาดของโคโลนี (CZ-CO) พร้อมทั้งจัดกลุ่มตามระดับความสามารถในการสร้างเอนไซม์ เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์สูงภายใต้สภาวะที่เป็นต่าง พบว่าเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มที่ 2 ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดจากทั้ง 4 กลุ่ม (CZ-CO มากกว่า 1.5 ซม ทั้งสิ้นมีจำนวน .28 ไอโซเลท โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่ในกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากโรงงานนมและผลิตภัณฑ์นม จำนวนทั้งหมด 22 ไอโซเลท การที่พบแบคทีเรียจากตัวอย่างดินบริเวณนี้เป็นจำนวนมาก อาจเป็นผลเนื่องมาจากเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียมักจะมีความจำเพาะต่อสับสเตรทค่อนข้างกว้าง แต่จะมีกิจกรรมการทำงานสูงขึ้นเมื่อใช้เคซีน (Casein) ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบมากถึงร้อยละ 80 ของโปรตีนทั้งหมดในน้ำนม เป็นแหล่งของสับสเตรทในอาหารเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมการทำงานสูงขึ้นมากกว่าการใช้โปรตีนจากแหล่งอื่น ๆ เช่น ฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) หรือ โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) เป็นต้น (Gupta et al., 2002; Kumar & Takagi, 1999) จึงทำให้พบแบคทีเรียที่ต้องการในตัวอย่างดินจากโรงงานนมและผลิตภัณฑ์นมที่มีน้ำนมหลงเหลืออยู่ในของเสียเหลือทิ้งมากกว่าสถานที่อื่น ๆ

เมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากการคัดเลือกเบื้องต้นบนอาหารแข็งทั้ง 28 ไอโซเลท มาทำการคัดเลือกต่อในอาหารเหลว BMSM ที่มีหางนมความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 10 พบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง มีเชื้อแบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลท ที่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์สูงโดดเด่นกว่าไอโซเลทอื่น ได้แก่ ไอโซเลท 032, 013, 012, 071, 053 และ 042 โดยสามารถวัดกิจกรรมของเอนไซม์ได้เท่ากับ 0.667, 0.635, 0.611, 0.555, 0.551 และ 0.549 หนึ่งต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลทเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินจากโรงงานนมและผลิตภัณฑ์นมทั้งหมด

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในระดับฟลาस्क

สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

จากการศึกษาอิทธิพลของสูตรอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส โดยใช้สูตรอาหารที่แตกต่างกัน 3 สูตร พบว่า เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จำนวน 5 ไอโซเลท จากทั้งหมดหกไอโซเลท มีกิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์

สูงที่สุด เมื่อใช้อาหารสูตร BPMM เป็นอาหารเพาะเลี้ยง ส่วนแบคทีเรียที่เหลืออีกหนึ่งไอโซเลทนั้น มีกิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดในอาหารเพาะเลี้ยงสูตร PPMM

การใช้อาหารสูตร BPMM และ PPMM ส่งผลให้แบคทีเรียมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงนั้น เป็นผลมาจากการที่อาหารทั้งสองชนิดมีแร่ธาตุและไอออนของโลหะชนิดต่าง ๆ เป็นองค์ประกอบ ต่างกับอาหารสูตร BMSM ที่มีเพียงแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และสารเคมีที่ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ช่วยควบคุมค่าพีเอชของอาหารเท่านั้นเป็นองค์ประกอบ โดยทั่วไปแล้วการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อจุลินทรีย์ มักจะมีการเติมไอออนของโลหะที่มีวาเลนซ์อิเล็กตรอน 2 อิเล็กตรอน (Divalent metal ions) เช่น ไอออนของแคลเซียม โคบอลต์ คอปเปอร์ โบรอน เหล็ก แมกนีเซียม แมงกานีส และ โมลิบดีนัม เป็นต้น ลงในอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งจะไปมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มเสถียรภาพของเอนไซม์ (Enzyme stabilization) และช่วยป้องกันเอนไซม์ไม่ให้เสียสภาพเมื่อผ่านความร้อน โดยการรักษาโครงสร้างของเอนไซม์ (Enzyme conformation) ภายใต้อุณหภูมิสูง แต่การใช้ไอออนของโลหะเหล่านี้ในอาหารเพาะเลี้ยงจำเป็นต้องใช้ในปริมาณที่เหมาะสม หากใช้ในปริมาณมากเกินไปจะส่งผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แทน (Jisha et al., 2013; Bhunia et al., 2012; Kumar & Takagi, 1999)

องค์ประกอบของสูตรอาหารทั้ง BPMM และ PPMM มีการเสริมแร่ธาตุและไอออนของโลหะชนิดต่าง ๆ ดังที่กล่าวข้างต้น แต่ปัจจัยที่ทำให้แบคทีเรียมีกิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ในอาหารสูตร BPMM สูงกว่าอาหาร PPMM เป็นผลมาจากระดับความเข้มข้นและชนิดของแร่ธาตุและไอออนของโลหะในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน โดยที่อาหารสูตร BPMM มีจำนวนชนิดของแร่ธาตุและไอออนของโลหะที่หลากหลายกว่าและมีความเข้มข้นต่ำกว่าอาหารชนิด PPMM ถึง 1000 เท่า ซึ่งความเข้มข้นของแร่ธาตุและไอออนของโลหะที่ค่อนข้างสูงในอาหาร PPMM อาจมีผลยับยั้งการสร้างเอนไซม์แทน ดังนั้นระดับความเข้มข้นของแร่ธาตุและไอออนของโลหะในอาหาร BPMM ที่ต่ำกว่า จึงอาจเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมและช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังเช่นงานวิจัยของ Ibrahim and Salamah (2009) ที่ทำการศึกษาผลของสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงที่มีต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรียชนิด *Bacillus haloduras* แล้วพบว่าไอออนของแมกนีเซียม แมงกานีส และแคลเซียม ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ โดยมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 893.75, 905.70 และ 918.54 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ ส่วนไอออนของซิงค์ คอปเปอร์ และโคบอลต์ กลับมีผลยับยั้งการผลิตเอนไซม์เมื่อใส่ลงในอาหารเพาะเลี้ยง และหากใช้ไอออนของแคลเซียม แมกนีเซียม และแมงกานีสร่วมกันในอาหารเพาะเลี้ยงที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายผสมเท่ากับ 5 มิลลิโมลาร์ จะทำให้วัดกิจกรรมจำเพาะ

ของเอนไซม์ได้เท่ากับ 1,381 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัม โปรตีน ซึ่งมีค่าสูงกว่าการใช้ไอออนของโลหะชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียว

แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

แหล่งของคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยง เป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรีย เนื่องจากคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลักของเซลล์คิดเป็นร้อยละ 50 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง รวมถึงเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ถึงร้อยละ 53.8 จึงทำให้ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในอาหารเพาะเลี้ยง มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรียเป็นอย่างมาก ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตเอนไซม์โดยทั่วไปนิยมใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร แต่มักเกิดการยับยั้งการผลิตเอนไซม์เมื่อใช้ที่ระดับความเข้มข้นสูง อันเป็นผลเนื่องมาจากกระบวนการ catabolite repression ด้วยเหตุนี้ การหาแหล่งคาร์บอนทดแทนกลูโคสจึงเป็นทางเลือกหนึ่ง ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งในการทดลองนี้ แหล่งคาร์บอนทดแทนที่สนใจนำมาศึกษาคือ กลูโคสและเด็กซ์ทรินที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง โดยที่เด็กซ์ทรินนั้นเป็น โอลิโกเมอร์ของน้ำตาล ที่เกิดจากการเชื่อมต่อกันของโมเลกุลกลูโคสด้วยจำนวนที่ไม่แน่นอนในแต่ละสาย และสามารถถูกย่อยสลายได้เป็นกลูโคสด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) ซึ่งงานวิจัยของ ขวัญฤทัย มาลัยเรือง (2556) ได้รายงานไว้ว่า เด็กซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพสูงกว่ากลูโคสทางการค้า เมื่อนำไปใช้ในอาหารเพาะเลี้ยง *E.coli* เพื่อผลิตมวลเซลล์ความเข้มข้นสูง

จากการศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหก ไอโซเลท โดยเปรียบเทียบระหว่างแหล่งคาร์บอนที่เป็นกลูโคสทางการค้าและแหล่งคาร์บอนทดแทนดังกล่าว พบว่าแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันทั้ง 3 ชนิด มีประสิทธิภาพสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียส่วนใหญ่เพื่อผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส ยกเว้นแบคทีเรียไอโซเลท 013 และ 053 ที่กลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังมีประสิทธิภาพสูงกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ๆ อย่างเห็นได้ชัด ซึ่งการที่เชื้อทั้งสองชนิดนี้สามารถใช้เด็กซ์ทรินได้น้อยอาจเป็นผลมาจากการที่เชื้อแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสสำหรับใช้ย่อยเด็กซ์ทรินให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสได้น้อยกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น ดังนั้นปริมาณของกลูโคสที่ถูกปล่อยเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ในการเจริญและการผลิตเอนไซม์จึงมีน้อย ทำให้วัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ได้น้อยตามไปด้วย

ในบรรดาแหล่งคาร์บอนทดแทนที่นำมาศึกษา การใช้เด็กซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยงให้ประสิทธิภาพสูงใกล้เคียงกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น โดยส่งผลให้แบคทีเรียมี

การสร้างเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดในแบคทีเรียสายพันธุ์ 012, 032, 042 และ 071 ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.55 ± 0.01 , 0.53 ± 0.01 , 0.48 ± 0.01 และ 0.48 ± 0.01 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และมีอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.023 ± 0.001 , 0.022 ± 0.000 , 0.020 ± 0.000 และ 0.020 ± 0.000 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังนั้นเด็กซ์ทรินจึงเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอส เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงและต้นทุนราคาวัตถุดิบต่ำกว่าการใช้กลูโคสทางการค้าและกลูโคสที่ได้จากการย่อยแป้ง อีกทั้งยังสามารถใช้ที่ระดับความเข้มข้นสูงได้โดยมีความเสี่ยงที่จะเกิดการยับยั้งการสร้างผลิตภัณฑ์จากการเกิดกระบวนการ catabolite repression น้อยกว่าแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น โดยการใช้แหล่งคาร์บอนทดแทนที่มีลักษณะเช่นเดียวกันนี้สามารถพบได้ในงานวิจัยหลายชิ้น เช่น งานวิจัยของ Kocher and Joshi (2015) ที่พบว่าการใช้เปลือกมันฝรั่งซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปมันฝรั่งเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนการใช้เคซีนในอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อ *Bacillus circulans* MTCC 7906 ทำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 10.513 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่ออนาที 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 เพื่อผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอส ให้ผลดีกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่น โดยวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดได้เท่ากับ 564 ± 1.73 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร เป็นต้น

แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

แบคทีเรียสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนทั้งในรูปของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ในการสร้างกรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก โปรตีนต่าง ๆ และองค์ประกอบของผนังเซลล์ เพื่อการเจริญและการผลิตผลิตภัณฑ์ โดยเซลล์ของแบคทีเรียส่วนใหญ่จะมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 14 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง และในอัลคาไลน์โปรตีเอสจะมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณร้อยละ 15.6 ดังนั้นแหล่งของไนโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตเอนไซม์ ในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสโดยทั่วไป นิยมใช้แหล่งไนโตรเจนร่วมกันหลายชนิด (complex nitrogen source) ซึ่งมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ในการ

เพาะเลี้ยง ดังนั้น การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแหล่งไนโตรเจนทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์จึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

จากการศึกษาประสิทธิภาพของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ในอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหกไอโซเลทพบว่า แหล่งไนโตรเจนชนิดที่เป็นสารอินทรีย์มีประสิทธิภาพสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ โดยกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนชนิดสารอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด เนื่องจากให้ค่ากิจกรรมและอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดในเชื้อแบคทีเรียไอโซเลท 013, 032, 042, 053 และ 071 ซึ่งวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดได้ที่เวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 1.93 ± 0.03 , 2.59 ± 0.26 , 0.54 ± 0.01 , 1.76 ± 0.06 และ 2.52 ± 0.09 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร และอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.080 ± 0.001 , 0.108 ± 0.011 , 0.023 ± 0.000 , 0.074 ± 0.002 และ 0.105 ± 0.004 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนสารสกัดจากเนื้อวัวและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนชนิดสารอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพดีรองลงมา การที่กากถั่วเหลืองมีประสิทธิภาพช่วยส่งเสริมการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรีย เนื่องจากกากถั่วเหลืองเป็นของเสียเหลือทิ้งของกระบวนการผลิตน้ำมันถั่วเหลือง ที่มีการสกัดเอากรดไขมันไม่อิ่มตัวออกจากเมล็ดถั่วไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ และคงเหลือส่วนที่เป็นโปรตีนทั้งชนิดอินทรีย์และอนินทรีย์ในส่วนที่เป็นกากมากถึง 40 เปอร์เซ็นต์ จึงทำให้กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนชั้นดีสำหรับการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส (Kumar, Joo, Koo, & Chang, 2004) นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์ได้น้อย เมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดที่เป็นสารอนินทรีย์ ซึ่งเป็นผลจากการที่เซลล์แบคทีเรียสามารถย่อยสลายแหล่งไนโตรเจนเหล่านี้ เช่น โซเดียมไนเตรทและโพแทสเซียมไนเตรท ได้รวดเร็วกว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ ดังนั้นกรดอะมิโนหรือไอออนของแอมโมเนียมที่ได้จากการย่อยสลายจึงถูกนำไปใช้ในการเจริญและการสร้างมวลเซลล์มากกว่าการนำไปใช้สร้างเอนไซม์ (Kumar & Takagi, 1999) ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองข้างต้นเป็นไปทิศทางเดียวกันกับงานวิจัยของ Nadeem, Qazi, Baig, and Syed (2008) ที่ศึกษาอิทธิพลขององค์ประกอบต่าง ๆ ในอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus licheniformis* N-2 และพบว่าการใช้กากถั่วเหลืองในอาหาร ทำให้แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุด ในขณะที่แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ซึ่งอยู่ในรูปของเกลือแอมโมเนียมมีผลยับยั้งการสร้างเอนไซม์ ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์มีค่าลดลงถึง 60 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Saurabh, Jasmine, Pritesh, and Rajendra Kumar (2007) ที่พบว่าการใช้กากถั่วเหลืองความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในอาหารเพาะเลี้ยง ทำให้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. (SBP-29) ที่แยกได้จากตัวอย่างดินของโรงงานแปรรูปสัตว์ปีก มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส สูงสุดเท่ากับ 3,028 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้ Joo and Chang (2004) ได้รายงานว่

การใช้กากถั่วเหลืองความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในอาหารเพาะเลี้ยง ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. I-312 ได้เช่นเดียวกัน ซึ่งวัดกิจกรรมของเอนไซม์ได้ 10,520 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

ค่าพีเอชในอาหารเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยสำคัญในการสร้างเอนไซม์และการลำเลียงสารผ่านเข้าออกเซลล์ของแบคทีเรียชนิดต่าง (Alkalophilic bacteria) ซึ่งเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากระบบการขนส่งอิเล็กตรอนเข้าออกเซลล์ของแบคทีเรียชนิดต่าง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มที่เป็น obligate alkalophilic bacteria ต้องอาศัยโซเดียมไอออน (Na^+) ในการช่วยลำเลียงโปรตรอนผ่านเข้าออกเซลล์ด้วยวิธี Na^+/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) ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องศึกษาเพื่อหาค่าพีเอชที่เหมาะสมในอาหารเพาะเลี้ยง ที่ช่วยส่งเสริมประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์จากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมด ไอโซเลท

จากการศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชที่มีต่อการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด ไอโซเลทพบว่า การใช้ค่าพีเอชเริ่มต้นในอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 10 ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียทุกชนิดมีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์สูงสุด โดยแตกต่างจากการใช้ค่าพีเอชอื่น ๆ ในอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสามารถวัดค่ากิจกรรมและอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดได้ที่เวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อแบคทีเรีย 012, 032 และ 042 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.95 ± 0.02 , 3.02 ± 0.03 , 1.91 ± 0.13 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.081 ± 0.001 , 0.126 ± 0.001 , 0.080 ± 0.005 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และที่เวลา 48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อแบคทีเรีย 013, 053 และ 071 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.47 ± 0.14 , 2.00 ± 0.00 , 2.46 ± 0.15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.031 ± 0.003 , 0.042 ± 0.000 , 0.051 ± 0.003 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ สอดคล้องกับงานวิจัยหลายชิ้นที่พบว่า การใช้ค่าพีเอชเท่ากับ 10 ในอาหารเพาะเลี้ยง ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของแบคทีเรีย ดังเช่นงานวิจัยของ Genckal and Tari (2006) ที่รายงานว่า การใช้ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 10 ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. L18 และ L21 ทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด เช่นเดียวกับ Smita et al. (Smita et al., 2012) ที่ศึกษาการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อ

Serratia liquefaciens และสามารถวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดได้เท่ากับ 66.23 พียูต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีค่าพีเอช 10 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกปัจจัยหนึ่งในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์ และมีความเหมาะสมแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้กลไกที่อุณหภูมิควบคุมการสร้างเอนไซม์ในจุลินทรีย์นั้นยังไม่เป็นที่แน่ชัด แต่งานวิจัยของ Frankena, Koningstein, van Verseveld, and Stouthamer (1986) แสดงให้เห็นถึงความเกี่ยวเนื่องกันของกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์กับเมตาบอลิซึมของพลังงานในเชื้อบราซิลีส ซึ่งถูกควบคุมด้วยอุณหภูมิและปริมาณการให้อากาศ

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในแบคทีเรียทั้งหกไอโซเลท โดยการแปรผันค่าให้แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าสภาวะการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำให้เชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์มากกว่าที่สภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยให้ผลดีในแบคทีเรีย 012, 013, 032 และ 042 ซึ่งสามารถวัดค่ากิจกรรมและอัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดได้เท่ากับ 1.81 ± 0.01 , 0.71 ± 0.11 , 3.02 ± 0.03 , 1.68 ± 0.11 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.075 ± 0.001 , 0.029 ± 0.004 , 0.126 ± 0.001 , 0.070 ± 0.005 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรีย 042 มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน แม้ว่าจะถูกเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างกันก็ตาม ส่วนแบคทีเรียไอโซเลท 053 และ 071 จะมีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์สูงเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิมีค่าเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส แล้วส่งผลให้มีการสร้างเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้นนั้น เป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยของ Banerjee, Sami, Azmi, and Soni (1999) ที่พบว่าแบคทีเรีย *B. brevis* สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร complete medium ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 10 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส รวมถึงงานวิจัยของ Sankareswaran, Anlabagan, and Prabhavathi (2014) ที่พบว่าการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินในสภาวะที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 9 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำให้ได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสสูงที่สุด

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูง ด้วยวิธี 16S rDNA sequencing

การวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีนด้วยวิธี 16S rDNA sequencing เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย เนื่องจากแบคทีเรียจะมี 16S rDNA gene ซึ่งเป็นยีนที่จะถูกถอดรหัส

ได้เป็น 16S rRNA แล้วประกอบกับ ribosomal protein ชนิดอื่นได้เป็นไรโบโซมที่มีความแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด และมีบางช่วงในสายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene ที่มีความเหมือนกันในแบคทีเรียทุกชนิดด้วยเช่นกัน จึงทำให้สามารถจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้

เมื่อใช้วิธี 16S rDNA sequencing ดังกล่าวข้างต้น มาจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย ไอโซเลท 032 พบว่ามีความใกล้เคียงกับเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cohnii* ที่ระดับ 98.27 เปอร์เซ็นต์ *B. cohnii* เป็นแบคทีเรียแกรมบวกชนิด obligate alkaliphiles ที่มีการสร้างสปอร์ทรงรี (Oval spores) บริเวณผนังเซลล์พบกรดอะมิโนและกรดแอสปาร์ติกแทนกรดไคอะมิโนไฟเมลิคอย่างพบในแบคทีเรียบางชนิด เจริญได้ในอุณหภูมิระหว่าง 10 – 47 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์สามารถย่อยแป้ง, pullulan, hippurate, Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, เจลาติน และเคซีนได้ (Spanka & 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 ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรีย *B. cohnii* APT5 ซึ่งคัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณที่ล้างรถในเขตพื้นที่ Besevler ของเมือง Ankara ประเทศตุรกี และพบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 10.0 แต่สามารถผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเคซีนเป็นองค์ประกอบ พีเอชเท่ากับ 11 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยวัฏจักรของเอนไซม์ได้เท่ากับ 693,318 ยูนิตต่ออนาที นอกจากนี้ยังพบว่าคุณสมบัติของอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ มีแนวโน้มที่ดีในการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมสารซักล้าง

ด้วยคุณสมบัติที่โดดเด่นของแบคทีเรียจีส *Bacillus* ซึ่งได้แก่ *B. licheniformis*, *Bacillus* sp., *B. subtilis* และ *B. alcalophilus* ในการผลิตเอนไซม์ชนิดหลังออกมาภายนอกเซลล์อย่างมีประสิทธิภาพ และได้การรับรองความปลอดภัยเมื่อใช้ในยาและอาหาร (Generally recognized as safe: GRAS) (Jisha et al., 2013) ทำให้แบคทีเรียในกลุ่มนี้เป็นที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส เห็นได้จากการที่บริษัทขนาดใหญ่ต่าง ๆ ที่ผลิตเอนไซม์ทางการค้า เช่น Genencor International (สหรัฐอเมริกา), Gist-Brocades (เนเธอร์แลนด์), Solvay Enzymes และ (เยอรมนี) Enzyme Development เป็นต้น ใช้แบคทีเรียในจีส (สหรัฐอเมริกา) *Bacillus* สำหรับการผลิตเอนไซม์ (Bhunja et al., 2012) ดังนั้น แบคทีเรีย *B. cohnii* ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินบริเวณ โรงงานนมและผลิตภัณฑ์นมภายในประเทศ จึงมีแนวโน้มที่จะสามารถนำมาใช้ใน

การผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสทางอุตสาหกรรมได้ จึงต้องศึกษาประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์เมื่อมีการขยายกำลังการผลิตต่อไป

ประสิทธิภาพของเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ (Batch Fermentation)

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

จากการศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะที่มีต่อการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรีย *B. cohnii* โดยใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมจากผลการทดลองในข้อ 3 และมีการแปรผันปัจจัยอื่น ๆ ในการเพาะเลี้ยง ได้แก่ ลักษณะการควบคุมค่าพีเอชในระหว่างการเพาะเลี้ยง และความเข้มข้นของอาหารที่ใช้ พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของอาหารสูตร BPMM พีเอช 10 ที่ความเข้มข้น 2 เท่า ไม่มีการเติมสับสเตรทและไม่มีการควบคุมค่าพีเอชตลอดการเพาะเลี้ยง ทำให้เชื้อ *B. cohnii* มีประสิทธิภาพในการเจริญและการสร้างเอนไซม์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารที่ความเข้มข้นเดียวกัน แต่มีการควบคุมค่าพีเอชในระหว่างการเพาะเลี้ยงให้เท่ากับ 10 ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เห็นได้จากค่าพารามิเตอร์ในการเจริญและการสร้างเอนไซม์มีค่าเพิ่มขึ้นจากเดิมมาก โดยวัดค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ได้เท่ากับ 0.437 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 เช่นเดียวกับงานวิจัยของ กฤษดากร จริโมภาส (2549) ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus* sp. ที่ชอบด่างในอาหารเหลวด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ ภายใต้สภาวะที่มีปริมาณของกลูโคสต่างกัน พบว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสในอาหาร 2 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ *Bacillus* sp. มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และอัตราจำเพาะของการสร้างเอนไซม์ (q_p) สูงที่สุด ซึ่งสาเหตุของการลดลงของการ

เจริญหรือการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรีย อาจเป็นผลมาจากกระบวนการ catabolite repression ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น หรือการขาดสารอาหารบางชนิดที่จำเป็นต่อการสร้างเอนไซม์ โดยเฉพาะแหล่งไนโตรเจน ที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ถึง 15 เปอร์เซ็นต์ แต่เนื่องจากเวลาในการทำวิจัยชิ้นนี้มีจำกัด การศึกษาอิทธิพลของปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้จึงเป็นแนวทางในการทำวิจัยขั้นถัดไป

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของ *B. cohnii* เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ ในถังหมักขนาด 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 หลงเหลือสำหรับการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสน้อย แต่เมื่อเข้าสู่ระยะ stationary phase ที่เชื้อหยุดการเจริญ กรดนิวคลีอิกจึงถูกนำไปใช้ในการเจริญน้อยลง ทำให้มีปริมาณของกรดนิวคลีอิกหลงเหลือพอสำหรับการนำไปใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์มากกว่าในระยะที่เชื้อกำลังมีการเจริญเติบโต (Moon & Parulekar, 1991)

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch fermentation) ที่มีต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรีย *B. cohnii* นั้น แสดงให้เห็นว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยงชนิดนี้ ช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียมีการเจริญและการสร้างเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อใช้ความเข้มข้นของอาหารเพาะเลี้ยงหรือความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเพิ่มขึ้นถึงระดับใดระดับหนึ่งเท่านั้น หากความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเกินระดับที่เหมาะสม จะเกิดการยับยั้งการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียด้วยกระบวนการ catabolite repression ซึ่งเป็นการยับยั้งอย่างถาวร ดังนั้นการศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิคการเพาะเลี้ยงชนิดอื่น เช่น การเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ (Fed-batch fermentation) เพื่อหลีกเลี่ยงข้อจำกัดดังกล่าว แล้วทำให้สามารถผลิตเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์จึงเป็นสิ่งจำเป็น

ประสิทธิภาพของเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ (Fed-batch Fermentation)

เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ นิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นการผลิตเซลล์จุลินทรีย์ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ รวมถึงเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ การเพาะเลี้ยงด้วยวิธีนี้ จะมีการเติมสารอาหารลงไปในถังหมักระหว่างการเพาะเลี้ยง และทำการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์เพียงครั้งเดียวเมื่อสิ้นสุดกระบวนการเพาะเลี้ยง

จากการศึกษาประสิทธิภาพของเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะที่มีต่อการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรีย *B. cohnii* โดยใช้อาหาร BPMM พีเอช 10 ที่มีเด็กซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนและกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตรในการทำงานเริ่มต้น 1.5 ลิตร ไม่มีเติมสับสเตรทและไม่มีการควบคุมพีเอชตลอดการเพาะเลี้ยง อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที และความเร็วใบกวน 500 รอบต่อนาที จากนั้นทำการเติมอาหารที่ระยะ deceleration phase ด้วยอาหารที่มีองค์ประกอบและความเข้มข้นเดียวกันกับในถังหมัก อัตราคงที่ที่ 0.90 ลิตรต่อชั่วโมง พบว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *B. cohnii* ได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะ เห็นได้จากอัตราจำเพาะของการสร้างเอนไซม์ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ อัตราการสร้างเอนไซม์ รวมไปถึงค่าผลได้เอนไซม์จำเพาะ เพิ่มขึ้นสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะที่ความเข้มข้นของอาหารเท่ากันค่อนข้างมาก ซึ่งผลการทดลองเป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยของ Radha et al. (Radha et al., 2014) ที่พบว่าการใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะ ทำให้เชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas putida* และ *Staphylococcus aureus* มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะ โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 1.81 เท่า การที่เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเดิมกะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ เป็นผลมาจากการจำกัดปริมาณของสารอาหารให้เป็นไปตามลักษณะการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ แต่เมื่อพิจารณาปริมาณคงเหลือของน้ำตาลในอาหารพบว่า แบคทีเรียยังไม่สามารถใช้น้ำตาลได้จนหมด ซึ่งอาจเกิดจากการ Overfeeding การขาดสารอาหารบางชนิด หรืออัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนในสูตรอาหารที่ไม่เหมาะสม ซึ่งอาจทำให้การเจริญและการสร้างเอนไซม์เกิดขึ้นน้อยกว่าที่ควรจะเป็น ดังนั้นหากมีการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าวในการทดลองต่อ ๆ ไป อาจส่งผลให้ประสิทธิภาพในการเจริญและการสร้างเอนไซม์ดีขึ้น

สรุปผล

1. แบคทีเรีย *Bacillus cohnii* เป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินภายในประเทศทั้งหมด 157 ไอโซเลท และมีแนวโน้มที่จะนำไปใช้ผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้

2. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสคือ สูตรอาหาร BPMM ที่มีเด็กซ์ทรินเป็นแหล่งคาร์บอนและกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 10 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

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

4. เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบกะ จะช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียมีการเจริญและการสร้างเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อใช้ความเข้มข้นของอาหารเพาะเลี้ยงหรือความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเพิ่มขึ้นถึงระดับใดระดับหนึ่งเท่านั้น หากความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเกินระดับที่เหมาะสม จะเกิดการยับยั้งการเจริญและการสร้างเอนไซม์ด้วยกระบวนการ catabolite repression ซึ่งเป็นการยับยั้งอย่างถาวร

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

6. การเพาะเลี้ยงแบบเติมกะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรีย *B. cohnii* ได้มากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบกะถึง 1.6 เท่า เนื่องจากมีการจำกัดปริมาณสารอาหารให้ เป็นไปตามลักษณะการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิด over feeding แล้วทำให้แบคทีเรียถูกยับยั้งการเจริญหรือการสร้างเอนไซม์จากกระบวนการ catabolite repression

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างคาร์บอนกับไนโตรเจนของอาหารเพาะเลี้ยง เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรีย

2. ควรมีการศึกษาลักษณะการเติมอาหารรูปแบบต่าง ๆ สำหรับการเพาะเลี้ยงแบบเติมกะ เช่น การเติมอาหารแบบ exponential fed-batch ที่สามารถควบคุมอัตราการเจริญจำเพาะ และส่งผลให้สามารถควบคุมอัตราการสร้างเอนไซม์ได้ หรือศึกษาการเติมอาหารแบบ intermittent addition ที่มีการเติมอาหารเป็นระยะ ๆ เป็นต้น

3. ศึกษาการใช้สารชนิดอื่น ๆ ในการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรีย และความเข้มข้นของสารต่าง ๆ เหล่านั้น สำหรับกระบวนการผลิตเอนไซม์ในถังหมัก
4. ควรมีการศึกษาอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนผสมภายในถังหมักระหว่างการเพาะเลี้ยง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรีย
5. ควรมีการศึกษากำทำบริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่ผลิตได้ และเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์บริสุทธิ์กับ crude enzyme เพื่อให้ทราบถึงลักษณะการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ต่อไป
6. ควรมีการศึกษาคูณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ที่ผลิตได้ เพื่อให้ทราบถึงกลไกในการทำงาน และสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงาน เพื่อให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้อย่างเหมาะสม

บรรณานุกรม

- กฤษณากร จริโมภาส. (2549). การผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสโดย *Bacillus sp.* ที่ชอบด่างในอาหารเหลว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยา, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ขวัญฤทัย มาลัยเรือง. (2556). การผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงด้วยการเพาะเลี้ยงแบบกะโดยใช้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้นสูง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- จุฑาทพร แสงวงแก้ว. (2543). การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยา, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ฉวีวรรณ สว่างวัน. (2548). การสลายแป้งมันให้เป็นน้ำตาลในปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ปราณี พัฒนพิพิชไพศาล. (2556). เอนไซม์เทคโนโลยี. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พิมล จำนงค์. (2545). การทำให้อัลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตจาก *Alkalotolerant Bacillus sp. 12* บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติต่าง ๆ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี, คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยีชีวเคมี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- วรรณวิมล ทรัพย์ดี. (2540). การผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis TISTR 25* ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สุดธิดา แสงยนต์. (2548). สมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยา, 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.
- Bhunia, 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.
- Fauziah, R.R. (2010). *The production of alkaline protease by Aspergillus oryzae 3087 under fed-batch fermentation*. Master's 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, 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.
- Kocher, G.S., & Joshi, N. (2015). Production and 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.

- 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), 265-275.
- 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.
- Nehete, P.N., Shah, V.D., & Kotari, R.M. (1986). Isolation of a high yielding alkaline protease variant of *Bacillus licheniformis*. *Enzyme Microb Technol*, 8, 370-372.
- 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), 3448-3457.
- Patrick, S.M., & Finn, B. (2008). Modes of fermentor operation In B. Mcneil & L.M. Harvey (Eds.), *Practical Fermentation Technology* (pp.69-86). West Sussex: John Wiley and Sons.
- 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.
- Priest, F.G. (1977). Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol Rev*, 41, 711-753.
- 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.

- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., & Deshpande, V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbio Mol Bio Rev*, 62 (3), 597-635.
- 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.
- 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.
- Shukla, 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 In *The 11th Iranian Chemical Engineering Congress*. Tehran, Iran.
- Tabandeh, F., Hosseinian M.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 แล้วนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

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

ส่วนประกอบ

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

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรเป็น 972 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 10 ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na₂CO₃) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 28 มิลลิลิตร

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

ส่วนประกอบ

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

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรเป็น 972 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 10 ด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 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
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.10	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	0.75	กรัมต่อลิตร
Na_2HPO_4	0.90	กรัมต่อลิตร
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.10	กรัมต่อลิตร
Trace element solution	1.0	มิลลิลิตรต่อลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 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 ₂ HPO ₄	1	กรัมต่อลิตร
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2	กรัมต่อลิตร
Trace element solution	10	มิลลิลิตรต่อลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดมาละลายในน้ำกลั่น ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 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 นำมาผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร แช่เย็นจนกว่าจะนำไปใช้

8. การเตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์

ส่วนประกอบ

Na_2CO_3 200 กรัมต่อลิตร

ชั่ง Na_2CO_3 หนัก 200 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1 ลิตร

9. การย่อยเด็กซ์ทรินจากแป้งมันสำปะหลัง (ขวัญฤทัย มาลัยเรือง, 2556)

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

7.2 ติดตั้งอุปกรณ์ต่าง ๆ ตั้งค่าอุณหภูมิของอ่างควบคุมอุณหภูมิให้เท่ากับ 95 องศาเซลเซียส แล้วต่อเข้ากับ Jacket ของถังย่อยแป้ง ใช้อัตราการกวนผสมเท่ากับ 400 รอบต่อนาที

7.3 เติมน้ำในถังย่อยแป้งส่วนหนึ่ง รอกะทั่งอุณหภูมิในถังประมาณ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (α -amylase) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ค่อย ๆ เติมแป้งมันสำปะหลังทีละนิดจนหมด (ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์) ปรับปริมาตรจนครบตามต้องการ

7.4 รอกวนกะทั่งอุณหภูมิเท่ากับ 95 องศาเซลเซียส แล้วจับเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะได้สารละลายเด็กซ์ทรินที่มีลักษณะเป็นของเหลวหนืดเล็กน้อย และมีสีส้มขุ่น

10. การย่อยกลูโคสจากแป้งมันสำปะหลัง (ขวัญฤทัย มาลัยเรือง, 2556)

การย่อยกลูโคสจากแป้งมันสำปะหลัง เป็นกระบวนการที่ต่อเนื่องจากการย่อยเด็กซ์ทริน

8.1 หลังจากได้สารละลายเด็กซ์ทรินจากการย่อยแป้งในข้อ 9 แล้ว จะทำการลดอุณหภูมิภายในถังย่อยแป้งลงให้เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส

8.2 เติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (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 ในกรณีตัวอย่างมีความเข้มข้นสูงมาก ให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยมีค่าความขุ่นประมาณ 0.1-0.8 แล้วจึงคำนวณค่าความขุ่นที่แท้จริง ดังสมการ

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

2. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสเฟส (พิมล จ่านงค์, 2545)

หลักการ

วัดปริมาณของกรดอะมิโนที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ในการย่อยสลายโปรตีน

การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์

1. สารละลาย Trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์
เตรียมโดยชั่งกรดไตรคลอโรอะซิติกหนัก 16.35 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตร
2. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_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 (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ โดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนตหนัก 1.32 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร
 - 3.2 เตรียมสารละลาย Sodium hydrogen carbonate (Na_2HCO_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. สารโพลินรีเอเจนต์ (Folin-ciocalteu reagent)

นำสารโพลินรีเอเจนต์ มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1

6. สารละลาย L-Tyrosine ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เตรียมโดยชั่ง L-Tyrosine 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 7-8 มิลลิลิตร จากนั้นค่อย ๆ เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มอล กวนจนไทโรซีนละลายหมด แล้วจึงปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร แล้วเจือจางให้ความมลดลง 10 เท่าด้วยน้ำกลั่น

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลาย L-Tyrosine

1.1 เตรียมสารละลาย L-Tyrosine ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายแต่ละความเข้มข้นลงในหลอดทดลอง หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

1.2 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

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

1.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นของสารละลาย L-Tyrosine

2. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสเฟสในสารละลายตัวอย่าง

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 คูดเอาเฉพาะส่วนใส (Supernatant) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่งในหลอดทดลอง

2.6 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.7 เติมสารโพลินรีเอเจนต์ (1:1) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที

2.8 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

3. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสในชุดควบคุม

3.1 คูดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบในหลอดทดลอง 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 ปั่นในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

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

3.5 คูดเอาเฉพาะส่วนใส (Supernatant) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่งในหลอดทดลอง

3.6 เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

3.7 เติมสารโพลินรีเอเจนต์ (1:1) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่ อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที

3.8 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส

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

MW of Tyrosine x Slope x Enzyme volume x 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 คูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดปั่นเหวี่ยงที่ผ่านการอบแห้งและชั่งน้ำหนักแล้ว

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

5.3 นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก

5.4 นำค่าน้ำหนักที่ได้ มาคำนวณมวลเซลล์แห้งตามสูตรดังต่อไปนี้

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

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 เติมน้ำกลั่นโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่ละน้อย คนให้เข้ากันจนสารละลายใส โดยให้ความร้อน จากนั้นเติมโพแทสเซียม

ทาร์เทรต 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 เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน 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 จากนั้นแช่ในน้ำเย็น 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 คูดเอาเฉพาะส่วนใสใส่หลอดทดลองปริมาตร 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 คูดเอาเฉพาะส่วนใสไปวัดปริมาณน้ำตาล
6. วัดปริมาณน้ำตาลที่ได้ด้วยวิธี DNS Assay (ข้อ 4)

6. การนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Total plate count

1. นำตัวอย่างอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย มาทำการเจือจางด้วยวิธี 10-fold serial dilution โดยใช้ น้ำกลั่นปลอดเชื้อ จนกระทั่งมีความเข้มข้นที่เหมาะสม ผสมให้ตัวอย่างเข้ากันดี
2. คูดตัวอย่างที่เจือจางแล้วแต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงกลางอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแข็ง BMSM พีเอช 10 ด้วยวิธีการปลอดเชื้อ (Aseptic technique)
3. ใช้ที่เขี่ยเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เขี่ยเชื้อให้ทั่วทั้งเพลท 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

ตารางผลการทดลองและผลการวิเคราะห์ชิ้นส่วนยีน

ด้วยวิธี 16S rDNA sequencing

ตารางผลการทดลอง

ตารางภาคผนวก ก-1 กิจกรรมของเอนไซม์และอัตราการสร้างเอนไซม์ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก
ได้จำนวน 28 ไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BSMF พีเอช 10 ที่
อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

NO.	ไอโซเลท	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

ตารางภาคผนวก ก-1 (ต่อ)

NO.	ไอโซเลข	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

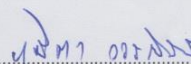
ผลการทดสอบ / วิเคราะห์

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

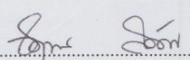
ผู้ทดสอบ / วิเคราะห์

นางสาวธันท์พร ภูน้ำทอง


ผู้ตรวจสอบ (2)


(ดร. ภูชิตา วรรณนิสสร)

ผู้ตรวจสอบ (1)


(ดร. จารุวรรณ สิทธิพล)

ผู้รับรอง


(ดร. บัณฑิต 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

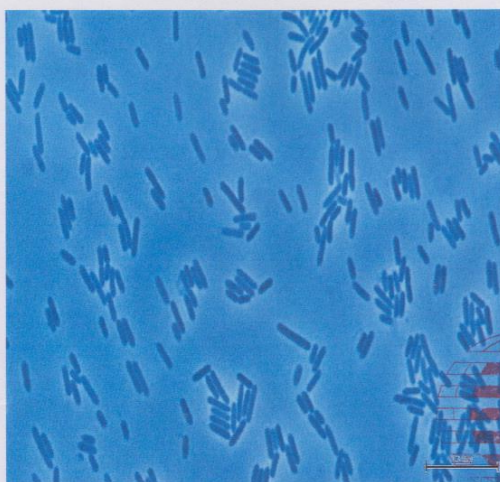


หน้า 1 ของ 1

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