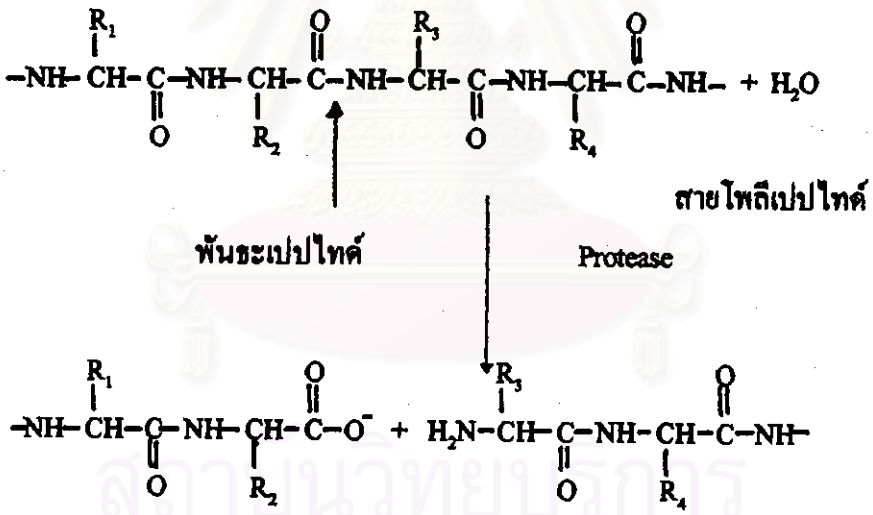
บทที่ 1

บทนำ

โปรตีเอส (Protease) เป็นเอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ (peptide bond) ของโปรตีนให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ และกรดอะมิโน สมการแสดงปฏิกิริยาเป็นดังนี้



เอนไซม์ชนิดนี้พบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลชีพ (Ward, 1983) โดยโปรตีเอสที่ผลิตได้จากพืชได้แก่ ปาเปนจากยางมะละกอ โบรมีเลนจากสับปะรด โปรตีเอสที่ได้จากสัตว์ เช่น เรนนินจากกระเพาะลูกวัว pancreatin จากตับอ่อนและ pepsin จากกระเพาะสุกร ส่วนโปรตีเอสที่ผลิตได้จากจุลชีพนั้นได้แก่ เชื้อราและแบคทีเรีย (MG Halpern , 1981) ซึ่งมีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมผงซักฟอก อุตสาหกรรมฟอกหนัง

และอุตสาหกรรมยา เป็นต้น ในทางการค้าพบว่ากลุ่มโปรตีเอสมีส่วนแบ่งในการตลาดถึง 60% เมื่อเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่นๆ (Ward , 1983)

โปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่ค้นพบเป็นชนิดที่สองของโลก หลังจากพบ " Amylase " โดย Kirchoff ในปี ค.ศ. 1814 โปรตีเอสที่พบจากพืชชนิดแรก คือ ปาเปนจากยางมะละกอ ซึ่งพบโดย Wurt & Bouchut ในปี ค.ศ. 1879 ต่อมาปี ค.ศ. 1905 Rohm นำโปรตีเอสจากตับอ่อน (Pancreatic protease) มาใช้ในการฟอกหนังและกำจัดขนที่ติดอยู่กับหนังสัตว์ และในปี ค.ศ.1913 ได้เริ่มนำโปรตีเอสมาใช้เป็นสารซักล้าง (Detergents) เป็นครั้งแรก แต่พบว่าความสามารถในการย่อยสลายของเอนไซม์และความเสถียรในสภาวะต่างไม่ดี ต่อมาในปี ค.ศ. 1954 Guntelberg & Ottesen ได้ค้นพบจุลชีพชนิดแรกที่ผลิตโปรตีเอสคือ *Bacillus subtilis* โดยตั้งชื่อว่า " Subtilisin " และในปี ค.ศ. 1959 บริษัทในประเทศสวิสเซอร์แลนด์ได้ผลิตโปรตีเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เป็นผลิตภัณฑ์ภายใต้ชื่อการค้าว่า Bio - 40 ซึ่งมีคุณภาพดีกว่าโปรตีเอสจากตับอ่อน ต่อมาในปี ค.ศ. 1960 บริษัท NOVO ได้ผลิตเอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus licheniformis* ซึ่งเรียกเอนไซม์นี้ว่า Subtilisin Carlsberg และใช้ชื่อทางการค้าว่า Biotex และเริ่มเข้าสู่ตลาดในสหรัฐอเมริกาโดยมีส่วนแบ่งของตลาดประมาณ 45 - 50 เปอร์เซ็นต์ ปี ค.ศ. 1971 คณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (FDA) ให้คำรับรองเกี่ยวกับโปรตีเอสว่าสามารถนำมาใช้ร่วมกับการซักล้างได้โดยไม่มีอันตราย นอกจากนี้ยังมีการพัฒนานำเอาโปรตีเอสจากจุลชีพไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ อีก เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งโปรตีเอสจะช่วยเพิ่มคุณภาพ ความเสถียรและช่วยในการละลายของอาหารให้ดีขึ้น

ชนิดและสมบัติของเอนไซม์โปรตีเอส

เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนอาจแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ตามตำแหน่งของพันธะเปปไทด์ที่ถูกไฮโดรไลส์คือ เอกโซเปปติเดส (exopeptidase) จะย่อยพันธะเปปไทด์จากด้านนอกเข้ามาและเอนโดเปปติเดส (endopeptidase) จะย่อยภายในสายโพลีเปปไทด์ เอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มเอนโดเปปติเดส โปรตีเอสที่ผลิตได้จากจุลชีพสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆ ตามกลไกพื้นฐานของสภาวะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (Hartley , 1960 , Outtrun & Boyce , 1990 , Fox และคณะ , 1991)

1. Acid Protease EC. 3.4.23

จุลชีพที่ผลิตส่วนใหญ่เป็นพวกเชื้อรา ในแบคทีเรียพบบ้างแต่น้อย โมเลกุลของเอนไซม์มี aspartate อยู่ที่บริเวณ active site ที่ pH 3-4 เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ แบ่งออกเป็น 2 ชนิดตามลักษณะโครงสร้าง (Matsubara & Feder , 1971) ได้ดังนี้

1.1 Rennin - like Acid Protease จุลชีพที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตโปรตีเอสในเชิงการค้า ได้แก่ *Mucor pusillus* , *Mucor miehei* และ *Endothia parasitica* นิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมทำเนยแข็ง

1.2 Pepsin - like Acid Protease ใช้ย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองในอุตสาหกรรมทำซีอิ๊ว (Soy sauce) และปรับปรุงคุณภาพของแป้งที่ใช้ทำขนมปัง *Aspergillus oryzae* เป็นจุลชีพที่สำคัญในการผลิตเอนไซม์ในอุตสาหกรรม เอนไซม์ชนิดนี้เป็น Endopeptidase มีช่วงการทำงานที่เหมาะสมที่ pH 4 - 4.5

2. Thiol Protease EC.3.4.22

เป็นโปรตีเอสที่ผลิตได้จากพืช ได้แก่ papain, ficin, และ bromelain มีจุลชีพบางชนิดที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ ได้แก่ *Clostidium spp.* และ *Streptococcus spp.* (Ward,1983) ทำงานได้ดีในช่วง pH เท่ากับ 7.0 เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมีหมู่ของ cysteine อยู่ที่บริเวณ active site

3. Metallo Protease EC.3.4.24

เอนไซม์ชนิดนี้เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Neutral Protease พบทั่วไปในแบคทีเรียและเชื้อรา โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลัสหลายชนิด เช่น *Bacillus megaterium, Bacillus cereus* และ *Bacillus thermoproteolyticus* ซึ่งจะผลิตเฉพาะนิวทรัลโปรตีเอสเท่านั้น (Priest,1977) แต่ใน *Bacillus subtilis* พบว่ามีการผลิตทั้งนิวทรัลโปรตีเอสและแอลคาไลน์โปรตีเอส นอกจากนี้ยังมี *Bacillus thuringenesis, Bacillus pumilus* และ *Bacillus polymyxa* (Griffin & FOGARTY,1973) เป็นต้น นิวทรัลโปรตีเอสจัดเป็นเอนไซม์ Metallo-endoprotease ที่มีอะตอมของโลหะเป็นส่วนประกอบของโมเลกุลและมีความสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ โลหะที่พบคือสังกะสี(Zn^{+2}) (Ward,1983) นอกจากนี้ยังพบว่าแคลเซียม (Ca^{+2}) จะมีผลทำให้เอนไซม์ชนิดนี้มีความเสถียรมากขึ้น เอนไซม์ชนิดนี้สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับกรดอะมิโนไลซีนและถูกยับยั้งปฏิกิริยาโดยสารประเภท chelating agents เช่น Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Dithizone (Ward, 1983; Millet และคณะ,1969) 1,1-Phenanthroline (Pero & Sloma,1993)ซึ่งจะยับยั้งเอนไซม์โดยการดึงอะตอมของสังกะสีออก แต่ไม่ถูกยับยั้งโดย Di-isoproprylFluorophosphate (DFP), Sulfhydryl reagent, Soybean trypsin inhibitor และ Potato protease inhibitor เอนไซม์ชนิดนี้มีความสามารถสูงสุดในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนที่ช่วง pH 7 - 8 โดยใช้

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เคซีนเป็นซับเสตรท มีความเสถียรในช่วง pH 5 - 10 (Endo,1962) เอนไซม์ชนิดนี้มีความเสถียรน้อยมากเมื่อเทียบกับโปรตีเอสชนิดอื่นๆ (Millet และคณะ,1969) ตัวอย่างนิวทรัลโปรตีเอสที่สำคัญ คือ Thermolysin ซึ่งผลิตจาก *Bacillus thermoproteolyticus* เป็นเอนไซม์ที่มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงได้ดี พบว่าหลังจากเลี้ยงที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เอนไซม์ยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 50 เปอร์เซนต์ (Endo,1962;Ohta,1966) นิวทรัลโปรตีเอสสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมฟอกหนัง, เบียร์, ซีอิ๊ว, น้ำปลา, ผลิตสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract), อุตสาหกรรมผลิตเนยแข็งและขนมปังต่างๆ มีผู้ศึกษาถึงคุณสมบัติของนิวทรัลโปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* พบว่าช่วยปรับปรุงคุณภาพของแป้งขนมปังประเภท Cracker และ Biscuit ทำให้แผ่แป้งเป็นแผ่นบางๆได้โดยไม่ฉีกขาดและช่วยลดฟองอากาศที่เกิดขึ้นระหว่างการอบ (Barrett,1979; Aunstrup,1980) และเมื่อใช้เอนไซม์นี้ร่วมกับไลเปส (Lipase) ในการทำเนยแข็ง. พบว่าช่วยเพิ่มรสชาดของเนยแข็งและไม่ทำให้เกิดรสขม (Godfrey,1983)

4. **Alkaline Protease EC.3.4.21.14**

เอนไซม์ชนิดนี้เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Serine Protease เนื่องจากมีหมู่กรดอะมิโนเซรีนอยู่ที่บริเวณ active site ถูกยับยั้งโดยสาร Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride (PMSF) และ Di-isopropryl Fluorophosphate (DFP) แคลเซียมไอออนช่วยทำให้เอนไซม์เสถียร ส่วน EDTA ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ได้ pH ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อยู่ระหว่าง 7-11 และมีลักษณะการไฮโดรไลส์โปรตีนเป็นแบบตัดพันธะในสาย (endopeptidase) (Horikoshi และ Akiba,1982;Ward,1983)

แอลคาไลน์โปรตีเอสผลิตได้จากเชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย โดยเฉพาะพบในแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus spp.* เป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ *Bacillus licheniformis, Bacillus subtilis* และ

Alkalophilic *Bacillus* ซึ่งเอนไซม์จะถูกสร้างและปล่อยออกมาเป็นอิสระในน้ำเลี้ยงเชื้อ (Extracellular enzyme) และอาจจะสร้างนิวทรัลโปรตีเอสไปพร้อมๆกัน หรืออาจจะมีการสร้างนิวทรัลโปรตีเอสก่อนการสร้างแอลคาไลน์โปรตีเอสก็ได้ (MG. Halpern,1981)

แอลคาไลน์โปรตีเอสสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม โดยอาศัยความแตกต่างของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบรวมทั้งคุณสมบัติทางภูมิคุ้มกันวิทยาและจลศาสตร์ (Keayและคณะ,1970b; Outtrup & Boyce,1990) ดังนี้

<u>กลุ่มที่ 1</u> Subtilisin Carlsberg พบครั้งแรกโดย Linderstrom Lang และ Ottesen ในปี คศ. 1947 ที่ห้องปฏิบัติการเมือง Carlsberg (Aunstrup,1979) ผลิตได้จาก *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus pumilus* เอนไซม์นี้มีลักษณะเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว ประกอบด้วยกรดอะมิโน 274 ตัว ไม่มีกรดอะมิโนซิสเตอีนหรือ ซิสทีน ดังนั้นจึงไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ โครงสร้างตติยภูมิเป็นรูปทรงกลม (spherical) มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.2 นาโนเมตร บริเวณเร่งประกอบด้วย Ser 221, His 64 และ Asp 32 เป็นเอนไซม์ที่ไม่มีความจำเพาะต่อซับสเตรท ชนิดใด (broad specificity) สามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ได้เกือบทุกชนิดและสามารถย่อยพันธะเอสเทอร์บางส่วนได้ด้วย ในการไฮโดรไลส์โปรตีนไม่จำเป็นต้องมีตัวกระตุ้น (activators) และไม่ต้องใช้แคลเซียมไอออนในการช่วยให้เอนไซม์เสถียรเหมือนแอลคาไลน์โปรตีเอสชนิดอื่นๆ pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 8-9 มีความเสถียรในช่วง pH 5-11 และแอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงเมื่อ pH ต่ำกว่า 5 และสูงกว่า 11 ซึ่งสันนิษฐานว่าเอนไซม์เกิดการย่อยตัวเอง (Autodigestion) โดยโมเลกุลจะคลายรูป (Unfold) (Ward,1983) และเอนไซม์ยังคงมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงประมาณ 55-60 องศาเซลเซียส

กลุ่มที่ 2 Subtilisin BPN' (Bacterial Protease Nagarse) หรือ Subtilisin NOVO ซึ่งผลิตจาก *Bacillus amyloliquefaciens* ในปี ค.ศ. 1954 Hagihara ได้ทำการเตรียมเอนไซม์นี้ในรูปผลึกครั้งแรก และในปีค.ศ. 1960 Ottesen & Spector ได้แยกเอนไซม์ชนิดนี้ออกจาก Bacterial protease NOVO ซึ่งพบว่าการเรียงตัวของกรดอะมิโนเหมือนกับ Subtilisin BPN' จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Subtilisin NOVO เอนไซม์ชนิดนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 275 ตัว การเรียงตัวของกรดอะมิโนคล้ายกับ Subtilisin Carlsberg ถึง 85 เปอร์เซ็นต์ (Pero & Sloma,1993) โดยมีกรดอะมิโนเพียง 58 ตัวเท่านั้นที่แตกต่างกัน ในโมเลกุลไม่มีกรดอะมิโนซิสเตอีน ดังนั้นจึงไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ บริเวณเร่งของเอนไซม์ประกอบด้วย Ser 221, His 64 และ Asp 32 (Outtrup & Boyce,1990) มีอะลานีนอยู่ปลายทางด้านอะมิโนและกลูตามีนอยู่ปลายทางด้านคาร์บอกซิล แคลเซียมไอออนช่วยทำให้เอนไซม์เสถียรมากขึ้นโดยเฉพาะที่อุณหภูมิสูงหรือที่ pHสูงหรือต่ำมากๆ เอนไซม์นี้มีความจำเพาะต่อการไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์และเอสเทอร์แตกต่างจาก Subtilisin Carlsberg (Ward,1983)

นอกจากเอนไซม์ 2 กลุ่มนี้แล้ว ยังได้มีการค้นคว้าและพัฒนาเชื้อแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งคือ Alkalophilic *bacilli* เพื่อให้มีคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ดีขึ้นมีความเสถียรในการซักล้าง (Washing condition) เช่น pHช่วง 9-10 อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส และอยู่ในสภาพที่มี Surfactants และ Sequestering agents ได้ เอนไซม์ชนิดนี้พบในจุลชีพ *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus subtilis* สามารถผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ดีที่ pHสูงกว่า 7.5 และทนต่อสภาวะที่เป็นด่างสูงถึง pH 13 ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ถึง 60 องศาเซลเซียส มีลักษณะเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว ไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ ไม่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบในโมเลกุล มีอะลานีนอยู่ปลายด้านหมู่

อะมิโนและไม่ค่อยมีความจำเพาะต่อซับสเตรทชนิดใดมีความสามารถในการไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์เกือบทุกชนิด (Aunstrup,1979; Ward,1983)

<u>การสร้างเอนไซม์และความสำคัญ</u>

การสร้างเอนไซม์ในกลุ่ม *Bacillus spp.* จะเกิดขึ้นในช่วงปลายการเจริญของเชื้อแบบทวีคูณ (Exponential phase or Logarithmic phase) หรือในระยะแรกของการเจริญแบบคงที่ (Stationary phase) ใน Complex media (Millet และคณะ,1969; Priest,1977) พบว่าการสังเคราะห์เอนไซม์ขึ้นกับปริมาณกรดนิวคลีอิก ในขณะที่เซลล์มีการเจริญ จะนำเอากรดนิวคลีอิกจำนวนมากไปใช้ในการสังเคราะห์ไรโบโซม และเมื่อเซลล์หยุดการเจริญการสร้างไรโบโซมก็จะหยุดลงไปด้วยทำให้มีกรดนิวคลีอิกเหลือพอที่จะนำไปใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์ ในช่วง Stationary phase จึงพบว่าระยะนี้มีปริมาณเอนไซม์สูง (Coleman,1967) เอนไซม์ที่สังเคราะห์จากไรโบโซมด้านปลายอะมิโนจะมี Leading sequence ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิค ซึ่งทำให้เอนไซม์ที่สังเคราะห์ขึ้นผ่านออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ได้ จากนั้น Leading sequence ซึ่งถือว่าเป็น Signal sequence จะถูกตัดออกโดยเอนไซม์เปปติเดสซึ่งอยู่ด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อถูกตัดออกแล้วส่วนที่เป็นเอนไซม์ก็จะพับอยู่ในรูปที่เสถียร (Ward,1983)

ได้มีผู้ศึกษาการสร้างโปรตีเอสจาก *Bacillus spp.* ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์ *Bacillus subtilis* 168 สามารถสร้างเอนไซม์ได้ทั้งนิวทรัลโปรตีเอสและแอลคาไลน์โปรตีเอส แต่หลังจากทำการกลายพันธุ์แล้วพบว่าสายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ไม่สร้างนิวทรัลโปรตีเอสสามารถสร้างสปอร์ได้ ในขณะที่สายพันธุ์กลายพันธุ์ที่ไม่สร้างแอลคาไลน์โปรตีเอสจะไม่สามารถสร้างสปอร์ได้ และเมื่อใช้ Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride (PMSF) ยับยั้งการทำงานของโปรตีเอส พบว่า

สารนี้สามารถยับยั้งการทำงานของแอลคาไลน์โปรตีเอสในระยะการสร้างสปอร์ 2-3 ชั่วโมงแรก ในขณะที่นิวทรัลโปรตีเอสมีปริมาณคงที่ จะเห็นได้ว่า แอลคาไลน์โปรตีเอสมีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์ ซึ่งการสร้างโปรตีเอสจะเกิดขึ้นระยะแรกของการสร้างสปอร์ซึ่งเป็นช่วงปลายของการเจริญระยะ Logarithmic phase (Dancer & Mandelstam,1975)

นอกจากนี้โปรตีเอสยังช่วยไฮโดรไลส์เอนไซม์อื่นที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นและอยู่ในรูป Inactive precursor form ภายนอกเซลล์ให้อยู่ในสภาพพร้อมที่จะทำงานได้ มีผู้ศึกษาถึงโปรตีเอสที่ถูกสร้างขึ้นและถูกปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์จาก *Bacillus lichentformis* พบว่าสามารถกระตุ้นเพนนิซิลิเนสที่เกาะติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ในรูปของ Inactive precursor form ให้อยู่ในรูปที่เป็นอิสระและแสดงแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ (Aiyappa และคณะ,1977)

<u>ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอส</u>

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักจะต้องมีปริมาณมากและราคาถูก เช่น ของเหลือใช้จากอุตสาหกรรมอื่น ซึ่งยังประกอบไปด้วยสารอาหารต่างๆ ที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ในการเจริญและให้ผลผลิตได้เป็นอย่างดี เช่น กากถั่วเหลือง กากเมล็ดทานตะวัน แป้งมันสำปะหลัง อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ได้ผลดีในห้องปฏิบัติการอาจไม่เหมาะสมกับเมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาดใหญ่ การพิจารณาหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจะเริ่มโดยพิจารณาจากสมการเคมีเพื่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์

แหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน + แหล่งไนโตรเจน + สารอื่นๆ $\longrightarrow$ เซลล์ + ผลิตภัณฑ์ + CO_2 + H_2O + ความร้อน

<u>แหล่งคาร์บอน</u>

สารที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนต่างๆเช่นแป้งและกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่อุดมสมบูรณ์ สามารถนำไปใช้ได้ง่าย กลูโคสในปริมาณที่เหมาะสมจะช่วยให้เซลล์มีการเจริญเติบโตที่พอเหมาะ การสร้างเอนไซม์ของเชื้อก็จะดำเนินไปตามปกติ (สุพจน์,2530) เมื่อแหล่งอาหารและพลังงานเริ่มลดน้อยลง การสร้างสปอร์ของเชื้อก็จะเกิดขึ้นพร้อมๆกับการสร้างเอนไซม์ แต่เมื่อมีปริมาณของกลูโคสมากเกินไป จะทำให้เกิด catabolite repression โดยกลูโคส (Doi,1973) จะกดการทำงานของยีนส์ที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ไม่ให้มีการสร้างเอนไซม์ออกมา หรือทำให้สร้างช้าลง (Bernlohr,1964) เช่นการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* NRLL-B3411 จะลดลงทันทีเมื่อเติมกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Heinceken & Conner,1972) เกษม พงษ์มณี (2536) ได้ศึกษาการใช้วัตถุดิบราคาถูกหลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าอาหารที่มีแป้งข้าวเหนียวเป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ผลผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสสูงกว่าสูตรอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วน Fujiwara และ Yamamoto (1985) ได้ใช้วัตถุดิบราคาถูกหลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าการเลี้ยง *Bacillus spp.* B21-2 โดยใช้แป้งและกลูโคส พบว่าแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้มีค่าสูงสุดเมื่อเทียบกับการใช้แลคโตส, ซูโครสและกลีเซอรีนเป็นแหล่งคาร์บอน

<u>แหล่งไนโตรเจน</u>

สารประกอบไนโตรเจนจะถูกย่อยสลายเพื่อผลิตกรดอะมิโน,กรดนิวคลีอิค,โปรตีนและส่วนประกอบของผนังเซลล์ แอลคาไลน์โปรตีเอสจะประกอบด้วยไนโตรเจน 15.6% (Moon & Parulekar,1991) การผลิตโปรตีเอสจะขึ้นกับปริมาณไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ การสร้างโปรตีเอสจะถูกกดดัน (repress) เมื่อมีกรดอะมิโนหรือเปปไทด์ในอาหารมากเกินไป โดยที่

กรดอะมิโนแต่ละชนิดมีความสามารถในการกดดันการสร้างเอนไซม์ได้ต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของเชื้อด้วย ใน *Bacillus spp.* กรดอะมิโนชนิดเดียวกันจะมีผลต่อการกดดันการสร้างเอนไซม์ได้ต่างกัน (Chaloupka & Kreckova,1968) บางครั้งกรดอะมิโนหรือ เปปไทด์หลายชนิดอยู่ร่วมกันก็จะมีผลต่อการกดดันการสร้างเอนไซม์ได้มากกว่ากรดอะมิโนชนิดเดียว (Jaroslav และคณะ,1987) สนธยา ศรีเมฆ (2533) ได้ทำการศึกษาผลของกรดอะมิโนผสมระหว่าง กลูตาเมท แอสปาเตท และแอสปาราจีน เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่ามีผลต่อการเจริญและการผลิต แอลคาไลน์โปรตีเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR25 ทำให้มีการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงกว่ามีกรดอะมิโนชนิดเดียวเสริมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะมิโนการเจริญของเชื้อจะสูงขึ้นแต่การผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสกลับลดต่ำลง แสดงว่าชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ O'Reilly & Day (1983) ได้ศึกษาการผลิตโปรตีเอสจาก *Aeromonas hydrophila* โดยใช้วัตถุดิบหลายชนิดเป็นแหล่งไนโตรเจน เช่น เคซีน, casamino acid, proteose, peptone, neopeptone, tryptose และไม่ใช้วัตถุดิบใดๆเลย พบว่าการไม่ใช้วัตถุดิบใดๆเลยเป็นแหล่งไนโตรเจนการเจริญของเชื้อจะต่ำมาก แต่จะมีการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสในปริมาณมาก เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับการใช้วัตถุดิบชนิดอื่นๆ พบว่าการเจริญของเชื้อจะสูงมากแต่การผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสกลับมีปริมาณต่ำลงอาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของกรดอะมิโนที่ไม่เหมาะสมมีผลต่อการกดดันการสร้างโปรตีเอสได้ นอกจากนี้ Fujiwara และ Yamamoto (1987) ได้ศึกษาการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอส *Bacillus spp.* B21-2 โดยใช้วัตถุดิบราคาถูกหลายชนิดเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า Bonito extract และกากถั่วเหลือง สามารถเพิ่มการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้วัตถุดิบชนิดอื่นๆ

อิทธิพลของฟอสเฟต

ฟอสเฟตมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์สารพันธุกรรม (DNA,RNA) และโปรตีน การย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต,การหายใจของเซลล์รวมทั้งควบคุมระดับ ATP ในขบวนการสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอส ฟอสเฟตจะมีส่วนช่วยในการเพิ่มความเสถียรของ mRNA โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ RNase และช่วยให้เอนไซม์ที่สร้างขึ้นถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ได้ดีขึ้น แต่ถ้าเริ่มต้นเลี้ยงเซลล์ด้วยปริมาณฟอสเฟตที่มากเกินไป จะมีผลยับยั้งการเจริญ และกดดันการสร้างโปรตีเอสได้ (Moon & Parulekar,1991)

อิทธิพลของไอออนโลหะ

ไอออนของโลหะมีส่วนสำคัญในการเจริญและสร้างเอนไซม์ของเชื้อสกุลบาซิลัส เช่น แมกนีเซียมไอออนมีความสำคัญและจำเป็นต่อการเจริญ การแบ่งตัว ขนาดและรูปร่างของเชื้อ มีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแมกนีเซียมมากเกินไปจะมีผลยับยั้งการเจริญและกดดันการสร้างเอนไซม์ (Webb,1949)

ส่วนไอออนชนิดอื่นๆ เช่น แมงกานีสและเหล็ก พบว่าเป็น cofactor สำหรับเอนไซม์หลายชนิดในขบวนการเมตาโบลิซึมของไนโตรเจนโดยมีกลูตามีนซินทิเตสเป็นเอนไซม์สำคัญในการใช้ไนโตรเจนจากอนินทรีย์ไนโตรเจน (John,1991)

อิทธิพลของภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการหมัก

ภาวะแวดล้อมในระหว่างการเลี้ยงเชื้อหรือเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอส ได้แก่

ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) pHเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เชื้อสร้างขึ้น มีผลต่อกระบวนการขนส่งสารผ่านเซลล์เมมเบรน Roger และBernard (1972) ได้

เลี้ยง *Bacillus subtilis* โดยเริ่มต้นที่ pHต่างๆ ตั้งแต่ 5 - 12 พบว่า pHที่เหมาะสมคือ 7.5 - 9.5 จะผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ดีที่สุด Moon และ Parulekar, (1991) พบว่าเมื่อเลี้ยง *Bacillus firmus* ในอาหารที่มี pHเท่ากับ 7.7 มีผลทำให้เชื้อมีการผลิตโปรตีเอสได้สูงสุด

อุณหภูมิ อุณหภูมิในการเลี้ยงต้องเหมาะสมเชื้อจึงมีการผลิตเอนไซม์ออกมา อุณหภูมิมีความสำคัญต่อการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อสูง การละลายของออกซิเจนจะต่ำ Jaroslave และคณะ (1991) ได้ทำการศึกษาใน *Bacillus megaterium* โดยอุณหภูมิจะมีอิทธิพลต่อการถอดรหัสของ mRNA ในการผลิตโปรตีเอส

อัตราเร็วในการกวนและอัตราการให้อากาศ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อที่เลี้ยง ขนาดของถังหมัก และชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะขึ้นอยู่กับอัตราการกวนและการให้อากาศภายในถังหมัก ซึ่งปริมาณออกซิเจนที่พอเหมาะจะมีผลให้จุลินทรีย์เจริญและสร้างเอนไซม์ได้ ถ้าปริมาณออกซิเจนต่ำจะทำให้เชื้อใช้กลูโคสไม่สมบูรณ์ทำให้อัตราการเจริญของเชื้อลดลง (Moon & Parulekar,1991) จากการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus lichentformis* แบบ Fed-batch โดยควบคุมปริมาณออกซิเจนให้ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 เปอร์เซนต์ พบว่าสามารถผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงกว่าการไม่ได้ควบคุมปริมาณออกซิเจนถึง 4.6 เท่า (Giesecke และคณะ,1991)

<u>ประโยชน์และความสำคัญของแอลคาไลน์โปรตีเอสในด้านอุตสาหกรรม</u> (Ward,1983;Outtrup & Boyce,1990;Fox และคณะ,1991)

โปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมหลายชนิด ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้กันในปัจจุบันโปรตีเอสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่นับได้ว่ามีปริมาณการขายประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ของการขายเอนไซม์ชนิดต่างๆทั้งหมด (Ward,1983) ใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอกจำนวน

1,300-1,500 ตันต่อปี และทำรายได้ทั้งหมด 300 ล้านเหรียญสหรัฐของเอนไซม์ทั้งหมดที่ใช้ในอุตสาหกรรม (Hubner และคณะ,1993) เราสามารถจำแนกประโยชน์ของโปรตีเอสในการนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมได้ดังนี้

1. การไฮโดรไลส์โปรตีน (Protein Hydrolysis) โดยทำให้โปรตีนมีขนาดเล็กลงสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่ายและสะดวกขึ้น ตัวอย่างได้แก่

- เจลาติน นำมาใช้ผสมในเครื่องดื่ม เครื่องสำอาง

- กรดอะมิโนจากกากถั่วเหลืองนำไปใช้ผสมในอาหารลดความอ้วน เครื่องดื่ม

- โปรตีนจากถั่วเหลือง สำหรับใช้ในการหมักซอส

- โปรตีนจากเนื้อปลา ช่วยลดระยะเวลาในการหมัก เพิ่มคุณค่าอาหาร เพิ่มรสชาด ป้องกันการเกิดรสขมในน้ำปลา และช่วยลดปริมาณปลาที่นำมาใช้หมัก

- โปรตีนจากหางนมและเคซีน ช่วยให้โปรตีนละลายน้ำ เพิ่มรสชาดให้ดีขึ้น และทำให้สารละลายใส

- โปรตีนจากเนื้อสัตว์ ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารกระป๋อง ซุป ช่วยทำให้เนื้อสัตว์นุ่มขึ้น (Meat Tenderization)

2. การทำขนมปัง ทำให้แป้งโด (Dough) มีความเหนียวนุ่มและฟู ขึ้น

3. อุตสาหกรรมนม ทำให้นมจับตัวเป็นก้อนในกระบวนการทำเนยแข็ง

4. อุตสาหกรรมเบียร์และเครื่องดื่ม ช่วยย่อยตะกอนโปรตีนทำให้เครื่องดื่มใส น่ารับประทาน

5. อุตสาหกรรมสารซักฟอก โดยเอนไซม์ที่นำไปผสมในสารซักฟอกจะช่วยย่อยสลายคราบโปรตีนต่างๆซึ่งเกาะบนเนื้อผ้า อีกทั้งยังช่วยลดปัญหามลพิษของภาวะแวดล้อม เนื่องจากเอนไซม์สามารถสลายได้ในธรรมชาติไม่ตกค้างเหมือนสารเคมีในผงซักฟอก
6. อุตสาหกรรมการฟอกหนัง โดยเอนไซม์จะช่วยกำจัดขนออกจากหนังสัตว์ทำให้หนังสัตว์นุ่มมีความยืดหยุ่นดี
7. ประโยชน์ด้านอื่นๆ เช่น ใช้ในอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ ใช้ในการทำความสะอาดเยื่อหุ้มผ่านในเครื่องมือต่างๆ เป็นต้น

<u>มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย</u>

จากที่กล่าวมาทั้งหมดนี้จะเห็นได้ว่า เอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสมีความสำคัญมากในระดับอุตสาหกรรม สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้มากมาย จึงทำให้มีความต้องการใช้เอนไซม์เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆในแต่ละปี ปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้าของเอนไซม์แต่ละชนิดมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆเป็นจำนวนมาก ดังแสดงในตารางที่1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่1 แสดงข้อมูลการนำเข้าของเอนไซม์ทุกชนิดของประเทศไทยตั้งแต่ปี 1991-1997

ปี ค.ศ.	มูลค่าการนำเข้า	
	ปริมาณ(ล้านตัน)	จำนวนเงิน(ล้านบาท)
1991	1.27	136
1992	1.28	204
1993	1.60	250
1994	2.18	275
1995	2.12	334
1996	2.11	367
1997	1.64	296

แหล่งที่มา กรมศุลกากร ประเทศไทย
ปี 1997 : เก็บข้อมูลตั้งแต่ เดือน มกราคม - กันยายน 1997

จากข้อมูลการนำเข้าเอนไซม์ของประเทศไทยมีแนวโน้มสูงขึ้น ซึ่งแสดงว่าความต้องการของการใช้เอนไซม์มีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ทำให้ประเทศต้องสูญเสียเงินเป็นจำนวนมากในการสั่งซื้อเอนไซม์มาใช้ในระดับอุตสาหกรรมเพราะประเทศเรายังไม่มีการพัฒนาอุตสาหกรรมเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์มากนัก เพื่อเป็นการลดต้นทุนการนำเข้าและสนองต่อความต้องการการใช้เอนไซม์ที่มีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ ดังนั้นจึงต้องมีการค้นคว้าพัฒนาการผลิตเอนไซม์ให้มีปริมาณมากพอต่อความต้องการภายในประเทศ ซึ่งมีทั้งการปรับปรุงสายพันธุ์ วิธีการผลิต รวมทั้งพัฒนาคุณสมบัติของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ให้สูงขึ้น

การทำการกลายพันธุ์ การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม และมีอีกวิธีหนึ่งที่สามารถเพิ่มผลผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสให้มีปริมาณมากก็คือ การหมัก โดยกระบวนการหมักในอุตสาหกรรม (Industrial Fermentation Process) เป็นวิธีหนึ่งในการเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้นและสามารถผลิตได้ครั้งละมากๆ ในระยะเวลาอันสั้น เป็นกระบวนการทางชีวเคมี โดยมีการเปลี่ยนแปลงของอินทรีย์สารเกิดขึ้นเนื่องจากการทำงานของจุลินทรีย์ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ ทั้งนี้การหมักอาจเกิดขึ้นในภาวะที่มีอัตราการให้อากาศ อัตราการกวน ค่าความเป็นกรด - ด่าง อุณหภูมิ และระยะเวลาในการหมักที่แตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก ดังนั้นจึงต้องมีการปรับปรุงสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการในปริมาณสูง ได้มีการศึกษาการผลิตเอลคาไลน์โปรตีเอสโดยกระบวนการหมักแต่มีการพิมพ์เผยแพร่น้อยมาก ทั้งๆที่เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรม (Hubner และคณะ 1993 ; Putten และคณะ 1996) งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการผลิตเอนไซม์เอลคาไลน์โปรตีเอสมีดังนี้

Fujiwara และ Yamamoto (1987) ได้ศึกษาถึงการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก Alkalophilic *Bacillus sp.* ให้มีปริมาณสูงขึ้นโดยใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก เช่น กากถั่วเหลือง bonito extract มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตโปรตีเอสได้

ปกรณ์ จิโรจน์กุลกิจ (2532) ได้ศึกษาคุณสมบัติและการทำให้บริสุทธิ์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากดินในประเทศไทยสามารถผลิตได้ทั้งนิวทรัลโปรตีเอสและแอลคาไลน์โปรตีเอสโดยเปรียบเทียบกับ *Bacillus licheniformis* ATCC 21415 ซึ่งเป็นเชื้อมาตรฐานพบว่าเชื้อทั้งสองสามารถผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้

ไม่แตกต่างกัน และการศึกษาสมบัติทางด้านกายภาพ เคมีจลศาสตร์ ความจำเพาะในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์เปรียบเทียบกับเอนไซม์มาตรฐานคือ Subtilisin Carlsberg และ Subtilisin BPN' พบว่ามีความจำเพาะในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์เหมือนกัน

Gieseche และคณะ (1990) ได้ศึกษาการเลี้ยง *Bacillus lichentformis* DSM 641 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ synthetic medium ซึ่งประกอบด้วยกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ในภาวะที่เหมาะสมพบว่าให้ผลผลิตโปรตีเอสได้ปริมาณพอสมควร

Moon และ Parulekar (1991) ได้ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Bacillus firmus* NRS 783 ในถังหมักระบบปิดและแบบ fed - batch พบว่าค่าความเป็น กรด - ด่าง อัตราการละลายของออกซิเจน ค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนและฟอสฟอรัสและสารสกัดจากยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อการเจริญของเซลล์ การสังเคราะห์และการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอส

Hubner และคณะ (1993) ได้ศึกษาการเลี้ยง *Bacillus lichentformis* DSM 641 โดยการหมักแบบ batch และ fed - batch โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบ complex medium ซึ่งมีส่วนประกอบคือ corn starch , Na- caseinate, soy flour, corn steep liquor พบว่าผลิตโปรตีเอสได้ในปริมาณสูงกว่าเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบ semi-synthetic medium ซึ่งประกอบด้วย glucose, casein peptone, yeast extract

เกษม พงษ์มณี (2536) ได้ศึกษาการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยใช้แหล่งวัตถุดิบจากการเกษตรเป็นแหล่งอาหาร เช่น แป้งข้าวเหนียว เป็นแหล่งคาร์บอน กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งไนโตรเจนโดยเลี้ยงในระดับขวดเขย่าภายใต้ภาวะที่เหมาะสม พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตโปรตีเอสได้

Putten และคณะ (1996) ได้ศึกษาการเลี้ยง *Bacillus licheniformis* ซึ่งผลิต Subtilisin Carlsberg โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบ complex medium ซึ่งประกอบด้วยแป้ง กลูโคส และ Na - caseinate พบว่าสามารถผลิตโปรตีเอสได้สูงสุด

ในการศึกษาการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่องนี้ ได้ทำการศึกษาต่อจากงานวิจัยของ เกษม พงษ์มณี ซึ่งได้ทำการศึกษาการเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในระดับขวดเขย่ามาแล้ว ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาในระดับขยายส่วนคือในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์ให้ได้ในปริมาณที่สูงกว่าในระดับขวดเขย่า โดยได้ดัดแปลงจากสูตรอาหารของ เกษม พงษ์มณี จากการใช้แป้งข้าวเหนียวมาใช้แป้งมันสำปะหลังแทน เนื่องจากแป้งมันสำปะหลังในประเทศเรามีเป็นจำนวนมากและมีราคาถูกกว่าแป้งข้าวเหนียวมาก

<u>วัตถุประสงค์ของการวิจัย</u>

1. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง โดยใช้วัตถุดิบทางการเกษตรมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการผลิตระดับขยายส่วนและผลิตขึ้นใช้เองภายในประเทศ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย