

## บทที่ 3

### ตรวจเอกสาร

#### 3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ CGTase

เอนไซม์ไซโคลเดกซ์ทรินไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase, E.C. 2.4.1.19) ผลิตได้จากแบคทีเรียหลายชนิดแต่ส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียในกลุ่มของ *Bacillus* แบคทีเรียเหล่านี้จะผลิตเอนไซม์ CGTase แล้วขับออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) เอนไซม์จากแบคทีเรียต่างสายพันธุ์นอกจากจะมีสมบัติบางอย่างต่างกัน เช่น พีเอช และ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานต่างกัน น้ำหนักโมเลกุล และยังทำให้เกิดไซโคลเดกซ์ทริน (CDs) ผลิตภัณฑ์หลักต่างชนิดกัน หรือได้อัตราส่วนของ  $\alpha:\beta:\gamma$ -CD แตกต่างกัน ดังตารางที่ 3.1 โดยแบคทีเรียที่รายงานส่วนใหญ่ผลิต  $\beta$ -CD เป็นผลิตภัณฑ์หลัก รองลงมาคือ  $\alpha$ -CD และ  $\gamma$ -CD ตามลำดับ แบคทีเรียที่มีอัตราส่วน  $\alpha : \beta : \gamma$  CDs ซึ่งแสดงความแตกต่างของ CD แต่ละชนิดอย่างมากจะเป็นผลดีต่อกระบวนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ของไซโคลเดกซ์ทรินแต่ละชนิด

#### 3.2 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์ CGTase

ในการพิจารณาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase จะแยกพิจารณาเป็นสองส่วน ส่วนแรก คือ ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ในขวดเขย่า และส่วนที่สอง คือ ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

##### 3.2.1 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์ CGTase ในขวดเขย่า

การเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าจะมีการทำงานแบบไม่ต่อเนื่อง (batch culture) ขณะทำการเลี้ยงเชื้อจะมีการเขย่าอย่างสม่ำเสมอและควบคุมอุณหภูมิตลอดการทดลอง ในทุกงานวิจัยจะใช้การเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่าเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ และหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ เช่น ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ พีเอช อุณหภูมิ และ เปอร์เซ็นต์เชื้อตั้งต้น

ตารางที่ 3.1 สายพันธุ์แบคทีเรียที่มีรายงานการผลิตไซโคลเดกซ์ทริน (CDs) ชนิดต่างๆ

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ผลิตภัณฑ์หลัก/ อัตราส่วน $\alpha:\beta:\gamma$	เอกสารอ้างอิง
<i>Bacillus macerans</i> IFO 3490	$\alpha$ -CD / 2.7:1:1	Kitahata และ Okada, 1974
<i>Bacillus macerans</i> IAM 1243	$\alpha$ -CD	Kitahata และ คณะ, 1974
<i>Bacillus macerans</i> ATCC 8514	$\alpha$ -CD	Depinto และ Campbell, 1968
<i>Bacillus</i> sp. INMIA T6 (thermophilic strain)	$\alpha$ -CD	Abelian และ คณะ, 1994
<i>Bacillus</i> sp. INMIA 1919	$\alpha$ -CD	Abelian และ คณะ, 1994
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	$\alpha$ -CD	Sabioni และ Park, 1992
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	$\alpha$ -CD	Kabaivanova และ คณะ, 1999
<i>Klebsiella pneumoniae</i> M 5 a	$\alpha$ -CD	Bender, H., 1986
<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i> AS-22	$\alpha$ -CD	Gawande และ Patkar, 1999
<i>Klebsiella oxytoca</i> 19-1	$\alpha$ -CD/96.5:3.5:0	Lee และ คณะ, 1992
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp. NP253	$\beta$ -CD / 1:24.1:7.2	วรางคณา สงวนพงษ์, 2540
<i>Bacillus megaterium</i> No5	$\beta$ -CD / 1:2.4:1	Kitahata และ Okada, 1974
<i>Bacillus cereus</i> RJ 30 NCIMB 13123	$\beta$ -CD	Ramakrishna และ คณะ, 1994
<i>Bacillus circulans</i> C31	$\beta$ -CD / 1:10.5:0	Pongsawasdi และ Yagisawa, 1987
<i>Bacillus</i> sp. A11	$\beta$ -CD / 1:4.6:1.6	สุรศักดิ์ ละลอกน้ำ, 2540
<i>Bacillus circulans</i> ATCC 9995	$\beta$ -CD / 1:9.8:3.2	อรุณี ตรีศิริโรจน์, 2537
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp. ATCC 21783	$\beta$ -CD / 1:11.5:1.5	Nakamura และ Horikoshi, 1976
<i>Bacillus</i> sp. BE101	$\beta$ -CD / 1.7:6.6:1.7	Lee และ Kim, 1991
<i>Bacillus</i> sp. INMIA T42 (thermophilic strain)	$\beta$ -CD	Abelian และ คณะ, 1994
<i>Bacillus</i> sp. INMIA A7/1 (alkalophilic strain)	$\beta$ -CD/ 1:58.4:7.4	Abelian และ คณะ, 1994
<i>Bacillus halophilus</i> INMIA 3849	$\beta$ -CD/ 3:20:1	Abelian และ คณะ, 1995
<i>Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes</i> EM1	$\beta$ -CD/ 43:46:11	Wind และ คณะ, 1995
<i>Bacillus firmus</i> NCIM 5119	$\beta$ -CD	Gawande และ คณะ, 1998
<i>Bacillus firmus</i>	$\beta$ -CD/ 0.08:1:0.2	Goel และ Nene, 1995
<i>Bacillus ohbensis</i> sp. nov. C-1400	$\beta$ -CD	Sin และ คณะ, 1991
<i>Bacillus lentus</i>	$\beta$ -CD / 1:67:1.6	Sabioni และ Yong, 1992
<i>Bacillus</i> sp. AL-6 (alkalophilic strain)	$\gamma$ -CD	Fujita และ คณะ, 1990
<i>Bacillus firmus/lentus</i> 290-3	$\gamma$ -CD	Englbrecht และ คณะ, 1990
<i>Brevibacterium</i> sp.	$\gamma$ -CD	Mori และ คณะ, 1994

Production ratios in percent (%)

### 3.2.1.1 ผลของแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ CGTase

สารประกอบคาร์บอนนอกจากใช้เป็นแหล่งคาร์บอนแล้วยังอาจใช้เป็นแหล่งพลังงานด้วย แหล่งคาร์บอนส่วนใหญ่ที่นิยมนำมาทดสอบคือ soluble starch อะมิโลเพกทิน เดกซ์ทริน อะมิโลส กลูโคส น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ ชนิดต่างๆ และ แป้งหลายชนิด เช่น แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียว แป้งข้าวโพด แป้งสาลี แป้งมันสำปะหลัง และ แป้งมันฝรั่ง โดยส่วนใหญ่จุลินทรีย์จะเจริญได้ในทุกแหล่งคาร์บอน แต่การผลิตเอนไซม์ CGTase จะเกิดขึ้นได้ดีในเฉพาะบางแหล่งคาร์บอนเท่านั้น

ในหลายงานวิจัยพบว่าเชื้อส่วนใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้เมื่อใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและน้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น กลูโคส ซูโครส ซาโลส มอลโตส ฟรุคโตส แลคโตส ซอร์บิทอล แมนนิทอล รวมทั้งการใช้ ซีเตรท และ กลีเซอรอล แต่การผลิตเอนไซม์ CGTase จะไม่สามารถเกิดขึ้นได้เลยในแหล่งคาร์บอนจำพวกนี้ [Nakamura และ Horikoshi, 1976; Sabioni และ Park, 1992; Gawande และ คณะ, 1998; Gawande และ Patkar, 1999; Lee และ คณะ, 1992] เช่นเดียวกับการใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นอะมิโลสมาทดสอบความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* AS-22, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus* sp.A11 พบว่าเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็น อะมิโลส การเจริญเติบโตของเซลล์จะสูง แต่จะให้อัตราการผลิตเอนไซม์ต่ำ [Gawande และ Patkar, 1999; Lee และ คณะ, 1992] นอกจากนี้พบว่าการใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งที่ผ่านการไฮโดรไลซิสแล้ว เช่น แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการไฮโดรไลซิส [Gawande และ คณะ, 1998] หรือ แป้งข้าวเหนียวที่ผ่านการไฮโดรไลซิส [วรางคณา สงวนพงษ์, 2540] จะให้อัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase ต่ำ ในการผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกันจะส่งผลให้อัตราการผลิตเอนไซม์ต่างกัน ดังตารางที่ 3.2

ความเข้มข้นของสับสเตรท (แหล่งคาร์บอน) ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ พบว่าการที่ความเข้มข้นของสับสเตรทสูงๆไม่ได้ทำให้เกิดการสังเคราะห์เอนไซม์สูงขึ้นตามไปด้วย แต่ในทางตรงกันข้ามในสับสเตรทบางประเภทที่ความเข้มข้นสูงๆอาจเป็นการยับยั้งการผลิตเอนไซม์ (substrate inhibition) [Kabaivanova และ คณะ, 1999] โดยส่วนมากความเข้มข้นของสับสเตรทจะอยู่ในช่วง 1-2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร



ตารางที่ 3.2 สายพันธุ์แบคทีเรียที่เรียกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase

สายพันธุ์แบคทีเรีย	แหล่งคาร์บอน	กิจกรรมของเอนไซม์ สูงสุด	เอกสารอ้างอิง
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp. NP 532	แป้งข้าวเหนียว	14 U/ml <sup>a</sup>	วรวงคณา สงวนพงษ์, 2540
<i>B. circulans</i> ATCC 9995	แป้งมันสำปะหลัง	1400 U/ml <sup>a</sup> (ในเวลา 24 ชม.)	อรุณี ตริศิริโรจน์, 2537
<i>Bacillus</i> sp. A11	แป้งข้าวสาลี	1520 U/ml (ในเวลา 75 ชม.)	
	แป้งข้าวเจ้า	714.14 U/mg prot. <sup>a</sup>	วัลยา เดชชัยกุล, 2533
	soluble starch	703.01 U/mg prot.	
	เดกซ์ทรีน II	3932 U/mg prot. <sup>a</sup>	นาถนารี รัฐปัตย์, 2539
	แป้งข้าวเจ้า	2026 U/mg prot.	
<i>B. firmus</i> NCIM 5119	แป้งข้าวโพด	1.05 U/ml <sup>b</sup>	Gawande และ คณะ, 1998
	แป้งข้าวสาลี	0.59 U/ml	
<i>B. cereus</i> RJ 30 NCIMB 13123	wheat bran extract	106 U/ml <sup>b</sup>	Jamuna และ คณะ, 1993
	ไซโลส	65 U/ml	
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp. ATCC 21783	soluble starch	1.70 U/ml <sup>a</sup>	Nakamura และ Horikoshi, 1976
	มอลทิทาล์	1.02 U/ml	
<i>Bacillus circulans</i> C31	soluble starch	93.3 U/ml <sup>a</sup>	โชติรส พิทยาภรณ์ และ มาลี เจริญวิทย์วรกุล, 2531
	แป้งมันสำปะหลัง	81.4 U/ml	
	แป้งข้าวเจ้า	80.7 U/ml	
<i>B. lentus</i>	อะไมโลเปคติน	74 U/ml <sup>a</sup>	Sabioni และ Park, 1992
	เดกซ์ทรีน	68 U/ml	
	soluble starch	61 U/ml	
<i>B. stearothermophilus</i> R2	กลูโคส ร่วมกับ กรดกลูตามิก	33.9 U/mg prot. <sup>c</sup>	Kabaivanova และ คณะ, 1999
<i>Klebsiella oxytoca</i> 19-1	soluble starch	53 U/ml <sup>c</sup>	Lee และ คณะ, 1992
<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i> AS-22	เดกซ์ทรีน	2.99 U/ml <sup>c</sup>	Gawande และ Patkar, 1999
	β-CD	2.78 U/ml	
	แป้งมันสำปะหลัง	2.72 U/ml	

<sup>a</sup> คือ การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดย Iodine method

<sup>b</sup> คือ การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดย phenolphthalein method

<sup>c</sup> คือ การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดย Lejuene et al's method

หมายเหตุ : การวัดกิจกรรมของเอนไซม์วิธีเดียวกัน (a, b, c) แต่คนละงานวิจัยมีการกำหนดชนิดของการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ หรือ รายละเอียดในการปฏิบัติต่างกัน ทำให้ไม่สามารถนำค่ากิจกรรมของเอนไซม์มาเปรียบเทียบกันได้โดยตรง

### 3.2.1.1 ผลของแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์ CGTase

จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 5-50% ของน้ำหนักแห้ง ดังนั้นไนโตรเจนจึงเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารประกอบไนโตรเจนในการเจริญเติบโตต่างกัน ในการผลิตเอนไซม์ CGTase แหล่งไนโตรเจนที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีทั้งอยู่ในรูปของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่นิยมใช้ในการทดสอบได้แก่ corn steep liquor (CSL), yeast extract, beef extract, peptone, polypeptone, defatted soybean, corn meal, casein และ urea ส่วนแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ได้แก่  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  และ  $\text{NH}_4$ -citrate เชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมซึ่งให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดต่างกัน ดังตารางที่ 3.3 แต่มีบางงานวิจัย เช่น ในการเลี้ยงเชื้อ *Alkalophilic Bacillus sp.* ATCC 21783 ที่พบว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ไม่สามารถใช้เหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ [Nakamura และ Horikoshi, 1976] และ ในการเลี้ยงเชื้อ *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* AS-22 พบว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  และ  $\text{NH}_4\text{Cl}$  จะให้กิจกรรมของเอนไซม์น้อยมาก [Gawande และ Patkar, 1999]

### 3.2.1.2 ผลของแหล่งเกลืออนินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์ CGTase

แหล่งเกลืออนินทรีย์ที่มีผลต่อการทำงานของเซลล์จุลินทรีย์ ได้แก่ สารประกอบของฟอสฟอรัส แมกนีเซียม ออกซิเจน ซัลเฟอร์ และแคลเซียม แต่จะมีผลมากน้อยอย่างไรขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังมีเกลืออนินทรีย์อื่นๆที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์หรือการผลิตเอนไซม์แต่จุลินทรีย์ต้องการในปริมาณน้อยจึงไม่จำเป็นต้องเติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อเนื่องจากมีปะปนมากับแหล่งคาร์บอนหรือแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงไปเช่น โคบอลต์ เหล็ก สังกะสี แมงกานีส เป็นต้น แหล่งเกลืออนินทรีย์ที่นิยมเติมลงไปในการเลี้ยงเชื้อได้แก่  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , และ  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) เป็นแร่ธาตุหนึ่งที่นิยมในอาหารเลี้ยงเชื้อ และยังเป็นสารเคมีที่ใช้ในการปรับพีเอชไปในตัวด้วย Horikoshi และ คณะ ได้รายงานสิทธิบัตรปี ค.ศ. 1974 ไว้ว่า เกลือคาร์บอเนตหรือไบคาร์บอเนตมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ต่างกัน ในการผลิตเอนไซม์ CGTase จาก *alkalophilic Bacillus sp.* No 38-2 (ATCC 21783) จะได้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อมี  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 %นน.โดยปริมาตร เป็นตัวปรับพีเอชเช่นเดียวกับการรายงานของ Gawande และ คณะ, 1998 ในการผลิตเอนไซม์ CGTase จากเชื้อ *B. firmus* ส่วนในงานวิจัยของอุไรวรรณ รัชทร, 2535 พบว่า *Bacillus sp.* A11 จะผลิตเอนไซม์ CGTase ได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Horikoshi ซึ่งประกอบด้วย  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.75% นอกจากนี้ยังพบว่าความ

ตารางที่ 3.3 สายพันธุ์แบคทีเรียที่เรียกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase

สายพันธุ์แบคทีเรีย	แหล่งไนโตรเจน	กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด	เอกสารอ้างอิง
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp. NP 532	Raw brewery yeast waste (BYW)	14.2 U/ml <sup>a</sup>	วรางคณา สงวนพงษ์, 2540
<i>B. circulans</i> ATCC 9995	CSL & (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1328 U/ml <sup>a</sup>	อรุณี ตริศิริโรจน์, 2537
<i>Bacillus</i> sp. A11	Peptone & Yeast extract	20 U/ml <sup>a</sup>	อุไรวรรณ รัชธร, 2535
<i>B. firmus</i> NCIM 5119	Pharmamedia & Yeast extract	0.69 U/ml <sup>b</sup>	Gawande และ คณะ, 1998
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp. ATCC 21783	Proflo & Yeast extract	0.60 U/ml	Nakamura และ Horikoshi, 1976
	Yeast extract	2.16 U/ml <sup>a</sup>	
	CLS	1.67 U/ml	
<i>B. lentus</i>	Defatted soy bean	1.27 U/ml	Sabioni และ Park, 1992
	Yeast extract	71 U/ml <sup>a</sup>	
	CSL & Yeast extract	71 U/ml	
	Meat extract & Yeast extract	67 U/ml	
<i>Klebsiella oxytoca</i> 19-1	Polypeptone	53 U/ml <sup>c</sup>	Lee และ คณะ, 1992
<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i> AS-22	Peptone & Yeast extract	2.83 U/ml <sup>c</sup>	Gawande และ Patkar, 1999
	Casein acid hydrolysate & Yeast extract	2.48 U/ml	
	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> & Yeast extract	2.56 U/ml	

<sup>a</sup> คือ การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดย Iodine method

<sup>b</sup> คือ การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดย phenolphthalein method

<sup>c</sup> คือ การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดย Lejuene et al's method

หมายเหตุ : การวัดกิจกรรมของเอนไซม์วิธีเดียวกัน (a, b, c) แต่คนละงานวิจัยมีการกำหนดยูนิตของการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ หรือ รายละเอียดในการปฏิบัติต่างกัน ทำให้ไม่สามารถนำค่ากิจกรรมของเอนไซม์มาเปรียบเทียบกันได้โดยตรง



เข้มข้นของ  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  มีผลต่อระยะปรับตัว (lag phase) และค่าความแตกต่างของพีเอช ระหว่างค่าพีเอชเริ่มต้นกับค่าพีเอช ที่ต่ำสุดในการเลี้ยงเชื้อ ( $\Delta \text{pH}_{\text{max}}$ ) [Makela และ คณะ, 1990] ดังแสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 แสดงอิทธิพลของโซเดียมคาร์บอเนตในการเลี้ยงเชื้อ Alkalophilic *Bacillus* sp. ATCC 21783 [Makela และ คณะ, 1990]

$\text{Na}_2\text{CO}_3$ (%)	ระยะปรับตัว (ชม.)	CGTase (ยูนิตต่อมล.)	$\Delta \text{pH}_{\text{max}}$
0.25	12	53	3.4
0.50	13	10	3.5
0.75	15	25	1.5
1.00	34	31	1.4
1.25	62	32	1.2
1.50	95	31	1.2
1.75	120	15	1.1

อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุอื่นๆที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด สรุปได้ดังตารางที่ 3.5

### 3.2.1.3 ผลของพีเอชและอุณหภูมิในการผลิตเอนไซม์ CGTase

ค่าพีเอช ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปมักเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์แตกต่างกันตามชนิดของเชื้อพบว่าจุลินทรีย์ที่มีการสร้างเอนไซม์ CGTase มีทั้งจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีในค่าพีเอชที่เป็นกลาง และที่เป็นเบส (pH 7-10) ดังตารางที่ 3.6

อุณหภูมิ สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้นขึ้นอยู่กับเชื้อแต่ละประเภท ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 ประเภท คือ เชื้อที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส (psychophiles), เชื้อที่เจริญได้ดีในช่วง 35 องศาเซลเซียส (mesophiles) และเชื้อที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส (thermophiles) ค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการผลิตเอนไซม์ CGTase แสดงในตารางที่ 3.6 ซึ่งโดยส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ชนิด mesophiles

ตารางที่ 3.5 สายพันธุ์แบคทีเรียที่เรียกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase

สายพันธุ์แบคทีเรีย	แหล่งคาร์บอน (% w/v)	แหล่งไนโตรเจน (% w/v)	แร่ธาตุอื่นๆ (% w/v)	เอกสารอ้างอิง
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp. NP 532	แป้งข้าวเหนียว 2%	Raw BYW 0.5% Peptone 0.5 %	$K_2HPO_4$ 0.1%, $Na_2CO_3$ 1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%	วรางคณา สงวนพงษ์, 2540
<i>B. circulans</i> ATCC 9995	แป้งมันสำปะ- หลัง 1%	CSL 5%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5%	$CaCO_3$ 0.5%	อรุณี ดิเรศิริโรจน์, 2537
<i>Bacillus</i> sp. A11	แป้งข้าวเจ้า 1%	Peptone 0.5%, Yeast extract 0.5%	$K_2HPO_4$ 0.1%, $Na_2CO_3$ 0.75%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%	อุไรวรรณ รัชธร, 2535
<i>B. firmus</i> NCIM 5119	แป้งข้าวโพด 2.1%	Pharmamedia 2.19%, Yeast extract 2.26%	$Na_2HPO_4$ 0.1%, $Na_2CO_3$ 1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%	Gawande และ คณะ, 1998
<i>B. cereus</i> RJ 30 NCIMB 13123	Wheat bran extract 1.5%	Peptone 0.5%	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, $K_2HPO_4$ 0.1%	Ramakrishna และ คณะ, 1994
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp. ATCC 21783	Soluble starch 1%	CSL 5%	$K_2HPO_4$ 0.1%, $Na_2CO_3$ 1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%	Nakamura และ Horikoshi, 1976
<i>Bacillus circulans</i> C31	Soluble starch 1%	Polypeptone 1% , Beef extract 0.5%, Yeast extract 0.2%	$NaCl$ 0.2%	Pongsawasdi และ Yagisawa, 1987
<i>B. lentus</i>	อะมิโลเพกติน 2%	Yeast extract 0.5%, CSL 1%	$K_2HPO_4$ 0.1%, $Na_2CO_3$ 1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%	Sabioni และ Park, 1992
<i>B. stearothermophilus</i> R2	กลูโคส 0.5%, กรดกลูตามิก 0.1%	Peptone 0.5%, Yeast extract 0.5%	$K_2HPO_4$ 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%	Kabaivanova และ คณะ, 1999
<i>Klebsiella oxytoca</i> 19-1	Soluble starch 1%	Polypeptone 1%	$K_2HPO_4$ 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%	Lee และ คณะ, 1992
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>pneumoniae</i> AS-22	เดกซ์ทรีน 4.93%	Peptone 2.06%, Yeast extract 1.83%	$NH_4H_2PO_4$ 0.67%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%	Gawande และ Patkar, 1999

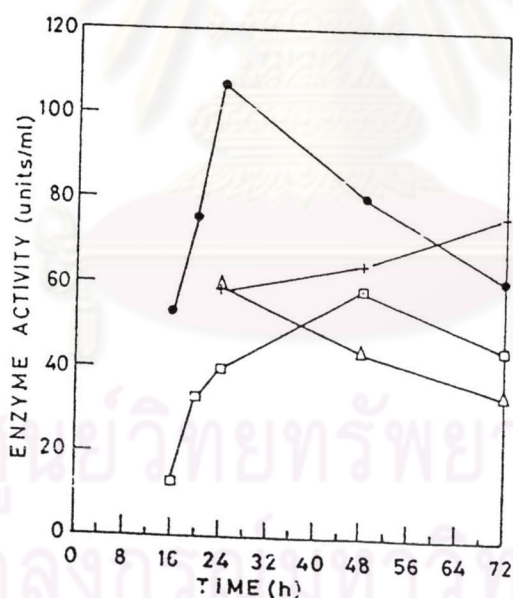


ตารางที่ 3.6 ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิที่เหมาะสมใน  
การผลิตเอนไซม์ CGTase

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ค่าพีเอชเริ่มต้น	อุณหภูมิ (°C)	เอกสารอ้างอิง
<i>Alkalophilic Bacillus sp.</i> NP 523	10.0	25	วรางคณา สงวนพงษ์, 2540
<i>Bacillus sp.</i> A11	9.0	37	วัลยา เตชชัยกุล, 2534
<i>Bacillus circulans</i> C31	7.0	-	โชติรส พิทยาภรณ์ และ มาลี เจริญวิทย์วรกุล, 2531
<i>Bacillus cereus</i> (RJ 30) NCIMB 13123	7.0	37	Jamuna และ คณะ, 1993
<i>Bacillus circulans</i> ATCC 9995	8.0	35	อรุณี ตริศิริโรจน์, 2537
<i>Bacillus circulans var alkalophilus</i> ATCC 21783	10.3	37	Nakamura และ Horikoshi, 1976
<i>Bacillus firmus</i>	9.8	-	Gawande และ คณะ, 1998
<i>Bacillus halophilus</i> INMIA-3849	7.2	37	Abelian และ คณะ, 1991
<i>Bacillus macerans</i> ATCC 8514	7.0	40	DePinto และ Campbell, 1974
<i>Bacillus macerans</i> IFO 3490	7.0	37	Kitahata และ คณะ, 1974
<i>Bacillus megatarium</i> No5	7.0	37	Kitahata และ คณะ, 1974
<i>Bacillus ohbensis sp. nov.</i> c-1400	10.0	30	Sin และ คณะ, 1991
<i>Bacillus sp.</i> AL-6	10.0	38	Fujita และ คณะ, 1990
<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i> AS- 22	9.5	28	Gawande และ Patkar, 1999
<i>Klebsiella oxytoca</i> 19-1	7.0	37	Gawande และ คณะ, 1998

### 3.2.1.4 ระบบที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อในขวดเขย่า

งานวิจัยของ Ramakrishna และ คณะ, 1993 ได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus cereus* (RJ 30) ในขวดเขย่าโดยใช้ระบบการหมักแตกต่างกัน 3 ระบบ คือ การหมักในระบบ submerged, solid substrate และ slurry fermentation เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ CGTase ในการหมักทั้ง 3 ระบบ กับ การหมักในระบบ submerged กับ wheat bran extract พบว่าถึงแม้ว่าการหมักในระบบ submerged กับ wheat bran extract จะได้กิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 108 ยูนิตต่อมล. ที่เวลา 24 ชม. แต่หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์จะลดต่ำลง ตรงข้ามกับการหมักในระบบ slurry ที่เมื่อเวลาชั่วโมงที่ 24 จะมีกิจกรรมต่ำกว่าการหมักในระบบ submerged กับ wheat bran extract ถึงครึ่งหนึ่ง แต่เมื่อเวลาผ่านไปกิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นจนถึงเวลามากกว่า 72 ชม. การหมักในระบบ slurry จะให้กิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 72 ยูนิตต่อมล. ดังรูปที่ 3.1 ถึงแม้ว่าผลการทดลองที่ได้จะพบว่าสามารถเลี้ยงเชื้อในระบบ solid substrate และ slurry ได้ดี แต่ต้องไม่ลืมว่าการหมักในระบบ submerged เป็นทางเลือกที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตทางการค้าในอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องจากประโยชน์ทางด้านการทำงาน ซึ่งสามารถควบคุมพารามิเตอร์ต่างๆได้อย่างแน่นอน เช่น การเติมอากาศ การกวน อุณหภูมิ และ พีเอช และยังสามารถรักษาการฆ่าเชื้อในระดับสูงไว้ได้ [Ramakrishna และ คณะ, 1994]



รูปที่ 3.1 การเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ในระบบการหมักต่างชนิด (□) submerged fermentation; (Δ) solid substrate fermentation; (+) slurry fermentation; (●) submerged with wheat bran extract [Ramakrishna และ คณะ, 1994]

จากปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase ดังที่กล่าวมาข้างต้นสามารถสรุปเชื้อแบคทีเรียและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ในขวดเขย่าได้ดังตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 สายพันธุ์แบคทีเรียและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase ในขวดเยาะ

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ผลิตภัณฑ์หลัก/ อัตราส่วน $\alpha:\beta:\gamma$	แหล่งคาร์บอน	ค่าพีเอช	อุณหภูมิ (°C)	ระบบในการเลี้ยง เชื้อ	เวลาที่ให้กิจกรรม สูงสุด (ชม.)	กิจกรรมของ เอนไซม์สูงสุด*	เอกสารอ้างอิง
<i>Alkalophilic Bacillus</i> sp. NP 532	$\beta$ -CD / 1:24.1:7.2	แป้งข้าวเหนียว	10	25	Submerged	60-80	14.1 U/ml	วราภรณ์ สงวนพงษ์, 2540
<i>B. circulans</i> ATCC 9995	$\beta$ -CD / 1:9.8:3.2	แป้งมันสำปะหลัง	8	35	Submerged	50-96	1400 U/ml	อรุณี ตีศรีโรจน์, 2537
<i>Bacillus</i> sp. A11	$\beta$ -CD / 1:9.7:0	แป้งข้าวจ้าว	9	37	Submerged	42	36 U/ml หรือ 78 U/mg prot.	อุไรวรรณ วัชร, 2535
<i>B. firmus</i> NCIM 5119	$\beta$ -CD	แป้งข้าวโพด	9.8	-	Submerged	80	7.05 U/ml	Gawande และ คณะ, 1998
<i>B. cereus</i> RJ 30 NCIMB 13123	$\beta$ -CD	wheat bran extract	7	37	Submerged	24	108 U/ml	Ramakrishna และ คณะ, 1994
		wheat bran			Slurry	48	58 U/ml	
		wheat bran				72	77 U/ml	
		wheat bran			Solid substrate	24	60 U/ml	
<i>Alkalophilic Bacillus</i> sp. ATCC 21783	$\beta$ -CD / 1:11.5:1.5	soluble starch	10.3	37	Submerged	48	11.73 U/ml	Nakamura และ Horikoshi, 1976
<i>Bacillus circulans</i> C31	$\beta$ -CD / 1:10.5:0	soluble starch	7.2	30	Submerged	96	201.6 U/ml หรือ 86.7 U/mg prot.	Pongsawasdi และ Yagisawa, 1987
<i>B. lentus</i>	$\beta$ -CD / 1:67:1.6	อะไมโลเปคติน	-	37	Submerged	37	74 U/ml	Sabioni และ Park, 1992
<i>B. stearothermophilus</i> R2	$\alpha$ -CD	กลูโคส ร่วมกับ กรด กลูตามิก	9	60	Submerged	48	19 U/ml หรือ 33.9 U/mg prot.	Kabaivanova และ คณะ, 1999
<i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i> AS-22	$\alpha$ -CD	เดกซ์ทริน	9.5	28	Submerged	12	16.5 U/ml	Gawande และ Patkar, 1999

\* การวัดกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละงานวิจัยมีการกำหนดชนิดของสารวัดกิจกรรมของเอนไซม์ หรือ รายละเอียดในการปฏิบัติต่างกัน ทำให้ไม่สามารถนำค่ากิจกรรมของเอนไซม์มาเปรียบเทียบกันได้โดยตรง



### 3.2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ CGTase ในถังปฏิกรณ์

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (fermenter) โดยส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นถังกวนที่มีใบพัดเพื่อช่วยการผสมและช่วยในการตีฟองอากาศที่ผ่านขึ้นมาจากเครื่องเติมอากาศที่กั้นถัง และทำงานในสภาวะปลอดเชื้อ เนื่องจากถังปฏิกรณ์มีขนาดการผลิตใหญ่ขึ้น ดังนั้นลักษณะการทำงานจะแตกต่างจากขวดเขย่าอย่างมากทั้งทางด้าน การถ่ายเทความร้อน และลักษณะการไหลของของไหลภายในถัง พารามิเตอร์ที่ทำการศึกษาในการเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ คือ อัตราเร็วในการกวน อัตราการป้อนอากาศ และการควบคุมพีเอช

#### 3.2.2.1 ความเร็วรอบในการกวน

ความเร็วรอบในการกวนเป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญสำหรับการเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์แบบมีใบพัดกวนเนื่องจากการกวนเป็นการช่วยผสมของไหลภายในถังให้มีการไหลเวียนดีขึ้นและเป็นการเพิ่มอัตราการถ่ายเทออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ แต่การเพิ่มรอบการกวนจะทำให้แรงเฉือนเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ทำให้กิจกรรมเอนไซม์ลดลง โดยมากความเร็วรอบในการกวนมีผลต่อการเจริญของเชื้อน้อยมากแต่จะมีผลต่อการผลิตเอนไซม์มากกว่า ในงานวิจัยของ อุไรวรรณ รัชทร, 2535 พบว่าความเร็วรอบในการกวน 300 รอบต่อนาทีเหมาะสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus sp.*A11 นอกจากนี้ Jamuna และคณะ, 1993 ทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus cereus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน คือ กลูโคสกับแป้งพบว่าความเร็วรอบที่เหมาะสมจะต่างกันด้วย โดยในอาหารที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบความเร็วรอบจะไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์มากนัก ตรงข้ามกับอาหารที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบเมื่อความเร็วรอบในการกวนเพิ่มขึ้นจาก 300 เป็น 500 rpm กิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จะต่างกันถึง 40% โดยความเร็วรอบที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือ 300 และ 500 rpm สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นน้ำตาลและแป้งตามลำดับ

#### 3.2.2.2 อัตราการให้อากาศ

ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำเป็นพารามิเตอร์สำคัญที่บ่งบอกว่าในระบบมีปริมาณของอากาศเพียงพอต่อจุลินทรีย์หรือไม่ การเพิ่มปริมาณออกซิเจนละลายน้ำทำได้ 2 วิธี คือ เติมอากาศเข้าสู่ระบบโดยตรง และ เพิ่มความเร็วรอบในการกวน (สำหรับถังปฏิกรณ์แบบมีใบพัดกวน) ซึ่งเป็นการช่วยในการตีฟองอากาศให้เป็นฟองเล็กๆและแตกกระจายไปยังส่วนต่างๆ ของถังปฏิกรณ์สำหรับจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ CGTase เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ (aerobic) ดังนั้นการให้อากาศระหว่างการหมักต้องควบคุมปริมาณให้พอเหมาะต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จะมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับชนิด ปริมาณของจุลินทรีย์ และช่วงของการเจริญเติบโต

ดังเช่นงานวิจัยของ อุไรวรรณ รัชทร, 2535 พบว่าอัตราการป้อนอากาศมีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Bacillus sp.* A11 มาก โดยเมื่อเพิ่มอัตราการป้อนอากาศมากขึ้นแบคทีเรียจะมี lag phase ลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่การผลิตเอนไซม์ CGTase จะมีกิจกรรมสูงสุดเมื่อให้อัตรา

การบ่อนอากาศเป็น 2 ลิตรต่อนาที่ ถ้าให้อากาศมากเกินไปแบคทีเรียจะเจริญได้เร็วแต่ผลิตเอนไซม์น้อย ส่วนงานวิจัยของ Jamuna และคณะ, 1993 ผลิตเอนไซม์จากเชื้อ *B. cereus* พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศจาก 0.25 เป็น 1.5 vvm ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มจาก 42.3 เป็น 54 ยูนิตต่อมล. แต่เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศขึ้นเป็น 2 vvm ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเหลือเป็น 43.7 ยูนิตต่อมล. นอกจากนี้พบว่าในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus circulans* ATCC 9995 ในระบบที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำจะได้กิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าระบบที่อากาศคงที่ 1 vvm (ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ) และพบว่าระบบที่ไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำจะเกิดการช็อคของจุลินทรีย์เนื่องจากสภาวะขาดออกซิเจนทำให้เชื้อหยุดการสร้างเอนไซม์ [อรุณี ตริศิริโรจน์, 2537] ดังนั้นจะเห็นได้ว่าปริมาณออกซิเจนละลายน้ำเป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญมากต่อการผลิตเอนไซม์

### 3.2.2.3 การควบคุมพีเอช

การเลี้ยง *Alkalophilic Bacillus sp.* NP 523 [วรางคณา สงวนพงษ์, 2540] ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Horikoshi ที่สภาวะในการทดลองเดียวกันพบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญและสร้างเอนไซม์ CGTase สูงสุดในสภาวะที่ไม่มีการควบคุมพีเอช โดยแบคทีเรียจะมีระยะปรับตัวประมาณ 8 ชม. เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแบบควบคุมพีเอช ในขณะที่แบบไม่ควบคุมพีเอชแทบจะไม่ปรากฏระยะปรับตัวเลย และยังพบว่าปริมาณเซลล์ เอนไซม์ และการใช้สารอาหารแบบไม่ควบคุมพีเอชจะมีค่าสูงกว่าแบบควบคุมพีเอช ดังแสดงในตารางที่ 3.8 เช่นเดียวกับรายงานของ Mauri และคณะในปี 1990 พบว่าถ้าแบคทีเรียเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการควบคุมพีเอชให้คงที่ตลอดเวลา แบคทีเรียจะผลิตเอนไซม์ CGTase ไม่ดีหรืออาจจะไม่ผลิตเลย [อ้างถึงใน อุไรวรรณ รัชธร, 2535] และจากการติดตามค่าพีเอชในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเพื่อผลิตเอนไซม์ CGTase ในงานวิจัยส่วนใหญ่พบว่าพีเอชมีค่าลดลงในช่วงที่แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตจากนั้นค่าพีเอชจะปรับสูงขึ้นในช่วงที่การเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะคงที่

ตารางที่ 3.8 แสดงผลการทดลองการเลี้ยงเชื้อ *Alkalophilic Bacillus sp.* NP 523 แบบควบคุมพีเอชและไม่ควบคุมพีเอช [วรางคณา สงวนพงษ์, 2540]

	การเลี้ยงเชื้อแบบควบคุมพีเอช	การเลี้ยงเชื้อแบบไม่ควบคุมพีเอช
Lag phase	8 ชม.	ไม่ปรากฏ
ปริมาณเซลล์สูงสุด (เซลล์ต่อมล.)	$10^9$	$10^{13}$
กิจกรรมของเอนไซม์ (ภายใน 80 ชม.)		
CD-forming	$2^3$	$2^6$
Starch dextrinizing (ยูนิตต่อมล.)	5	25
ความเข้มข้นของแป้งข้าวเหนียว (กรัมต่อลิตร)	ไม่ลดลงต่ำกว่า 5	ลดลงเกือบเป็น 0



### 3.2.2.4 ระบบที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

การเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อผลิตเอนไซม์ CGTase งานวิจัยโดยมากเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบไม่ต่อเนื่อง (batch fermentation) เช่น การผลิตเอนไซม์ CGTase จาก *Bacillus sp.* A11 [อุไรวรรณ รัชทร, 2535], *Bacillus circulans* ATCC 9995 [อรุณี ตรีศิริโรจน์, 2537], *Alkalophillic Bacillus sp.* NP 523 [วรางคณา สงวนพงษ์, 2540], *Klebsiella oxytoca* 19-1 [Lee และ คณะ, 1992], *Bacillus cereus* (RJ 30) NCIMB 13123 [Jamuna และคณะ, 1993] และ *K. pneumoniae pneumoniae* AS-22 [Gawande และ Patkar, 1999] ซึ่งพบว่าการผลิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพจะได้กิจกรรมของเอนไซม์สูงและเร็วกว่าเมื่อเทียบกับการผลิตในขวดเขย่า

ส่วนงานวิจัยที่เป็นการศึกษาเลี้ยงเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบต่อเนื่องจากการตรวจเอกสารพบว่า มีเพียงงานวิจัยเดียวคือ Jamuna และคณะ, 1993 โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus cereus* NCIMB 13123 เริ่มจากแบบไม่ต่อเนื่อง 16 ชั่วโมง ต่อจากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นแบบต่อเนื่อง โดยทำการทดลองอยู่ในช่วงที่อัตราการเจือจาง (dilution rate) เท่ากับ  $0.06-0.12 \text{ hr}^{-1}$  พบว่าที่อัตราการเจือจางเท่ากับ  $0.06 \text{ hr}^{-1}$  กิจกรรมของเอนไซม์รักษาไว้ได้คงที่ในช่วง 42-49 ญูนิตต่อมิลลิลิตร ตลอดการทำงาน 400 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อเทียบกับการทำงานแบบไม่ต่อเนื่องแล้วพบว่าแบบต่อเนื่องจะให้กำลังการผลิตเอนไซม์สูงกว่าแบบไม่ต่อเนื่องมาก โดยการทำงานแบบไม่ต่อเนื่องจะมีกำลังการผลิตเอนไซม์สูงสุด เท่ากับ 1750 ญูนิตต่อลิตร·ชม. ส่วนการทำงานแบบต่อเนื่องจะให้กำลังการผลิตเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 5400 ญูนิตต่อลิตร·ชม.

จากพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ CGTase ในถังปฏิกรณ์ดังที่กล่าวมาแล้ว สามารถสรุปเชื้อแบคทีเรียและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ในถังปฏิกรณ์ได้ดังตารางที่ 3.9

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ตารางที่ 3.9 สายพันธุ์แบคทีเรียและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ CGTase ในถังปฏิกรณ์

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ระบบในการเลี้ยงเชื้อ	ค่าพีเอช	อุณหภูมิ (°C)	ความเร็วรอบในการกวน (rpm)	ปริมาณออกซิเจน	เวลาที่ให้กิจกรรมสูงสุด (ชม.)	กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด*	ปริมาณเซลล์ในถัง	เอกสารอ้างอิง
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp. NP 532	ถังกวนระบบกะ	10	25	-	1 vvm	60-120	33 U/ml	$10^{13}$ cells/ml	วารงคณา สงวนพงษ์, 2540
<i>B. circulans</i> ATCC 9995	ถังกวนระบบกะ	8	35	250-350	ควบคุม D.O. ในถัง	50-96	2600 U/ml	9.9 cells/ml	อรุณี ศิริศิริโรจน์, 2537
<i>Bacillus</i> sp. A11	ถังกวนระบบกะ	9	37	300	2 l/min	48	136 U/ml หรือ 269 U/mg prot.	3.35mg/5 ml	อุไรวรรณ รัชทร, 2535
<i>Klebsiella pneumoniae</i> pneumoniae AS-22	ถังกวนระบบกะ	9.5	28	400	1 l/min	28	32.5 U/ml	75 A 660 nm	Gawande และ Patkar, 1999
<i>Klebsiella oxytoca</i> 19-1	ถังกวนระบบกะ	7	37	400	0.5 vvm	9	53 U/ml	13 OD <sub>600</sub>	Lee และคณะ, 1992
<i>B. cereus</i> RJ 30 NCIMB 13123	ถังกวนระบบต่อเนื่อง fluidised bed	7	37	300	1.5 vvm		1.75 KU/L/h <sup>a</sup> 5.4 KU/L/h <sup>a</sup> 23 KU/L/h <sup>a</sup>		Jamuna และ คณะ, 1993

\* การวัดกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละงานวิจัยมีการกำหนดขั้นตอนการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ หรือ รายละเอียดในการปฏิบัติต่างกัน ทำให้ไม่สามารถนำค่ากิจกรรมของเอนไซม์มาเปรียบเทียบกันได้โดยตรง

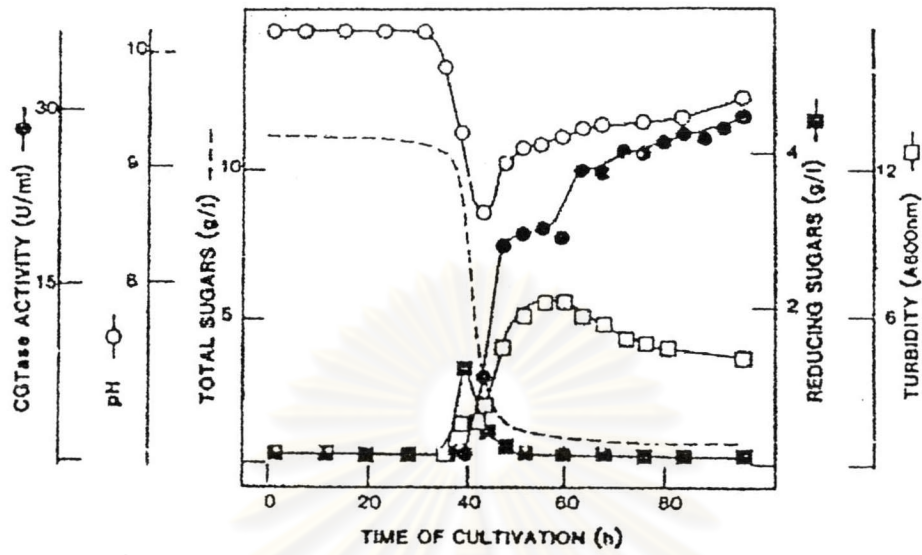
<sup>a</sup> คือ กำลังการผลิตเอนไซม์ CGTase สูงสุด (maximum productivity)

### 3.3 ลักษณะการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์

จากการติดตามช่วงเวลาของการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ CGTase ของเชื้อ *Bacillus circulans* var. *alkalophilus* ATCC 21783 [Makela และ คณะ, 1988], *Bacillus circulans* ATCC 9995 [อรุณี ตริศิริโรจน์, 2537], *Alkalophilic Bacillus* sp. NP 523 [วรางคณา สงวนพงษ์, 2540], และ *Bacillus* sp. A11 [อุไรวรรณ รัชธร, 2535] โดยใช้แบ่งเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า มีลักษณะคล้ายคลึงกันคือมีการเจริญของเชื้อ การผลิตเอนไซม์ และการเปลี่ยนแปลงพารามิเตอร์ต่างๆ ดังรูปที่ 3.2 โดยเชื้อ ATCC 21783 และ A11 จะมีช่วงระยะปรับตัวยาวนานกว่าเชื้อ ATCC 9995 ส่วนระยะการเจริญเติบโตจะสั้น ใช้เวลาเพียงแค่ 13-16 ชั่วโมง (เปรียบเทียบเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน) และกราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ ATCC 21783 และ ATCC 9995 เป็นแบบ diauxic

หลังจากพ้นช่วงระยะปรับตัวพารามิเตอร์ต่างๆ ที่วัดได้จะมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นพร้อมๆ กัน ในช่วงต้นค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะคงที่ระยะหนึ่ง หลังจากนั้นในช่วงที่เซลล์เริ่มมีการเจริญเติบโตค่าพีเอชในน้ำหมักมีค่าลดลง 1.3-1.5 ยูนิต ขณะเดียวกันเซลล์เริ่มผลิตเอนไซม์ CGTase จุดที่พีเอชตกลงต่ำสุดเกิดขึ้นบริเวณที่กราฟการเจริญเติบโตกำลังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น หลังจากนั้นค่าพีเอชกลับเพิ่มขึ้นมาขึ้นอย่างช้าๆ ในช่วงระยะคงที่ (stationary phase) และระยะถดถอย (death phase) จากการตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมักพบว่า น้ำตาลรีดิวซ์เกิดขึ้นในช่วงเวลาสั้นเนื่องจากแบคทีเรียเปลี่ยนแปลงเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงเนื่องจากการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อทำให้เกิดกรดขึ้นซึ่งพิจารณาจากค่าพีเอชลดลงเช่นเดียวกัน แบคทีเรียจะเริ่มมีการเจริญพร้อมกับการผลิตเอนไซม์ เอนไซม์ CGTase จะถูกผลิตอย่างรวดเร็วระหว่างระยะการเจริญเติบโตทวีคูณ (log phase) และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งได้กิจกรรมของเอนไซม์สูงเมื่อแบคทีเรียอยู่ในช่วงระยะคงที่

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.2 รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ CGTase ของเชื้อ *Bacillus circulans* var. *alkalophilus* ATCC 21783 [Makela และคณะ, 1990]

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### 3.4 ค่าพารามิเตอร์และแบบจำลองคณิตศาสตร์ทางจลนพลศาสตร์

ข้อมูลทางจลนพลศาสตร์ เช่น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ และค่าสัมประสิทธิ์ผลได้ของเซลล์และผลิตภัณฑ์จากสารอาหาร รวมทั้งแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายการเจริญเติบโตของเซลล์ เป็นสิ่งสำคัญที่ใช้ในการอธิบายการทำงานของเซลล์ ติดตามปฏิกิริยาภายในถึงปฏิกรณ์เป็นข้อมูลในกระบวนการออกแบบควบคุมการผลิตและการ optimization

#### 3.4.1 อิทธิพลของภาวะในการเลี้ยงเชื้อต่อค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์

Jamuna และคณะ, 1993 รายงานถึงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดและอัตราการผลิตเอนไซม์ CGTase ในการเลี้ยงเชื้อ *B. cereus* ในถังปฏิกรณ์แบบไม่ต่อเนื่องโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น soluble starch และกลูโคส ในสภาวะต่างกัน ได้แก่ ความเร็วรอบในการกวน อัตราการให้อากาศ และอุณหภูมิ ดังแสดงในตารางที่ 3.10 พบว่าในแหล่งคาร์บอนที่เป็น soluble starch เมื่อใช้ความเร็วรอบในการกวนเท่ากัน (300 rpm) เมื่ออุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะจะลดลง โดยที่อุณหภูมิ 30°C ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด แต่อัตราการผลิตเอนไซม์ต่ำ ในขณะที่อุณหภูมิ 37°C ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่ำกว่า แต่ให้อัตราการผลิตเอนไซม์สูงสุด ส่วนที่ความเร็วรอบในการกวน 500 rpm อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตราการผลิตเอนไซม์มีค่าสูงสุด สำหรับในแหล่งคาร์บอนที่เป็นกลูโคส ที่ความเร็วรอบ 300 rpm ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด ซึ่งมีค่ามากกว่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm ถึง 84.28 % ส่วนอัตราการผลิตเอนไซม์ที่ความเร็วรอบต่างๆ ไม่ต่างกันมาก และเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศจาก 0.25 เป็น 2 vvm อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเพิ่มขึ้น 2 เท่า และอัตราการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นกว่า 3 เท่า

Sirisansaneeyakul และ คณะ, 1996 รายงานถึงค่าจลนพลศาสตร์ในการเจริญเติบโตและผลิต CGTase (วัดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยวิธี starch-dextrinizing) ของ *B. circulans* var. *alkalophilus* TISTR 907 ในขวดเขย่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของ soluble corn starch 1-2.5 % น้ำหนักโดยปริมาตร ดังแสดงในตารางที่ 3.11 ถึงแม้ว่าที่ความเข้มข้นของแป้ง 1% จะให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $\mu$ ) ต่ำกว่าที่ความเข้มข้นอื่นแต่กลับให้ค่าผลได้ของชีวมวลและเอนไซม์จากสารอาหาร ( $Y_{x/s}$  และ  $Y_{p/s}$ ) รวมทั้งค่าอัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ ( $q_p$ ) สูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่นๆ

ตารางที่ 3.10 อิทธิพลของสภาวะการเลี้ยงเชื้อต่อค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ในการเลี้ยงเชื้อ *B. cereus* ในถังปฏิกรณ์แบบไม่ต่อเนื่อง [Jamuna และ คณะ, 1993]

แหล่งคาร์บอน	อัตราการกวน (rpm)	อัตราการให้อากาศ (vvm)	อุณหภูมิ (°C)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ชม. <sup>-1</sup> )	อัตราการผลิต CGTase (ยูนิต/มล./ชม.)
soluble	300	1.0	30	0.5	0.34
starch	300	1.0	37	0.29	0.58
	300	1.0	42	0.1	0.39
soluble	300	1.0	37	0.29	0.34
starch	500	1.0	37	0.32	3.1
	700	1.0	37	0.19	2.6
กลูโคส	200	1.0	37	0.11	2.15
	300	1.0	37	0.7	2.16
	500	1.0	37	0.63	2.62
กลูโคส	300	0.25	37	0.45	1.0
	300	0.5	37	0.75	2.13
	300	1.0	37	0.68	2.61
	300	1.5	37	0.88	2.69
	300	2.0	37	0.87	3.64

ตารางที่ 3.11 ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของ *B. circulans* var. *alkalophilus* TISTR 907 ในขวดเขย่า [Sirisansaneeyakul และคณะ, 1996]

Starch concentration (%)	Specific growth rate ( $\mu$ ) (h <sup>-1</sup> )	Biomass yield		Enzyme yield (Y <sub>P/S</sub> ) (U/g starch)	Specific productivity (q <sub>p</sub> ) (U/ g cll h)
		(Y <sub>X/S</sub> ) (g/g starch)	(Y <sub>X/N</sub> ) (g/g nitrogen)		
1.0	0.06	0.26	2.38	1.76	0.11
1.5	0.10	0.10	1.29	0.45	0.08
2.0	0.08	0.11	3.70	0.59	0.09
2.5	0.09	0.05	1.51	0.50	0.15

### 3.5.2 แบบจำลองคณิตศาสตร์ทางจลนพลศาสตร์

สำหรับงานวิจัยที่ทำการศึกษาแบบจำลองทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของเซลล์ในการผลิตเอนไซม์ CGTase จากการตรวจเอกสารยังไม่พบ พบแต่งงานวิจัยที่ศึกษาแบบจำลองคณิตศาสตร์ของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ผลิต  $\alpha$ -amylase ได้แก่

Pazlarova และ คณะ, 1984 ศึกษาการผลิตเอนไซม์  $\alpha$ -amylase จาก *Bacillus subtilis* โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย แป้ง 10-40 กรัมต่อลิตร และ caseinate 5-15 กรัมต่อลิตร เป็นสารอาหารที่จำกัดการเจริญเติบโต ดังนั้นในงานวิจัยนี้แบบจำลองจะขึ้นกับสารตั้งต้น 2 ชนิด โดย  $S_1$  คือ caseinate และ  $S_2$  คือ แป้ง จากการวิเคราะห์ข้อมูลจากการทดลองได้เป็นสมการสำหรับอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์โดยมี caseinate เป็นตัวยับยั้ง

$$\mu = 0.086S_1S_2 / (2 + S_2 + S_2^2 / 33) \quad (3.1)$$

$$R_p = 117.7\mu \exp(-0.311S_1)X - .018P \quad (3.2)$$

โดยพารามิเตอร์จากสมการที่ 3.1 และ 3.2 ใช้ระเบียบวิธีถดถอยแบบไม่เป็นเชิงเส้น (nonlinear regression) โดยใช้เทคนิค optimization ด้วยโปรแกรม Fortran (SSQMIN) ในการประมาณค่า และจากการสมมูลมวลได้ค่าสัมประสิทธิ์ผลได้จากการทดลอง คือ  $Y_{s1/x}$  เท่ากับ 0.96 (กรัม caseinate ต่อกรัม น้ำหนักเซลล์แห้ง) และ  $Y_{s2/x}$  เท่ากับ 1.47 (กรัมแป้งต่อกรัม น้ำหนักเซลล์แห้ง)

Yoo และ คณะ, 1988 ผลิตเอนไซม์  $\alpha$ -amylase จาก *Bacillus amyloliquefaciens* (ATCC 23350) โดยใช้มอลโตสเป็นสารอาหารและใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของ Haldane ในการอธิบายจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของเซลล์ และการผลิตเอนไซม์ใช้จลนพลศาสตร์ที่มีพื้นฐานมาจาก catabolite repression ภายใต้กลไกการควบคุมแบบ positive [Imanaka และ Aiba, 1977] ดังแสดงในสมการที่ 3.3 และ 3.4

$$\mu = \frac{\mu_m S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_I}} \quad (3.3)$$

$$q_p = K_p \frac{1 + K_e S^n}{1 + K_e (1 + K_b) S^n} \quad (3.4)$$



จากการประมาณค่าพารามิเตอร์โดยใช้วิธี Gauss-Newton พบว่าได้ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของแบบจำลอง ดังแสดงในตารางที่ 3.12 นอกจากนี้พบว่าแบบจำลองข้างต้นสามารถนำไปใช้อธิบายลักษณะการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในการเลี้ยงเชื้อที่มี soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี

ตารางที่ 3.12 ค่าพารามิเตอร์สำหรับแบบจำลองคณิตศาสตร์ของการผลิต  $\alpha$ -amylase จาก *Bacillus amyloliquefaciens* (ATCC 23350) [Yoo และ คณะ, 1988]

Maximum specific growth rate	$\mu_m$	0.306 h <sup>-1</sup>
Saturation constant	$K_s$	0.76 g/L
Cell yield	$Y$	0.58 g dry cell mass / g maltose
Maintenance constant	$K_d$	0.026 g maltose / g cell mass h
Inhibition constant	$K_i$	86 g/L
Proportionality constant	$K_p$	43.5 Unit / mg cell mass h
Equilibrium constant for binding between cAMP and CAP	$K_e$	0.001
Equilibrium constant	$K_b$	19.9
Stoichiometric constant for binding of cAMP to CAP	$n$	2.41

Roychoudhury และคณะ, 1989 ผลิต  $\alpha$ -amylase จาก *Bacillus amyloliquefaciens* (ATCC 23350) โดยใช้กลูโคสช่วงความเข้มข้น 2.2 - 10.8 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แบบจำลองของ Valilin ในการอธิบายจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโต

$$\mu = \frac{\mu_m S^n}{S^n + K_s \{S_0\}^p} \quad (3.5)$$

$$q_s = \frac{\mu}{Y_{x/s}} + m \quad (3.6)$$

โดยค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลอง  $\mu_m$  เท่ากับ 2 ชม<sup>-1</sup>,  $K_s$  เท่ากับ 0.1714[1/S<sub>0</sub>]<sup>0.68</sup>,  $n$  เท่ากับ 1 และ  $p$  เท่ากับ 1.68 ส่วนผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร ( $Y_{x/s}$ ) และอัตราการใช้สารอาหารเพื่อการดำรงชีวิต ( $m$ ) คำนวณได้จากสมการที่ 3.6 โดย  $Y_{x/s}$  เท่ากับ 0.33 (กรัมกลูโคสต่อกรัมเซลล์) และ  $m$  เท่ากับ 0 (กรัมกลูโคสต่อกรัมเซลล์·ชม.) และสำหรับการใช้มอลโตสเป็นแหล่งคาร์บอนจะได้ค่า  $Y_{x/s}$  เท่ากับ 0.554 (กรัมมอลโตสต่อกรัมเซลล์)