บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เกษม พงษ์มณี (2536) ได้ศึกษาการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยการคัดเลือกสูตรอาหารในระดับขวดเขย่า และพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1%(w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05%(w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001%(w/v), แป้งข้าวเหนียว 0.25%(w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในอัตราส่วน 1:1 ซึ่งผ่านการย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริก อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อ 37 $^{\circ}C$ อัตราการเขย่า 250 rpm. ซึ่งข้อมูลเบื้องต้นนี้ได้นำมาเป็นภาวะเริ่มแรกของการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง โดยได้ดัดแปลงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งข้าวเหนียวเป็นแป้งมันสำปะหลังเนื่องจากประเทศไทยเรามีปริมาณแป้งมันสำปะหลังเป็นจำนวนมากและมีราคาถูกกว่าแป้งข้าวเหนียว

4.1.1 รูปแบบการเปลี่ยน pH การเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอส

จากการเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 เพื่อผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Basal medium ที่มีแป้งมันสำปะหลังปริมาณ

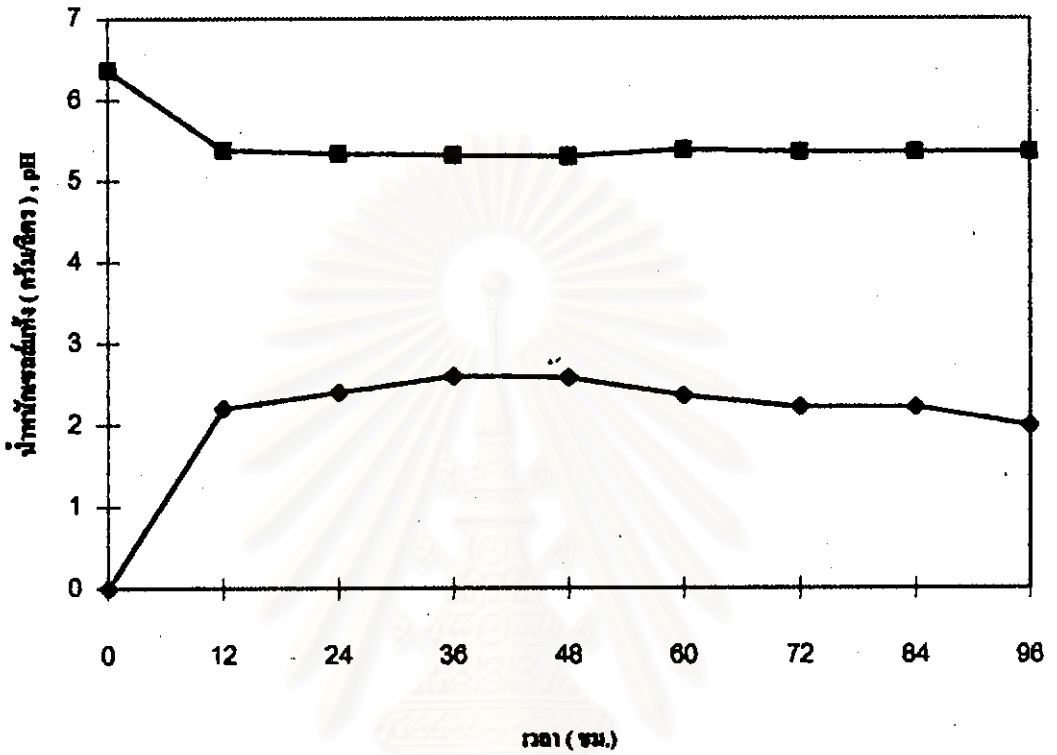
0.5 % (w/v) กากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v) ที่อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm. อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm. เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยไม่มีการควบคุมความเป็นกรด - ด่าง ผลการทดลองแสดงดังกราฟรูปที่ 1 พบว่าในช่วงชั่วโมงที่ 0-24 เชื้อจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วซึ่งอยู่ในระยะ log phase และ pH จะลดลงจาก 6.4 มาเป็น 5.5 หลังจากชั่วโมงที่ 24 pH จะมีค่าเพิ่มขึ้นแต่ก็ยังมีค่าต่ำกว่า 7.0 เมื่อวิเคราะห์หาแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีไม่พบเลย ดังนั้นการทดลองต่อๆไป ยกเว้นการทดลองที่แปรผัน pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงต้องมีการควบคุม pH ด้วย 2 N NaOH เพื่อควบคุมให้ pH อยู่ในช่วง 7.0 ทุกการทดลอง

4.1.2 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้

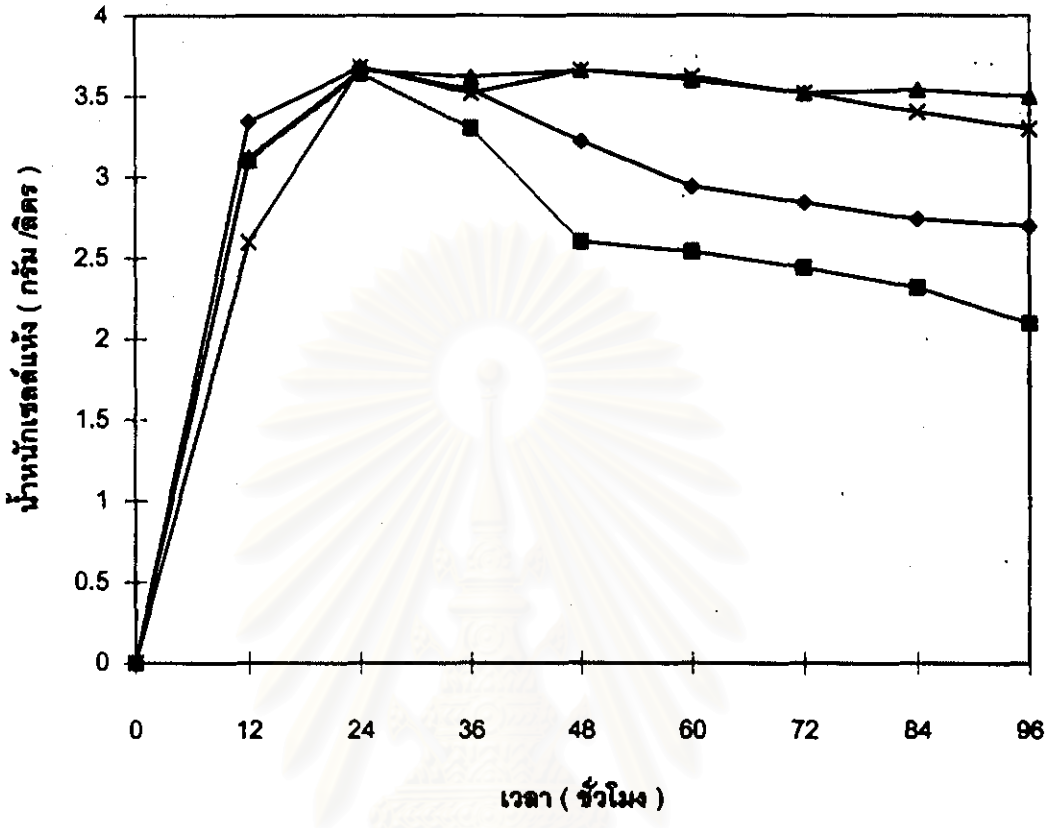
การผลิตเอนไซม์ในถังหมักจะทำให้ได้ ผลผลิตในปริมาณสูง ซึ่งจะต้องหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต ปัจจัยหนึ่งที่ต้องคำนึงถึงก็คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น โดยเมื่อเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในสูตรอาหารที่เตรียมได้จากข้อ 3.1.3 ในบทที่ 3 โดยใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.3% (v/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยมี pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C ใช้อัตราเร็วในการกวน 250 rpm. อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm. แล้วแปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้นตั้งแต่ 0.1 %, 0.5 %, 1.0 % และ 3.0 % (v/v) ตามลำดับ ติดตามการเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอส โดยเก็บน้ำหมักทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ทำการทดลองตามการทดลองในบทที่ 3 ข้อที่ 3.4.2, 3.4.3, 3.5 และ 3.7 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังกราฟรูปที่ 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ จากกราฟรูปที่ 2 จะพบว่าในชั่วโมงที่ 0 - 24 จะมีการเจริญของเชื้อแบบทวีคูณในช่วง

log phase และ พบว่าที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.1% - 0.3 % การเจริญจะสูงสุดใกล้เคียงกัน แต่ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5% จะพบว่าเชื้อสามารถผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงสุดโดยเริ่มผลิตตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และผลิตได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 84 ซึ่งผลิตได้ประมาณ 169.71 ยูนิตต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3 เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์พบว่าในชั่วโมงที่ 0 - 24 ของทุกปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ พบว่ามีการลดลงของน้ำตาลอย่างรวดเร็วซึ่งสอดคล้องกับกราฟในรูปที่ 2 ซึ่งในชั่วโมงที่ 0 - 24 มีการเจริญแบบทวีคูณในระยะ log phase แสดงว่ามีการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญเติบโตในระยะ log phase หลังจากนั้นการเจริญเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase ปริมาณน้ำตาลค่อนข้างคงที่ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 4 เมื่อนำน้ำหนักเซลล์แห้งและแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีในชั่วโมงที่ 84 ของแต่ละปริมาณเชื้อเริ่มต้นมาเปรียบเทียบกัน พบว่าที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v) สามารถผลิต แอลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงสุด ดังแสดงในกราฟรูปที่ 5 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5% (v/v)

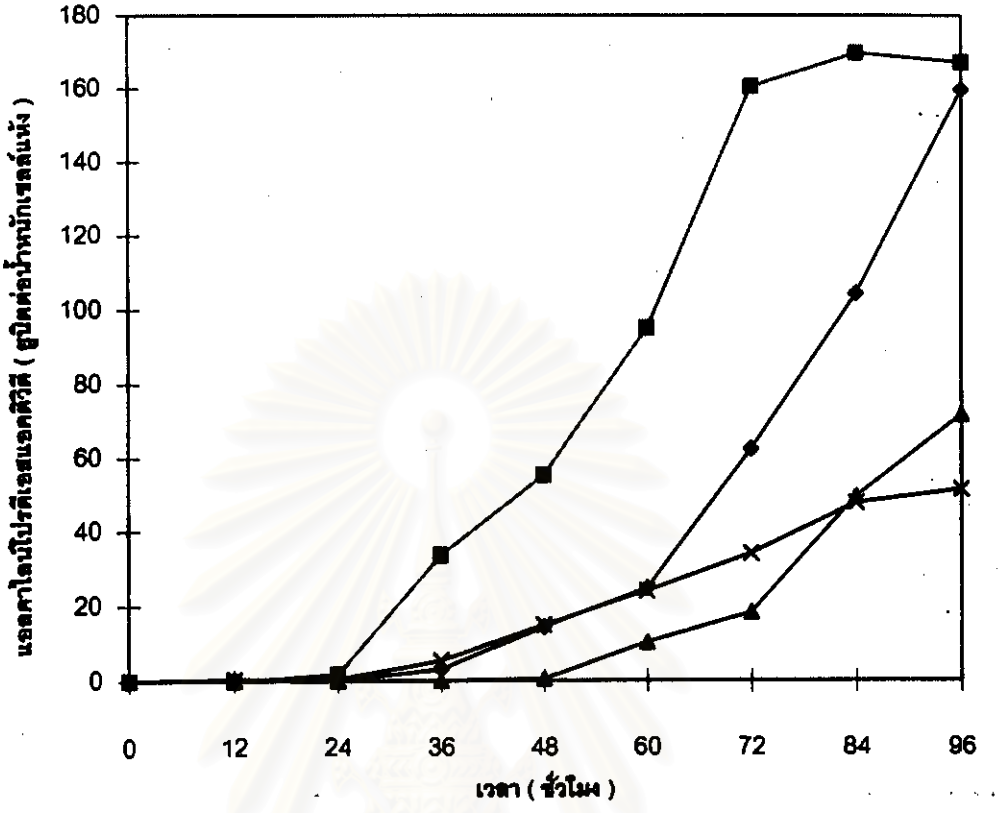
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



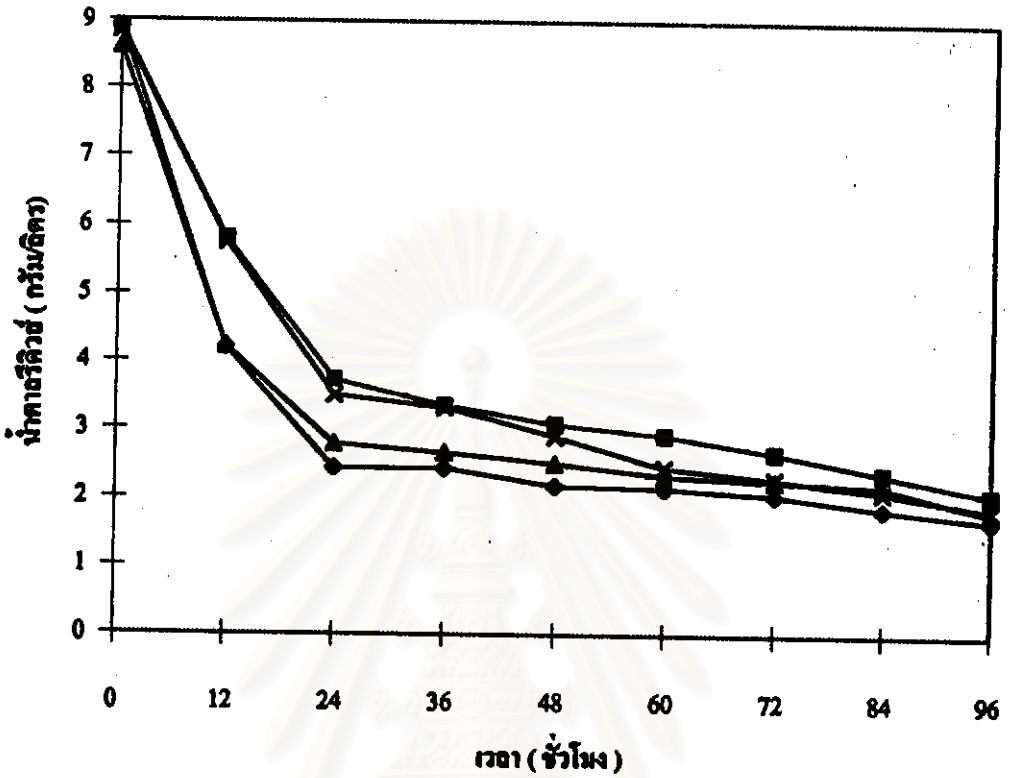
รูปที่ 1 การเจริญและ pH เมื่อเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v) แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0 % (v/v) , อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm. , อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm. , อุณหภูมิในการเลี้ยงเท่ากับ 37 ^{o}C โดยไม่มีการควบคุม pH ตลอดการทดลอง



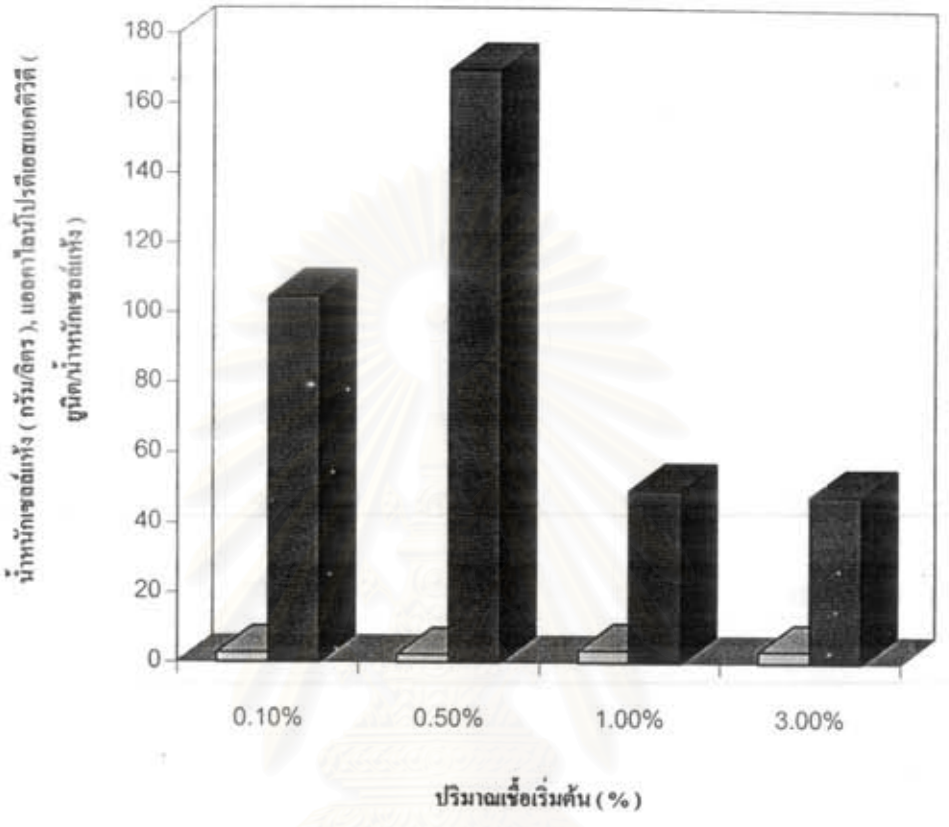
รูปที่ 2 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้เป็น 0.1 % , 0.5 % , 1.0 % , และ 3.0 % (v/v) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v) อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm. , อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0



รูปที่ 3 เปรียบเทียบแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้เป็น 0.1 % , 0.5 % , 1 .0 % , และ 3.0 % (v/v) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v) อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm. , อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C , pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0



รูปที่ 4 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้เป็น 0.1 % , 0.5 % , 1.0 % , และ 3.0 % (v/v) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.1 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 %(w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v) อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm. , อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C , pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0



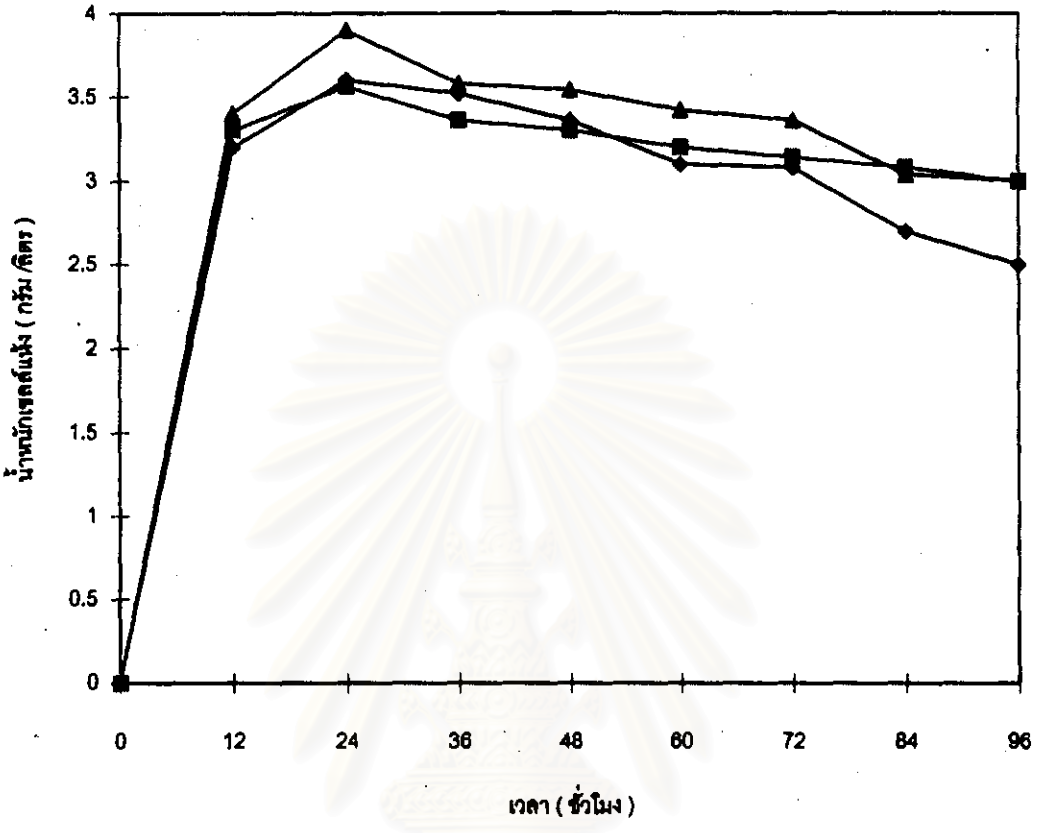
รูปที่ 5 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิต แอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 0.1 %, 0.5 % ,1.0 % และ 3.0 % (v/v) ในชั่วโมงที่ 84 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v) อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 $^{\circ}C$,pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0

น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)

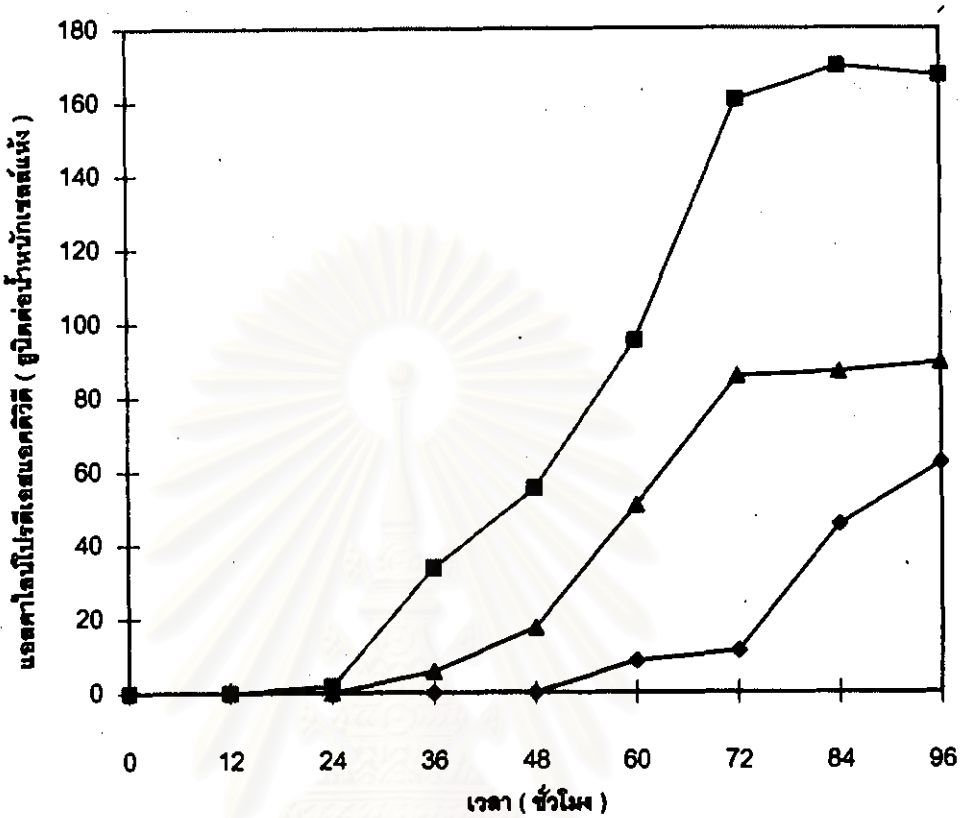
แอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี (ยูนิต/น้ำหนักเซลล์แห้ง)

4.1.3 ผลของอัตราการให้อากาศ

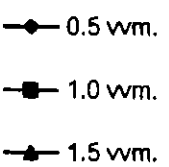
เนื่องจากปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีผลโดยตรงต่อการเจริญและการผลิตผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ ซึ่งปัจจัยที่มีผลโดยตรงต่ออัตราการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ อัตราการให้อากาศและอัตราการกวน จากการเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 ตามวิธีและภาวะเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 4.1.2 โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5% (v/v) แล้วแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 vvm., 1.0 vvm., และ 1.5 vvm. ตามลำดับ ติดตามการเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสเช่นเดียวกับข้อ 4.1.2 ผลการทดลองดังแสดงในกราฟรูปที่ 6, 7, 8 และ9 ตามลำดับ พบว่าที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.5 vvm. จะมีการเจริญของเชื้อสูงสุด ในขณะที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm. และ 1.0 vvm. การเจริญของเชื้อจะใกล้เคียงกัน โดยในชั่วโมงที่ 0 - 24 จะมีการเจริญของเชื้อแบบทวีคูณในระยะ log phase ดังแสดงในกราฟรูปที่ 6 แต่สำหรับการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสพบว่าที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm. จะผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด และที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 vvm.เชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้ต่ำและช้ากว่า ดังแสดงในกราฟรูปที่ 7 เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์พบว่าในชั่วโมงที่ 0 - 24 ของทุกอัตราการให้อากาศ พบว่ามีการลดลงของน้ำตาลอย่างรวดเร็วซึ่งสอดคล้องกับกราฟในรูปที่ 6 ซึ่งมีการเจริญแบบทวีคูณในระยะ log phase แสดงว่ามีการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ หลังจากการเจริญเข้าสู่ stationary phase ปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่จะค่อนข้างคงที่ ดังแสดงในรูปที่ 8 เมื่อนำน้ำหนักเซลล์แห้งและแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีในชั่วโมงที่ 84 ของแต่ละอัตราการให้อากาศมาเปรียบเทียบกัน พบว่าที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0vvm. สามารถผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงสุด ดังแสดงในกราฟรูปที่ 9 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm.

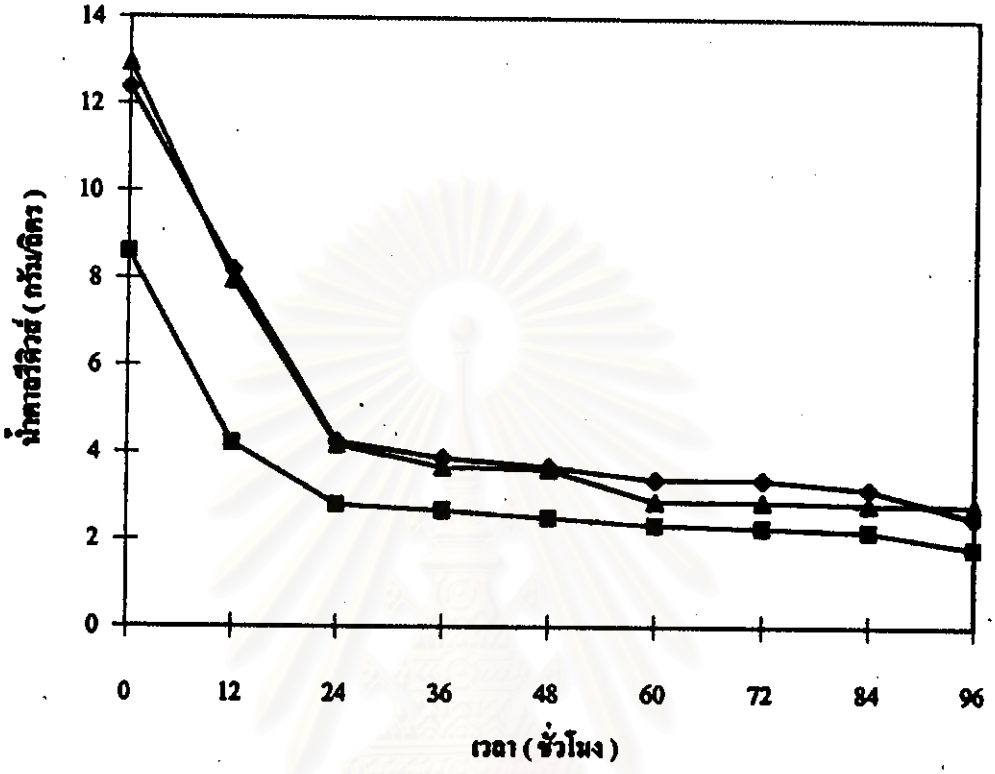


รูปที่ 6 เปรียบเทียบการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 vvm., 1.0 vvm. และ 1.5 vvm. โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 %(w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0

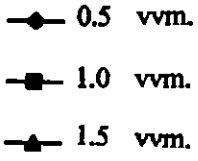


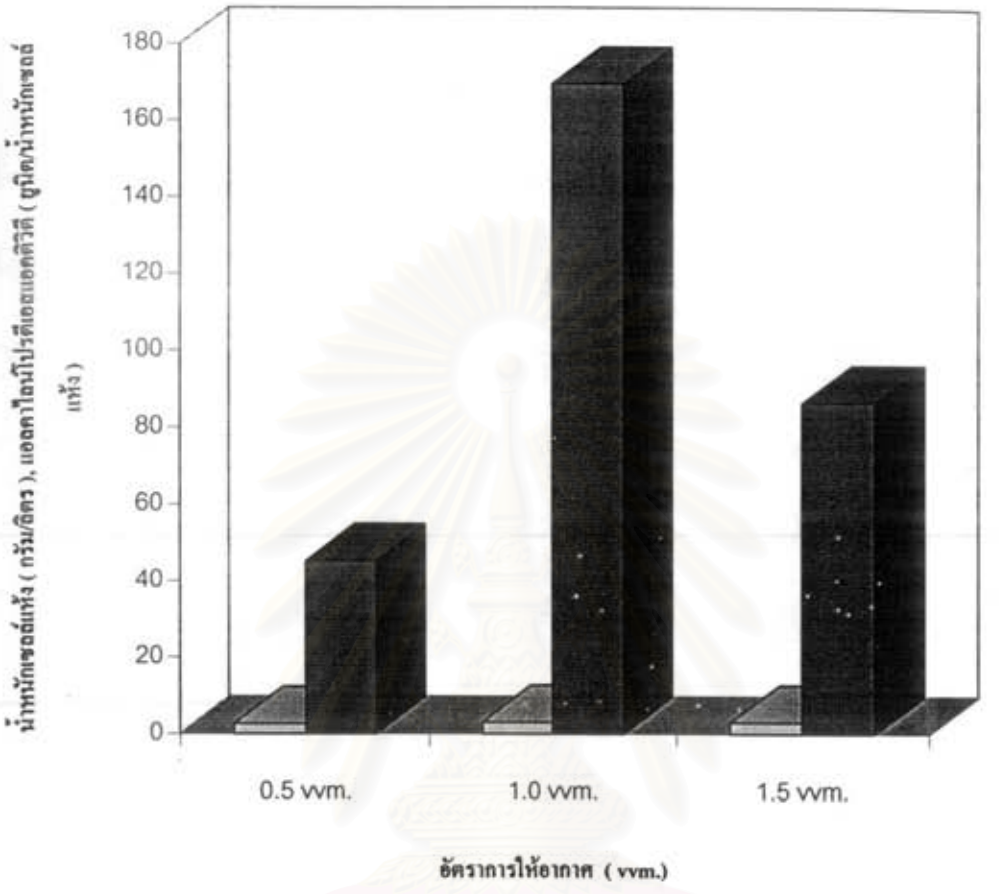
รูปที่ 7 เปรียบเทียบแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 vvm., 1.0 vvm. และ 1.5 vvm. โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 %(w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v) , ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 $^{\circ}C$, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0





รูปที่ 8 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 vvm., 1.0 vvm. และ 1.5 vvm. โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0





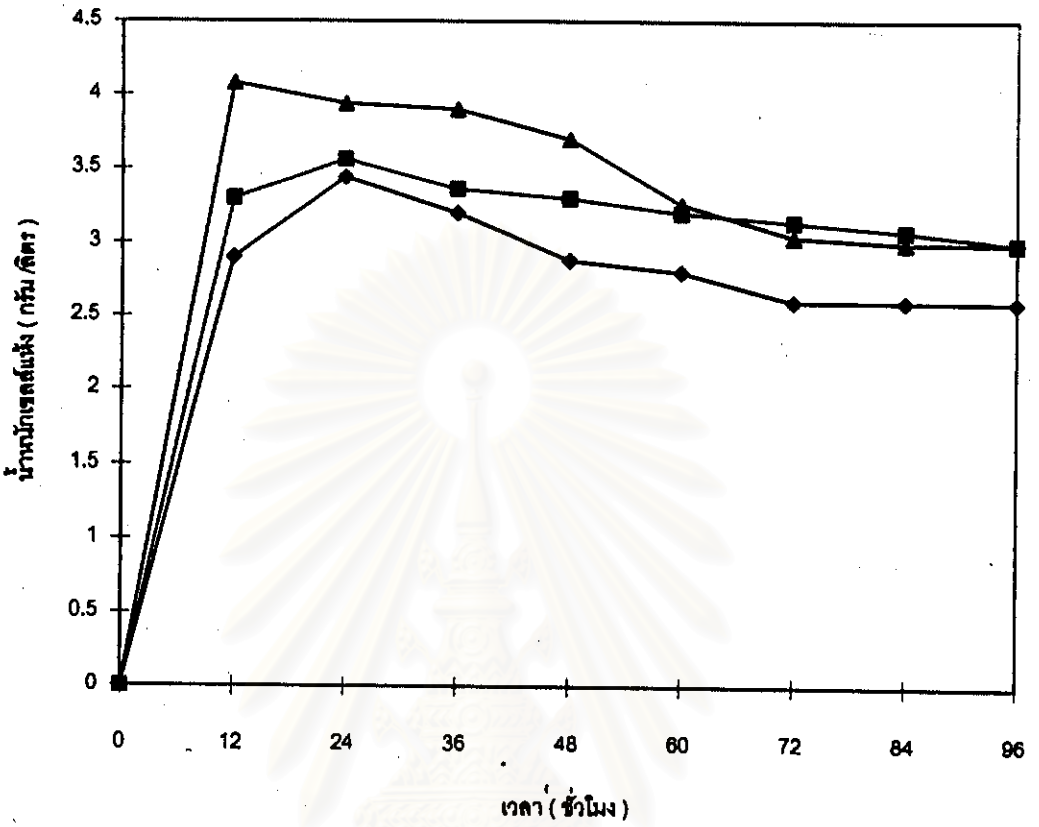
รูปที่ 9 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิต แอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 vvm., 1.0 vvm. และ 1.5 vvm.. ในชั่วโมงที่ 84 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 %(w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 $^{\circ}C$, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0

4.1.4 ผลของอัตราเร็วในการกวน

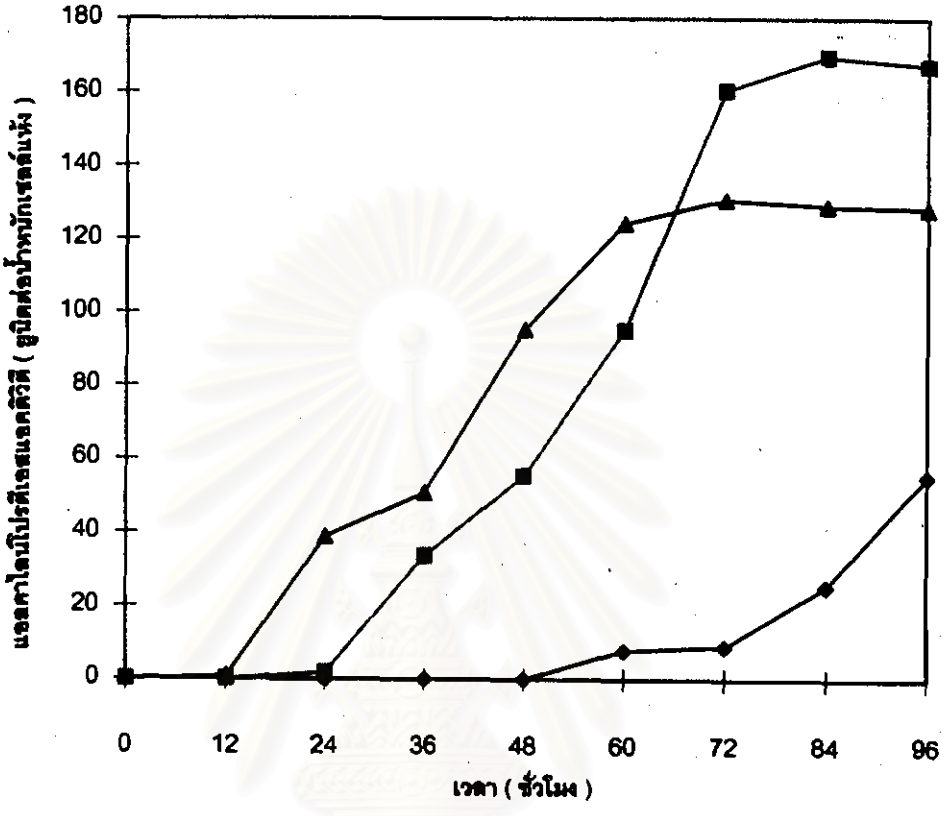
อัตราเร็วในการกวนก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่ออัตราการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งใบกวนในถังหมักทำหน้าที่ในการตีฟองอากาศที่ผ่านเข้าไปจากก้นถังหมักให้เป็นฟองขนาดเล็กและแตกกระจายไปยังส่วนต่างๆของอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้การกวนยังทำให้จุลินทรีย์และสารอาหารที่ใช้ไม่ตกตะกอน เกิดการผสมและสัมผัสกันอย่างสม่ำเสมอ จากการเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 ตามวิธีและภาวะเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 4.1.2 โดยมีอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm. แล้วแปรผันอัตราเร็วในการกวนเป็น 150 rpm., 250 rpm.และ 350 rpm. ตามลำดับ คิดตามการเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสเช่นเดียวกับข้อ 4.1.2 ผลการทดลองดังแสดงในกราฟรูปที่ 10, 11, 12 และ 13 ตามลำดับ จากกราฟรูปที่10 พบว่าที่อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 350 rpm.จะมีการเจริญของเชื้อสูงสุด ในขณะที่อัตราเร็วในการกวนที่ 150 rpm. และ 250 rpm. การเจริญของเชื้อจะใกล้เคียงกัน แต่ที่อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm. เชื้อจะผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสให้แอคติวิตีสูงสุด ในขณะที่อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 150 rpm. จะพบว่าเชื้อผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสให้แอคติวิตีต่ำสุด ผลิตเอนไซม์ได้ช้า ดังแสดงในกราฟรูปที่ 11 เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์พบว่าในชั่วโมงที่ 0 - 24 ของทุกอัตราเร็วในการกวน พบว่ามีการลดลงของน้ำตาลอย่างรวดเร็วซึ่งสอดคล้องกับกราฟในรูปที่ 10 ซึ่งมีการเจริญของเชื้อแบบทวีคูณในระยะ log phase แสดงว่าน้ำตาลถูกใช้ในการเจริญเติบโตในช่วง log phase หลังจากเชื้อเจริญเข้าสู่ stationary phase แล้วปริมาณน้ำตาลจะค่อนข้างคงที่ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 12 เมื่อนำน้ำหนักเซลล์แห้งและแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีในชั่วโมงที่ 84 ของแต่ละอัตราเร็วในการกวนมาเปรียบเทียบกัน พบว่าที่อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm. สามารถผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอส

ได้สูงสุด ดังแสดงในกราฟรูปที่ 13 ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ที่อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm.

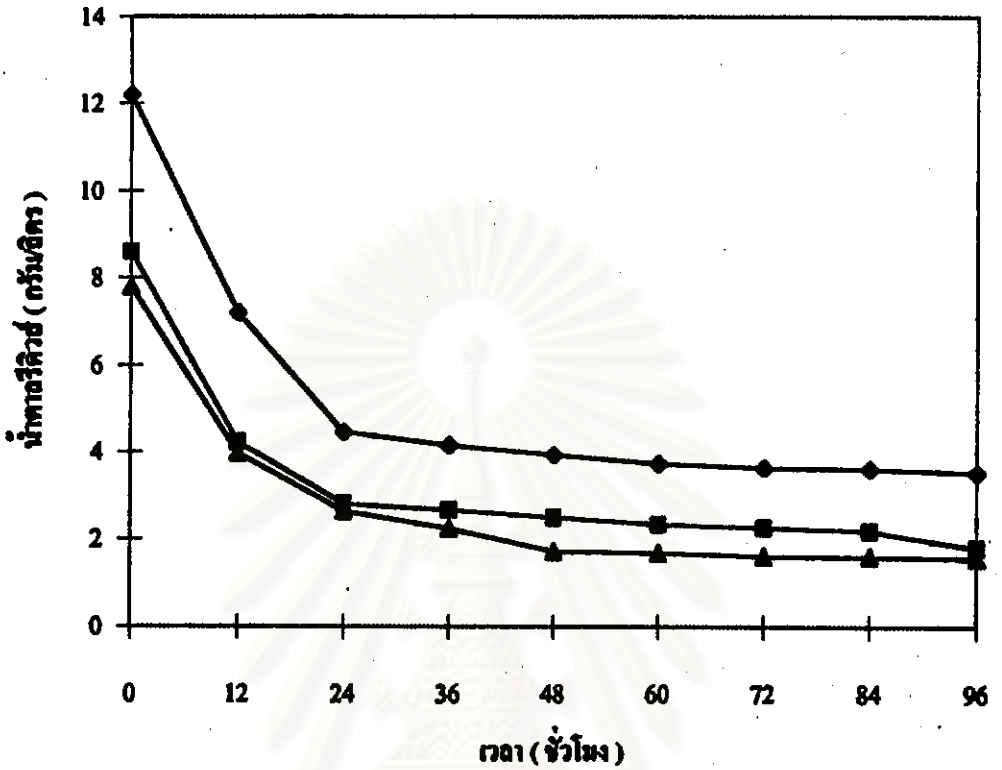
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



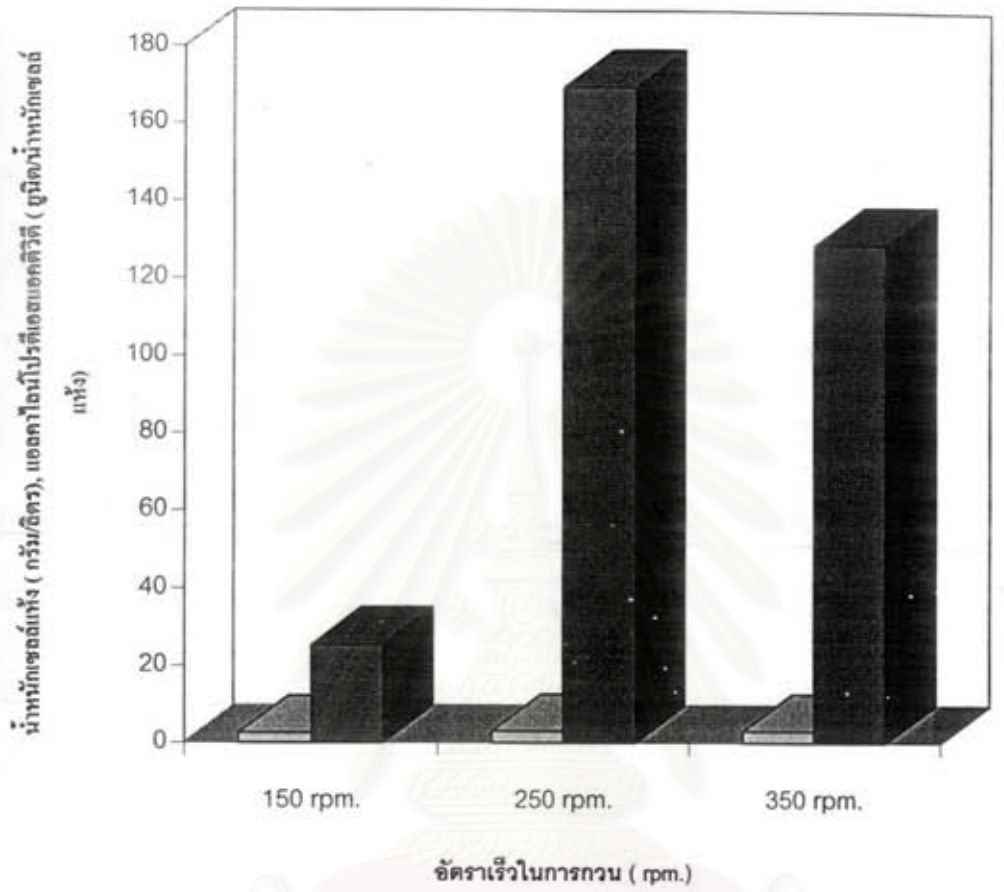
รูปที่ 10 เปรียบเทียบการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันอัตราเร็วในการกวนเป็น 150 rpm., 250 rpm., และ 350 rpm. โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v) อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C,pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0



รูปที่ 11 เปรียบเทียบแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันอัตราเร็วในการกวนเป็น 150 rpm., 250 rpm. , และ 350 rpm. โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 %(w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v) อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm. , อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 ^{o}C, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0



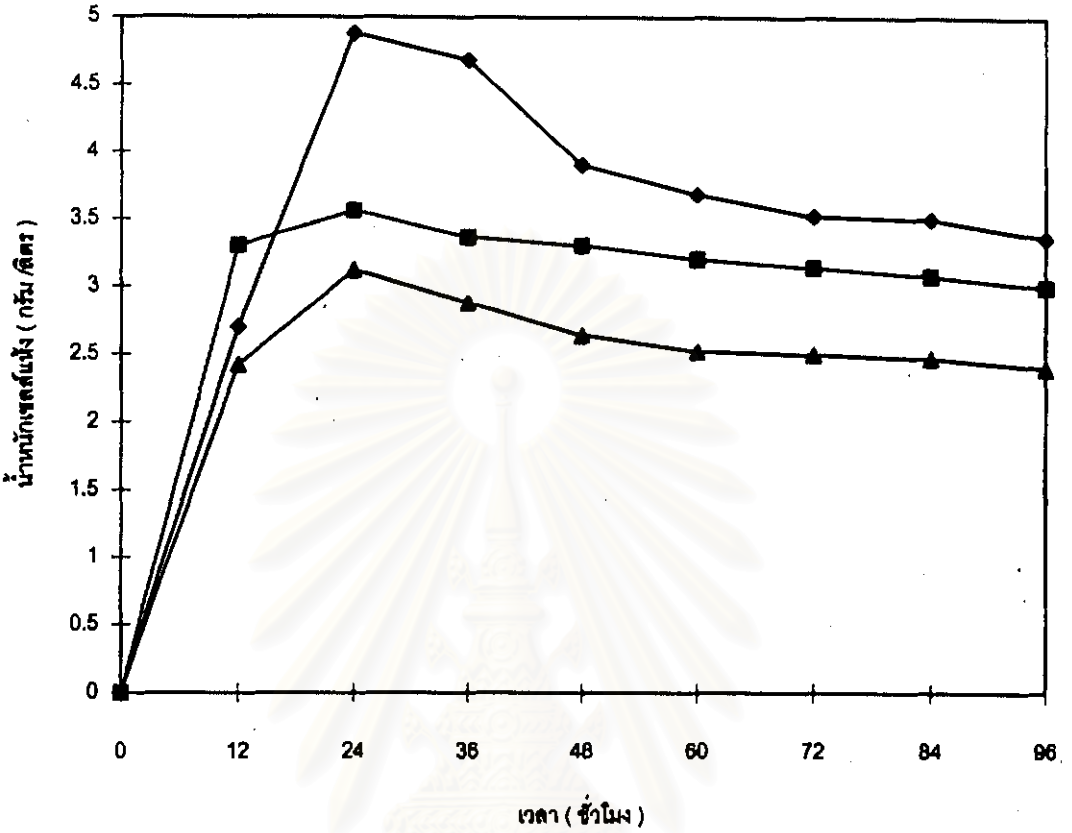
รูปที่ 12 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันอัตราเร็วในการกวนเป็น 150 rpm., 250 rpm., และ 350 rpm. โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v) อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 $^{\circ}C$, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0



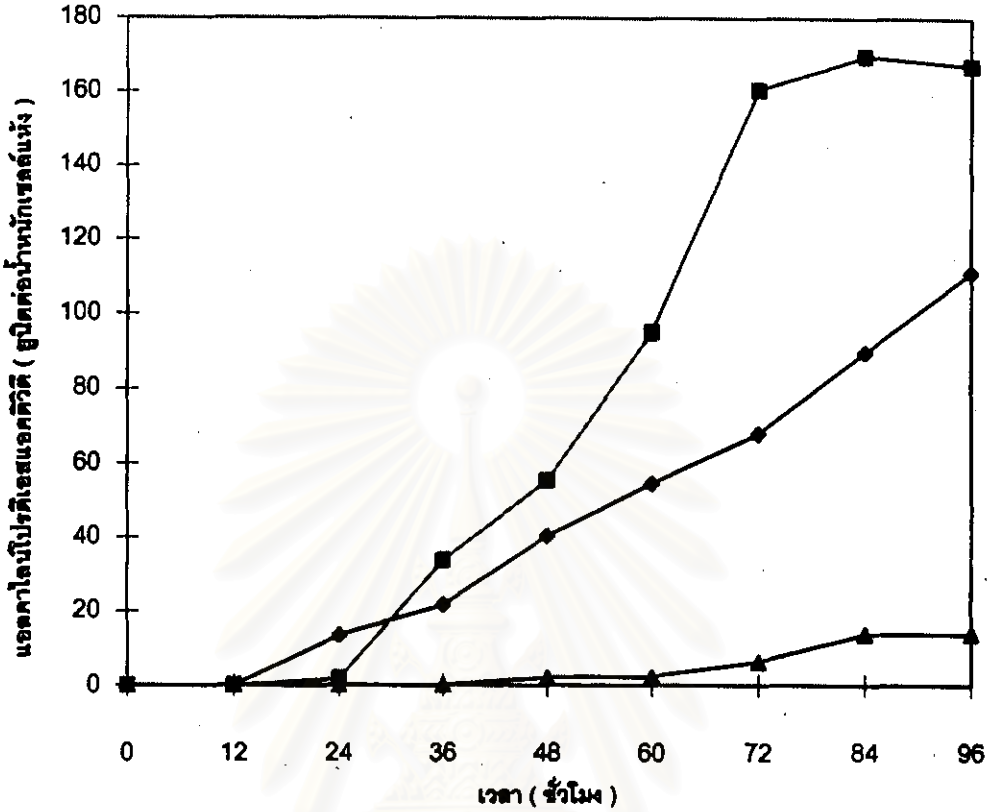
รูปที่ 13 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิต แอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันอัตราเร็วในการกวนเป็น 150 rpm., 250 rpm.และ 350 rpm. ในชั่วโมงที่ 84 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v) , ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v) อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm. ., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 ^{o}C , pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0

4.1.5 ผลของอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อ

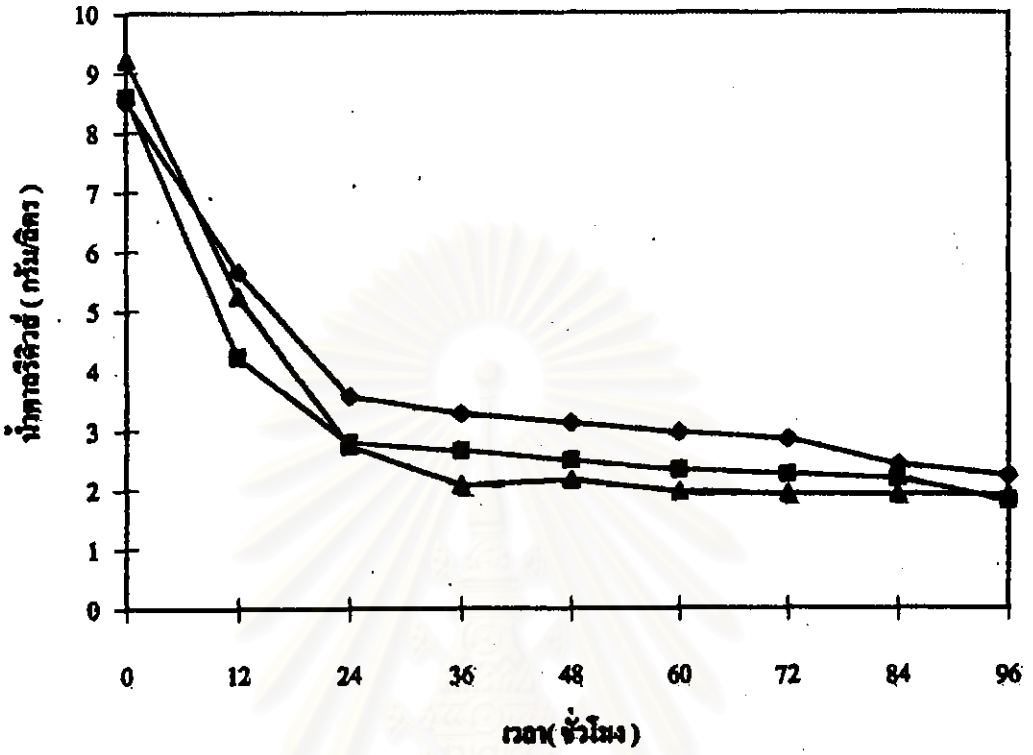
อุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่ออัตราการเจริญและการผลิตเอนไซม์ในถังหมักเช่นกัน เมื่อเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในภาวะเดียวกับที่ใช้ใน 4.1.2, 4.1.3 และ 4.1.4 แล้วแปรผันอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 30 °C, 37 °C และ 40 °C ตามลำดับ คิดตามการเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสเช่นเดียวกับข้อ 4.1.2 ผลการทดลองดังแสดงในกราฟรูปที่ 14, 15, 16 และ 17 ตามลำดับ จากกราฟรูปที่ 14 พบว่าที่อุณหภูมิเท่ากับ 30 °C มีการเจริญของเชื้อสูงที่สุด โดยจะมีการเจริญของเชื้อเข้าสู่ log phase ในชั่วโมงที่ 0 - 24 แต่ที่อุณหภูมิในการเลี้ยงที่ 37 °C พบว่าเชื้อผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสให้แอคติวิตีสูงสุด ในขณะที่อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อที่ 40 °C เชื้อผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้น้อยมาก ดังแสดงในกราฟรูปที่ 15 เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์พบว่าในชั่วโมงที่ 0 - 24 ของทุกอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีการลดลงของน้ำตาลอย่างรวดเร็วซึ่งสอดคล้องกับกราฟในรูปที่ 14 ซึ่งมีการเจริญแบบทวีคูณในระยะ log phase แสดงว่าเชื้อมีการใช้น้ำตาลในการเจริญเติบโตแบบทวีคูณในช่วงนี้เช่นกัน หลังจากเชื้อเจริญเข้าสู่ stationary phase แล้วนั้นปริมาณน้ำตาลจะค่อนข้างคงที่ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 16 เมื่อนำน้ำหนักเซลล์แห้งและแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีในชั่วโมงที่ 84 ของแต่ละอุณหภูมิในการเลี้ยงมาเปรียบเทียบกัน พบว่าที่อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 37 °C สามารถผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงสุด ดังแสดงในกราฟรูปที่ 17 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้อุณหภูมิในการเลี้ยงเท่ากับ 37 °C



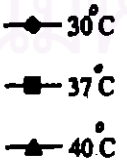
รูปที่ 14 เปรียบเทียบการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเป็น 30 °C, 37 °C และ 40 °C โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v) อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm. ., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0

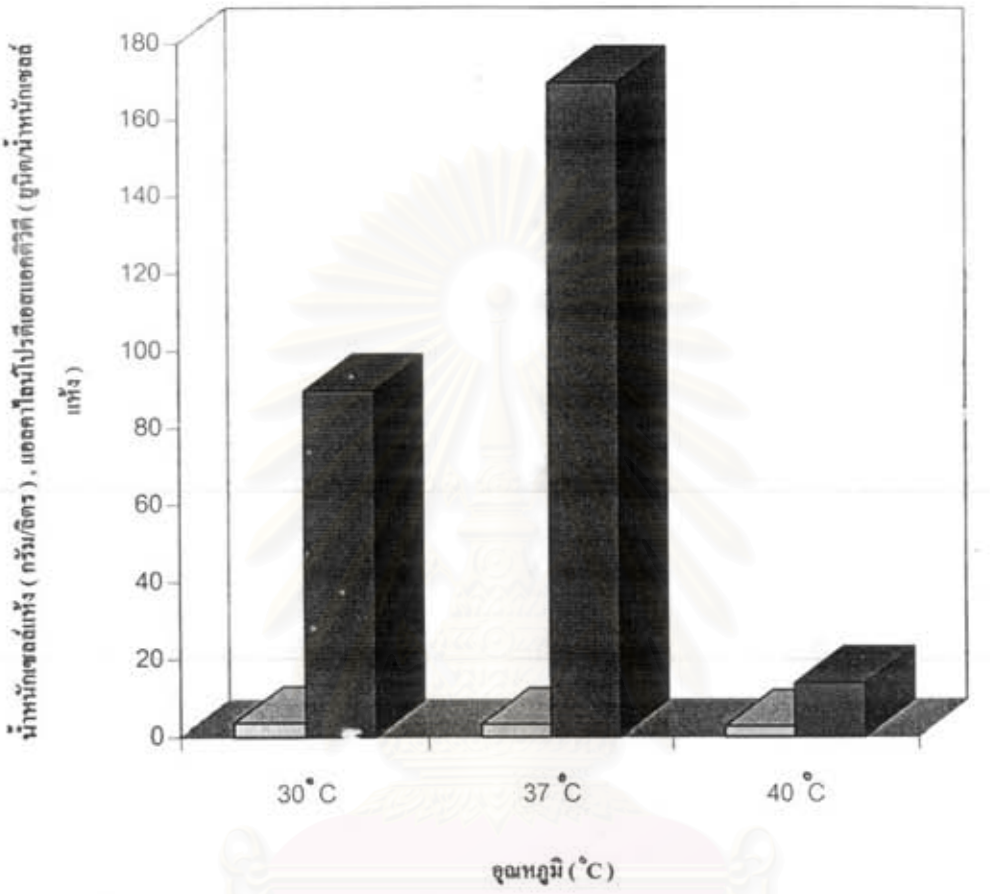


รูปที่ 15 เปรียบเทียบแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเป็น 30 °C, 37 °C และ 40 °C โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v) อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm. ., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0



รูปที่ 16 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเป็น 30 °C, 37 °C และ 40 °C โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v) อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0





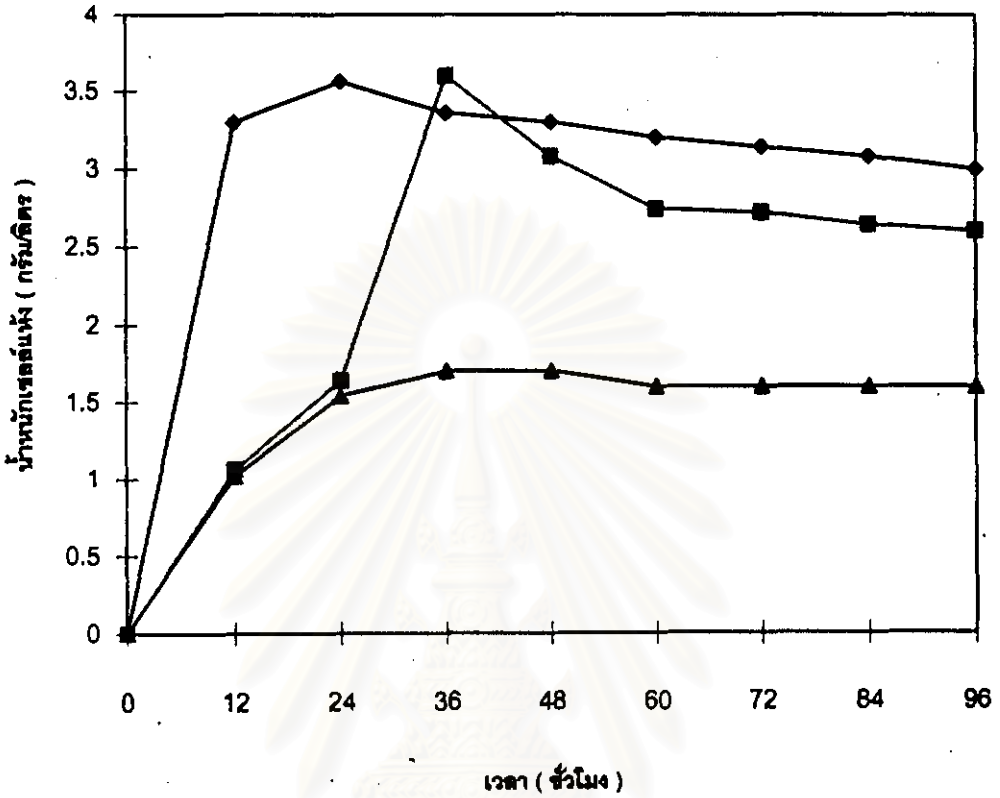
รูปที่ 17 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิต แอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเป็น 30 °C , 37 °C และ 40 °C ในชั่วโมงที่ 84 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v) อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm. , อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0

4.1.6 ผลของ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

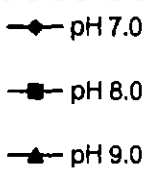
pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อขบวนการผลิตเอนไซม์และการส่งสารผ่านเซลล์เมมเบรน ซึ่งเมื่อเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในภาวะเดียวกับที่ใช้ในข้อ 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4 และ 4.1.5 แล้วแปรผัน pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 , 8.0 และ 9.0 ตามลำดับ โดยใช้ 2 N NaOH เป็นตัวปรับค่าความเป็นด่าง แล้วติดตามการเจริญและการผลิตเอลคาไลน์โปรตีเอสเช่นเดียวกับข้อ 4.1.2 ผลการทดลองดังแสดงในกราฟรูปที่ 18, 19, 20 และ 21 ตามลำดับ จากกราฟรูปที่ 18 พบว่าที่ pH เท่ากับ 7.0 เชื้อจะมีการเจริญแบบทวีคูณในระยะ log phase ในชั่วโมงที่ 0 - 24 ส่วนที่ pH เท่ากับ 8.0 จะมีช่วง log phase ในช่วง 24 ชั่วโมงแรกค่อนข้างต่ำกว่าที่ pH 7.0 และจะเริ่มเข้าสู่ระยะ log phase สูงที่สุดชั่วโมงที่ 36 ส่วนที่ pH เท่ากับ 9.0 เชื้อแทบจะมีการเจริญน้อยที่สุด จากกราฟรูปที่ 19 เมื่อพิจารณาการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสนั้นพบว่าที่ pH เท่ากับ 7.0 จะมีการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุด ในขณะที่ pH เท่ากับ 8.0 มีการผลิตเอนไซม์ได้น้อยมากและไม่มีการผลิตเอนไซม์นี้เลยที่ pH เท่ากับ 9.0 เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าที่ pH เท่ากับ 8.0 น้ำตาลรีดิวส์แทบจะไม่ได้ใช้เลยในช่วง 24 ชั่วโมงแรก ซึ่งสอดคล้องกับกราฟรูปที่ 18 ที่มีการเจริญของเชื้อในระยะ log phase ที่ค่อนข้างต่ำเกิดขึ้น และที่ pH เท่ากับ 9.0 น้ำตาลรีดิวส์จะถูกใช้ไปน้อยมาก เนื่องมาจากเชื้อมีการเจริญเติบโตน้อยการใช้น้ำตาลจึงน้อยไปด้วย ส่วนที่ pH เท่ากับ 7.0 เชื้อมีการใช้น้ำตาลอย่างมากในช่วง 24 ชั่วโมงแรก ซึ่งเชื้อใช้ในการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ หลังจากเชื้อเข้าสู่ stationary phase แล้ว ปริมาณน้ำตาลมีปริมาณคงที่ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 20 เมื่อนำน้ำหนักเซลล์แห้งและแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีในชั่วโมงที่ 84 ของแต่ละ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมาเปรียบเทียบกันพบว่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 สามารถผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี

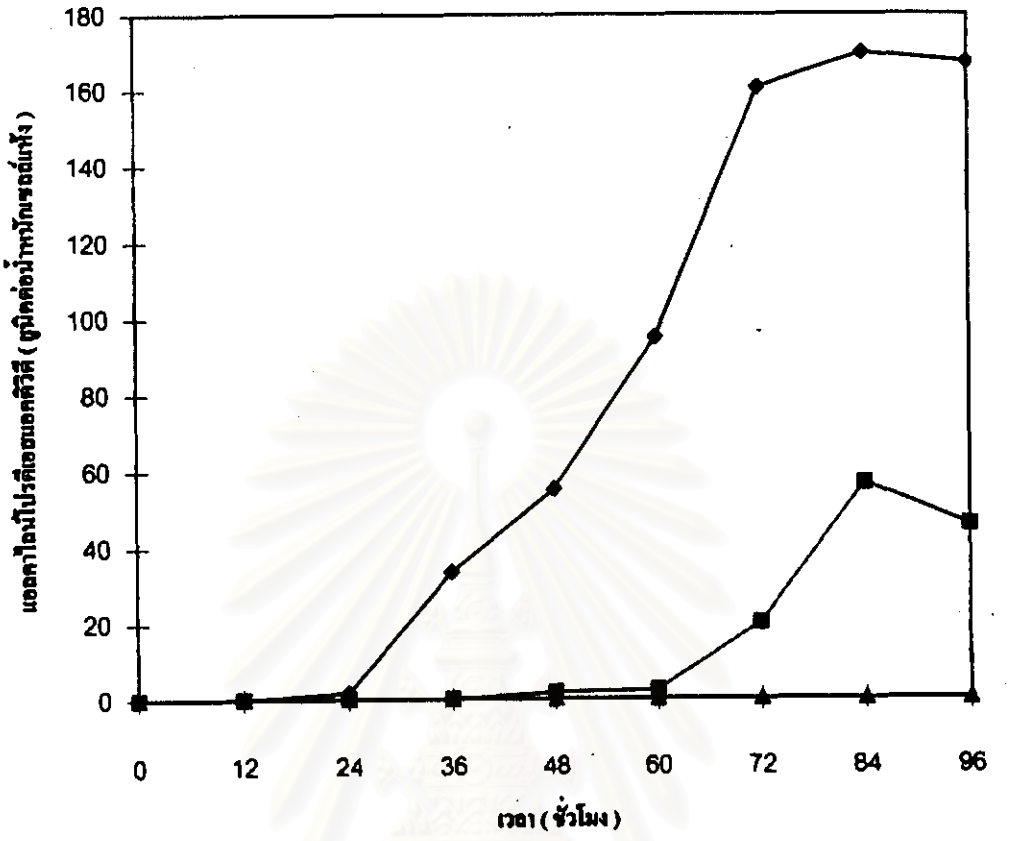
สูงสุด ดังแสดงในกราฟรูปที่ 21 ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ pH เริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

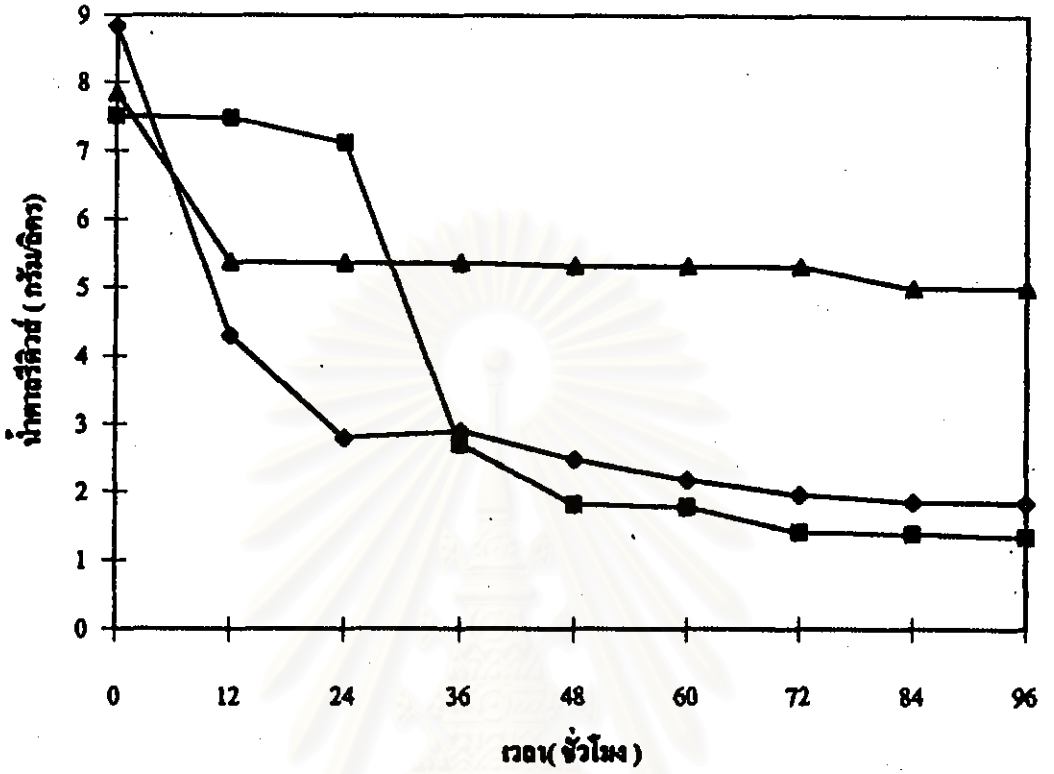


รูปที่ 18 เปรียบเทียบการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 แปรผัน pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 , 8.0 และ 9.0 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v) , ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v) อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm. ., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C

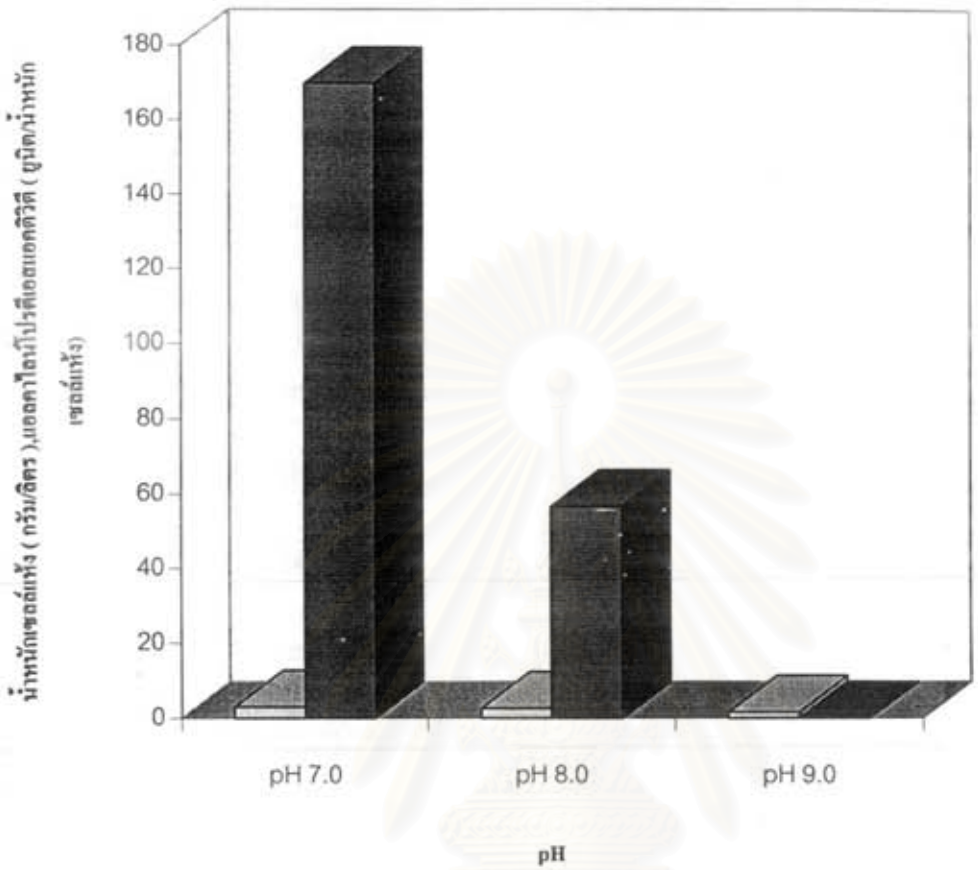




รูปที่ 19 เปรียบเทียบแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผัน pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 , 8.0 และ 9.0 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v) , ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v) อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm. ., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 ^{0}C



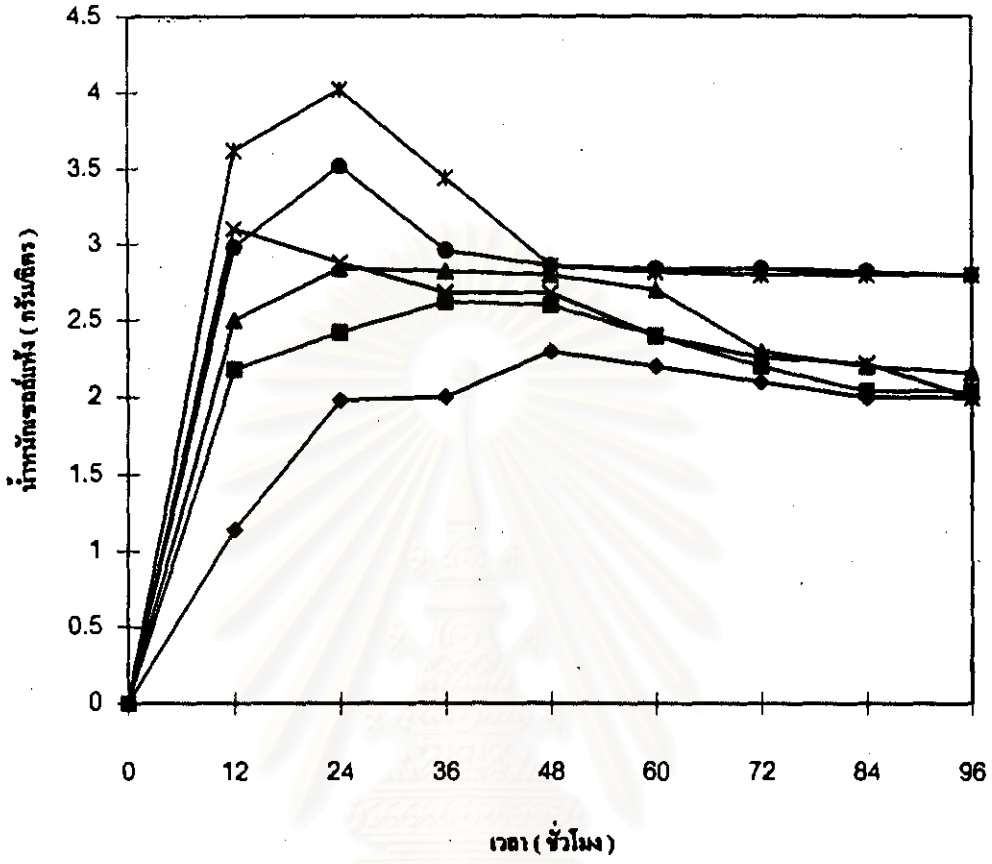
รูปที่ 20 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผัน pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 , 8.0 และ 9.0 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v) , ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v) อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm. ., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C



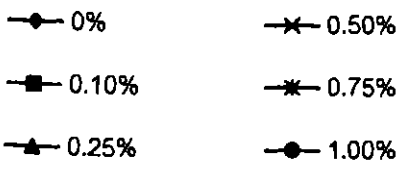
รูปที่ 21 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิต แอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 แปรผัน pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 , 8 .0 และ 9.0 ในชั่วโมงที่ 84 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v) , ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v) อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm. ., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 ^{0}C

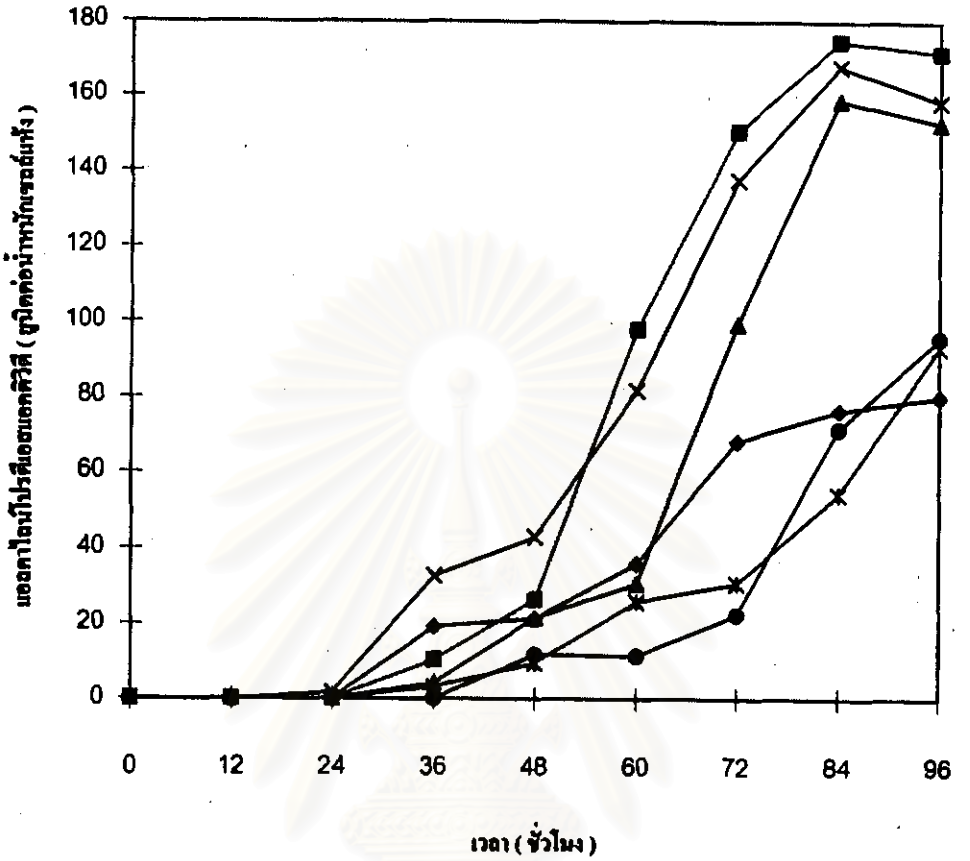
4.1.7 ผลของปริมาณของแหล่งคาร์บอน

การเพิ่มการเจริญของเซลล์อีกวิธีหนึ่งอาจทำได้โดยการเพิ่มปริมาณสารอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการทดลองนี้ได้ศึกษาถึงผลของปริมาณแป้งมันสำปะหลังซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอน จากการเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 ตามวิธีและภาวะเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4, 4.1.5 และ 4.1.6 แล้วแปรผันปริมาณแป้งมันสำปะหลังเป็น 0 %, 0.10 %, 0.25 %, 0.50 %, 0.75 % และ 1.00 % (w/v) ตามลำดับ ติดตามการเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสเช่นเดียวกับข้อ 4.1.2 ผลการทดลองดังแสดงในกราฟรูปที่ 22, 23 24 และ 25 ตามลำดับ จากกราฟรูปที่ 22 พบว่าที่ปริมาณของแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 0 % (w/v) ซึ่งไม่ได้ใส่แป้งมันสำปะหลังในอาหารเลี้ยงเชื้อเลย เชื้อก็ยังคงมีการเจริญอยู่แต่จะมีการเจริญต่ำสุด ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.75 % (w/v) เชื้อจะเจริญได้สูงสุด ในขณะที่ความเข้มข้นอื่นพบว่ามีการเจริญของเชื้อจะใกล้เคียงกัน โดยจะเจริญเข้าสู่ระยะ log phase ในชั่วโมงที่ 0 - 24 และที่ความเข้มข้นของปริมาณแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 0.1 % (w/v) พบว่าเชื้อผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสให้แอคติวิตีสูงสุด ดังแสดงในกราฟรูปที่ 23 เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในชั่วโมงที่ 0 - 24 ของทุกปริมาณแป้งมันสำปะหลัง พบว่ามีการลดลงของน้ำตาลอย่างรวดเร็วซึ่งสอดคล้องกับกราฟในรูปที่ 22 ซึ่งมีการเจริญของเชื้อแบบทวีคูณในช่วงนี้เช่นกัน แสดงว่ามีการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญเติบโตในช่วงนี้ หลังจากเชื้อเข้าสู่ stationary phase แล้วนั้นปริมาณน้ำตาลค่อนข้างคงที่ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 24 เมื่อนำน้ำหนักเซลล์แห้งและแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีในชั่วโมงที่ 84 ของแต่ละปริมาณแป้งมันสำปะหลังมาเปรียบเทียบกัน พบว่าที่ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 0.1 % (w/v) สามารถผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีได้สูงสุด ดังแสดงในกราฟรูปที่ 25 ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนในการทดลองต่อไป

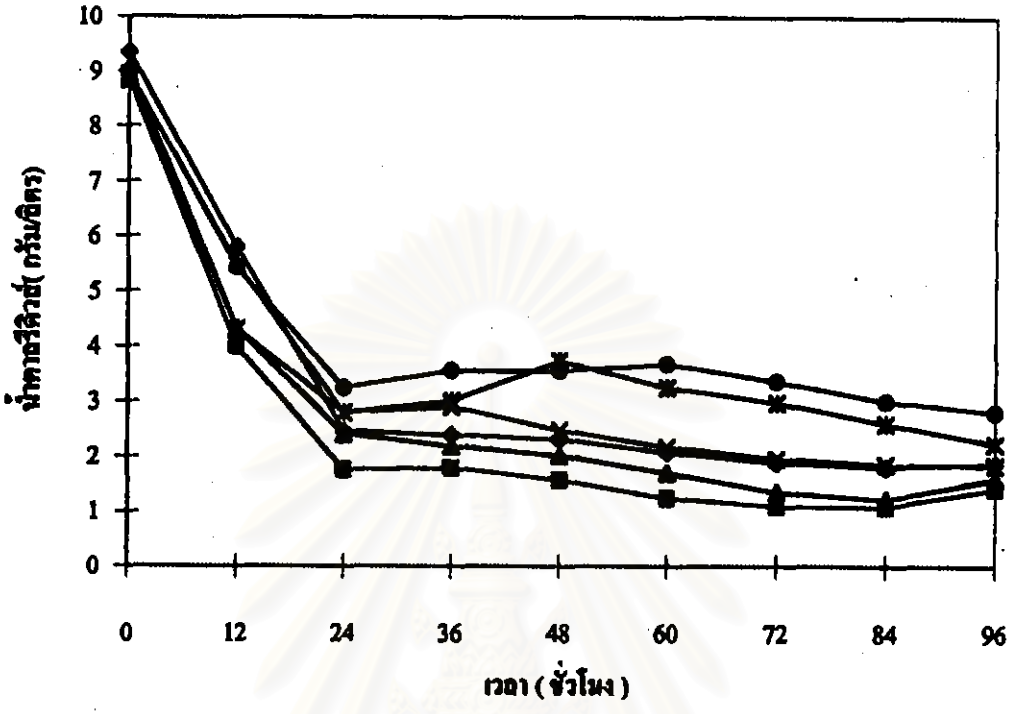


รูปที่ 22 เปรียบเทียบการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันปริมาณของแป้งมันสำปะหลังเป็น 0 %, 0.10 %, 0.25 %, 0.50 %, 0.75 % และ 1.00 % (w/v) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v) อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 ^{0}C, pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

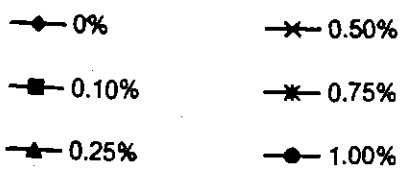


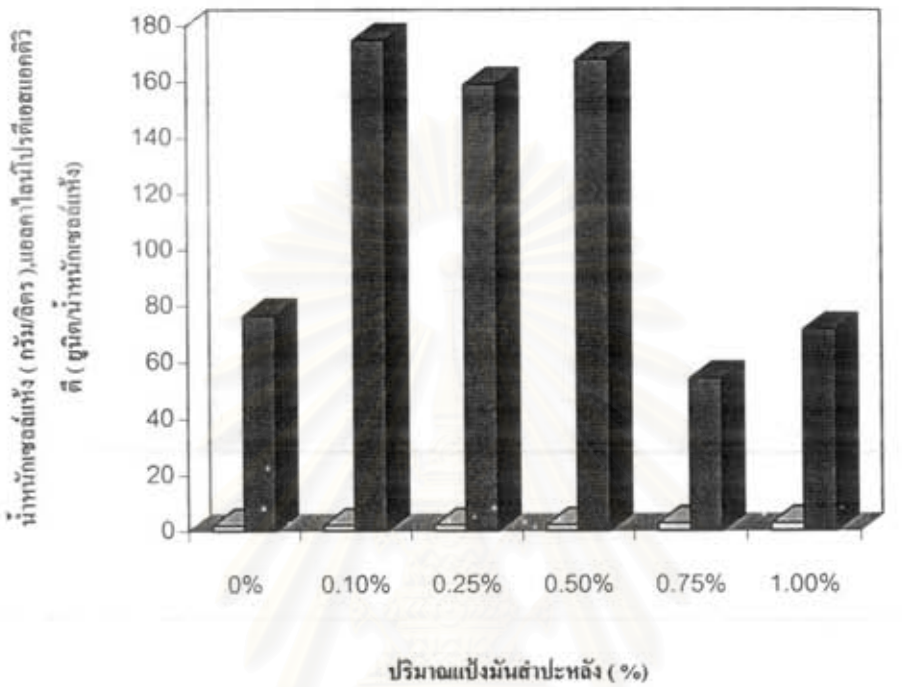


รูปที่23 เปรียบเทียบแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันปริมาณแป้งมันสำปะหลังเป็น 0 % , 0.10 % , 0.25 % , 0.50 % , 0.75 % และ 1.00 % (w/v) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v) , ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v) อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm. ., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 $^{\circ}C$, pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0



รูปที่ 24 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR25 เมื่อแปรผันปริมาณของแป้งมันสำปะหลังเป็น 0 %, 0.10 %, 0.25 %, 0.50 %, 0.75 % และ 1.00 % (w/v) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v) อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C, pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0





รูปที่ 25 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิต แอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันปริมาณแป้งมันสำปะหลังเป็น0 % , 0.10 % , 0.25 % , 0.50 % , 0.75 % และ 1.00 % (w/v) ในชั่วโมงที่ 84 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v) , ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v) อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm. ., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 ^{0}C , pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

□ น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)

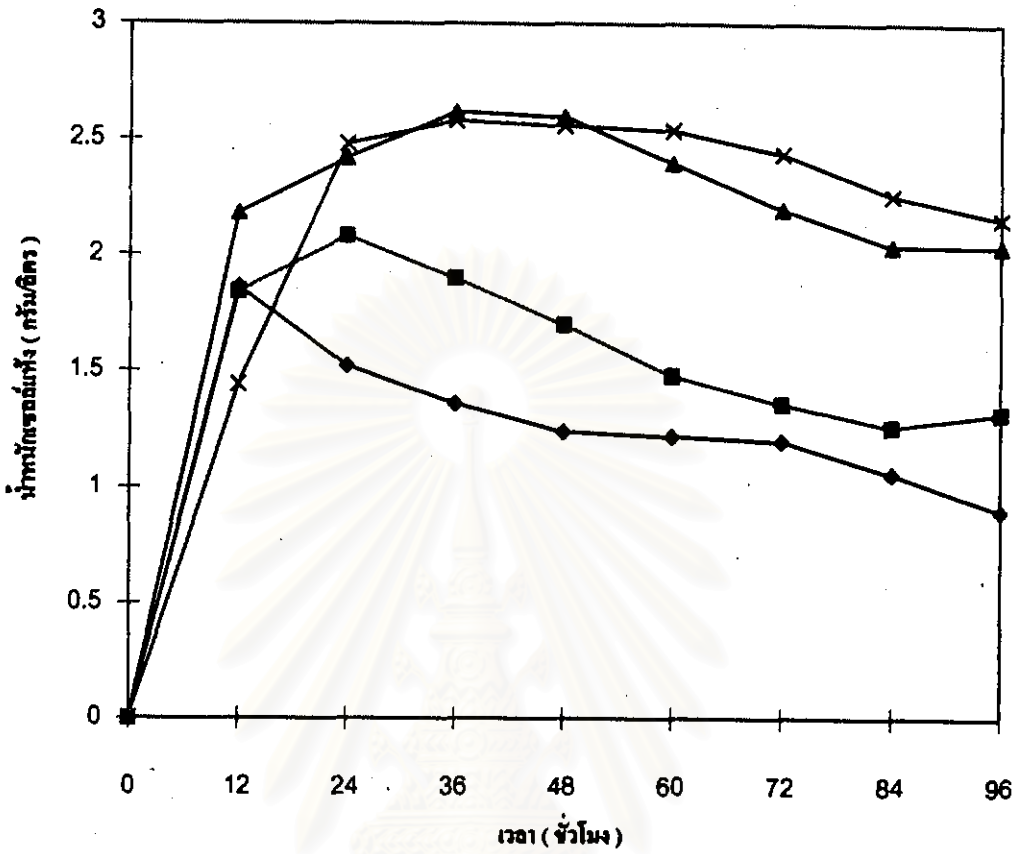
■ แอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี (ยูนิต/น้ำหนักเซลล์แห้ง)

4.1.8 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจน

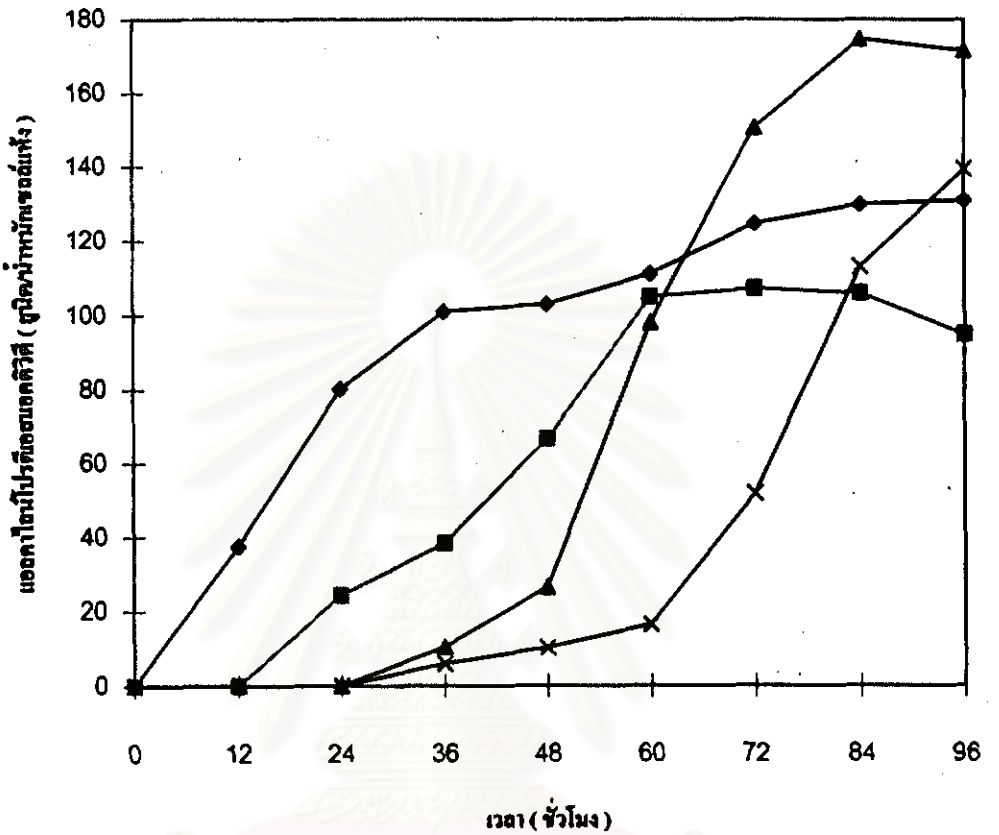
อีกวิธีหนึ่งในการเพิ่มการเจริญเติบโตและการผลิตเอลคาไลน์โปรตีเอสก็คือ การศึกษาถึงผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจน ในการทดลองนี้ใช้กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในอัตราส่วน 1:1 ย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริกและความร้อน โดยเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 ตามวิธีและภาวะเดียวกับที่กล่าวไว้ในข้อ 4.1.2, 4.1.3, 4.1.4, 4.1.5, 4.1.6 และ 4.1.7 แล้วแปรผันปริมาณไนโตรเจนเป็น 0.1 % , 0.2 % , 0.3 % และ 0.4 % (v/v) ตามลำดับ ติดตามการเจริญและการผลิตเอลคาไลน์โปรตีเอสเช่นเดียวกับข้อ 4.1.2 ผลการทดลองดังแสดงในกราฟรูปที่ 26, 27, 28 และ 29 ตามลำดับ จากกราฟรูปที่ 26 พบว่าที่ปริมาณของเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนเท่ากับ 0.1 % (v/v) การเจริญของเชื้อจะต่ำสุด ในขณะที่ความเข้มข้นอื่นการเจริญจะใกล้เคียงกัน เมื่อดูการผลิตเอลคาไลน์โปรตีเอสจากกราฟรูปที่ 27 จะพบว่าที่ปริมาณของเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนเท่ากับ 0.1 % และ 0.2 % (v/v) เชื้อจะผลิตเอนไซม์เร็วโดยเริ่มผลิตตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และ 24 ตามลำดับ แต่ที่ปริมาณของเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนเท่ากับ 0.3 % (v/v) จะเริ่มผลิตเอลคาไลน์โปรตีเอสที่ชั่วโมง 24 และผลิตเอลคาไลน์โปรตีเอสให้แอคติวิตีสูงสุดที่ชั่วโมง 84 เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าในชั่วโมงที่ 0 - 24 ของทุกปริมาณไนโตรเจน พบว่ามีการลดลงของน้ำตาลอย่างรวดเร็วซึ่งสอดคล้องกับกราฟในรูปที่ 26 ซึ่งมีการเจริญเข้าสู่ระยะ log phase ในช่วงนี้เช่นกัน แสดงว่ามีการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญในช่วงนี้เช่นกัน หลังจากเชื้อเข้าสู่ stationary phase แล้วนั้นปริมาณน้ำตาลค่อนข้างคงที่ แต่จะพบว่าในชั่วโมงที่ 0 ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ของปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.4 % (v/v)จะมีค่าสูงสุด ตามด้วยที่ปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.3 % ,0.2 % และ 0.1 % (v/v) ตามลำดับ เนื่องจากในกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย ดังแสดงในกราฟรูปที่ 28 เมื่อนำน้ำหนักเซลล์แห้งและแอลคาไลน์โปรตีเอส

แอคติวิตีในชั่วโมงที่ 84 ของแต่ละปริมาณในโตรเจนมาเปรียบเทียบกันพบว่าที่ความเข้มข้นของในโตรเจนเท่ากับ 0.3 % (v/v) จะมีการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีสูงสุด ดังแสดงในกราฟรูปที่ 29 ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณในโตรเจนเท่ากับ 0.3 % (v/v)ในการทดลองต่อไป

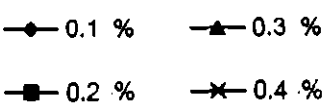
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

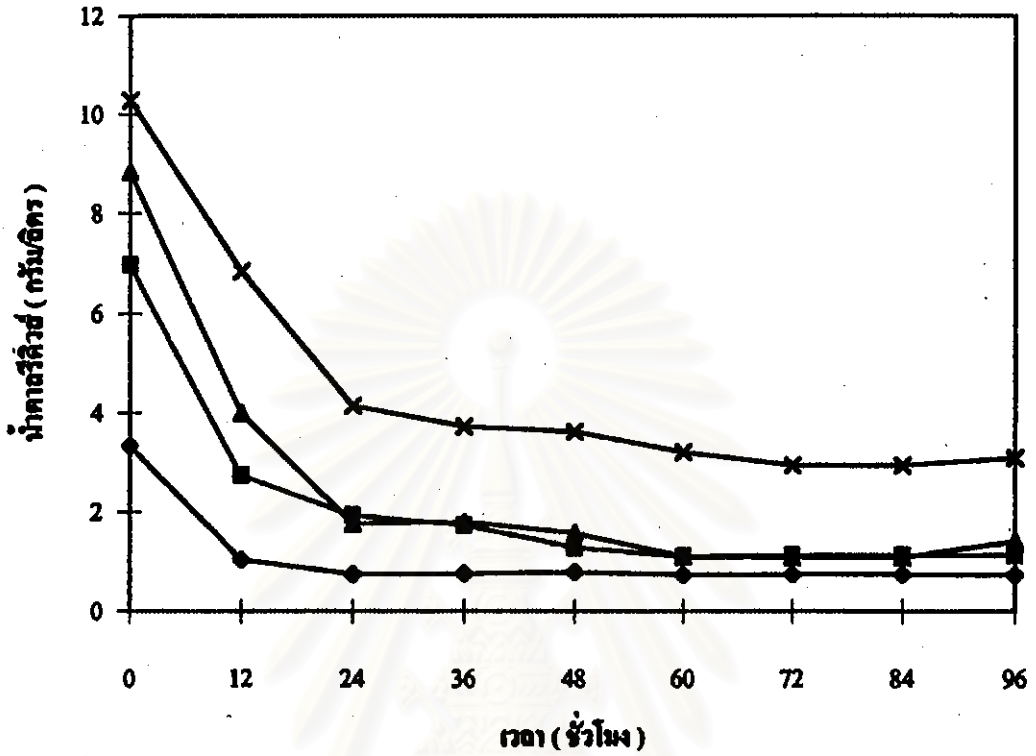


รูปที่ 26 เปรียบเทียบการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 แปรผันปริมาณไนโตรเจนจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 เป็น 0.1 % , 0.2 % , 0.3 % และ 0.4 % (v/v) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 0.1 % (w/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v) , อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm. ., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C., pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

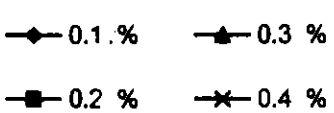


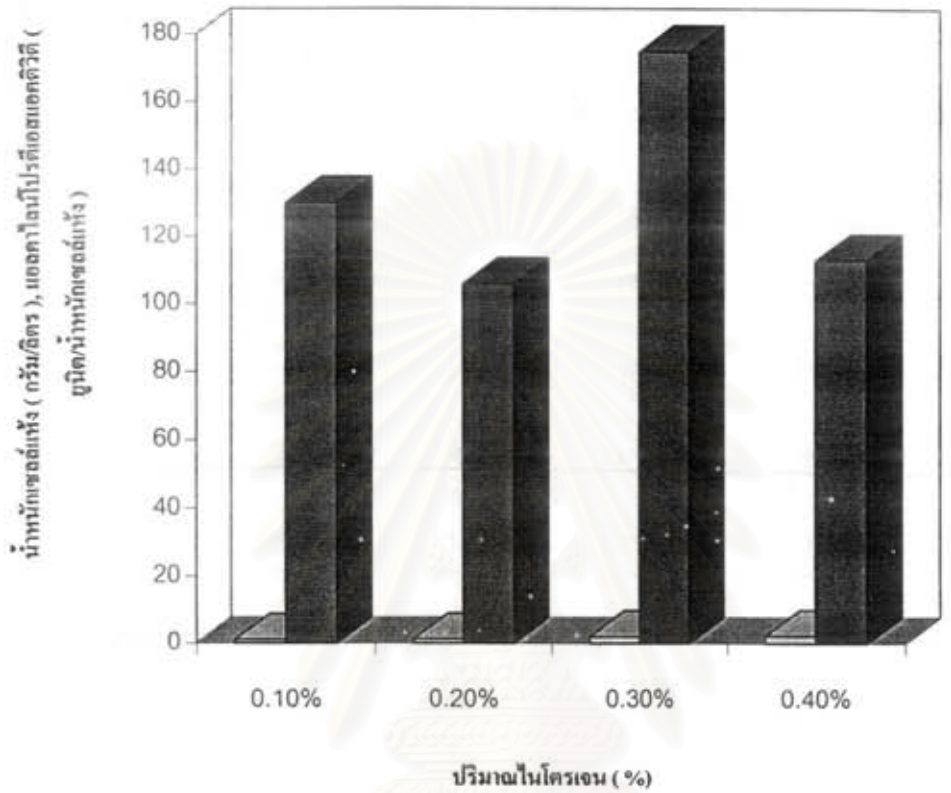
รูปที่ 27 เปรียบเทียบแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 แปรผันปริมาณไนโตรเจนจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 เป็น 0.1 % , 0.2 % , 0.3 % และ 0.4 % (v/v) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 0.1 % (w/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v) อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm. ., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C , pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0





รูปที่ 28 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR25 เมื่อแปรผันปริมาณไนโตรเจนจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 เป็น 0.1 %, 0.2 % , 0.3 % และ 0.4 % (v/v) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 0.1 % (w/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v) , อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm. ., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 $^{\circ}C$, pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0





รูปที่ 29 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิต แอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันปริมาณไนโตรเจนจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันเป็น 0.1 % , 0.2 % , 0.3 % , และ 0.4 % (v/v) ในชั่วโมงที่ 84 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v), ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 0.1 % (w/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v) อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm. ., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 ^{0}C , pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

4.2 การเตรียมแอลคาไลน์โปรตีเอสให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และนำมาทำเป็นเอนไซม์ผง

เมื่อทำการศึกษาได้ภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ได้แล้ว ดังแสดงในกราฟรูปที่ 30 จึงทดลองเลี้ยงตามภาวะดังกล่าวคือใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v) อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm. อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm. อุณหภูมิในการเลี้ยงเท่ากับ 37 °C ค่าความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 0.1 % (w/v) ปริมาณกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.3 % (v/v) จะพบว่าเชื้อจะมีการเจริญแบบทวีคูณในระยะ log phase ในชั่วโมงที่ 0 - 24 จากนั้นการเจริญของเชื้อจะค่อนข้างคงที่ ซึ่งสอดคล้องกับการลดลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ในช่วงเวลานี้เช่นกัน และพบว่าเชื้อจะเริ่มผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป และสูงสุดในชั่วโมงที่ 84 จากนั้นนำมาปั่นแยกเอาเฉพาะส่วนน้ำใสด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ โดยปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนน้ำใสซึ่งเรียกว่า crude enzyme มาหาค่าแอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีได้ค่า 353 หน่วยต่อมิลลิลิตร และมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 1.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 198.32 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน จากนั้นนำ crude enzyme มาทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วย 70 % แอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำไปปั่นตกตะกอน นำเอาตะกอนมาละลายด้วยสารละลายอิมมิดาโซลบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.6 แล้วทำ dialyzed ในสารละลายอิมมิดาโซลบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.6 เพื่อเอาเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออก นำสารละลายเอนไซม์ที่เข้มข้นมาหาแอคติวิตีได้ค่าประมาณ 330.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ

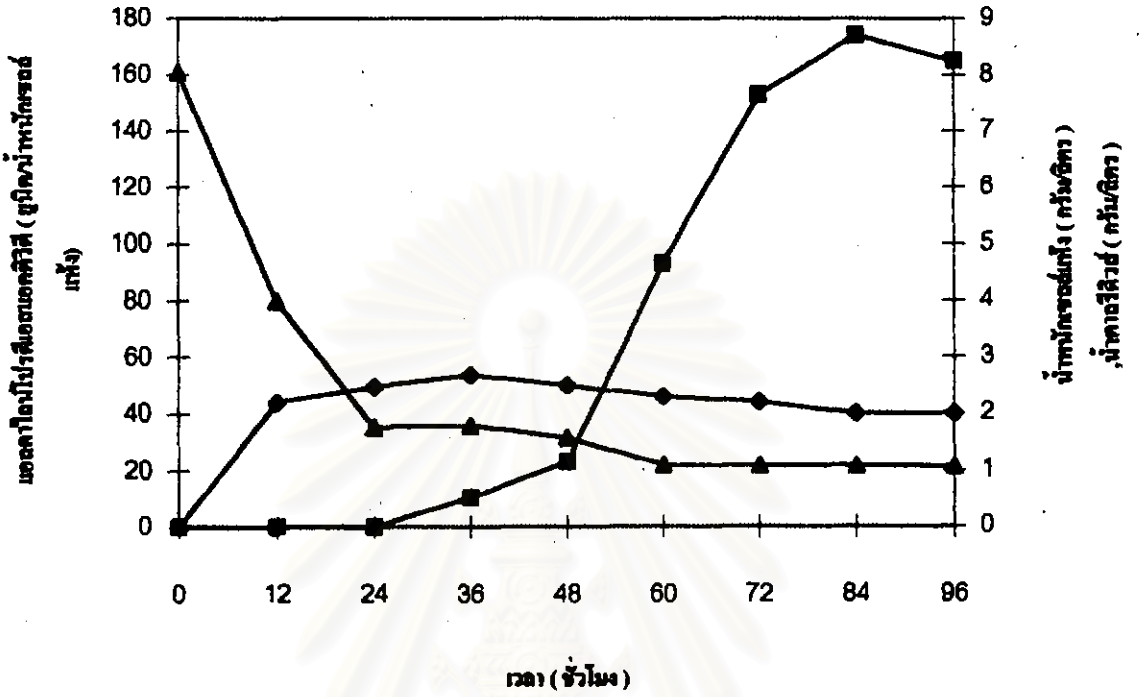
มีปริมาณโปรตีน 0.903 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 365.94 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน พบว่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตเอนไซม์ที่ได้เท่ากับ 93.60 % และสารละลายเอนไซม์ที่ได้มีแอคติวิตีจำเพาะเพิ่มขึ้น 1.85 เท่า (ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 1.85 เท่า) จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้มาทำให้แห้งโดยวิธี lyophilized ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การทำให้แอลคาไลน์โปรตีเอสบริสุทธิ์บางส่วนตามขั้นตอนต่างๆ

ขั้นตอน	แอคติวิตีรวม (ยูนิต/ลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/ลิตร)	แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน)	เปอร์เซ็นต์ผลผลิต	ความบริสุทธิ์
crude enzyme	353,000	1780	198.32	100	1
ตกตะกอนด้วย 70 % แอมโมเนียมซัลเฟต	330,400	902.88	365.94	93.60	1.85

4.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเอนไซม์ในระยะยาว

นำเอนไซม์ผงที่ได้จากข้อ 4.2 มาเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ กันคือ -80 , -20 , 4 , 25 - 30 และ 65 ^{0}C แล้วนำมาทดสอบความเสถียรของแอคติวิตีทุกๆ 7 วัน โดยเปรียบเทียบกับแอคติวิตีเริ่มต้น เก็บเป็นเวลา 60 วัน พบว่าทุกอุณหภูมิที่นำเอนไซม์ไปเก็บรักษาเมื่อตรวจสอบแอคติวิตีแล้วไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีเลย ดังแสดงในตารางที่ 3



รูปที่ 30 แสดงการเจริญ , แอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตี , น้ำตาลรี ดิวส์ ในการเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในสูตร อาหารที่ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1 % (w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 % (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001 % (w/v) แป้งมันสำปะหลัง 0.1% (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณในโตรเจน 0.3 % (v/v) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v) , อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm. , อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 rpm. , อุณหภูมิในการเลี้ยงเท่ากับ 37 °C , pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ตารางที่ 3 ผลการเก็บรักษาแอลคาไลน์โปรตีเอสผงที่อุณหภูมิต่างๆ

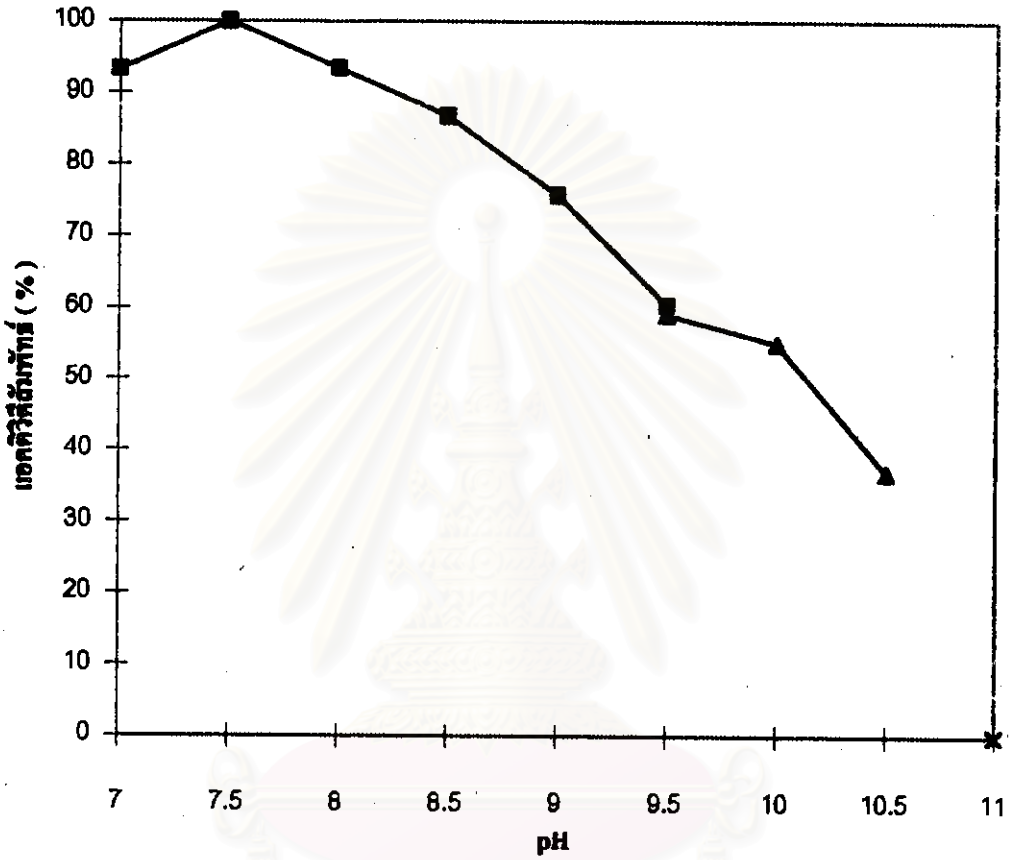
จำนวนวันที่เก็บ	Relative Activity (%)				
	-80 °C	-20 °C	4 °C	25 - 30 °C	65 °C
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
7	105.30	101.10	106.50	98.99	96.60
14	103.80	104.32	100.36	103.30	101.82
21	101.36	102.03	98.80	99.27	97.23
28	101.65	104.13	101.96	101.71	101.61
35	100.63	100.36	99.32	103.02	100.36
42	102.32	100.52	101.38	104.32	102.30
49	100.48	103.22	100.94	100.62	104.22
56	102.35	100.92	100.23	103.33	99.82
60	101.36	101.22	103.56	100.87	100.35

แอคติวิตีเอนไซม์ผง 330.40 ยูนิตต่อมิลลิกรัม = 100 %

4.4 การตรวจหาโปรตีเอสแอคติวิตีของเอนไซม์ผงที่ pH ต่างๆกันในที่ที่มี EDTA และไม่มี EDTA

เอนไซม์จะทำงานได้ดีในช่วง pH ที่เหมาะสม (Optimum pH) จากรูปที่ 31 และตารางที่ 4 ทำการทดลองโดยหาโปรตีเอสแอคติวิตีของเอนไซม์ผงที่อุณหภูมิ 45 ^{o}C เป็นเวลา 20 นาที โดยแปรผัน pH ในช่วง 7.0 - 11.0 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ (วิธีเตรียมในภาคผนวกที่ 4) พบว่า pH ที่ให้แอคติวิตีสูงสุดคือสารละลาย Tris - HCl บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.5 ส่วนที่ pH 11.0 (สารละลายคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์) ตรวจไม่พบโปรตีเอสแอคติวิตีเลย เมื่อใช้สารยับยั้ง EDTA 0.5 โมลาร์ pH 8.0 พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ผงในช่วง pH 7.0 - 9.5 ได้ถึง 77.49 - 16.10 % ส่วนที่ pH 10.5 จะมีผลยับยั้งการทำงานของแอลคาไลน์โปรตีเอสเพียง 6.83 % เท่านั้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 31 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสผงจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ 45 °C เป็นเวลา 20 นาที

—■— pH 7.0 - 9.5 Tris - HCl buffer 0.1 โมลาร์

—▲— pH 9.5 - 10.5 Carbonate - Bicarbonate buffer 0.1 โมลาร์

—✱— pH 11.0 Carbonate buffer 0.1 โมลาร์

ตารางที่ 4 ผลของสารยับยั้ง EDTA ต่อการทำงานของเอนไซม์ผงจาก *B. subtilis* TISTR 25

pH	Relative activity (%)		เปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดย EDTA
	ไม่เติม EDTA	เติม EDTA	
7.0	93.29	15.3	77.94
7.5	100.00	37.35	62.65
8.0	93.38	34.98	58.40
8.5	86.72	35.98	50.74
9.0	75.73	41.32	34.41
9.5	60.36	44.26	16.10
10.0	59.05	49.67	9.38
10.5	36.70	29.87	6.83
11.0	0.00	0.00	0.00

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย