บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากงานวิจัยของเกษม พงษ์มณี (2536) ซึ่งได้ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในระดับขวดเขย่า งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยต่อเนื่องโดยนำ *Bacillus subtilis* TISTR 25 มาศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต แอลคาไลน์โปรตีเอสในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เพื่อที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณมาก โดยใช้ภาวะเดียวกับในระดับขวดเขย่าตอนเริ่มการทดลอง ใช้สูตรอาหาร Basal medium ซึ่งประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v) และ $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v) โดยใช้กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันแทนสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v) ใช้แป้งมันสำปะหลังปริมาณ 0.5 % (w/v) แทนกลูโคส ซึ่งในงานวิจัยของเกษม พงษ์มณี (2536) ใช้แป้งข้าวเหนียวแทนการใช้กลูโคส เนื่องจากประเทศไทยเรามีการปลูกมันสำปะหลังกันมากทำให้มีปริมาณของแป้งมันสำปะหลังมากและมีราคาถูกกว่าแป้งข้าวเหนียวแต่ให้ผลผลิตเอนไซม์ไม่แตกต่างกันมากนัก (เกษม พงษ์มณี , 2536) ทำให้ลดต้นทุนในการผลิตเอนไซม์ลง ดังนั้นตลอดการทดลองนี้จึงใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนกลูโคส

การทดลองในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยไม่ได้ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมี pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.42 ผลการทดลองดังแสดงใน

กราฟรูปที่ 1 พบว่าในช่วงชั่วโมงที่ 0-24 pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีค่าต่ำกว่า 6.0 หลังจากนั้น pH จะมีความเป็นด่างเพิ่มขึ้น แต่ก็ยังมีค่าต่ำกว่า 7.0 มาก เมื่อนำน้ำหมักมาตรวจสอบแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี พบว่าไม่มีการผลิต แอลคาไลน์โปรตีเอสเลย แต่เมื่อตรวจสอบแอคติวิตีของโปรตีเอสชนิดอื่นพบว่ามีการผลิตซึ่งคาดว่าเป็น Neutral Protease และทดสอบโดยนำ skim milk agar plate ซึ่งมีpHประมาณ 7.0 มาเจาะหลุมเล็กๆแล้วนำน้ำหมักที่ได้มาหยอดใส่หลุมทิ้งไว้สักครู่ พบว่ามีบริเวณใสเกิดขึ้นรอบหลุม แสดงว่าเชื้อนี้มีการผลิตนิวทรัลโปรตีเอส แต่ไม่ใช่แอลคาไลน์โปรตีเอส หรืออาจมีการสร้างแอลคาไลน์โปรตีเอสแต่เกิด Autodigestion ในภาวะที่ pH ต่ำกว่า 6.0 จึงทำให้วิเคราะห์แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสไม่พบ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Moon และ Parulekar (1991) ได้ศึกษาการเลี้ยง *Bacillus firmus* ในถังหมักโดยไม่มีการควบคุม pH พบว่า pH จะมีค่าลดลงในช่วงการเจริญของระยะ log phase และจะค่อยๆเพิ่มขึ้นในช่วงสุดท้ายของการเจริญ pH เริ่มต้นของการทดลองจะมีค่ามากกว่า pH สุดท้าย สาเหตุเพราะว่าเชื้อมีการผลิตผลิตภัณฑ์ซึ่งมีความเป็นกรดออกมาในช่วงการเจริญระยะ growth phase จึงทำให้ pH มีค่าลดลง และทำให้การผลิตโปรตีเอสต่ำแต่มีการเจริญเติบโตดี และพบว่าที่ pH ต่ำกว่า 7.0 การเจริญของเชื้อจะสูงสุด นอกจากนี้ Putten และคณะ (1996) ยังพบว่าการเลี้ยง *Bacillus licheniformis* โดยควบคุม pH เชื้อจะผลิตโปรตีเอสให้แอคติวิตีสูงกว่าไม่ควบคุม pH ดังนั้นการทดลองต่อๆไปจึงต้องมีการควบคุม pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ให้มีค่าต่ำกว่า 7.0 โดยใช้ 2 N NaOH

ปัจจัยแรกที่ศึกษาได้แก่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ซึ่งในการทดลองระดับขวดเขย่าใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1 % (v/v) โดยใช้สูตรอาหาร Basal medium มีปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 %(v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm. , อัตราเร็วในการกวน 250 rpm. , อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 ^{o}C ,

pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 แต่ในระดับถังหมักได้แปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 0.1 %, 0.5 %, 1.0 % และ 3.0 % (v/v) พบว่าที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.1 % (v/v) จะมีการเจริญของเชื้อสูงสุด ซึ่งคาดว่าเพราะปริมาณเซลล์น้อยจึงได้รับสารอาหารอย่างเต็มที่ทำให้เชื้อเจริญได้ดีที่สุด แต่ถ้าดูการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสกลับพบว่าที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v) การผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจะสูงที่สุด เหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอส อาจเนื่องมาจากปริมาณเชื้อเริ่มต้น และปริมาณสารอาหารที่ใช้เหมาะสมกันทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ได้มาก

ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมักผสมเป็นเนื้อเดียวกันอย่างสม่ำเสมอ จุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ ทำให้เชื้อมีการเจริญและมีการผลิตผลิตภัณฑ์ได้ดีก็คือ อัตราการให้อากาศและอัตราเร็วในการกวน จากการทดลองในข้อ 4.1.3 โดยการแปรผันอัตราการให้อากาศพบว่าที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm. เชื้อมีการเจริญได้ดีที่สุด เพราะได้รับปริมาณออกซิเจนมากทำให้มีการใช้อาหารเป็นแหล่งพลังงานได้อย่างสมบูรณ์ แต่เมื่อดูการผลิตเอนไซม์พบว่าที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm. จะมีการผลิตเอนไซม์สูงสุด และที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm. จะมีการผลิตเอนไซม์ต่ำสุด เมื่อแปรผันอัตราเร็วในการกวนพบว่าที่อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 350 rpm. เชื้อจะมีการเจริญสูงสุดเมื่อเทียบกับอัตราเร็วในการกวนที่ 150 rpm. และ 250 rpm. อาจเนื่องมาจากที่อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 350 rpm. นั้นมีการผสมของอาหารเป็นเนื้อเดียวกันอย่างดีและต่อเนื่องทำให้อากาศมีฟองเล็กมีพื้นผิวสัมผัสมาก ซึ่งทำให้เชื้อได้รับสารอาหารอย่างเต็มที่ทำให้เจริญเติบโตได้ดีแต่เมื่อดูการผลิตเอนไซม์ พบว่าผลิตได้ต่ำกว่าที่อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm. แต่ที่อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 150 rpm. พบว่าผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ต่ำสุด

อาจเนื่องมาจากอัตราเร็วในการกวนที่ช้า ทำให้สารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกันไม่สม่ำเสมอ เป็นเนื้อเดียวกันอาจเป็นสาเหตุให้เชื้อไม่สามารถใช้สารอาหารได้อย่างสมบูรณ์ จากการทดลองที่ผ่านมาจะเห็นว่าการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสให้ได้ในปริมาณสูงนั้นต้องมีอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนที่เหมาะสมไม่ต่ำหรือสูงจนเกินไป คือที่อัตราการให้อากาศเท่า 1.0 vvm. และอัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm. ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Moon และ Parulekar (1991) ที่พบว่าการที่จะทำให้เซลล์สังเคราะห์ผลิตภัณฑ์มากจะต้องลดปริมาณการให้ออกซิเจนลงให้เหมาะสม และพบว่าในจุลินทรีย์พวกบาซิลัส การสังเคราะห์โปรตีเอสซึ่งผลิตออกมาภายนอกเซลล์จะถูกกดดันภายใต้การจำกัดออกซิเจนภายในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การศึกษาอุณหภูมิการเลี้ยงเชื้อในถังหมักนั้นพบว่าที่อุณหภูมิเท่ากับ 30 °C, 37 °C และ 40 °C การเจริญเติบโตของเชื้อใกล้เคียงกัน แต่เมื่อพิจารณาการผลิต แอลคาไลน์โปรตีเอสพบว่าที่อุณหภูมิเท่ากับ 37 °C จะผลิตได้ปริมาณสูงสุด อาจเป็นเพราะที่อุณหภูมินี้เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการดำรงชีวิตและการผลิตเอนไซม์เนื่องจากเป็นเชื้อที่แยกได้จากดินในประเทศไทยซึ่งมีอุณหภูมิในช่วงนี้ จากการทดลองของ Jaroslav และคณะ (1991) พบว่าอุณหภูมิมีอิทธิพลต่อระดับของ mRNA ซึ่งทำหน้าที่สำหรับสร้างโปรตีเอสของ *Bacillus megaterium*

สภาพความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อก็มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และการผลิตเอนไซม์ ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อนั้น ผลิตภัณฑ์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นจากเมตาโบลิซึม อาจทำให้ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อแปรเปลี่ยนไปจากเดิมอย่างรวดเร็วมาก มีผลทำให้จุลินทรีย์หยุดชะงักการเจริญเติบโตได้หรือไปยับยั้งการผลิตผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ ในการศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์มักมีปัญหาเกี่ยวกับการควบคุม pH และมักไม่อาจทำให้ pH เป็นปัจจัยที่คงที่ได้ เพื่อหลีกเลี่ยงการเปลี่ยนแปลง pH จึงจำเป็นต้องรู้จักการควบคุม pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจทำได้

โดยเติมสารบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมและปริมาณที่พอเหมาะลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์และการขนส่งของสารต่างๆผ่านเซลล์เมมเบรน การแปรผัน pH นั้นมีผลต่อสมดุลกรด-เบส มีผลกระทบต่อสรีระวิทยาเฉพาะบางอย่างของจุลินทรีย์ได้อีกด้วย (สุพจน์ ใช้เทียมวงศ์,2530) มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสารอาหาร ,ตัวชักนำ (inducers) และปัจจัยที่ทำให้เจริญเติบโตระหว่าง biotic และ abiotic phase ในการทดลองนี้ได้ศึกษาผลของ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าที่ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 จะมีการเจริญเติบโตสูงสุด ส่วนที่ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.0 จะมีช่วง log phase ที่ต่ำกว่าในชั่วโมงที่ 0-24 หลังจากนั้นจึงเริ่มเข้าสู่ช่วง log phase ที่มีการเจริญสูงขึ้น ในชั่วโมงที่ 24 - 36 อาจเนื่องมาจากในช่วงชั่วโมงที่ 0 - 24 นั้น มีการผลิตกรดออกมาในน้ำหมัก pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่า 7.0 จึงไม่เหมาะสมในการทำให้เชื้อไม่เจริญภายใน 24 ชั่วโมงแรก หลังจาก 24 ชั่วโมงแรกไปแล้ว pH โดยรวมลดลงใกล้ 7.0 เชื้อจึงเริ่มสามารถเจริญต่อไปได้ในชั่วโมงที่ 24 - 36 ต่อไป ส่วนที่ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 9.0 นั้นการเจริญจะต่ำมาก เมื่อพิจารณาน้ำตาลรีดิวส์พบว่าที่ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.0 นั้น พบว่าแทบจะไม่มีการใช้น้ำตาลในชั่วโมงที่ 0-24 และการใช้น้ำตาลรีดิวส์จะต่ำซึ่งสอดคล้องกับลักษณะการเจริญค่อนข้างต่ำใน 24 ชั่วโมงแรก ส่วนที่ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 9.0 นั้นการเจริญของเชื้อต่ำ อัตราการใช้น้ำตาลก็จะต่ำไปด้วย ได้มีผู้ศึกษาคือ Janssen และ คณะ (1991) พบว่าในการเลี้ยง *Thermus sp.* Rt 41 A เพื่อผลิตโปรตีเอส พบว่าถ้า pH สูงกว่า 7.5 จะทำให้ธาตุที่เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อตกตะกอนเป็นเหตุให้โปรตีเอสไม่มีความเสถียรและอาจทำให้ไม่ผลิตเอนไซม์นี้เลย Kitada และ คณะ (1976) ได้ศึกษาการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก Alkalophilic *Bacillus sp.* โดยใช้ Methyl Acetate เป็นแหล่งอาหาร พบว่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญและการผลิต

เอนไซม์ พบว่าการที่เชื้อจะผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ต้องอยู่ในภาวะที่อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นด่างเท่านั้น Moon และ Parulekar (1991) พบว่าที่ pH ของอาหารเลี้ยง *Bacillus firmus* เท่ากับ 7.7 จะมีการผลิตโปรตีเอสให้แอคติวิตีสูงสุดและถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อมี pH สูงตอนเริ่มต้นจะทำให้เชื้อไม่เจริญในช่วงแรก ดังนั้น pH สามารถกดดันการผลิตโปรตีเอสได้

จุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เป็นพวก Chemoorganotroph ซึ่งจะใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอนที่ใช้ เช่น คาร์โบไฮเดรต ลิปิด และโปรตีน เป็นต้น เอนไซม์ส่วนใหญ่ที่ผลิตได้จากกระบวนการหมัก เป็นชนิดที่ชักนำให้เกิดได้ (inducible enzyme) เอนไซม์จะถูกสร้างขึ้นก็ต่อเมื่อมีสารที่เป็นตัวชักนำ (inducer) อยู่ด้วย inducer ส่วนใหญ่ก็คือซับสเตรทของเอนไซม์นั่นเอง หรือเป็นสารที่มีโครงสร้างใกล้เคียงกับซับสเตรท ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์จะต้องมี inducer เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย แต่เป็นที่น่าเสียดายที่ความรู้เรื่อง ตัวชักนำ ไม่มีการรายงานไว้มากนักเนื่องจากผู้ผลิตเก็บไว้เป็นความลับ ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์มากเช่นเดียวกับการผลิตสารอื่นในกระบวนการหมัก Aunstrup รายงานไว้ในปี 1974 ว่าในการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสในอาหารเลี้ยงเชื้อต้องมีโปรตีนความเข้มข้นสูง และคาร์โบไฮเดรตต้องมีปริมาณน้อย การใช้คาร์โบไฮเดรตความเข้มข้นสูงมักทำให้เกิดปรากฏการณ์ Catabolite repression วิธีแก้ไขทำโดยการเติมคาร์โบไฮเดรตลงไปเป็นช่วงๆ ตลอดระยะเวลาของการหมัก ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้ศึกษาถึงผลของปริมาณแหล่งคาร์บอน โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนโดยแปรผันปริมาณแป้งเป็น 0 % , 0.1 % , 0.25 % , 0.5 %, 0.75 % และ 1 % (w/v) พบว่าการเจริญจะเพิ่มขึ้นตามลำดับ โดยที่ 0 % อัตราการเจริญจะต่ำสุด แต่ก็ยังเจริญได้เนื่องจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้นมีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วยในปริมาณสูงจึงใช้เป็นแหล่ง

คาร์บอนได้ด้วย และถ้าพิจารณาการผลิต แอลคาไลน์โปรตีเอสชั่วโมงที่ 84 พบว่าที่ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 0.75 % และ 1 % (w/v) การผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจะต่ำสุด สาเหตุที่เป็นเช่นนี้คาดว่าเนื่องจากเกิด Catabolite repression โดยกลูโคสจะไปกดการทำงานของยีนส์ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ออกมาหรือทำให้สร้างได้น้อยลง (Bernlohr,1964;Doi,1973) และที่ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 0.1 % (w/v) จะพบว่ามีการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงสุด

จุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนมากจะใช้ไนโตรเจนในรูปสารประกอบอนินทรีย์หรือสารประกอบอินทรีย์ เชื้อจะใช้สารที่เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อสร้าง กรดอะมิโนเริ่มต้น, กรดนิวคลีอิก, โปรตีน และส่วนประกอบของผนังเซลล์ Aunstrup และคณะ (1974)รายงานไว้ว่าแอลคาไลน์โปรตีเอสมีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบอยู่ถึง 15.6 % ถ้ามีไนโตรเจนปริมาณมากหรือน้อยเกินไปอาจเกิดการกดดันการสร้างเอนไซม์ได้ (Kole และ คณะ, 1988) จากการรายงานของ Moon และ Parelukar (1991) พบว่าไนโตรเจนมีบทบาทสำคัญในการรักษาสภาพเซลล์ไม่ให้เกิดการแตกได้ (lysis) การเลือกแหล่งไนโตรเจนขึ้นกับความสามารถของเชื้อว่าสามารถใช้สารประกอบไนโตรเจนชนิดไหนได้ดีกว่ากัน ในแบคทีเรียจะใช้กรดอะมิโนได้ดีกว่าการใช้เกลือแอมโมเนียมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนหลายชนิด เชื้อแต่ละชนิดจะใช้แหล่งไนโตรเจนไม่เหมือนกัน เชื้อจะใช้แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ได้ง่ายที่สุดก่อน เมื่อสารนั้นหมดแล้วจึงใช้สารประกอบตัวอื่นเป็นแหล่งไนโตรเจนต่อไป แหล่งที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมักจะเป็นผลผลิตทางการเกษตรหรือของเหลือใช้จากการเกษตรที่มีปริมาณมากและราคาถูก เช่น กากถั่วเหลือง, กากเมล็ดทานตะวัน เป็นต้น ซึ่งในการทดลองนี้เราใช้กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในอัตราส่วน 1:1 ย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้ความร้อนและความดันสูงช่วยเพื่อให้เกิดเป็นเปปไทด์สายสั้นๆ และเกิดกรดอะมิโนอิสระ กากถั่วเหลืองนิยมใช้มากเพราะว่ามีสมดุลย์ของสาร

เปปไทด์สายสั้นๆ และเกิดกรดอะมิโนอิสระ กากถั่วเหลืองนิยมใช้มากเพราะว่ามีสมบัติของสารอาหารเหมาะสมซึ่งประกอบด้วย โปรตีน ไขมัน เซลลูโลส แคลเซียม ฟอสฟอรัส (กำเนิด สุภัณวงษ์ ,2534) ส่วนกากเมล็ดทานตะวันนั้นมีส่วนประกอบซึ่งคาดว่ากรดอะมิโนในกากเมล็ดทานตะวันไปช่วยเสริมกับกรดอะมิโนซึ่งเป็นส่วนประกอบของกากถั่วเหลือง ให้เชื้อมีการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงขึ้น ซึ่งในการทดลองได้ทำการแปรผันปริมาณไนโตรเจนในกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 เป็น 0.1 %, 0.2 %, 0.3 % และ 0.4 % (v/v) ซึ่งเมื่อดูจากกราฟรูปที่ 26 พบว่าที่ปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.1 % (v/v) การเจริญของเชื้อจะต่ำสุด คาดว่าเกิดจากมีสารอาหารน้อยเกินไปในการที่จะไปใช้สร้างสารที่ใช้ในการเจริญ และที่ปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.4 % (v/v) พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้ต่ำ คาดว่าเกิด Catabolite repression แต่ที่ปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.3 % (v/v) พบว่าเชื้อมีการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงสุดเพราะมีปริมาณกรดอะมิโนที่เหมาะสม

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนนั้นมีหลายวิธีด้วยกันแล้วแต่ความเหมาะสมของการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ เช่น ใช้วิธีตกตะกอนด้วยสารละลายโดยใช้อะซีโตน , เอธิลแอลกอฮอล์ , เมทธานอล หรือใช้เกลืออนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟตหรือโซเดียมซัลเฟต เป็นต้น แต่ในการทดลองนี้เลือกวิธีตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 % เพราะสะดวกและไม่ยุ่งยากซับซ้อน จากนั้นนำไปทำการขจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกไปโดยทำ dialyzed พบว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นจาก 198.32 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เป็น 365.94 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน แต่ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเพียง 1.85 เท่า เท่านั้น เพราะเป็นการทำการบริสุทธิ์เอนไซม์เพียงขั้นตอนเดียว แต่ถ้าต้องการให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นควรผ่านขั้นตอนของ

จากการทดลองหาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในถังหมัก ขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง พบว่าการผลิตเอนไซม์นั้นถ้าเปรียบเทียบแอคติวิตีกับการทดลองของคุณเกษม พงษ์มณี (2536) มีค่าต่ำกว่ามาก เนื่องจากเชื้อนี้มีการ subculture มาหลายครั้ง และมีการเก็บรักษาไม่ถูกต้องนัก ทำให้สูญเสียแอคติวิตีไป จึงได้ทำการกระตุ้นโดยการเลี้ยงบน skim milk plate แล้วทำการทดลองในระดับขวดเขย่าในช่วงแรก (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) ไว้เปรียบเทียบผลผลิตที่ได้กับในระดับถังหมัก ขนาด 5 ลิตร จากการทดลองพบว่าในระดับขวดเขย่าเชื้อผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี 209.05 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ได้แอคติวิตี 356.63 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าการผลิตเอนไซม์ในระดับถังหมักมีประสิทธิภาพช่วยให้ผลิตได้ในปริมาณสูงขึ้น และภาวะที่เหมาะสมในระดับถังหมักก็ไม่ได้แตกต่างจากภาวะในระดับขวดเขย่ายกเว้นปริมาณเชื้อเริ่มต้นและปริมาณคาร์บอนเท่านั้น ดังแสดงในตารางที่ 5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบปัจจัยที่ศึกษาในระดับขวดเขย่าและในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

ปัจจัยที่ศึกษา	ระดับขวดเขย่า	ระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร
ปริมาณเชื้อเริ่มต้น	1 %	0.5 %
อัตราการให้อากาศ	——	1.0 vvm.
อัตราเร็วในการกวน	250 rpm.	250 rpm.
ค่าความเป็นกรด - ด่าง	7.0 (ไม่ได้ควบคุม)	7.0 (ควบคุม)
อุณหภูมิในการเลี้ยง	37 องศาเซลเซียส	37 องศาเซลเซียส
ปริมาณคาร์บอน	0.5 % แป้งมันสำปะหลัง	0.1 % แป้งมันสำปะหลัง
ปริมาณไนโตรเจน (กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวัน)	0.3 % (v/v)	0.3 % (v/v)
แอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี	209.05 ยูนิตต่อมิลลิลิตร	356.63 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

จากการนำเอาเอนไซม์ผงซึ่งผ่านการทำให้บริสุทธิ์เพียงขั้นตอนเดียวโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 % มาหา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์พบว่าที่ pH 7.0 - 10.5 สามารถตรวจพบการทำงานของโปรตีเอส ทำให้ทราบว่าโปรตีเอสที่ผลิตได้จาก *B. subtilis* TISTR 25 สามารถทำงานได้ในช่วงกว้างทำให้มีประโยชน์ในแง่การนำไปใช้งานในด้านอุตสาหกรรมโดยเฉพาะในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้ง ซึ่งนำเอาเอนไซม์ที่ผลิตได้จากงานวิจัยนี้ไปใช้ในการผสมในอาหารกุ้งและเชื้อแบคทีเรียสามารถนำมาใช้ในการบำบัดน้ำเสียในบ่อเลี้ยงกุ้ง ซึ่งเอนไซม์ที่หลั่งจากเชื้อชนิดนี้สามารถทำงานได้ตลอด ในช่วงที่ pH ของน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งอยู่ใน

ช่วง pH 7.0 - 10.5 ทำให้ค่าใช้จ่ายน้อยลงเมื่อเติมเชื้อหรือเอนไซม์นี้เพียงครั้งเดียว และจากการใช้สาร EDTA เพื่อยับยั้งการทำงานของนิวทรัลโปรตีเอส พบว่าที่ pH 10.5 แอคติวิตีของโปรตีเอสจะลดลงน้อยมากอาจเป็นเพราะที่ pH 10.5 นิวทรัลโปรตีเอสไม่สามารถทำงานได้จึงมีแต่แอลคาไลน์โปรตีเอสเท่านั้นที่สามารถทำงานได้ แต่ที่ pH 7.0 - 9.5 เมื่อใช้สาร EDTA ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์พบว่าแอคติวิตีลดลง 77.94 - 16.10 % แสดงว่าในช่วง pH นี้เป็นช่วงการทำงานของนิวทรัลโปรตีเอส ส่วนแอคติวิตีที่ยังคงเหลืออยู่ในที่ที่มี EDTA อาจเนื่องมาจากที่ pH 7.0 - 9.5 มีแอลคาไลน์โปรตีเอสปนอยู่ด้วย ทำให้ทราบว่าการทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนเอนไซม์โปรตีเอสด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 % เพียงขั้นตอนเดียวนั้นไม่สามารถแยกนิวทรัลโปรตีเอสและแอลคาไลน์โปรตีเอสออกจากกันได้ และจากงานวิจัยหาภาวะที่เหมาะสมในถังหมัก 5 ลิตร นี้เราตรวจหาเฉพาะแอลคาไลน์โปรตีเอสเท่านั้นเราจึงเลือกใช้ที่ pH 10.5 ในการวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์เนื่องจากที่ pH 10.5 นิวทรัลโปรตีเอสไม่สามารถทำงานได้จึงมีเพียงแอลคาไลน์โปรตีเอสเท่านั้น ถึงแม้ว่าที่ pH 10.0 จะตรวจพบโปรตีเอสได้มากกว่าแต่ก็ยังมีนิวทรัลโปรตีเอสปนอยู่มากกว่าที่ pH 10.5

จากงานวิจัยทั้งหมดนี้ถ้าเรานำมาคำนวณต้นทุนการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีพบว่าในระดับถังหมักจะถูกกว่าในระดับขวดเขย่าเมื่อพิจารณาจากปริมาณวัตถุดิบและปริมาณเชื้อที่ใช้ ค่าใช้จ่ายในการผลิตในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่องโดยมีปริมาณน้ำหมัก 3.5 ลิตร ต่อการหมัก 1 ครั้ง มีดังนี้

1. ค่าวัตถุดิบในการผลิต ประมาณ 900 บาท
2. ค่าไฟฟ้าและสาธารณูปโภค ประมาณ 1,800 บาท

ดังนั้นต้นทุนการผลิตต่อครั้งประมาณ 2,700 บาท

ปริมาณเอนไซม์ผงที่ได้ต่อการหมัก 1 ครั้ง ประมาณ 6.65 กรัมต่อปริมาณน้ำหมัก 3.5 ลิตร ดังนั้นได้แอคติวิตีรวมเท่ากับ (330.40 x 3,500)/181 = 960.74 unit / gm. enzyme powder เมื่อเรานำมาเปรียบเทียบกับเอนไซม์ผงของบริษัท sigma ซึ่งผลิตได้จาก *B. licheniformis* ซึ่งปริมาณเอนไซม์ผง 25 มิลลิกรัม จะมีแอคติวิตีเท่ากับ 175 ยูนิต ซึ่งมีราคา 1,500 บาท จึงเห็นได้ว่าเอนไซม์ผงที่ผลิตโดยการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในงานวิจัยนี้มีราคารวมทั้งหมด 54,762.17 บาท ซึ่งทำให้คุ้มค่าในการผลิตเอนไซม์ในเชิงการค้า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลอง

1. ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง ในอาหารสูตร Basal medium โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v) อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm. อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm. อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 ^{0}C ควบคุมความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 ซึ่งมีปริมาณแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 0.1 % (w/v) และปริมาณไนโตรเจนในกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน1:1 เท่ากับ 0.3 % (v/v) โดยสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดประมาณ 174.28 ยูนิตต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
2. การเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่อุณหภูมิ 65 , 25 - 30 , 4 , -20 และ -80 ^{0}C สามารถเก็บรักษาเอนไซม์ได้โดยไม่สูญเสียแอคติวิตีเลยในระยะเวลา 60 วัน
3. เอนไซม์ผงที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 % มีความบริสุทธิ์เพียง 1.85 เท่า และมีช่วง pH การทำงานของเอนไซม์กว้าง ตั้งแต่ 7.0 - 10.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย