หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การศึกษาสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 ในการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส

จากการศึกษาของ ร.อ.ปกรณ์(2532) และสนธยา(2533) โดยใช้สูตรอาหารพื้นฐานในการเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย KH_2PO_4 0.44 เปอร์เซนต์, Na_2HPO_4 0.48 เปอร์เซนต์, $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 เปอร์เซนต์, $CaCl_2.2H_2O$ 0.005 เปอร์เซนต์ และ $FeSO_4.7H_2O$ 0.004 เปอร์เซนต์ pH เท่ากับ 6.0 เมื่อ pH สูงกว่า 6.0 ขึ้นไปจะเกิดการตกตะกอน การเตรียมอาหารจำเป็นต้องแยก $CaCl_2.2H_2O$ และ $FeSO_4.7H_2O$ ในการ autoclave แล้วจึงนำไปผสมกันภายหลังทำให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นได้ง่าย และจากรายงานของ Terry และคณะ(1985) พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 จากเหตุผลดังกล่าวจึงทำการคัดเลือกหาสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมกว่า โดยคัดเลือกสูตรอาหารพื้นฐานที่มีความแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ ซึ่งสูตรอาหารพื้นฐานทั้งสูตรที่ 1 และ 2 ที่ใช้ในการทดลองนี้มีรายงานใช้ในการศึกษาและผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสโดยเชื้อ *Bacillus spp.* ในระดับอุตสาหกรรมได้ผลผลิตเอนไซม์ปริมาณสูง (MG Halpern, 1981; Sadanobu และคณะ, 1975)

การใช้สูตรอาหารพื้นฐานสองสูตรที่มีความแตกต่างกัน โดยที่สูตรอาหารสูตรที่ 1 มีชนิดของแร่ธาตุน้อยกว่า มีกลูโคสปริมาณ 0.5 กรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตร เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน และสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ปริมาณ 2.0 กรัมต่ออาหาร 100 มิลลิลิตรเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน ทำการเลี้ยงเชื้อและเก็บตัวอย่างมาตรวจวัดการ

เจริญ แอคติวิตีของเอนไซม์ และ pH ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นในระหว่างการทดลอง จากผลการทดลองรูปที่ 1 จะเห็นว่าสูตรอาหารพื้นฐานทั้งสูตรที่ 1 และ 2 เชื้อจะเริ่มเจริญอย่างรวดเร็วในระยะเวลา 8 ชั่วโมงแรก โดยที่ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้นั้นมีการเปลี่ยนแปลงมาก จากนั้นจะมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนถึงชั่วโมงที่ 28-32 ก็จะค่อยๆลดลงในที่สุด ในช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างสูงหรือเรียกว่า การเจริญช่วง Logarithmic phase นั้น การสร้างเอนไซม์ของเชื้อที่ตรวจพบมีแอคติวิตีต่ำหรือไม่มีแอคติวิตีเลย แสดงว่าเชื้อยังไม่มีการสร้างเอนไซม์หรือเพียงแต่เริ่มสร้างเท่านั้น จนกระทั่งการเจริญเริ่มเข้าสู่ระยะที่เรียกว่า Stationary phase คือมีอัตราการเจริญค่อนข้างคงที่ จึงมีการสร้างเอนไซม์สูงขึ้น ดังนั้นการสร้างเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 จะเกิดในช่วงปลายของการเจริญระยะ Logarithmic phase ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ ร.อ.ปกรณ์ (2532) และสนธยา (2533) แม้ว่าจะเลี้ยงในอาหารที่ต่างกัน และเหมือนกับเชื้อบาซิลลัสในสกุลอื่นดังรายงานของ Millet และคณะ (1969) อีกด้วย

การเปลี่ยนแปลงของ pH ระหว่างการเลี้ยงเชื้อที่เหมือนกันคือในช่วง 8 ชั่วโมงแรกจะมี pH ลดลง และค่อยๆเพิ่มขึ้นจนค่อนข้างจะคงที่ ซึ่งปกติการเลี้ยงเชื้อแบบใช้ขวดเขย่าจะมีการเปลี่ยนแปลง pH มากในระหว่างการเลี้ยง และมีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อโดยที่การเปลี่ยนแปลง pH จะลดลงในระยะที่มีการเจริญสูง และจะเพิ่มขึ้นเมื่อการเจริญใกล้ถึงช่วงปลายของระยะ Logarithmic phase ในสภาวะที่การเลี้ยงเชื้อไม่มีการควบคุม pH หรือไม่สามารถควบคุมได้ก็จะทำให้ pH เริ่มต้นและเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงมีความแตกต่างกันมาก การเปลี่ยนแปลงของ pH ที่ลดลงในช่วงแรกนั้น เป็นผลมาจากเชื้อจุลินทรีย์นำกลูโคสไปใช้เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญในช่วงที่มีอัตราการเจริญสูง ในขบวนการเมแทบอลิซึมจะเกิดกรดขึ้นทำให้ pH ลดลง (Seung-Hyeon Moon,1990) ซึ่งการเปลี่ยนแปลง pH นี้เองก็มีผลต่อความสามารถในการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของเชื้อด้วย โดยที่เอนไซม์โปรตีเอสจะถูกจำกัดการสร้างหรือทำให้สร้างได้น้อยลงในสภาพที่มี pH ต่ำกว่า 7.0 (Seung-Hyeon Moon,1990 ; Reilly,1983) ดังนั้นในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานทั้งสองสูตรจึงปรับ pH เริ่มต้นให้เท่ากับ 7.0

ส่วนประกอบของสูตรอาหารพื้นฐานทั้งสองสูตรมีความแตกต่างกันในชนิดและปริมาณของสารประกอบ โดยอาหารสูตรที่ 2 มีส่วนประกอบไอออนของโลหะที่มีส่วนช่วยใน

การเจริญของเชื้อบาซิลลัสด้วย คือ แมงกานีส เหล็ก และสังกะสี (สุพจน์,2530) ซึ่งน่าจะให้ผลการทดลองแตกต่างจากสูตรอาหารสูตรที่ 1 แต่จากผลการทดลองปรากฏว่าในด้านการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 สูตรอาหารทั้งสองสูตรให้ผลการเจริญที่มีรูปแบบเหมือนกัน รวมทั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ที่สร้างออกมาก็ใกล้เคียงกันด้วย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเชื้อ *B.subtilis* สายพันธุ์ TISTR 25 นี้มีความต้องการไอออนเหล่านี้น้อยมาก หรือไอออนเหล่านี้มีความจำเป็นในการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของเชื้อน้อยก็ได้

5.2 การศึกษา pH ที่เหมาะสมในการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส

จากการศึกษาของ ร.อ.ปกรณ์ (2532) พบว่าเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 สามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอสและขับออกสู่นอกเซลล์ได้ 2 ชนิดคือ นิวทรัลโปรตีเอส และแอลคาไลน์โปรตีเอส โดยมีอัตราส่วนของนิวทรัลโปรตีเอสต่อแอลคาไลน์โปรตีเอสประมาณ 1:2.8 และนิวทรัลโปรตีเอสที่สร้างออกมาสามารถมีแอคติวิตีร่วมกับแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ในช่วง pH ตั้งแต่ 4.5-10.0 โดยจะมีแอคติวิตีของนิวทรัลโปรตีเอสสูงสุดที่ pH เท่ากับ 7.0 (อุดมลักษณ์,2533) ส่วนแอลคาไลน์โปรตีเอสมีแอคติวิตีสูงสุดที่ pH 10.5 (ผลการทดลองข้อ 4.2) และมีช่วงการทำงานได้ในระหว่าง pH 7-11 ดังนั้นในการตรวจหาแอคติวิตีของโปรตีเอสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเอนไซม์จะอยู่ในลักษณะ crude enzyme ถ้าต้องการวัดแต่แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส ก็อาจทำได้โดยการศึกษาที่ pH ที่นิวทรัลโปรตีเอสไม่ทำงาน จากผลการทดลองในตารางที่ 4 เมื่อพิจารณาระหว่างน้ำเลี้ยงเชื้อที่เติม EDTA 5 มิลลิโมลาร์ ซึ่งยับยั้งนิวทรัลโปรตีเอสได้ประมาณ 96-97 เปอร์เซนต์ (ร.อ.ปกรณ์, 2532) กับน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติม EDTA พบว่าค่าแอคติวิตีสัมพัทธ์ที่ pH 7.5-8.5 ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่เติม EDTA นั้นต่ำกว่าซึ่งเป็นผลจากนิวทรัลโปรตีเอสถูกยับยั้งแอคติวิตีโดย EDTA ดังนั้นถ้าวัดแอคติวิตีที่ pH สูงกว่า 9.0 ขึ้นไป จึงเป็นการวัดแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส แต่เนื่องจากแอลคาไลน์โปรตีเอสมีแอคติวิตีสูงสุดที่ pH 10.5 จึงใช้ pH 10.5 ในการทดลองตั้งแต่ข้อที่ 2 ในการตรวจหาแอคตวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส

5.3 การคัดเลือกชนิดและปริมาณของวัตถุดิบที่เหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน

การคัดเลือกชนิดและปริมาณวัตถุดิบที่เหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน โดยใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นตัวศึกษาปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่จะใช้เพื่อคัดเลือกชนิดของวัตถุดิบต่างๆ ทั้งนี้เนื่องจากสารสกัดจากยีสต์ประกอบด้วย กรดอะมิโน โปรตีน วิตามินและสารอาหารที่จำเป็นในการเจริญของเซลล์จุลินทรีย์และการสร้างเอนไซม์ต่างๆ ในการทดลองที่เกี่ยวกับการใช้ไนโตรเจนของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ก็จะใช้สารสกัดจากยีสต์นี้ทำการศึกษาด้วย (B.Sikyta,1983;Seung-Hyeon Moon,1989) ในการทดลองพบว่า ในขณะที่การเจริญของเซลล์และการเปลี่ยนแปลงของ pH ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 0.1-3.0 เปอร์เซนต์ ไม่แตกต่างกันนัก แต่การสร้างเอนไซม์ของเชื้อแตกต่างกันโดยปริมาณเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้สารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซนต์ (รูปที่ 3 ข.) ที่ความเข้มข้นสารสกัดจากยีสต์ 0.1 เปอร์เซนต์ เชื้อสร้างเอนไซม์ได้น้อย อาจเป็นเพราะในระหว่างการเลี้ยงเชื้อต้องใช้กรดอะมิโนจำนวนหนึ่งที่จะนำไปใช้ในการเจริญและสร้างเซลล์เพิ่มจำนวน เมื่อปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ต่ำก็จะมีปริมาณของกรดอะมิโนต่ำ ดังนั้นกรดอะมิโนจึงไม่เพียงพอที่จะเหลือนำไปสังเคราะห์เอนไซม์ในจำนวนมากๆได้ Coleman(1967) ได้รายงานไว้ว่าขณะที่เซลล์มีการเจริญสูงสุดแล้วจึงจะมีการสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอสเริ่มขึ้น โดยที่กรดนิวคลิอิกจะจับกับกรดอะมิโนเพื่อสังเคราะห์เอนไซม์ แต่เมื่อปริมาณของกรดอะมิโนต่ำการสังเคราะห์เอนไซม์ก็ไม่สมบูรณ์หรือสังเคราะห์ออกมาได้น้อย ในกรณีที่ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์เท่ากับ 3.0 เปอร์เซนต์ การสร้างเอนไซม์ของเชื้อได้ปริมาณต่ำเช่นกัน ทั้งนี้น่าจะเป็นผลมาจากปริมาณของกรดอะมิโนในสารสกัดจากยีสต์มีมากเกินไป จึงทำให้เกิดการกดดันการสร้างเอนไซม์ ซึ่ง สนธยา(2533) ได้ทำการศึกษาถึงแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์โปรตีเอสของเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 ไว้ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของกรดอะมิโนเพิ่มขึ้นจะมีการเจริญของเชื้อสูงขึ้น แต่แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ตรวจพบจะต่ำลงเช่นเดียวกัน ดังนั้นปริมาณของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการสร้างเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจึงจะ

ช่วยให้การสร้างเอนไซม์ได้ปริมาณสูงสุด ซึ่งในการทดลองนี้ปริมาณที่เหมาะสมจะใช้ในการทดลองต่อไปเพื่อคัดเลือกชนิดของแหล่งไนโตรเจนคือ 2.0 เปอร์เซนต์

การคัดเลือกชนิดของวัตถุดิบที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเทียบกับสารสกัดจากยีสต์ มีวัตถุดิบที่ใช้ คือ กากถั่วเหลือง, กากเมล็ดทานตะวัน, กากมะพร้าว, วีทกลูเตน, คอร์นกลูเตน, คอร์นสตีพลิเคอร์ โดยเปรียบเทียบวิธีเตรียมวัตถุดิบ 2 วิธีคือ วิธีอบนึ่งฆ่าเชื้อ และการย่อยสลายด้วยกรดภายใต้สภาวะการอบนึ่งฆ่าเชื้อ การเตรียมวัตถุดิบทั้ง 2 วิธีเนื่องจากวัตถุดิบการเกษตรส่วนใหญ่ แม้ว่าจะมีปริมาณโปรตีนอยู่สูง (ตารางที่ 8) แต่เป็นเปปไทด์สายยาวและมีเส้นใยจำนวนมาก มีการละลายน้ำได้น้อย ดังนั้นการย่อยสลายด้วยกรดและความร้อนจะช่วยทำให้เปปไทด์สายยาวถูกตัดออกเป็นสายสั้นลง และเกิดกรดอะมิโนอิสระละลายในน้ำมากขึ้น (Jens,1976) ในจำนวนวัตถุดิบที่ใช้มีสารสกัดจากยีสต์และคอร์นสตีพลิเคอร์ อยู่ในรูปที่ละลายน้ำได้อยู่แล้ว จากผลการทดลองพบว่า กากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวันที่ย่อยสลายด้วยกรดนั้นจะให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด แม้ว่าปริมาณของไนโตรเจนรวมของวัตถุดิบบางชนิด คือ วีทกลูเตน และ คอร์นกลูเตน จะมีค่ามากกว่าเมื่อใช้วัตถุดิบในน้ำหนักที่เท่ากัน (ตารางที่ 5) แต่แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้น้อยกว่า ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะปริมาณของกรดอะมิโนและชนิดของกรดอะมิโนที่มาจากวัตถุดิบวีทกลูเตนและคอร์นกลูเตนนั้นมีผลต่อการกดดันการแสดงออกของจีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสทำให้เกิดการสร้างเอนไซม์น้อยลงหรือมีสารยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสในเมล็ดข้าวสาลี และข้าวโพด จากรายงานของ Shul'gin (1985) พบว่า ในข้าวสาลีมีสารยับยั้งซึ่งมีคุณสมบัติที่ยับยั้งแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอส Subtilisin Carlsberg และ BPN'ได้ โดยจะจับตัวกับเอนไซม์ทั้งสองชนิดในอัตราส่วน 1:1 เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนมีความเสถียรได้หรือจากรายงานของ Mosolov (1985) พบว่า โปรตีนชนิดหนึ่งที่พบในข้าวโพดมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสโดยเฉพาะ Subtilisin โดยจะจับตัวกับเอนไซม์เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนในอัตราส่วนของสารที่ยับยั้งต่อเอนไซม์เท่ากับ 1:2 และเนื่องจากเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 ก็มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับเอนไซม์มาตรฐาน Subtilisin Carlsberg และ BPN' ด้วย (ร.อ.ปกรณ์,2532) จึงน่าจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ตรวจ

พบจากการใช้ วีทกลูเตน และคอร์นกลูเตน เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนมีแอคติวิตีต่ำก็ได้

ผลการทดลองใช้วัตถุดิบผสม พบว่าวัตถุดิบผสมระหว่าง กากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวัน จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด (รูปที่ 6 ข.) และเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้วัตถุดิบเพียงชนิดเดียว คือ กากถั่วเหลืองหรือกากเมล็ดทานตะวันปรากฏว่า การใช้วัตถุดิบผสมนั้นช่วยให้ได้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงกว่าการใช้วัตถุดิบเพียงชนิดเดียว อาจเป็นไปได้ว่าการใช้วัตถุดิบเพียงชนิดเดียวนั้น ปริมาณและชนิดของกรดอะมิโนที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์ของเชื้อนี้มีอยู่ในระดับหนึ่ง เมื่อใช้วัตถุดิบผสมจึงเท่ากับเสริมชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีมากขึ้นหรือมีความเหมาะสมยิ่งขึ้น ดังรายงานของ สนธยา(2533) ได้ทำการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการสังเคราะห์เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 นี้ โดยใช้กรดอะมิโนผสม 16 ชนิดจะให้ผลการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้ดีกว่าการใช้กรดอะมิโนเพียง 4 ชนิด หรือชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น ดังนั้นจึงใช้วัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวันมาทำการทดลองแปรผันหาปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกได้ ปรากฏว่าที่ปริมาณวัตถุดิบผสมเท่ากับ 2.0 เปอร์เซนต์ จะให้ปริมาณเอนไซม์สูงที่สุด แต่ที่ความเข้มข้นของวัตถุดิบผสมเท่ากับ 3.0 และ 4.0 เปอร์เซนต์นั้นไม่สามารถช่วยเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ได้และยังกลับทำให้ผลผลิตต่ำลงอีกด้วย (รูปที่ 7 ข.) ซึ่งมีลักษณะทำนองเดียวกันกับผลในรูปที่ 3 ข. โดยที่ใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นตัวศึกษา เมื่อความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนเพิ่มขึ้นการสร้างเอนไซม์ก็จะเพิ่มขึ้นจนถึงจุดหนึ่งซึ่งมีความเข้มข้นของกรดอะมิโนจากวัตถุดิบมากเกินไป ก็จะเกิดการกดดันการสร้างเอนไซม์ และกรดอะมิโนหรือเปปไทด์หลายชนิดเมื่ออยู่ร่วมกันในบางกรณีนอกจากจะช่วยในการเสริมการสร้างเอนไซม์แล้วยังสามารถกดดันการสร้างเอนไซม์ได้ (Jaroslav และคณะ,1987 ; Doi,1973) ดังผลการทดลองรูปที่ 4 ข.และ 6 ข. วัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับสารสกัดจากยีสต์ เมื่อเปรียบเทียบการใช้กากถั่วเหลืองหรือสารสกัดจากยีสต์เพียงอย่างเดียวโดยวัตถุดิบผสมของกากถั่วเหลืองกับสารสกัดจากยีสต์จะให้ปริมาณเอนไซม์ต่ำกว่าการใช้วัตถุดิบเพียงชนิดเดียว แสดงให้เห็นว่าการใช้วัตถุดิบผสมนี้สามารถทำให้เกิดการกดดันการสร้างเอนไซม์ของเชื้อนี้ได้

5.4 การคัดเลือกชนิดและปริมาณของวัตถุดิบที่เหมาะสมจะใช้เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

การศึกษาหาชนิดและปริมาณของวัตถุดิบที่เหมาะสมจะใช้เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน โดยใช้กลูโคสเป็นตัวศึกษา จากผลการทดลองรูปที่ 8 พบว่า ที่ปริมาณของกลูโคสเท่ากับ 0.25 เปอร์เซนต์ เชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด และจะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น ตั้งแต่ 0.5-1.0 % การเจริญของเชื้อจะเพิ่มขึ้นแต่การสร้างเอนไซม์กลับลดลง ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อมีมากเกินไปทำให้เกิด catabolite repression โดยที่กลูโคสจะไปกดการทำงานของจีนส่วนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ ทำให้ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ได้ หรือทำให้เกิดการชะลอการสร้างเอนไซม์ (Doi,1973;Bernlohr,1964) ระดับความเข้มข้นของกลูโคสที่เพิ่มขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสัมพันธ์กับการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 โดย สนธยา(2533) ได้ศึกษาผลของระดับความเข้มข้นของกลูโคสต่อการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ พบว่าเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสมากขึ้นค่าแอคติวิตีสูงสุดที่ได้จะมีค่าลดต่ำลงเมื่อเทียบกับปริมาณของกลูโคสที่เหมาะสม และการเพิ่มขึ้นของแอคติวิตีระหว่างการเลี้ยงเชื้อจะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆในชั่วโมงแรกๆของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้ก็คล้ายกัน คือ ที่ความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ 0.75 และ 1.0 เปอร์เซนต์ เชื้อจะเริ่มสร้างเอนไซม์ประมาณชั่วโมงที่ 24 ในขณะที่ความเข้มข้นของกลูโคสตั้งแต่ 0-0.5 เปอร์เซนต์นั้นเชื้อจะเริ่มสร้างเอนไซม์ได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8-12 แสดงให้เห็นว่าระดับความเข้มข้นของกลูโคสมีผลต่อการสร้างเอนไซม์จริง ซึ่งความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมจากการทดลองคือ 0.25 เปอร์เซนต์

การคัดเลือกหาชนิดของวัตถุดิบที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน พบว่าเมื่อใช้ กลูโคส,ไฮโดรไลเสทของแป้งมันสำปะหลัง, แป้งข้าวเหนียวและแป้งข้าวโพด เลี้ยงเชื้อจะทำให้ได้แอคติวิตีของเอนไซม์ได้ดีกว่าการใช้ซิเตรท หรือกลูตาเมท และเนื่องจากไฮโดรไลเสทของแป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังนำไปผ่านกระบวนการย่อยสลายให้ได้น้ำตาล ซึ่งต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายและเวลาในการเตรียม สำหรับแป้งข้าวโพดมีผลให้ได้เอนไซม์แอคติวิตีพอๆ กันกับการใช้แป้งข้าวเหนียวแต่ราคาสูงกว่า ดังนั้นแป้งข้าวเหนียวและกลูโคสจึงน่าจะเหมาะสมกว่าในการใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนซิเตรทและกลูตาเมทนั้น

เมื่อนำมาเสริมกับวัตถุดิบอื่นจะช่วยเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ (สนธยา,2533)

Aida(1972) ได้รายงานไว้ว่า การใช้แหล่งคาร์บอนหลายแหล่งปะปนกันอาจทำให้ผลผลิตดีกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว เช่น การเติมอะซีเตทร่วมกับกลูโคสในการเลี้ยงเชื้อ *Corynebacterium sp.* จะช่วยเพิ่มผลผลิตกรดกลูตามิคได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงใช้วัตถุดิบผสมระหว่าง กลูโคส, แป้งข้าวเหนียว, กลูตาเมท และซิเตรท มาทำการผสมกันในอัตราส่วน 1:1 ให้มีปริมาณสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.25 เปอร์เซนต์ จากผลการทดลองรูปที่ 10 การใช้วัตถุดิบผสมไม่ว่าจะเป็นชนิดใดผสมกันก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้วัตถุดิบเพียงชนิดเดียว (จากผลการทดลองรูปที่ 9)แล้ว จะมีการสร้างเอนไซม์ได้น้อยกว่า ในขณะที่จะมีการเจริญได้ดีกว่า คือ สามารถรักษาช่วงของการเจริญในระยะคงที่ (stationary phase)ได้นานกว่าการใช้วัตถุดิบเพียงชนิดเดียวทั้งนี้เป็นเพราะแหล่งคาร์บอนที่ผสมกันสองชนิดนี้มีความแตกต่างในการนำไปใช้โดยจุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอนใดที่เชื้อสามารถนำไปใช้ได้ง่ายก็จะถูกนำไปใช้ในการเจริญและการสร้างพลังงานของเซลล์ก่อน แหล่งคาร์บอนชนิดใดเซลล์นำไปใช้ได้ยากกว่าก็จะถูกนำไปใช้ได้ช้ากว่า(William Burrows,1973) ดังจะเห็นได้จากลักษณะการเจริญของเชื้อเมื่อใช้วัตถุดิบที่เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว (รูปที่ 9 ก.)เชื้อจะมีการเจริญจนถึงชั่วโมงที่ 24 และจะเริ่มลดลงมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้วัตถุดิบผสมสองชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนแล้ว ลักษณะการเจริญของเชื้อหลังจากชั่วโมงที่ 24 เชื้อจะมีการเจริญค่อนข้างคงที่หรือลดลงอย่างช้าๆ บางชนิดยังมีการเจริญสูงขึ้นอีกซึ่ง ได้แก่ วัตถุดิบผสมระหว่างกลูโคสกับแป้งข้าวเหนียว แหล่งต้นตอคาร์บอนนั้นส่วนใหญ่จะเกี่ยวข้องโดยตรงกับการเจริญของเชื้อ ขณะที่ Heineken และ Conner (1972) รายงานว่าผลของแหล่งไนโตรเจนนั้นเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสและแอลคาไลน์โปรตีเอส โดยศึกษาในเชื้อ *B.subtilis* NRRL-B3411

5.5 การขยายส่วนในการผลิตและการศึกษาถึงผลของการเขย่าให้อากาศ

การเขย่าให้อากาศแก่ระบบในการเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 เพื่อผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสทำการทดลองโดยขยายขนาดของขวดรูปชมพู่จากขนาด

500 มิลลิลิตร เป็น 1 ลิตร และแปรผันจำนวนรอบของการเขย่าให้อากาศตั้งแต่ 100-300 รอบต่อนาที จากผลการทดลองรูปที่ 12 ก. การเจริญของเชื้อจะเห็นว่าเมื่อความเร็วรอบของการเขย่าเพิ่มขึ้นการเจริญของเชื้อจะสูงขึ้นตามลำดับยกเว้นที่ความเร็วรอบเท่ากับ 250 และ 300 รอบต่อนาทีมีการเจริญไม่แตกต่างกันนัก

Chain และ Gualandi (1954)ได้รายงานไว้ว่าการละลายของออกซิเจนในขวดเขย่าจะเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มของความเร็วรอบในการเขย่าหรือระยะทางที่ขวดเขย่าเคลื่อนที่ และจุลินทรีย์มีความต้องการใช้ออกซิเจนในขบวนการเมแทบอลิซึมและการหายใจ โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็น *Bacillus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และต้องการอากาศในการเจริญ ดังนั้นปริมาณออกซิเจนที่เพียงพอจะช่วยให้เมแทบอลิซึมเกิดขึ้นได้และดำเนินไปด้วยดีรวมทั้งเซลล์จะมีการเจริญได้สูงด้วย เมื่อพิจารณาดูจากรูปที่ 12 ข.การสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 ที่ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศเท่ากับ 100 รอบต่อนาที แอคติวิตีของเอนไซม์มีน้อยมากและเริ่มที่จะมีการสร้างเอนไซม์เมื่อชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก แสดงให้เห็นว่าการเขย่าให้อากาศนั้นออกซิเจนมีการละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อน้อยเกินไป การเจริญของเซลล์จึงต่ำและมีผลทำให้การสร้างเอนไซม์ต่ำไปด้วย เมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่าขึ้นจนถึง 250 รอบต่อนาที การสร้างเอนไซม์ก็มีมากขึ้นตามจำนวนรอบของการเขย่าและสูงสุดที่ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 250 รอบต่อนาที จนกระทั่งความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 300 รอบต่อนาที ปริมาณเอนไซม์ที่ได้ลดลงมีค่าใกล้เคียงกับที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณออกซิเจนที่มากเกินไปจะกดการสร้างเอนไซม์ของเชื้อก็ได้ (O'Reilly,1983)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างภาชนะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อที่มีขนาดใหญ่ขึ้น คือ จากเดิมใช้ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 150 มิลลิลิตรขยายเป็นขวดขนาด 1 ลิตร บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ 300 มิลลิลิตร จะเห็นว่าอัตราส่วนของปริมาตรบรรจุของขวดกับอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าเท่ากัน เมื่อใช้จำนวนรอบในการเขย่าเท่ากัน เปรียบเทียบในสภาวะการเขย่า 200 รอบต่อนาที จากรูปที่ 11 ข.และ 12 ข. ปรากฏว่าอัตราการเจริญและการสร้างเอนไซม์ไม่แตกต่างกันนัก ทั้งนี้เป็นเพราะว่า การขยายขนาดการผลิตเพิ่มขึ้นเพียงสองเท่า และยังคงอัตราส่วนของปริมาตรอากาศต่ออาหารเลี้ยงเชื้อไว้เท่ากัน

5.6 การเตรียมเอนไซม์โปรตีเอสในรูปผงและการเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่อุณหภูมิต่างๆ

การเตรียมเอนไซม์โปรตีเอสในรูปผงทำโดยการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมซัลเฟต และเอธานอลที่ความเข้มข้นดังในวิธีการทดลองแล้วจึงนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับการทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธีการนำไปกรองด้วย อัลตรา-ฟิวเตรชั่น แล้วจึงทำให้แห้งโดยวิธี ไลโอฟิไลเซชั่น ซึ่งจากผลการทดลองตารางที่ 6 จะเห็นว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ผงที่ได้จากวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซนต์ มีค่าสูงที่สุด คือ 4.61 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อดูจากค่าปริมาณโปรตีนและยูนิตของเอนไซม์ทั้งหมดแล้วจะเห็นว่าสามารถตกตะกอนโปรตีนส่วนที่เป็นเอนไซม์ได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับการตกตะกอนด้วยเกลือโซเดียมซัลเฟต หรือ เอธานอล การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตหรือโซเดียมซัลเฟตนี้มีข้อดีกว่าการตกตะกอนด้วยเอธานอล คือ เป็นวิธีที่ค่อนข้างง่าย ทำได้โดยการค่อยเติมเกลือลงในสารละลายเอนไซม์จนกระทั่งความเข้มข้นที่ต้องการของเอนไซม์ที่จะตกตะกอนก็จะเกิดตะกอนขึ้น สามารถแยกตะกอนออกจากสารละลายได้ด้วยวิธีการกรองและทำให้แห้งโดยวิธีการอบ รวมทั้งความสามารถในการละลายของเอนไซมผงที่เตรียมได้แล้ว จะละลายน้ำได้ดีแต่มีข้อเสียคือเอนไซม์ที่ได้มีเกลือที่ใช้ตกตะกอนปนอยู่ด้วย แต่การแยกเกลือออกจากผลิตภัณฑ์สามารถทำได้โดยใช้ต้นทุนไม่สูง นอกจากนี้ยังมีปัญหาเรื่องการการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ง่าย

(Aunstrup,1979) รายงานว่าการตกตะกอนด้วยตัวทำละลาย เช่น เอธานอล นั้นมีข้อดีคือผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีความบริสุทธิ์สูงกว่าการตกตะกอนด้วยเกลือ ทำให้มีแอคติวิตีสูงกว่าการแยกและทำให้แห้งใช้เวลาสั้นสามารถแยกเอธานอลและนำมาใช้ใหม่ได้โดยการกลั่น แต่ต้นทุนในการกลั่นกลับมาใช้ใหม่จะสูงและสามารถนำกลับมาใช้ได้ใหม่ในปริมาณต่ำ แต่จากผลการทดลองในตารางที่ 6 กลับพบว่า แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้ต่ำกว่าการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และใช้เวลาในการอบแห้งนานกว่า ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์โปรตีเอสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 นี้ ส่วนวิธีการทำให้เข้มข้นด้วยอัลตรา-ฟิวเตรชั่น แม้ว่าจะได้จำนวนยูนิตของเอนไซม์สูง แต่ก็มีปัญหาในการกรองเนื่องจากการอุดตันของแผ่นเมมเบรนที่ใช้กรองมีความละเอียดสูง อุดตันได้ง่ายถ้าสารที่ใช้กรองมีอนุภาคใหญ่ ทำให้ต้องใช้เวลานานในการกรองและการทำแห้งโดยวิธี ไลโอฟิไลเซชั่น

อีกทั้งแผ่นเมมเบรนยังมีราคาแพงด้วย แต่มีข้อดีที่มีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์อยู่ในระดับต่ำ (Aunstrup,1979)

วิธีการเตรียมเอนไซม์ในรูปผงที่ต้องการความบริสุทธิ์และมีแอคติวิตีสูงอาจต้องใช้วิธีการหลายๆวิธีประกอบกัน แต่อย่างไรก็ดีสำหรับการทดลองนี้เลือกใช้วิธีการเตรียมเอนไซม์ผงโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซนต์เนื่องจากมีข้อได้เปรียบวิธีอื่นอยู่ทั้งด้านผลผลิตที่ได้และความสะดวกในการเตรียมผงเอนไซม์ จึงนำมาทำการทดลองโดยทำการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและผสมผงเซลลูโลส 0.5 เปอร์เซนต์เพื่อเป็นตัวจับกับเอนไซม์ (Aunstrup,1979) จากการทดลอง (ตารางที่ 7) การเติมผงเซลลูโลสจะทำให้เวลานำไปกรองและอบแห้งทำได้ง่ายและใช้เวลาน้อย รวมทั้งเอนไซม์ที่อบแห้งแล้วจะนำมาบดให้เป็นผงละเอียดได้ง่าย และเมื่อเปรียบเทียบกับการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแต่ไม่เติมผงเซลลูโลส ปรากฏว่าค่าแอคติวิตีที่ได้เปรียบเทียบกันแล้วมีความแตกต่างกันน้อยมาก แต่วิธีที่เติมผงเซลลูโลสจะมีข้อเสียเปรียบตรงที่เมื่อนำมาละลายน้ำหรือบัฟเฟอร์จะละลายได้ช้ากว่าเอนไซม์ผงที่ไม่ได้เติมผงเซลลูโลส

การเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่เตรียมได้ในสภาวะที่อุณหภูมิต่างๆกันเป็นเวลา 120 วัน (ตารางที่ 8) ปรากฏว่าที่อุณหภูมิ -20 ถึง 30 องศาเซลเซียส สามารถเก็บเอนไซม์ไว้ได้โดยไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีเลย ขณะที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สามารถเก็บไว้ได้นานถึง 50 วันโดยไม่สูญเสียแอคติวิตีเช่นกัน และเมื่อเก็บไว้จนครบ 120 วัน แอคติวิตีของเอนไซม์ยังคงเหลืออยู่ถึง 85.2 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อเก็บไว้จนครบ 120 วัน แอคติวิตีเอนไซม์ผงลดลงเหลือ 52.5 เปอร์เซนต์ ซึ่งจากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 ที่เตรียมได้ในรูปผงนี้มีความสามารถในการเก็บที่อุณหภูมิค่อนข้างสูงโดยไม่เสียแอคติวิตี ดังนั้นการเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่เตรียมได้นั้น ถ้าเก็บไว้ที่อุณหภูมิที่ไม่สูงกว่าอุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) ก็เพียงพอที่จะสามารถเก็บรักษาแอคติวิตีของเอนไซม์ไว้ได้นานโดยไม่มีความจำเป็นในการเก็บที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งนับเป็นคุณสมบัติที่ดีประการหนึ่งของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 นี้

สรุปผลการทดลอง

1. การหาสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยมีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนและสารสกัดจากยีสต์ 2.0 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน พบว่าสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 เปอร์เซนต์ $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 เปอร์เซนต์ และ $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 เปอร์เซนต์ โดยปรับ pH เท่ากับ 7.0

2. pH ที่เหมาะสมในการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 คือ pH 10.5

3. การใช้วัตถุดิบ กากถั่วเหลือง, กากเมล็ดทานตะวัน, กากมะพร้าว, วีทกลูเตน และคอร์นกลูเตน เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์ พบว่ากากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวันจะให้ผลผลิตเอนไซม์สูง

4. วัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวันในอัตราส่วน 1:1 สามารถช่วยเพิ่มผลผิตเอนไซม์ได้สูงขึ้นกว่าการใช้วัตถุดิบเพียงชนิดเดียวและปริมาณวัตถุดิบผสมที่เหมาะสมจะใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ คือ 2.0 เปอร์เซนต์

5. วัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน คือ กลูโคส, คาสซาวาสตาร์ชไฮโดรไลเสท, แป้งข้าวเหนียว, แป้งข้าวโพด, ซิเตรท, กลูตาเมท พบว่าแป้งข้าวเหนียวเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมที่สุดที่จะใช้เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

6. การใช้วัตถุดิบผสมระหว่าง แป้งข้าวเหนียวกับกลูโคส, แป้งข้าวเหนียวกับซิเตรท แป้งข้าวเหนียวกับกลูตาเมท, กลูโคสกับซิเตรท, กลูโคสกับกลูตาเมทและกลูตาเมทกับซิเตรท ในอัตราส่วนเท่ากับ 1:1 ไม่สามารถเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ โดยได้ค่าแอคติวิตีต่ำกว่าการใช้แป้งข้าวเหนียวเพียงชนิดเดียว

7. การเขย่าให้อากาศในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ในระดับขวดเขย่าที่ความเร็วรอบต่างๆมีผลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 โดยที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาทีจะช่วยให้ได้ผลผลิตเอนไซม์สูง

8. การเตรียมเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสโดยเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 พบว่า วิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซนต์ และนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8-10 ชั่วโมง เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่นในการวิจัยนี้ และเมื่อเติมผงเซลลูโลสปริมาณ 0.5 เปอร์เซนต์ จะช่วยให้เอนไซม์ผงที่ได้ไม่จับกับภาชนะ และใช้เวลาในการอบแห้งน้อยลง

9. เอนไซม์ผงที่เตรียมได้สามารถที่จะเก็บรักษาไว้ได้ที่อุณหภูมิห้อง หรือ ต่ำกว่า ในระยะเวลานาน 120 วันโดยไม่สูญเสียแอคติวิตีเลย และยังสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงถึง 45 และ 60 องศาเซลเซียสโดยไม่เสียแอคติวตีได้ระยะเวลาหนึ่ง ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่ดีประการหนึ่งด้วย