



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา

สาขา

จุลชีววิทยา

ภาควิชา

เรื่อง สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ลอกกาไหม
จาก *Bacillus* sp. C4 โดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

Optimized Conditions for Silk Degumming Protease Production
from *Bacillus* sp. C4 by Response Surface Methodology

نامผู้วิจัย นางสาวนิตา ร่มสั่มซ่า

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ปทุมพร นิยมเอนก, Dr.Eng.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ปราโมทย์ ศิริโรจน์, Dr.Agr.Sci.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์อนุวัตร แจ่มชัด, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ ร้อยเอกชัยวัฒน์ กิตติกุล, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ลอกกาไหม
จาก *Bacillus* sp. C4 โดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

Optimized Conditions for Silk Degumming Protease Production
from *Bacillus* sp. C4 by Response Surface Methodology

โดย

นางสาวนิสา ร่มสั่มซ่า

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

พ.ศ. 2552

นิตา ร่มสัมชา 2552: สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ลอกขาวไหมจาก *Bacillus* sp. C4 โดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) สาขา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ปทุมพร นิมนต์, Dr.Eng. 152 หน้า

Bacillus sp. C4 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากน้ำทิ้งของโรงงานผลิตเส้นไหม ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับลอกขาวไหมได้ดีที่สุด วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ก็เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตโปรติเอสจาก C4 โดยเริ่มจากการคัดเลือกวัตถุดิบ และพบว่าแป้งมันไฮโดรไลซ์ แป้งถั่วเหลือง และ skim milk เป็นแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และสารเหนียวที่เหมาะสมตามลำดับ จากนั้นทำการกลั่นกรองปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยใช้ Plackett-Burman design ซึ่งปัจจัยที่นำมาศึกษามี 7 ชนิด คือ แป้งมันไฮโดรไลซ์ แป้งถั่วเหลือง skim milk พีเอช เริ่มต้น อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง ความเร็วรอบในการเขย่า และปริมาณกลีเซอรอลเริ่มต้น พบว่าปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสใน Modified BMSM medium อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) คือ แป้งถั่วเหลือง และ skim milk เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) และวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology) โดยปัจจัยที่นำมาศึกษา คือ ปริมาณแป้งถั่วเหลือง ปริมาณ skim milk และความเร็วนรอบในการเขย่า พบว่าแบบจำลองมีความแม่นยำสูงสามารถอธิบายความแปรปรวนได้ 91.2 เปอร์เซ็นต์ โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ทำให้ค่าทำนาย (จากแบบจำลอง) ของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด (1,575.5 units/ml) คือ แป้งถั่วเหลือง 2.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) skim milk 0.1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และความเร็วนรอบในการเขย่า 280 rpm ส่วนค่าสังเกตของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด เท่ากับ 1,536.9 units/ml ซึ่งมากกว่าเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิม (729.0 units/ml) ถึง 2.2 เท่า นอกจากนี้ยังได้เพาะเลี้ยง C4 ในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร เพื่อเป็นการยืนยันความสำคัญของการให้อากาศต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก C4 โดยควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงในถังหมักที่พีเอช 7.5 อัตราการกวน 350 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 2 vvm และค่าการละลายของออกซิเจนในถังหมัก เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ ให้คงที่ตลอดการทดลอง สามารถเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์โปรติเอสเป็น 1,898.1 units/ml โดยกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น 1.2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงในอาหาร BMSM ที่เหมาะสมในฟลาสก์ (1,575.5 units/ml)

Nisa Romsomsa 2009: Optimized Conditions for Silk Degumming Protease Production from *Bacillus* sp. C4 by Response Surface Methodology. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Assistant Professor Patoomporn Chim-anage, Dr.Eng. 152 pages.

Bacillus sp. C4 was isolated from waste water of Thai silk industry, and determined as a potential protease producer for silk degumming process. The objective of this research is to optimize the medium and cultivation condition for growth and protease production from C4. The prior selection of raw materials suited for protease production was employed by simple screening method in BMSM broth as a basal medium. Hydrolyzed cassava starch, soy flour and skim milk were selected to be suitable carbon, nitrogen sources and the enzyme inducer, respectively. Plackett-Burman design was introduced for screening of seven variables for protease production, i.e., hydrolyzed cassava starch, soy flour, skim milk, initial pH, temperature, shaker speed and inoculum size. The results indicated that soy flour and skim milk were significant variables on protease production ($P \leq 0.05$). Hence soy flour, skim milk and shaker speed were further optimized via central composite design (CCD) and response surface methodology for potential use on an industrial scale. The analysis of variance (ANOVA) showed the adequacy of the model ($R^2 = 0.912$) and verification experiments confirmed its validity. According to the model, the predicted maximal protease production was 1,575.5 units/ml and the corresponding concentrations of soy flour and skim milk were 2.0% (w/v), 0.1% (w/v) and 280 rpm of shaker speed, respectively. However the observed value of maximum protease production was 1,536.9 units/ml which was a 2.2-fold increase as compared to that of unoptimized condition in shake flask (729.0 units/ml). To emphasize the aeration necessity, C4 was cultivated in 2 liter stirred tank reactor containing the optimized BMSM medium and controlling pH, agitation rate, temperature, aeration rate and dissolved oxygen at 7.5, 350 rpm, 30°C, 2 vvm and 70% air saturation, respectively. Accordingly, the result obtained was 1,898.1 units/ml of enzyme which was an about 1.2-fold increase as compared to that in the shake flask with optimized BMSM medium (1,575.5 units/ml).

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปทุมพร จิมเอนก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก อาจารย์ ดร.ปราโมทย์ ศิริโรจน์ และ รองศาสตราจารย์ ดร. อนุวัตร แจ่มชัด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำที่ปรึกษาแนะนำในด้านการวิจัยและเรียบเรียงวิทยานิพนธ์ ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. พิชราภรณ์ ศิวยไพเราะพราหมณ์ ประธานการสอบ และ รองศาสตราจารย์ ดร. อาภรณ์ วงษ์วิจารณ์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำปรึกษาและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณบุคลากร เจ้าหน้าที่ และเพื่อนๆ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำต่างๆ ในระหว่างการวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อประทวน คุณแม่รำพึง ร่มสัมช่า และญาติพี่น้องทุกท่าน ที่สนับสนุนและให้โอกาสในการศึกษา ตลอดจนเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้ามาตลอดในทุกเรื่อง

นิสา ร่มสัมช่า

มกราคม 2552

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	62
อุปกรณ์	62
วิธีการ	63
ผลและวิจารณ์	72
สรุปและข้อเสนอแนะ	97
สรุป	97
ข้อเสนอแนะ	99
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	101
ภาคผนวก	119
ภาคผนวก ก อาหารเพาะเชื้อและถังหมักที่ใช้ในการทดลอง	120
ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์ทางเคมี	124
ภาคผนวก ค ข้อมูลการทดลอง	130
ภาคผนวก ง ข้อมูลที่นำมาวิเคราะห์ทางสถิติ	145
ประวัติการศึกษา และทำงาน	152

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 การจำแนกเอนไซม์ peptidases ตามระบบของ Enzyme Classification (EC system)	6
2 ตัวอย่างของ exopeptidases และการทำงานของเอนไซม์	7
3 ตัวอย่างของ endopeptidases และการทำงานของเอนไซม์	10
4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของจุลินทรีย์บางชนิด	27
5 แสดงส่วนประกอบของชั้นรังไหมชนิด <i>Bombyx mori</i>	35
6 ส่วนประกอบของกรดอะมิโนของเซรีซินและไฟโบรอิน (กรดอะมิโนเป็นกรัมในโปรตีน 100 กรัม)	36
7 ส่วนประกอบของกรดอะมิโนของไฟโบรอินในไหมป่า (กรดอะมิโนเป็นกรัมในโปรตีน 100 กรัม)	37
8 การลอกกาไหมด้วยโปรติเอสและประสิทธิภาพในการลอกกาไหม	46
9 แผนมาตรฐานสำหรับเมตริกแถวแรกในการทดลองที่คัดเลือก N-1 ปัจจัยในการทดลอง N ครั้ง	49
10 ตารางเมตริกของแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman ที่มีปัจจัยต้องกลั่นกรองจำนวน 7 ปัจจัยโดยมีจำนวนสิ่งทดลอง (N) ทั้งหมด 12 การทดลอง และมีจำนวน dummy variables 4 ตัว	50
11 ค่าของ code level ใน central composite design (CCD) สำหรับ 3 ปัจจัย	57
12 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการคัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนในโตรเจนและสารเหนียวนาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับลอกกาไหม จาก <i>Bacillus</i> sp. C4	65
13 ระดับของปัจจัยต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับลอกกาไหมจาก <i>Bacillus</i> sp. C4 โดยใช้ Plackett and Burman design	67

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14	ตารางเมตริกของการจัดการทดลอง Plackett and Burman design ที่มีปัจจัยต้อง กลั่นกรอง จำนวน 7 ปัจจัย ที่ใช้ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับ ลอกกาวยไหมโดย <i>Bacillus</i> sp. C4	67
15	ค่าระดับของแต่ละปัจจัยที่เป็นตัวแปรอิสระต่างๆ ในแผนการทดลอง CCD ที่ใช้ ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับลอกกาวยไหม โดย <i>Bacillus</i> sp. C4	68
16	แผนการทดลอง CCD ที่ใช้ในการศึกษาปัจจัยจำนวน 3 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการ ผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับลอกกาวยไหมโดย <i>Bacillus</i> sp. C4 ซึ่งมีจำนวน หน่วยทดลองทั้งหมด 17 สิ่งทดลอง	69
17	ผลของแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับการลอกกาวยไหม	76
18	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับการลอกกาวยไหม จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BSM medium ที่เติมสารเหนียวต่างชนิดกัน	79
19	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากการจัดแบบการทดลอง Plackett and Burman design ในการกลั่นกรองปัจจัยการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับการลอกกาวยไหม	83
20	การวิเคราะห์ความแปรปรวนในการจัดการทดลอง Plackett and Burman design เพื่อกลั่นกรองปัจจัยการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับการ ลอกกาวยไหม ที่ระดับความมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)	84
21	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสำหรับลอกกาวยไหมที่ <i>Bacillus</i> sp. C4 ผลิตขึ้น โดยใช้แผนการทดลอง CCD และนำไปสร้าง RSM และกิจกรรมของเอนไซม์ โปรติเอสที่ได้จากสมการทำนาย	87

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
22	การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยจากค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส ในแผนการทดลอง CCD เพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับลอกกาวไหม	88
23	เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส สำหรับลอกกาวไหม จาก <i>Bacillus</i> sp. C4 จากการตรวจสอบสมการจากแผนการทดลอง CCD และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการสมการทำนาย	92
ตารางผนวกที่		
ค1	การเจริญ และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในอาหาร BMSM medium ของ <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับลอกกาวไหม	131
ค2	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับการลอกกาวไหม จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 200 rpm เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง	132
ค3	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับลอกกาวไหม จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ	134
ค4	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจาก <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับลอกกาวไหมจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BMSM medium ที่เติมสารเหนียวนาต่างชนิดกัน	137
ค5	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจาก <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับการลอกกาวไหม จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ เป็นระยะเวลา 20 24 30 และ 36 ชั่วโมง	138
ค6	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจาก <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับการลอกกาวไหม จากการเพาะเลี้ยงในการจัดการทดลอง Plackett and Burman Design	140
ค7	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจาก <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับลอกกาวไหมจากการเพาะเลี้ยงในแผนการทดลอง CCD	141

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ค8 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจาก <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับการลอกกาวยไหมดจากการเพาะเลี้ยงในการตรวจสอบสมการ (validation)	143
ค9 การเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากการเพาะเลี้ยงแบบเปิดเสร็จในถังหมักของ <i>Bacillus</i> sp.C4 สำหรับการลอกกาวยไหมด	144
ง1 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส จาก <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับการลอกกาวยไหมด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเชื้อ 23 สูตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 200 rpm เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และใช้ Student's <i>t</i> -test ที่ระดับความมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)	146
ง2 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับการลอกกาวยไหมด จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Tukey's test	147
ง3 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส จาก <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับการลอกกาวยไหมด เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเชื้อ BSM medium ที่เติมสารเหนียวต่างกัน 4 ชนิด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 200 rpm เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และใช้ Student's <i>t</i> -test ที่ระดับความมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)	148
ง4 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส จาก <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับการลอกกาวยไหมด จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BSM medium ที่เติมสารเหนียวต่างชนิดกัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 200 rpm เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากการทดลอง 3 ซ้ำ ด้วยวิธี Tukey's test	149
ง5 การวิเคราะห์สมการถดถอยของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจาก <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับการลอกกาวยไหมด ในการจัดการทดลอง Plackett and Burman design ที่ระดับความมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)	149

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ง6 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจาก <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับลอกกาวใหม่ ในการจัดการทดลอง Plackett and Burman design โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และใช้ Student's <i>t</i>-test ที่ระดับความมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)	150
ง7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการจัดการทดลอง Plackett and Burman design ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับลอกกาวใหม่	150
ง8 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจาก <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับลอกกาวใหม่ จากแผนการทดลอง CCD โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และใช้ Student's <i>t</i>-test ที่ระดับความมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)	151
ง9 การวิเคราะห์สมการถดถอยค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส จากแผนการทดลอง CCD ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับลอกกาวใหม่ ที่ระดับความมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)	151

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงโครงสร้างทางเคมีของเส้นไหม	33
2	แสดงส่วนประกอบโครงสร้างภายในของเส้นไหม	34
3	แผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนองแบบ 2 มิติ (contour plot)	55
4	แผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนองแบบ 3 มิติ (response surface plot)	55
5	แสดงสิ่งทดลอง (design points) สำหรับสมการกำลังสอง	56
6	การเจริญ และการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับลอกกาไหมในอาหารเหลว BSM medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ 200 rpm เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง	74
7	การผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับลอกกาไหมจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM medium สูตรดัดแปลงต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 rpm เป็นระยะเวลา 20 24 30 และ 36 ชั่วโมง	81
8	แผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแป้งถั่วเหลือง และ skim milk ต่อ กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจาก <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับลอกกาไหม โดยความเร็วรอบในการเขย่าอยู่ที่ระดับ center point (200 rpm)	89
9	แผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแป้งถั่วเหลือง และความเร็วรอบในการเขย่า ต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจาก <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับลอกกาไหม โดยปริมาณ skim milk อยู่ที่ระดับ center point (0.2 % (w/v))	90
10	แผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนองแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง skim milk และความเร็วรอบในการเขย่าต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจาก <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับลอกกาไหม โดยปริมาณแป้งถั่วเหลือง อยู่ที่ระดับ center point (1.5% (w/v))	91

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
11 ผลการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. C4 สำหรับลอกกาวไหมจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM medium สูตรดัดแปลงที่สภาวะเหมาะสม (optimized medium) ในถังหมัก ปริมาตร 1.5 ลิตร โดยควบคุมอัตราการกวนเท่ากับ 350 rpm อัตราการให้อากาศ 2 vvm ค่าการละลายของออกซิเจนในถังหมัก เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว ค่าพีเอช 7.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตลอดจนการทดลอง เป็นระยะเวลา 30 ชั่วโมง	95
ภาพผนวกที่	
ก1 ถังหมัก Biostat B (B. Braun Biotech International) ขนาด working volume สูงสุด 2 ลิตร	123

สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ลอกกาไหม
จาก *Bacillus* sp. C4 โดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง

Optimized Conditions for Silk Degumming Protease Production
from *Bacillus* sp. C4 by Response Surface Methodology

คำนำ

ปัจจุบันผ้าไหมของไทยได้เป็นที่นิยมแพร่หลายกันมากทั้งในและต่างประเทศ ผ้าไหมไทยจึงเป็นสินค้าสำคัญของประเทศอีกชนิดหนึ่ง นอกจากจะช่วยนำเงินตราต่างประเทศเข้ามาและช่วยให้ประชาชนมีอาชีพ อันเป็นผลดีทางเศรษฐกิจแล้ว ยังเป็นสิ่งที่เชิดชูวัฒนธรรมของชาติอีกด้วย จึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งสำหรับการพัฒนาอาชีพการเลี้ยงไหมไทย เพื่อส่งเสริมคุณภาพชีวิตของประชาชน รวมถึงการนำวิทยาการและเทคโนโลยีมาพัฒนาการผลิตผลิตภัณฑ์ไหม เพื่อตอบสนองความต้องการด้านคุณภาพของผลิตภัณฑ์ของตลาด

กระบวนการลอกกาไหม (silk degumming) เป็นกระบวนการสำคัญอย่างหนึ่งที่ใช้ในการเตรียมเส้นไหมเพื่อการย้อมและทอต่อไป การลอกกาไหมโดยใช้สารละลายด่างที่มีความเข้มข้นสูงทำให้เกิดความเสียหายของเส้นไหม และสูญเสียกาไหม (เซรีซิน; sericin) ได้ ซึ่งกาไหมมีคุณสมบัติหลายประการที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ เช่น ป้องกันรังสียูวี รักษาความชุ่มชื้น และป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ เป็นต้น ดังนั้นการใช้เอนไซม์โปรติเอสที่สามารถย่อยเซรีซินได้โดยไม่ย่อยไฟโบรอิน (fibroin) น่าจะช่วยหลีกเลี่ยงความเสียหายที่เกิดกับเส้นใยไฟโบรอินได้ นอกจากนี้คุณสมบัติเรื่องความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์ยังมีส่วนช่วยในการควบคุมกระบวนการลอกกาและคุณภาพของเส้นไหมได้

จุลินทรีย์ที่เป็นแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ซึ่งอยู่ในสกุลของ *Bacillus* สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสออกมานอกเซลล์ (extracellular proteases) (Schaeffer, 1969; Dawson and Kurz, 1969; Ward, 1983; Kole *et al.*, 1987) โดยเอนไซม์โปรติเอสจัดเป็นเอนไซม์หนึ่งที่มีความสำคัญมากในการผลิตระดับอุตสาหกรรม เช่น การผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมสารซักฟอก อาหาร เครื่องหนัง และผ้าไหม (Kembhavi *et al.*, 1993; Gessesse and Gashe, 1997;

Manachini and Fortina, 1998; Kumar and Takagi, 1999) ราคาต้นทุนการผลิตเอนไซม์มาจากอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์คิดเป็น 30 ถึง 40 เปอร์เซ็นต์ (Joo *et al.*, 2002) ดังนั้นการคัดเลือกสูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่มีราคาถูกและมีคุณภาพสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอส จึงมีความสำคัญมากซึ่งมีรายงานที่ศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส (Hanlon *et al.*, 1982; McKeller and Cholette, 1984; Kole *et al.*, 1988a; Kaur *et al.*, 2001) ไอออนโลหะ (Varela *et al.*, 1996) ปัจจัยทางกายภาพ เช่น ค่าพีเอช อุณหภูมิ ความเข้มข้นของกลูโคส (Nehete *et al.*, 1985) ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายน้ำ (dissolved oxygen; DO) (Moon and Parulekar, 1993; Hameed *et al.*, 1999) และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (Nehete *et al.*, 1985) ส่วนการหาสภาวะที่เหมาะสม (optimization) เป็นกระบวนการทางสถิติที่ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายโดยใช้วิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (response surface methodology; RSM) ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรต้นคือ ปัจจัยต่างๆ ต่อตัวแปรตาม คือ ค่าตอบสนอง ซึ่งช่วยให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน สารเหนียวนำ (inducer) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม สำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับย่อยกาวไหมจาก *Bacillus* sp. C4 รวมถึงการพัฒนาการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบเบ็ดเสร็จในถังหมักเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และสารเหนียวนำ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกาวไหม
2. ศึกษาถั่วงอกปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกาวไหม
3. ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกาวไหม
4. ศึกษาการเพาะเลี้ยงในถังหมักสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกาวไหม

การตรวจเอกสาร

1. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับเอนไซม์

เอนไซม์เป็นกลุ่มโปรตีนที่มีการขดตัว หรือโครงรูป (conformation) ที่จำเพาะซึ่งโครงรูปธรรมชาติของเอนไซม์แต่ละชนิดจะถูกกำหนดโดยการเรียงลำดับของกรดอะมิโนในสายโพลีเปปไทด์ โดยเอนไซม์มีหน้าที่ทำให้ปฏิกิริยาเคมีต่างๆ ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่เกิดขึ้นไม่ว่าจะเป็นการสังเคราะห์ (anabolism) หรือการสลาย (catabolism) สารชีวโมเลกุล เพื่อให้เกิดพลังงานสำหรับกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์เป็นปฏิกิริยาที่สามารถเกิดขึ้นได้ในสภาวะแวดล้อมภายในเซลล์ โดยที่ไม่ต้องใช้อุณหภูมิสูง และมีพีเอชเป็นกลาง ทั้งนี้เพราะภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตมีตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพ (biological catalyst) ที่เรียกว่าเอนไซม์ (enzyme) ช่วยเร่งปฏิกิริยาเพื่อให้กระบวนการต่างๆ ของชีวิตดำเนินไปตามปกติ ในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งนั้น พบว่าเอนไซม์สามารถเพิ่มอัตราการเกิดปฏิกิริยาได้ถึง 10⁸ ถึง 1,014 เท่าของปฏิกิริยาเดิมที่มีตัวเร่ง (พัชรา, 2541) เนื่องจากเอนไซม์ช่วยลดพลังงานกระตุ้น (activation energy) ปฏิกิริยาจึงเข้าสู่ภาวะสมดุล (equilibrium position) ได้เร็วขึ้น โดยที่เอนไซม์ไม่ได้เปลี่ยนแปลงสถานะสมดุล

2. ชนิดของเอนไซม์

เอนไซม์ของแบคทีเรียจำแนกออกเป็นชนิดต่างๆ ได้ดังนี้

2.1 แบ่งตามลักษณะการสร้างเอนไซม์

2.1.1 เอนไซม์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้น (inductive enzyme, induced enzyme หรือ adaptive enzyme) เอนไซม์ชนิดนี้จะเกิดขึ้นได้เมื่อมีสารอาหารหรือสับสเตรทเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้างเอนไซม์ ซึ่งถ้าไม่มีสับสเตรทชนิดนี้ เซลล์ก็จะไม่สร้างเอนไซม์ดังกล่าว

2.1.2 เอนไซม์ที่มีอยู่ประจำ (constitutive enzyme) เป็นเอนไซม์ที่เซลล์สร้างขึ้นได้เองเป็นประจำโดยไม่ขึ้นอยู่กับสารอาหารหรือสับสเตรท

2.2 แบ่งตามแหล่งที่เอนไซม์ทำงาน

2.2.1 เอนไซม์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์แล้วถูกขับออกมาทำงานภายนอกเซลล์เรียกว่า “extracellular enzyme” หรือ “exoenzyme” เมื่อทำปฏิกิริยากับสับสเตรทแล้วทำให้โมเลกุลของสับสเตรทเล็กลงจนเข้าสู่เซลล์ได้ ตัวอย่างเอนไซม์ เช่น โปรติเอส เจลาติเนส มอลเตส เป็นต้น

2.2.2 เอนไซม์ที่สร้างขึ้นและทำงานภายในเซลล์โดยทำปฏิกิริยากับสับสเตรทภายในเซลล์ เรียกว่า “intracellular enzyme” หรือ “endoenzyme” ตัวอย่างเอนไซม์ เช่น ไฮโดรเลส ออกซิเดส เป็นต้น (นงลักษณ์ และ ปรีชา, 2544)

3. ข้อมูลพื้นฐานของเอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ประเภทไฮโดรไลติกเอนไซม์ (hydrolytic enzyme) โดยจัดอยู่ใน Class E.C.3.4.-.- หรือที่รู้จักกันในชื่อของ peptidyl-peptide hydrolases มีความสามารถในการตัดหรือการสังเคราะห์พันธะเปปไทด์ของสายโพลีเปปไทด์หรือโปรตีน (Beg *et al.*, 2002) โดยกระบวนการที่เรียกว่าโปรติโอไลซิส (proteolysis) โดยใช้น้ำในการเข้าร่วมทำปฏิกิริยา โปรติเอสพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเจริญและการดำรงชีวิตอยู่ของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เอนไซม์โปรติเอส มีชื่อสามัญหลายชื่อ ได้แก่ เอนไซม์เปปติเดส โปรติเอส โปรติเนส เปปไทด์ไฮโดรเลส และโปรติโอไลติก เป็นต้น

4. การจำแนกเอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอสถูกจัดอยู่ในหมวดหมู่ (class) ที่ 3 เป็นเอนไซม์ประเภทไฮโดรไลติกเอนไซม์ ซึ่งถูกจัดตามลักษณะเฉพาะการทำงานบนพันธะเปปไทด์ โดย International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) ทำการแบ่งเอนไซม์ตามระบบ Enzyme Classification (EC system) ออกเป็นหมวดหมู่ย่อย (sub-subclass) ทั้งหมด 13 sub-classes ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การจำแนกเอนไซม์ peptidases ตามระบบของ Enzyme Classification (EC system)

Sub-subclasses	Type of peptidases	Number of entries
3.4.11	Aminopeptidases	19
3.4.13	Dipeptidases	12
3.4.14	Dipeptidyl-peptidases	8
3.4.15	Peptidyl-peptidases	3
3.4.16	Serine-type carboxypeptidases	4
3.4.17	Metallocarboxypeptidases	19
3.4.18	Cysteine-type carboxypeptidases	1
3.4.19	Omega peptidases	11
3.4.21	Serine endopeptidases	75
3.4.22	Cysteine endopeptidases	26
3.4.23	Aspartic endopeptidases	32
3.4.24	Metalloendopeptidases	69
3.4.99	Endopeptidases of unknown type	2
Total		281

ที่มา: Beyon and Bond (2001)

โดยเอนไซม์โปรติเอส ทั้ง 13 sub-classes สามารถแบ่งออกเป็นสองกลุ่มใหญ่ ตามกลไกการทำงาน ดังต่อไปนี้

4.1 Exopeptidases (Peptidases: EC 3.4.11 ถึง 19)

กลุ่มโปรติเอสที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์จากทางปลายด้านใดด้านหนึ่งของสายโพรตีนอย่างจำเพาะ ตัวอย่างและกลไกในการทำงานของ exopeptidases ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งสามารถแบ่งเอนไซม์ได้เป็น 6 ประเภท

ตารางที่ 2 ตัวอย่างของ exopeptidases และการทำงานของเอนไซม์

Number	Name	Reaction
3.4.11	α-Aminoacylpeptide hydrolyases	
3.4.11.1	Cytosol aminopeptidase (leucine aminopeptidase)	Aminoacyl-peptide + H ₂ O = amino acid + peptide
3.4.11.2	Microsomal aminopeptidase	Aminoacyl-peptide + H ₂ O = amino acid + peptide
3.4.11.9	Aminopeptidase	Aminoacyl-peptide + H ₂ O = amino acid + peptide
3.4.13	Dipeptide hydrolyases	
3.4.13.3	Aminoacyl-histidine dipeptidase (carnosinase)	Aminoacyl-histidine + H ₂ O = amino acid + histidine
3.4.14	Dipeptidylpeptide hydrolases	
3.4.14.1	Dipeptidyl peptide peptidase I (cathepsin C)	Dipeptidyl-peptide + H ₂ O = dipeptide + peptide
3.4.14.5	Dipeptidyl peptidase IV (Xaa-pro-dipeptidyl-aminopeptidase)	Aminoacylprolyl-peptide + H ₂ O = aminoacylproline + peptide
3.4.15	Dipeptidyl-dipeptide hydrolases	
3.4.15.1	Dipeptidyl carboxypeptidase I (angiotensin converting enzyme, peptidase P, kininase II, carboxycathepsin)	Peptidyl-dipeptide + H ₂ O = peptide + dipeptide
3.4.16	Serine carboxypeptidases	
3.4.16.1	Serine carboxypeptidase (carboxypeptidase Y, carboxypeptidase C, cathepsin A, phaseoline)	Peptidyl-amino acid + H ₂ O = peptide + amino acid

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Number	Name	Reaction
3.4.17	Metallo-carboxypeptidases	
3.4.17.1	Carboxypeptidases A	Peptidyl-amino acid + H ₂ O = peptide + amino acid
3.4.17.2	Carboxypeptidases B	Peptidyl-lysine/arginine + H ₂ O = peptide + lysine/arginine
3.4.18	Cystein carboxypeptidases	
3.4.18.1	Lysosomal carboxypeptidase B	Peptidyl-amino acid + H ₂ O = peptide + amino acid
3.4.19	Omega peptidases	
3.4.19.3	5-Oxopropyl-peptidase (pyroglutamyl amino-peptidase)	5-Oxopropyl-peptide + H ₂ O = 5-oxoproline + peptide

ที่มา: Polgar (1989)

4.1.1 Aminopeptidases (EC 3.4.11) คือ โปรติเอสที่ย่อยพันธะเปปไทด์จากทางด้านปลายอะมิโน (N-terminal) ของโปรตีนเข้ามาทีละหน่วย

4.1.2 Dipeptidases (EC 3.4.13) คือ โปรติเอสที่มีความจำเพาะต่อการย่อยพันธะเปปไทด์ของ dipeptide

4.1.3 Dipeptidyl-peptidases, Tripeptidyl-peptidases (EC 3.4.14) คือ โปรติเอสที่ย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีนจากทางด้านปลายอะมิโนเข้ามาทีละสองหรือสามหน่วย

4.1.4 Peptidyl-dipeptidases (EC 3.4.15) คือ โปรติเอสที่ย่อยพันธะเปปไทด์จากทางด้านปลายคาร์บอกซิล (C-terminal) ของโปรตีนเข้ามาทีละสองหน่วย

4.1.5 Carboxypeptidases (EC 3.4.16 ถึง 18) คือ โปรติเอสที่ย่อยพันธะเปปไทด์จากทางด้านปลายคาร์บอกซิลของโปรตีนเข้ามาทีละหน่วย แบ่งได้ 3 กลุ่ม คือ Serine carboxypeptidases (EC 3.4.16), Metallo carboxypeptidases (EC 3.4.17) และ Cysteine carboxypeptidases (EC 3.4.18)

4.1.6 Omega peptidases (EC 3.4.19) คือ โปรติเอสที่สามารถย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีน ได้ทั้งจากทางด้านปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซิล

4.2 Endopeptidases (Proteinases: EC 3.4.21 ถึง 24 และ 99)

กลุ่มโปรติเอสที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ภายในสายโปรตีนซึ่งมักมีความจำเพาะต่อชนิดของกรดอะมิโนระหว่างตำแหน่งพันธะเปปไทด์ที่ย่อย สามารถแบ่งโปรติเอส ได้ 5 กลุ่ม ตามกลไกการทำงานที่บริเวณเร่งให้เกิดปฏิกิริยา (catalytic mechanism) ดังตัวอย่างที่แสดงไว้ในตารางที่ 3

4.2.1 Serine endopeptidases (EC 3.4.21) เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีกรดอะมิโน serine และ histidine อยู่ทีบริเวณเร่ง จะถูกยับยั้งได้โดย diisopropyl-phospho-fluoride (DFP) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับหมู่ OH^- ของ serine ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ และพบหมู่ imidazol ด้วยเช่นกัน เอนไซม์ในกลุ่มนี้เป็นอัลคาไลน์โปรติเอส (alkaline protease) ซึ่งมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาอยู่ในช่วงพีเอช 7 ถึง 11

4.2.2 Cysteine endopeptidases (EC 3.4.22) เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมีกรดอะมิโน cysteine และ histidine อยู่ทีบริเวณเร่ง และถูกยับยั้งด้วย sulfhydryl reagents แสดงว่ามี $-\text{SH}$ ทีบริเวณเร่ง เอนไซม์ในกลุ่มนี้เป็นนิวทรัลโปรติเอส (neutral proteases) ซึ่งมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาอยู่ในช่วงพีเอช 6 ถึง 7.5

4.2.3 Aspartic endopeptidases (EC 3.4.23) เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีกรดอะมิโน aspartate อยู่บริเวณเร่ง เอนไซม์ในกลุ่มนี้เป็นแอซิดโปรติเอส (acid protease) ซึ่งมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาอยู่ในช่วงพีเอช 2 ถึง 4

ตารางที่ 3 ตัวอย่างของ endopeptidases และการทำงานของเอนไซม์

Number	Name	Preferential cleavage at the carboxyl end of Xaa- or Xaa-Xaa bond
3.4.21	Serine Proteinases	
3.4.21.1	Chymotrypsin	Try↓, Trp↓, Phe↓, Leu↓, Met↓
3.4.21.4	Trypsin	Arg↓, Lys↓
3.4.21.5	Thrombin	Arg↓, converts fibrinogen to fibrin
3.4.21.6	Coagulation factor Xa (thrombokinas)	Arg↓, Ile↓, Arg↓, Gly↓, converts prothrombin to thrombin
3.4.21.7	Plasmin (fibrinolysis)	Lys↓, >Arg↓, converts fibrin into soluble products
3.4.21.9	Enteropeptidase (enterokinase)	Arg-Lys↓, Ile in trypsinogen
3.4.21.12	<i>Myxobacter</i> β-lytic proteinase	Peptide portion as Xaa-Xaa-Xaa-Ala↓
3.4.21.14	Microbial serine proteinase: subtilisin, Aspergillus alkaline proteinase, Tritirachium alkaline proteinase (proteinase K)	
3.4.21.19	Staphylococcal serine proteinase	Glu↓, Asp↓
3.4.21.20	Cathepsin G	Similar to chymotrypsin
3.4.21.26	Prolyl endopeptidase (post-proline cleaving enzyme, postproline endopeptidase)	Pro↓ L-Xaa and Pro↓ D- Xaa but neither Pro↓ L-Pro nor Pro↓ D-Pro bonds
3.4.21.34	Plasma kallikrein	Lys↓ Arg and Arg↓ Ser bonds in kininogen to produce bradykinin
3.4.21.35	Tissue kallikrein (kallidin)	Met↓ Lys and Arg↓ Ser bonds in kinninigen to produce lysylbradykinin
3.4.21.36	Pancreatic elastase	A short segment as Xaa-Xaa-Xaa-Ala↓
3.4.21.37	Leukocyte elastase (neutrophil elastase)	Xaa-Xaa-Xaa-(Ala, Val)↓
3.4.21.39	Chymase (mass cell protease I)	Similar to chymotrysin

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Number	Name	Preferential cleavage at the carboxyl end of Xaa- or Xaa-Xaa bond
3.4.22	Cystein proteinases	
3.4.22.1	Cathepsin B	Phe-Xaa↓ Phe-Xaa↓
3.4.22.2	Papain	Phe-Xaa↓
3.4.22.3	Ficin	
3.4.22.4	Bromelain	
3.4.22.6	Chymopapain	Phe-Xaa↓
3.4.22.7	Asclepain	Phe-Xaa↓, Phe-Xaa↓
3.4.22.8	Clostripain	Arg↓, especially Arg↓ Pro bond
3.4.22.14	Actidin	Phe-Xaa↓
3.4.22.15	Cathepsin L	
3.4.22.16	Cathepsin H	
3.4.22.17	Calpain (Ca ² ± activated neutral protease)	
3.4.23	Aspartic proteinases	
3.4.23.1	Pepsin A (pepsin)	Phe (Try, Leu)↓ Trp(Phe, Tyr) bond
3.4.23.4	Chymosin (rennin)	A single bond in casein K
3.4.23.5	Cathepsin D	
3.4.23.6	Microbial aspartic proteinase: <i>Aspergillus saitoi</i> aspartic proteinase (aspergillopeptidase A), Penicillinase	
3.4.23.15	Renin (angiotensin-forming enzyme)	Leu↓ Leu bond in angiotensinogen to generate angiotensin I
3.4.24	Metalloproteinase	
3.4.24.3	<i>Clostridium histolyticum</i> collagenase	Xaa↓ Gly bond in sequence- Pro- Xaa- Gly-Pro-

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Number	Name	Preferential cleavage at the carboxyl end of Xaa- or Xaa-Xaa bond
3.4.24.4	Microbial metalloproteinases: <i>Bacillus thermoproteolytic</i> neutral Proteinase (thermolysin), <i>Bacillus subtilis</i> neutral proteinase, Myxobacter β -lytic proteinase	Xaa↓ Leu (Phe)
3.4.24.7	Vertebrate collagenase	
3.4.24.11	Membrane metalloendopeptidase (enkephalinase, neutral endopeptidase 24.11, kidney-brsh-border neutral proteinase)	
3.4.24.14	Procollagen N-proteinase	Xaa↓ Gln in pro α 1 and 2 chains of procollagen

ที่มา: Polgar (1989)

4.2.4 Metalloendopeptidases (EC 3.4.24) เอนไซม์ในกลุ่มนี้ต้องการไอออนของโลหะในการเร่งปฏิกิริยา โดยไอออนของโลหะจะรวมอยู่ในโมเลกุลเอนไซม์ที่บริเวณเร่ง หรือร่วมในปฏิกิริยาการย่อยสลาย และโปรติเอสกลุ่มนี้ จะถูกยับยั้งด้วยสารจับไอออนของโลหะ (metal chelating agents) เช่น ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether) N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA) และ 1, 10 – phenanthroline ช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาอยู่ในช่วงพีเอช 6.5 ถึง 7.5

4.2.5 โปรติเอสชนิดที่ยังไม่รู้ถึงกลไกการเร่งปฏิกิริยา (EC 3.4.99)

5. กลไกการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส (mechanism of protease)

กลไกของเอนไซม์โปรติเอส แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นกลุ่มที่มีการสร้าง covalent enzyme complex ในช่วงที่เอนไซม์อยู่ในสถานะทรานซิชัน (transition state) หรือภาวะของเอนไซม์ที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงที่พร้อมจะทำปฏิกิริยา ที่บริเวณ catalytic site จะมีกรดอะมิโนอยู่ที่ตำแหน่งจุดศูนย์กลางในการทำงาน มีความเป็น nucleophilic สูง เพื่อสร้างพันธะโควาเลนต์กับสับสเตรท กลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อน เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ พวก serine และ cysteine proteases อีกกลุ่มหนึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่มีการสร้าง covalent enzyme complex แต่จะใช้ปฏิกิริยาบางอย่าง เช่น น้ำ หรือโลหะเข้ามาเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ พวก aspartic peptidases และ metallopeptidase ซึ่งมีรายละเอียดของแต่ละชนิด ดังนี้ (Barrett, 2001)

5.1 Serine endopeptidases

กลไกการทำปฏิกิริยาของ serine endopeptidases มีลักษณะสำคัญ 2 ประการ คือ การสร้าง เอสเทอร์ระหว่างออกซิเจนตำแหน่งที่อยู่ติดกับกรดอะมิโน Ser 195 (ระบบการจัดเรียงตัวของ chymotrypsin) ซึ่งเป็น functional group ของเอนไซม์กับส่วนที่เป็นหมู่ acyl ของสับสเตรท รวมตัวกันเป็นสารประกอบตัวกลาง (intermediate) ที่มีรูปทรงแบบ tetrahedral ทำให้สับสเตรทแตกตัว ส่วนแรกเป็นส่วนของสับสเตรทที่มีกรดอะมิโนติดอยู่เป็นผลผลิตที่หลุดออกมา ลักษณะส่วนที่ 2 คือ มีโครงสร้างหลัก (backbone) 2 สายที่มีหมู่ -NH-group เป็นส่วนประกอบ ซึ่งแต่ละหมู่จะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับออกซิเจนหมู่ carbonyl ของพันธะเปปไทด์ที่เข้าทำปฏิกิริยา ทำให้ออกซิเจนมีประจุลบ และภายหลังแยกตัวเป็น acyl enzyme intermediate

5.2 Cysteine endopeptidases

กลไกการทำงานของ cysteine endopeptidases มีความคล้ายคลึงกับ serine endopeptidases คือ มีการสร้าง covalent enzyme complex และมีการสร้าง tetrahedral complex เพื่อตัดพันธะเปปไทด์ของสับสเตรท โดยตัวอย่างเอนไซม์นี้ คือ papain ซึ่งอะตอมที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนหรือใช้อิเล็กตรอนร่วมกัน คือ ซัลเฟอร์ ซึ่งอยู่ใน histidine side chain ซึ่งมี His 25 (ระบบการจัดตำแหน่งของ papain) จากนั้น side chain ของ His 159 จะทำหน้าที่เป็นตัวรับ

ไฮโดรเจน ส่วน -NH-group ของกลูตามีน และ His 25 จะเข้ามาทำปฏิกิริยาด้วยกลายเป็น tetrahedral enzyme complex และกลายเป็น thioacyl-enzyme intermediate

5.3 Aspartic endopeptidases

การตัดพันธะเปปไทด์ของสับสเตรทของเอนไซม์กลุ่มนี้เชื่อว่าจะไม่มีการจับนิวคลีโอไฟล์ โดยหมู่ฟังก์ชันนัลของเอนไซม์ จึงไม่มีการสร้างพันธะโคเวเลนต์ ระหว่างเอนไซม์กับส่วนสับสเตรทเหมือนกับ serine และ cysteine endopeptidases ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้คือ porcine pepsin โดยกลไก คือ side chain ของ aspartic acid จำนวน 2 side chain (กรดอะมิโนลำดับที่ 32 และ 215 ของระบบการจัดเรียง porcine pepsin) เข้ามาจับกับสับสเตรทเพื่อตัดพันธะ เปปไทด์ของสับสเตรท เกิด tetrahedral complex จากนั้นจะแยกออกได้เป็นผลผลิต 2 ชนิด

5.4 Metalloendopeptidases

เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีความคล้ายคลึงกับ aspartic endopeptidases โดยจะไม่มีการสร้าง intermediate ที่เกิดจากการสร้างพันธะโคเวเลนต์ แต่ carboxyl group ของพันธะของสับสเตรทที่เอนไซม์ต้องการจะย่อยในกระบวนการย่อยสับสเตรทของเอนไซม์นี้จะมีโลหะที่ active site เข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งมักจะเป็น Zn^{2+} หรืออาจธาตุ transition อื่นๆ แทนก็ได้

6. จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์โปรติเอส

6.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีรายงานมากที่สุดในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยแต่ละสายพันธุ์จะสร้างเอนไซม์ที่มีสมบัติแตกต่างกัน ซึ่งสายพันธุ์ที่ถูกนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ คือ พวก *Bacillus* ตัวอย่างการศึกษาการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากแบคทีเรียแกรมบวกที่อยู่ในจีนัส *Bacillus* เช่น

Kobayashi *et al.* (1996) พบว่า *Bacillus* sp. KSM-K-16 สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส ในอาหารที่มีการปรับสภาพเป็นด่าง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเมื่อทำ

การแยกเอนไซม์ด้วยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) จะได้เอนไซม์ 3 ชนิด คือ M-protease, N และ H-protease โดยมีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ดังนี้ 12.3, 11 และ 12.5 ตามลำดับ ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ดังนี้ 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Gessesse and Gashe (1997) ศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส จาก *Bacillus* sp. AR-900 ซึ่งแยกได้จากทะเลสาบ Arenguadie (alkaline soda lake) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี nug meal เป็นองค์ประกอบ เชื้อจะเริ่มผลิตเอนไซม์ในช่วงเวลาที่ 20 และผลิตได้สูงสุดในช่วงเวลาที่ 40 ของการเจริญ อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 55 องศาเซลเซียส และ ช่วงค่าพีเอช 9.5 ถึง 11.5 ตามลำดับ ในกรณีที่มี Ca^{2+} อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ จะเพิ่มขึ้นเป็น 65 องศาเซลเซียส

Banerjee *et al.* (1999) พบว่า *B. brevis* ซึ่งแยกได้จากน้ำพุร้อน สามารถผลิต เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส โดยแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่เชื้อสามารถใช้สำหรับผลิต เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสได้สูงสุด คือ น้ำตาลแลคโตส และกากถั่วเหลือง ตามลำดับ สภาวะที่ เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเท่ากับ 10.5 และพบว่า เกลืออะซิเตทของ Ca^{2+} และ Na^{+} ช่วยเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์สูง (thermostability) ให้กับเอนไซม์ และยังช่วยป้องกันการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์มีครึ่งชีวิต (half-life) เพิ่มขึ้น

Gupta *et al.* (1999) ศึกษา *Bacillus* sp. SB5 ที่คัดแยกจากดินถูกนำไปเพาะเลี้ยงใน อาหารที่มีเคซีนเป็นองค์ประกอบ 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่มี สมบัติคงทนต่อสารฟอกขาว และมีค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่ 10 และ 60 ถึง 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียแกรมบวกกลุ่มอื่นที่สามารถสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส ได้ เช่น *Kurthia spiroforme* เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่หายาก รูปเกลียว และสามารถสร้างเอนไซม์ อัลคาไลน์โปรติเอสที่มีความคงตัวของเอนไซม์สูง (Steele *et al.*, 1992)

Oyama *et al.* (1997) ศึกษา *Pimelobacter* sp. Z-483 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน สามารถเจริญได้ในอาหาร casein agar ที่มี EDTA เป็นองค์ประกอบ เมื่อทำ Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่เชื้อสร้างมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 23 kDa และ 27 kDa เมื่อศึกษาด้วยวิธี gel filtration

Nilegaonka *et al.* (2002) ศึกษาแบคทีเรียแกรมบวก *Arthobacter ramosus* ที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสโดยแยกได้จากดินบริเวณทะเลสาบ (alkaline lake) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสังเคราะห์ที่มีเคซีนเป็นองค์ประกอบ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้ออยู่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 9

Bakhtiar *et al.* (2003) พบว่า *Nesterenkonia* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน ชอบเจริญในสิ่งแวดล้อมที่เป็นด่าง โดยแยกได้จากขนนกที่เก็บมาจากบริเวณทะเลสาบ และเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อพีเอช 10 ที่มีขนนกเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน พบว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสได้ และให้ชื่อว่า AL-20 protease

ตัวอย่างการศึกษาการสร้างเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสจากแบคทีเรียแกรมบวกที่อยู่ในจีนัส *Bacillus* เช่น

Feder *et al.* (1971) พบว่า *B. stearothermophilus* สามารถผลิตนิวทรัลโปรติเอส carboxypeptidase-like enzyme และอัลคาไลน์โปรติเอส ที่มีคุณสมบัติในการเกิดไฮโดรไลซิสของ furylacryloylglycyl-L-leucine amide, furylacryloylglycine และ carbobenzoxy-L-glycine-p-nitrophenyl ester ตามลำดับ โดยนิวทรัลโปรติเอส และ carboxypeptidase-like enzyme ถูกแยกออกจากกันโดย gel filtration

B. thermoproteolyticus เป็นแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอส โดยมีชื่อเรียกว่า thermolysin (Titani *et al.*, 1972; Holmes *et al.*, 1982)

Fogarty and Griffin (1973) พบว่า *B. polymyxa* สามารถผลิตเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอส โดยแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสสูงสุด คือ อะราบินอส และ แป้งไฮโดรไลซ์ ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอส คือ เปปโตน

และไอออนของแคลเซียมและแมงกานีสส่งเสริมการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเช่นกัน ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสสูงสุดอยู่ในช่วงระหว่าง 5.9 ถึง 7

Fujio and Kume (1990) พบว่า *B. stearothermophilus* สามารถผลิตนิวทรัลโปรติเอสที่ทนความร้อนสูง โดยค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 6 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และกิจกรรมของเอนไซม์มีความเสถียรเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที และเอนไซม์ถูกยับยั้งด้วย diisopropyl-fluorophosphate, EDTA และ iodoacetic acid

Eijsink *et al.* (1991) พบว่าแบคทีเรียในจินัส *Bacillus* สามารถผลิตเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอส ซึ่งเป็น metalloendopeptidases ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว ขนาดมวลโมเลกุล ประมาณ 33 ถึง 35 kDa ประกอบด้วยไอออนของสังกะสีที่ตั้งอยู่ตำแหน่ง active site และไอออนของแคลเซียมประมาณ 2 ถึง 4 อะตอม

Yang *et al.* (2000) พบว่า *B. subtilis* Y-108 สามารถผลิตนิวทรัลโปรติเอสเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเปลือกกุ้งและปูเป็นส่วนประกอบ มีค่าพีเอชเท่ากับ 6 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 20.2 units/ml และเมื่อนำเอนไซม์บริสุทธิ์มาทำ SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 44 kDa นอกจากนี้เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่ค่าพีเอชเท่ากับ 8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเมื่อมีไอออนของ Mn^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} และ Co^{2+} แต่เอนไซม์ถูกยับยั้งด้วย Hg^{2+} และ EDTA แสดงให้เห็นว่าเป็นเอนไซม์ metal-chelator-sensitive neutral protease

Ghorbel *et al.* (2003) พบว่า *B. cereus* BG-1 สามารถผลิตเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 60 องศาเซลเซียส และมีไอออนของแคลเซียม ส่วนค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 8 และช่วงค่าพีเอชที่เอนไซม์มีความคงทน คือ ช่วงระหว่าง 6 ถึง 9 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 และ 3 ชั่วโมง และกิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งด้วย EDTA นั้นแสดงว่าเอนไซม์ดังกล่าวเป็น metalloendopeptidases

Guangrong *et al.* (2006) พบว่า *Thermophilic bacillus* สายพันธุ์ HS08 ซึ่งทำการคัดแยกจากตัวอย่างดิน สามารถผลิตเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอส และเมื่อทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sepharose anion exchange chromatography และ Sephacryl S-100HR on AKTA purifier 100 protein liquid chromatography พบว่ามวลโมเลกุลของเอนไซม์เท่ากับ 39 kDa และสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ คือ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และค่าพีเอชเท่ากับ 7.5 นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์สามารถคงทนได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และพบว่า Zn^{2+} ส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ ส่วน EDTA และ phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) นั้นยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ และสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ คือ azocasein

Niu *et al.* (2006) พบว่า *B. nematocida* สามารถผลิตเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอส โดยพบว่ามีมวลโมเลกุลของโปรติเอสบริสุทธิ์เท่ากับ 40 kDa และสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ คือ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และค่าพีเอชเท่ากับ 6.5

6.2 เชื้อรา

ตัวอย่างการศึกษาการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อรา เช่น

Chakrabarti *et al.* (2000) ศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาร์ไลน์โปรติเอสจาก *Aspergillus terreus* IJIRA 6.2 โดยเฉพาะเลี้ยงแบบ solid-state fermentation ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ ด้วยการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography และวิเคราะห์หามวลโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์มีค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่ 8.5 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และมีความคงทนต่ออุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในช่วงค่าพีเอชตั้งแต่ 5.5 ถึง 9.5

Dayanandan *et al.* (2003) ศึกษา *A. tamari* ซึ่งคัดแยกจากดินบริเวณโรงฟอกหนัง สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นสับสเตรท และเมื่อนำมาเพาะเลี้ยงแบบ solid-state fermentation พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 8 ถึง 9 และเมื่อนำเอนไซม์มาย่อยขนแพะ พบว่าคุณภาพหนังที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสดีกว่าการใช้วิธี lime sulphide และน้ำทิ้งจากกระบวนการฟอกหนังด้วยเอนไซม์ดังกล่าวมีค่า Biochemical Oxygen

Demand (BOD), Chemical Oxygen Demand (COD), Total Dissolved Solids (TDS) และค่า Total Suspended Solids (TSS) ต่ำกว่าที่วิเคราะห์ได้จากน้ำทิ้งจากการฟอกหนังด้วย lime sulphide

Tunga *et al.* (2003) พบว่า *A. parasiticus* เป็นเชื้อราที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส เมื่อทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีตกตะกอนด้วยอะซิโตน, ion exchange chromatography และ gel filtration ตามลำดับ เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 200 เท่า และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 23 kDa เมื่อศึกษาด้วยวิธี SDS-PAGE สภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 8 และถูกยับยั้งการทำงานโดย PMSF

ตัวอย่างการศึกษาการสร้างเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสจากเชื้อรา เช่น

Ogawa *et al.* (1995) ศึกษาการเพาะเลี้ยง *A. oryzae* IAM 2704 โดยเพาะเลี้ยงบน Membrane-Surface Liquid Culture (MSLC) พบว่าปริมาณเอนไซม์โปรติเอสที่เชื้อผลิตขึ้นสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงโดยการเขย่าในฟลาสก์ ในอาหารเหลว และอาหารแข็ง และพบว่า ปริมาณโปรติเอสถูกผลิตขึ้นสูงสุด (1,550 units/ml) เมื่อใช้กลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ และเคซีน 0.4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเพาะเลี้ยงแบบ batch culture และเมื่อเพาะเลี้ยงแบบ repeat batch culture พบว่า ปริมาณโปรติเอสที่ถูกสร้างขึ้น เท่ากับ 30,000 units/ml

ตัวอย่างการศึกษาการสร้างเอนไซม์แอซิดโปรติเอสจากเชื้อรา เช่น

Hashimoto *et al.* (1973) ศึกษาการผลิตแอซิดโปรติเอสจาก *Penicillium duponti* สายพันธุ์ K1014 จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ คือ 50 องศาเซลเซียส

Wang *et al.* (1974) ศึกษาการผลิตแอซิดโปรติเอสจาก *Rhizopus oligosporus*, *Mucor disperses* และ *Actinomucor elegans* พบว่าผลผลิตของเอนไซม์จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูงกว่าในอาหารเหลว พบว่ารำข้าวสาลี เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์มากที่สุด โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการการผลิตเอนไซม์จาก *R. oligosporus* คือ เปอร์เซ็นต์ความชื้นเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ถึง 4 วัน ส่วนสภาวะที่เหมาะสมต่อการการผลิตเอนไซม์จาก *M. disperses* คือ เปอร์เซ็นต์ความชื้นเท่ากับ 50 ถึง 63 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 3 ถึง 4 วัน และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์จาก *A. elegans* คือ เปอร์เซ็นต์ความชื้นเท่ากับ 50 ถึง 63 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

Wu and Hang (2000) ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Neosartorya scheri* var. *spinosa* IBT 4872 ซึ่งใช้รำข้าวสาลีเป็นวัตถุดิบ โดยศึกษาหาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ได้แก่ ปริมาณน้ำเริ่มต้น อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง และความเข้มข้นของฟอสเฟต พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส คือ ปริมาณน้ำเริ่มต้นเท่ากับ 53 มิลลิลิตรต่อกรัมของสับสเตรท อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของฟอสเฟตเท่ากับ 0.86 โมลต่อลิตร ซึ่งปริมาณเอนไซม์ที่ผลิตได้ในสภาวะดังกล่าวเท่ากับ 1.59 units/ml (8.83 หน่วยต่อกรัมของรำข้าวสาลี)

6.3 แอคติโนมัยซีท

Alkalophilic actinomycetes ที่สามารถสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม *Streptomyces* เช่น *Streptomyces moderatus* NRRL 3150 (Chandrasekaran and Dhar, 1983) *Streptomyces* sp. YSA-130 (Yum *et al.*, 1994) และ *S. diastaticus* SS1 (Chaphalkar and Dey, 1994) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อ *Nocardiopsis dassonvillei* (Kim *et al.*, 1996) และ *Oerskovia xanthineolytica* TK-1 (Tamai *et al.*, 1994) ด้วยเช่นกัน

Tsuchiya *et al.* (1992) พบว่า alkalophilic *Thermoactinomyces* sp. HS682 เป็นเชื้อที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 25 kDa อุณหภูมิ และพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ คือ 70 องศาเซลเซียส และ 11.5 ตามลำดับ

Ambrose *et al.* (1998) ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Dermatophilus congolensis* ซึ่งเป็น filamentous branching actinomycete ที่ก่อโรคในสัตว์ และเป็นเชื้อที่สร้างเอนไซม์ alkaline serine protease ซึ่งมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมอยู่ในช่วง 7 ถึง 10

6.4 ยีสต์

ยีสต์ที่สามารถสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสได้ เช่น *Candida lipolytica* (Tob *et al.*, 1976) และ *Aureobasidium pullulans* (Donaghy and McKay, 1993) เป็นต้น

Chi *et al.* (2006) ศึกษาการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสจาก *A. pullulans* พบว่าเอนไซม์ถูกผลิตสูงสุดเท่ากับ 623.1 units/mg. protein ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย soluble starch 2.5 กรัม NaNO₃ 2.0 กรัม และน้ำทะเล 100 มิลลิลิตร พีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6 ที่อุณหภูมิ 24.5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 ชั่วโมง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือ 45 องศาเซลเซียส และพีเอช 9

7. การผลิตเอนไซม์โปรติเอส (production of protease)

เอนไซม์จัดเป็นสารเมแทบอลิต์ที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด การผลิตเอนไซม์โดยจุลินทรีย์มีความเกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์อย่างมาก ดังนั้นการพัฒนาการผลิตเอนไซม์ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น จึงจำเป็นต้องทำการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในสถานะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ ซึ่งปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและการผลิตเอนไซม์มีหลากหลายปัจจัย โดยแต่ละปัจจัยมีความสำคัญมากน้อยแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสถานะการเพาะเลี้ยงหรือรูปแบบการเพาะเลี้ยงจะต้องเหมาะสมกับจุลินทรีย์แต่ละชนิด โดยมีรายละเอียดแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ดังนี้

7.1 สายพันธุ์ของจุลินทรีย์และการปรับปรุงสายพันธุ์ (strains and improvement of strains)

ชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์เป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แตกต่างกัน สายพันธุ์ที่ได้รับคัดเลือกจากธรรมชาติ สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งอาจไม่เพียงพอหรือคุ้มค่าที่จะนำมาผลิตในระดับอุตสาหกรรม จึงมีการนำวิธีการปรับปรุงสายพันธุ์เข้ามาช่วยในการผลิตเอนไซม์ให้ดีขึ้น หรือเพิ่มความสามารถในการใช้สับสเตรทที่มีราคาถูกลงแทนที่จะใช้กลูโคสเพียงอย่างเดียว เช่น แป้งหรือน้ำเชื่อมข้าวโพด (corn syrup) (Parekh *et al.*, 2000)

7.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ (culture medium)

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อการสร้างเอนไซม์โปรติเอสจะคล้ายกับสูตรอาหารหรือสภาวะในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทั่วไป ซึ่งประกอบด้วย แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน น้ำแร่ธาตุ วิตามิน และออกซิเจน บางครั้งอาจต้องการสารเหนี่ยวนำในการกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์ ในกรณีที่เป็น inducible enzyme

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับใช้ในการผลิตเอนไซม์ในระดับอุตสาหกรรม การเลือกใช้นิเวศของอาหารให้เหมาะสมมีหลักเกณฑ์ คือ สามารถสร้างผลผลิตหรือมวลชีวภาพ (biomass) ต่อมวลสับสเตรทที่ใช้มากที่สุด ให้ความเข้มข้นผลผลิตหรือมวลชีวภาพสูงสุด สามารถให้อัตราการสร้างผลผลิตสูงสุด วัตถุดิบมีคุณภาพดี สามารถหาได้ตลอดปี มีปัญหาน้อยที่สุดในระหว่างการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ การนึ่งฆ่าเชื้อ กระบวนการเลี้ยง โดยเฉพาะการให้อากาศและการกวน การสกัด การทำให้บริสุทธิ์ และปัญหาของเสียที่จะเกิดขึ้น (Stanbury *et al.*, 1999)

7.2.1 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนเป็นสารที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์องค์ประกอบและพลังงานของเซลล์ จุลินทรีย์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงทั่วไป ส่วนมากจะใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตส มอลโตส และเซลลูโลส เป็นต้น ส่วนแหล่งคาร์บอนที่ใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอส มีรายงานการศึกษา ดังนี้

Ferrero *et al.* (1996) พบว่าเคซีน จัดเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ทนต่ออุณหภูมิสูง จากเชื้อ *B. licheniformis* MIR 29 (กิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 76 units/ml) ผลรองลงมา คือ แป้ง อินนูลิน แลคโตส เมลิไบโอส ราฟฟิโนส และกาแลคโตส ในขณะที่ กลูโคส โซโลส กลีเซอรอล และมอลโตส นั้นยับยั้งการผลิตเอนไซม์

Banerjee *et al.* (1999) ศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *B. brevis* ในอาหาร complete medium พบว่าแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์ (กิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 3,455 units/ml) ผลรองลงมา คือ ซูโครส กลูโคส แป้ง และมอลโตส และต่ำที่สุด คือ กาแลคโตส (กิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 650 units/ml)

Mabrouk *et al.* (1999) พบว่าแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. licheniformis* คือ แลคโตส กลูโคส สารสกัดจากถั่วเหลืองและ ammonium phosphate เท่ากับ 4, 1.5, 6, 1.2 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 10 และเชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้สูงขึ้นเป็น 29,554 units/ml เมื่อเพิ่มอัตราการหมุนของใบพัดจาก 250 เป็น 400 rpm

Johnversly and Naik (2001) ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอส จากเชื้อ *Bacillus* sp. JB-99 ในอาหาร synthetic medium พบว่า กรดซิตริก และแป้ง ให้กิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงสุด รองลงมา คือ ราฟฟิโนส อะราบิโนส และฟรุกโตส

Kanekar *et al.* (2002) ศึกษาถึงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *A. ramosus* และ *B. alcalophilus* ที่คัดแยกมาจากดินบริเวณทะเลสาบ Lonar พบว่า เมื่อใช้ soyacake เป็นแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน สามารถส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสได้ดีที่สุด และความเข้มข้นของสับسترที่ 1 เปอร์เซ็นต์เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์

Shikha *et al.* (2007) ศึกษาสับسترที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. pantotheneticus* พบว่า เมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และรำข้าวสาลีเป็นแหล่งไนโตรเจน และสภาวะการเพาะเลี้ยง คือ อุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และค่าพีเอชเท่ากับ 10 พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะดังกล่าวเท่ากับ 285 units/ml

จากรายงานผลการศึกษาข้างต้นจะเห็นได้ว่าชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส

7.2.2 แหล่งไนโตรเจน

เซลล์จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณ 8 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง โดยความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความแตกต่างกันไป บางชนิดจะให้อยู่ในรูปของสารอินทรีย์ (organic nitrogen) หรือบางชนิดจะให้อยู่ในรูปสารอนินทรีย์ (inorganic nitrogen) จุลินทรีย์จะนำไนโตรเจนไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม เพื่อใช้ในการ

สังเคราะห์กรดอะมิโน โปรตีน และส่วนประกอบของผนังเซลล์ (สมใจ, 2537) ในส่วนเอนไซม์โปรติเอส ประกอบด้วยไนโตรเจน 15 เปอร์เซ็นต์ (Kumar and Takagi, 1999) โดยมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการใช้แหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ดังนี้

Ferrero *et al.* (1996) พบว่าโซเดียมไนเตรท (sodium nitrate) เป็นสารอินทรีย์ไนโตรเจน ที่ทำให้เกิดการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด จากเชื้อ *B. licheniformis* MIR 29 ผลรองลงมาคือ แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) และเปปโตน เป็นสารอินทรีย์ไนโตรเจนที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ต่ำที่สุด

Banerjee *et al.* (1999) พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่ส่งผลต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. brevis* มากที่สุด คือ soybean meal ผลรองลงมา คือ biopeptone, meat extract, tryptone, malt extract, yeast extract ส่วน yeast autolysate ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์น้อยที่สุด

Johnversly and Naik (2001) ศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส จาก *Bacillus* sp. JB-99 ในอาหาร synthetic medium ที่มีกรดซิตริก และแอมโมเนียมไนเตรท เป็นแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน ตามลำดับ โดยทำการเพาะเลี้ยงในฟลาस्क ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ 180 rpm ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชที่เหมาะสมกับการเจริญและการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 9

Joo *et al.* (2001) ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. horikoshii* พบว่าเมื่อเติมถั่วเหลืองบด (soybean meal) 1.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร และเคซีน 1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ในสภาวะการเพาะเลี้ยง ค่าพีเอชเท่ากับ 9 อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16 ถึง 18 ชั่วโมง ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด

นอกจากนี้ยังพบว่า แอมโมเนียมคลอไรด์ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสสูงสุดอีกด้วย (Mehrotra *et al.*, 1999)

7.2.3 ไอออนของโลหะ และเกลือ (metal ion and salt)

ไอออนของโลหะ และเกลือ มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเจริญ และเมแทบอลิซึม ต่อจุลินทรีย์ (Hughes and Poole, 1989, 1991) แร่ธาตุสำคัญที่นำมาเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ซัลเฟอร์ แคลเซียม และคลอรีน เป็นต้น ส่วนแร่ธาตุชนิดอื่นๆ เช่น โคบอล ทองแดง เหล็ก แมงกานีส โมลิบดีนัม และสังกะสี ก็มีความสำคัญเช่นกัน แต่มักเป็นองค์ประกอบของส่วนประกอบหลัก สารอนินทรีย์ฟอสเฟตที่ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมักใส่ในปริมาณที่สูงกว่าแร่ธาตุอื่นๆ โดยสารฟอสเฟตทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ในกรณีที่เพาะเลี้ยงในพลาสติก มีรายงานเกี่ยวกับความสำคัญของแร่ธาตุต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ดังนี้

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) ที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร สามารถกระตุ้นการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสได้ดีที่สุดใน *B. firmus* (Moon and Parulekar, 1991) หรือการศึกษาจากการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *R. oryzae* ROITRB-13 (NRRL-21498) แบบ solid-state fermentation พบว่า ส่วนประกอบของเกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ และการผลิตเอนไซม์ คือ ชุดของสารละลายเกลือที่มีไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 12.8 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 3 กรัมต่อลิตร โซเดียมคลอไรด์ ($NaCl$) 0.5 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) 0.5 กรัมต่อลิตร และแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 0.01 กรัมต่อลิตร ไอออนของโลหะโดยเฉพาะไอออนบวกที่มีจำนวนประจุเป็น +2 เช่น แคลเซียมไอออน แมกนีเซียมไอออน และแมงกานีสไอออน สามารถส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ และทนความร้อนได้ดีขึ้น ซึ่งคาดว่าเกิดจากไอออนเหล่านี้ไปเพิ่มความเสถียร โครงสร้างของเอนไซม์ (Kumar and Takagi, 1999)

7.3 สารเหนียวน้ำ

เอนไซม์ส่วนใหญ่ที่ถูกผลิตในระดับอุตสาหกรรมมักจัดเป็น inducible enzyme โดยเอนไซม์ประเภทนี้จะถูกสังเคราะห์ได้ก็ต่อเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีสารเหนียวน้ำ โดยสารเหนียวน้ำมักเป็นสารพวกแป้งหรือ dextrins สำหรับการผลิต อะไมเลส และ มอลโตส สำหรับการผลิต pullulanase หรือ pectin สำหรับการผลิต pectinases สารเหนียวน้ำบางชนิดยังมีคุณสมบัติเป็นสารเหนียวน้ำที่ดีมาก เช่น isovaleronitrile เป็นสารเหนียวน้ำสำหรับการผลิต nitrilase (Kobayashi et al., 1992) สารที่มีโครงสร้างคล้ายสับสเตรท (substrate analogues) ไม่สามารถเกาะกับเอนไซม์

ได้แต่อาจทำหน้าที่เป็นสารเหนียวนาได้ สารเหนียวนาส่วนใหญ่ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์โดยจุลินทรีย์มักเป็น สับสเตรท หรือเป็นสารที่มีโครงสร้างคล้ายสับสเตรท แต่บางครั้งสารประกอบตัวกลาง และผลิตภัณฑ์ ก็ถูกใช้เป็นสารเหนียวนาเช่นกัน

มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับสารเหนียวนาต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ดังนี้ แคลเซียมคลอไรด์ ประกอบด้วยแคลเซียมเป็นตัวเหนียวนาส่งเสริมกิจกรรมได้ดีที่สุด (Kobayashi *et al.*, 1995; Sousa *et al.*, 2007) ส่วนการเติม Sodium Lauryl Sulphate (SLS) ปริมาณ 0.15 เปอร์เซ็นต์สามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* 21415 หรือการเติมน้ำมันข้าวโพด 1 เปอร์เซ็นต์สามารถส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสได้เป็นอย่างดี (Mabrouk *et al.*, 1999)

7.4 สารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ (inhibitor)

สารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ประเภทแรกเป็นพวกที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ active site มีมวลโมเลกุลต่ำ ไม่สามารถผันกลับ (irreversible) มาเป็นโครงสร้างเดิมได้หลังทำปฏิกิริยาที่บริเวณ amino acid residue ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้คือ serine protease inhibitors ได้แก่ DFP และ PMSF โดยจะเข้าทำปฏิกิริยาที่บริเวณกรดอะมิโน serine ที่บริเวณ active site หรือพวก aspartic protease inhibitors ซึ่งได้แก่ diazoacetyl compound และ acetyl heptapeptide pepstatin ส่วน metalloprotease inhibitors จะเป็นพวก methyl chelating agent สารยับยั้งประเภทที่สองจะเป็นสารโปรตีนที่ได้จากธรรมชาติ (natural protein protease inhibitors) โดยสามารถแยกได้จากพืช และสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ทำหน้าที่คล้ายสับสเตรทของเอนไซม์เรียกว่า predosubstrate ทำให้เกิดภาวะแข่งขัน โดยแย่งเอนไซม์จับกับสับสเตรท (Neuath, 1989)

7.5 อุณหภูมิและพีเอช

สภาวะแวดล้อมภายนอก เช่น ค่าพีเอช มีผลต่อปฏิกิริยาเมแทบอลิซึมของเซลล์จุลินทรีย์ เนื่องจากเมแทบอลิซึมภายในเซลล์สามารถเกิดปฏิกิริยาได้โดยอาศัยเอนไซม์ ซึ่งค่าพีเอชมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้เอนไซม์โปรติเอสส่วนใหญ่ถูกผลิตเมื่อค่าพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วงระหว่าง 3 ถึง 4 (Ray *et al.*, 1992) หรือนิวทรัลโปรติเอส ถูกผลิตเมื่อค่าพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วงระหว่าง 6.8 ถึง 7 (Moormann *et al.*, 1993) และอัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. NG

312 มีความเสถียรเมื่อค่าพีเอชอยู่ในช่วงระหว่าง 7 ถึง 11 และมีความเสถียรสูงสุดเมื่อค่าพีเอชอยู่ในช่วงระหว่าง 9 ถึง 10 (Jasvir *et al.*, 1999)

อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์เช่นกัน กลไกในการควบคุมการผลิตเอนไซม์โดยอุณหภูมิยังไม่แน่ชัด แต่จากรายงานของ Frankena *et al.* (1986) พบว่าความสัมพันธ์กันระหว่างการสังเคราะห์เอนไซม์และเมแทบอลิซึมของพลังงาน ซึ่งควบคุมโดยอุณหภูมิและปริมาณออกซิเจนอีกชั้นหนึ่ง โดยข้อมูลอุณหภูมิที่เหมาะสมของจุลินทรีย์บางชนิดในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส แสดงดังในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของจุลินทรีย์บางชนิด

Optimum temperature (°C)	Organisms
28	<i>Penicillium griseoflvn</i>
30	<i>Bacillus</i> sp. B21-2
32	<i>A. flavus</i>
35	<i>Bacillus</i> sp. Y
36	<i>Bacillus</i> sp. B21-2
37	<i>B. alcalophilus</i> subsp. halograns KP 1239
39.5	<i>B. licheniformis</i>
40	<i>Bacillus</i> sp. strain B18
45	<i>B. theomorber</i>
52	<i>Thermoactinomyces</i> sp. HS682
55	<i>B. stearotherophilus</i> AP-4
60	<i>B. stearotherophilus</i> F1

ที่มา: Frankena *et al.* (1986)

7.6 การให้อากาศและการกวน

กระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังหมักส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ประเภทที่ต้องการอากาศหรือออกซิเจนในการเจริญ คือ strictly aerobe หรือ facultative anaerobe จึงต้องมีการให้อากาศในระหว่างการเพาะเลี้ยง เพื่อใช้ในการออกซิไดส์กลูโคสหรือแหล่งคาร์บอนอื่นๆ โดยมีรายงานเกี่ยวกับปัจจัยดังกล่าวต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ดังนี้

จากการศึกษาส่วนประกอบของอาหารสำหรับการเจริญ และการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. I-312 พบว่า ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมประกอบด้วยถั่วเหลืองบดหยาบ 15 กรัมต่อลิตร แป้งสาลี 10 กรัมต่อลิตร ฟรุกโตส 5 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 4 กรัมต่อลิตร Na_2HPO_4 1 กรัมต่อลิตร $CaCl_2$ 0.05 กรัมต่อลิตร โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 8 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะการเลี้ยงอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง และมีอัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm (Joo and Chang, 2005) ส่วนการศึกษาอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนในถังหมักที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. licheniformis* NCIM-2042 พบว่าการผลิตเอนไซม์เกิดขึ้นสูงสุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง (72 ชั่วโมง) พบว่าอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมเท่ากับ 3 vvm และอัตราการกวนที่เหมาะสมเท่ากับ 200 rpm (Potumarthi *et al.*, 2007)

8. ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากจุลินทรีย์

ในการสังเคราะห์เอนไซม์โปรติเอสจากจุลินทรีย์ พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ โดยทั่วไปลักษณะการสังเคราะห์เอนไซม์โปรติเอสมี 2 แบบ คือ แบบถูกเหนี่ยวนำแบบ inducible enzyme และแบบ constitutive enzyme ซึ่งถูกควบคุมด้วยกลไกที่ซับซ้อนหลายขั้นตอน (Strach and Hoch, 1993)

Moon and Parulekar (1991) ศึกษาการเพาะเลี้ยง *B. firmus* NRS 785 (NRRL B1107) ในอาหาร semidefied medium โดยเพาะเลี้ยงในถังหมักที่มีปริมาตรอาหาร 1 ลิตร แบบ batch culture พบว่า เซลล์เริ่มต้นมีการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสระหว่างระยะเจริญ (growth phase) และอัตราในการสร้างจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อเจริญเข้าใกล้ระยะปลายสุดของ growth phase โดยกิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์อยู่ในระยะ post growth phase ส่วนระดับการเกิด catabolite repression เกิดจาก

แหล่งคาร์บอนบางชนิด เช่น กลูโคส เป็นต้น ในขณะที่กรดอะมิโนอาจมีคุณสมบัติเป็นสารเหนียวหรือสารยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีนได้

Calik *et al.* (2000a) ศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรตีนจากเชื้อ *B. licheniformis* DSM 69 โดยใช้ mass-flux-balance-based stoichiometric model ซึ่งเป็นแบบจำลอง (model) ที่อาศัย metabolic reaction network ภายในเซลล์ โดยทดลองใช้กรดซิตริกเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็นสารที่เข้าสู่ Tricarboxylic Acid Cycle (TCA cycle) ได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการ glycolysis pathway แต่ใช้กระบวนการ gluconeogenesis pathway, pentose phosphate pathway และ anaplerotic reaction แทน ผลการทดลองพบว่าการสังเคราะห์เอนไซม์จะเริ่มสร้างเมื่อค่า specific growth rate (μ) ต่ำลง และจะสูงสุดเมื่อค่าเท่ากับ 0 h^{-1} มีค่า specific production rate (q_p) เท่ากับ $0.0260 \text{ mmol/g D.W.h}$ สามารถอธิบายได้ว่าเมื่อค่า μ สูง เซลล์จะใช้แหล่งพลังงาน (Adenosine Triphosphate; ATP) แหล่งคาร์บอน นิวคลีโอไทด์ fatty acid และ cofactor ในการสร้างส่วนประกอบของเซลล์ในอัตราสูง ส่งผลให้การสร้างเอนไซม์ลดลง ในขณะที่เมื่อค่า μ ต่ำจะให้ผลในทางตรงข้าม

Feng *et al.* (2001) ศึกษาการสร้างอัลคาไลน์โปรตีนในแบคทีเรีย *B. pumilus* ที่ได้รับการโคลนยีนที่สามารถสร้างเอนไซม์ α -amylase เข้าสู่เซลล์ ทำให้สามารถใช้เป็นสับสเตรทได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหาร complete medium ค่าพีเอชเท่ากับ 7 พบว่าในระยะแรกของการเจริญซึ่งเป็นระยะ early exponential phase พบปริมาณเอนไซม์น้อยมาก และจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในกลางระยะ exponential phase โดยจะสังเคราะห์เอนไซม์หลังจากที่มีการเจริญไปแล้วระยะหนึ่งและมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ระยะ stationary phase

Singh *et al.* (2001) ศึกษาการเจริญ การผลิต และการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนจากเชื้อ *Bacillus sp.* SSR1 จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร complete medium ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย lactose, beef extract, yeast extract และ biopeptone เป็นส่วนประกอบ ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 10 การเขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm พบว่า การผลิตเอนไซม์เริ่มต้นไปพร้อมๆ กับการเจริญและมีกิจกรรมสูงสุดเมื่อเซลล์เจริญอยู่ในระยะ stationary phase ซึ่งอาจกล่าวว่าการสร้างเอนไซม์ลักษณะนี้เป็นแบบ growth associate pattern

Singh *et al.* (2004) ศึกษาการเจริญ และการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนจาก *B. sphaericus* ในอาหาร complete medium ปริมาตร 5 ลิตร ในถังหมัก โดยควบคุมการให้อากาศอยู่

ที่ 5 L/min (1 vvm) กวนด้วยอัตราคงที่ 300 rpm พบว่าเชื้อเริ่มสังเคราะห์เอนไซม์ในระยะ exponential phase หลังจากเชื้อมีการเจริญไปแล้ว 2 ถึง 3 ชั่วโมง ซึ่งอธิบายได้ว่าต้องมีความเข้มข้นของเซลล์ในระดับหนึ่ง (critical cell mass) ถึงเริ่มมีการสังเคราะห์เอนไซม์ อัตราการสร้างเอนไซม์สูงสุดที่ระยะ deceleration phase (ชั่วโมงที่ 9) ซึ่งเป็นระยะที่ค่า μ ต่ำสุด พบว่ากลูโคสมีความจำเป็นต่อการสร้างเอนไซม์ในระยะ post growth phase เมื่อปริมาณกลูโคสหมด อัตราการสร้างเอนไซม์เท่ากับศูนย์ เมื่อนำค่าทางจลนพลศาสตร์มาสร้างสมการ โดยใช้รูปแบบจำลองของ Kono และ Asia สรุปได้ว่าการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากแบคทีเรียชนิดนี้เป็นทั้งแบบ growth และ non-growth associate

9. ประโยชน์ของเอนไซม์โปรติเอส

โปรติเอสเป็นไฮโดรไลติกเอนไซม์สำคัญที่ได้มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย เช่น ในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ นม และผลิตภัณฑ์จากนม เครื่องนุ่งห่ม อาหาร และ พงชัฟลอก เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาโรคด้วย (Rao *et al.*, 1998)

9.1 การใช้เอนไซม์โปรติเอสเป็นส่วนประกอบของสารชักฟอก

ในอุตสาหกรรมผงชัฟลอกได้มีการนำเอนไซม์โปรติเอสมาใช้เป็นส่วนประกอบของผงชัฟลอกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการซักคราบสกปรก โดยเอนไซม์โปรติเอสจะย่อยสารจำพวกโปรตีน เช่น เลือด นม ไข่ และคราบโปรตีนจากผิวหนัง ที่ติดอยู่ตามเนื้อผ้าให้เป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็ก และละลายน้ำได้ดี เพื่อทำให้คราบต่างๆ ที่เกาะอยู่บนเนื้อผ้าหลุดออกได้ง่ายขึ้น ซึ่งเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรมผงชัฟลอกเป็นโปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp.

9.2 การใช้เอนไซม์โปรติเอสในอุตสาหกรรมอาหาร

ในอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง มีการนำเอนไซม์ chymosin หรือ rennin มาใช้ในกระบวนการผลิต เนื่องจาก chymosin หรือ rennin เป็นโปรติเอสที่มีความจำเพาะต่อการย่อยพันธะเปปไทด์ (Phe105-Met106 bond) ของโปรตีนเคซีนในนม โดยจะย่อยเคซีนได้เป็น para-k - casein และ macroglycopeptide ส่วนหางนม (whey) ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตเนยแข็ง ประกอบด้วยโปรตีนที่ไม่ละลาย จะมีการใช้ทรีปซิน เพื่อให้กลับมามีรสได้

ส่วนอุตสาหกรรมการทำขนมปังนั้นมีการเติมเอนไซม์โปรติเอสลงไปในแป้งในขณะนวด เพื่อให้แป้งนวดง่าย และมีการจับตัวเป็นก้อน เนื่องจากในแป้งสาลีมีโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ เรียกว่า gluten เป็นตัวกำหนดคุณสมบัติของแป้งในเวลานวด ซึ่งโปรติเอสที่ใช้เป็น exoprotease และ endoprotease ที่ได้จาก *A. oryzae*

การผลิตชีวส์จะมีการเติมเอนไซม์โปรติเอสลงไปในกระบวนการหมัก เพื่อย่นระยะเวลาในการหมัก นอกจากนั้นในกระบวนการผลิตเป็นซูปก้อนหรือผงซูปเข้มข้น ได้มีการนำโปรติเอสมาใช้ในการย่อยเนื้อสัตว์ เพื่อให้ได้กลิ่นและรสชาติดีขึ้น (Kumar and Takagi, 1999)

9.3 การใช้เอนไซม์โปรติเอสในทางการแพทย์

ทางการแพทย์มีการนำโปรติเอสมาใช้ในการรักษาโรคหลายชนิด เช่น ในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของตับอ่อน เนื่องจากผู้ป่วยนั้นไม่สามารถหลั่งน้ำย่อยลงสู่ลำไส้เล็กได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงมีการใช้เป็นยาเม็ดซึ่งเป็นส่วนผสมของโปรติเอส ไลเปส และอะไมเลส ที่เรียกว่า pancreatin เพื่อช่วยในการย่อยอาหาร

ในผู้ป่วยลิ่มเลือดอุดตัน มีการใช้โปรติเอสในการรักษา โดยการฉีดโปรติเอสเข้าไปในหลอดเลือดเพื่อทำหน้าที่ละลายลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือด ซึ่งขัดขวางการไหลเวียนของเลือด และเป็นสาเหตุของโรคหัวใจ โดยโปรติเอสที่ใช้ในการรักษานี้เรียกว่า urokinase ซึ่งแยกได้จากปัสสาวะของคน หรือ streptokinase ได้จาก *Streptococcus haemolyticus* นอกจากนั้นยังมีโปรติเอสที่นำมาใช้ในทางการแพทย์อีก เช่น bromelain ใช้รักษาการอักเสบของเนื้อเยื่อ chymopapain ใช้รักษาโรคไขสันหลังอักเสบ collagenase ใช้รักษาโรคไขสันหลังอักเสบ และ chymotrypsin ใช้ในการผ่าตัดเลนส์ตา เป็นต้น

9.4 การใช้โปรติเอสในอุตสาหกรรมฟอกหนัง

มีการนำโปรติเอสมาใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง เพื่อกำจัดขนสัตว์ออกจากหนังสัตว์ ซึ่งนอกจากจะประหยัดแล้วยังได้หนังสัตว์ที่นุ่ม และมีคุณภาพดีกว่าเมื่อเทียบกับการฟอกด้วยวิธีการแช่ใน sodium sulphate

10. เส้นไหม

เส้นไหมเป็นเส้นใยโพลีอะไมด์ที่หนอนไหมสร้างใยขึ้นมา ซึ่งเป็นกรดอะมิโนประเภทแอลฟา โดยเป็นพอลิเมอร์ที่มีโซ่ยาวด้วยการควบแน่น ($R_1, R_2, R_3, \dots$ เป็น side chain) ดังแสดงในภาพที่ 1

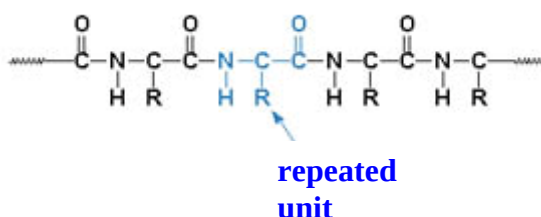
การสังเคราะห์โปรตีนในเส้นไหม ทำในเซลล์ของต่อมไหมที่อยู่ในตัวของหนอนไหม สารไหมเหลว (liquid silk) จะถูกขับออกทางต่อมไหมส่วนท้าย และหลังจากนั้นส่งไปยังต่อมไหมส่วนกลาง (middle silk gland) ระหว่างที่อยู่ในต่อมไหมส่วนกลาง สารไหมเหลวจะกลายเป็นเจลาติน (gelatin) ส่วนเซรีซินถูกขับออกมาจากส่วนอื่นของต่อมไหมส่วนกลาง เพื่อเคลือบเจลาติน หลังจากนั้นเจลาตินของไฟโบรอินจะมีความเหนียวขึ้น โดยอาศัยการส่ายหัวของหนอนไหม หลังจากที่ใช้ไฟโบรอิน 2 เส้นจะประกอบเป็นเส้นไหมโดยเคลือบด้วยกาวเซรีซิน

10.1 โครงสร้างทางรูปร่างของเส้นไหม

10.1.1 ภาควัดขวางของเส้นไหม

เส้นใยของไหมประกอบด้วยไฟโบรอินจำนวน 2 เส้น ล้อมรอบด้วยกาวเซรีซิน เมื่อขยายโครงสร้างภายในเส้นใยไฟโบรอิน จะพบโครงสร้างของกลุ่มเส้นใยไฟบริล โดยเส้นใยไฟโบรอิน 1 เส้น จะมีจำนวนของเส้นใยไฟบริลจำนวน 50 ถึง 150 เส้น ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.3 ถึง 3 ไมครอน เมื่อสังเกตจากกล้องจุลทรรศน์แบบออปติคัล เปรียบเทียบกับการสังเกตจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน มีจำนวนของเส้นใยไฟบริลจำนวน 900 ถึง 1,400 เส้น โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 ถึง 0.4 ไมครอน โดยทั่วไป เส้นใยไหมมีพื้นที่หน้าตัดเป็นมุมจนถึงวงกลมที่ไม่สม่ำเสมอ พื้นที่หน้าตัดของเส้นใยไฟบริล 1 เส้น ที่ชั้นนอกสุดของเส้นใย ประมาณ 80 ตารางไมครอน ที่ชั้นกลางของเส้นใยมีขนาดพื้นที่หน้าตัด ประมาณ 100 ตารางไมครอน และชั้นในของเส้นใยประมาณ 60 ตารางไมครอน

ถึงแม้ว่าภาควัดขวางของเส้นไหมมีความหนาไม่สม่ำเสมอ แต่เส้นใยก็สามารถเกาะเกี่ยวกันได้ง่าย เนื่องจากเส้นใยมีลักษณะบางมาก และจากสภาพของความหนาที่ไม่สม่ำเสมอนี้เอง ช่วยให้เส้นไหมมีความเงางาม



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างทางเคมีของเส้นไหม

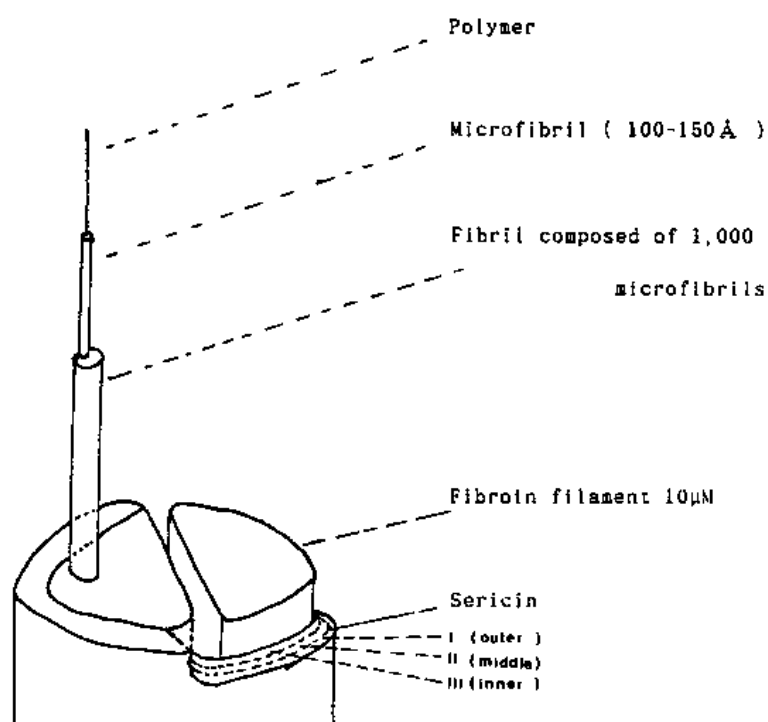
ที่มา: Anonymous (2008a)

10.1.2 ลักษณะผิวของเส้นไหม

โดยทั่วไปแล้ว ผิวของเส้นไหมชั้นนอกจะพบกาวเซรีซินมาก และเซรีซินมีโครงสร้างเป็นคลื่นมากมายไปตามแนวยาว ปกคลุมเส้นใยไฟโบรอิน แต่เซรีซินที่ชั้นกลางและชั้นในจะมีโครงสร้างการเคลือบที่ไม่สม่ำเสมอว่าโครงสร้างของผิวไฟโบรอินของเส้นไหมที่ลอกกาวเซรีซินออกไปแล้ว กลุ่มเส้นใยไฟบริลจะพันเป็นเกลียวเข้าด้วยกัน และเรียงตัวเป็นโครงสร้างตาข่าย และสามารถพบเป็นโครงสร้างเหมือนท่อพุ่งไปตามแนวความยาว โดยมีช่องว่าง 0.2 ถึง 0.3 ไมครอน

10.1.3 โครงสร้างภายในของเส้นไหม

เมื่อนำภาคตัดขวางของใยไฟบริลมาลอกกาวเพื่อจัดเอาเซรีซินออกให้หมดด้วยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) 10 เปอร์เซ็นต์ หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 N เป็นเวลา 3 ถึง 10 ชั่วโมง ก่อนลอกกาวด้วยเคมี เส้นใยไฟบริลมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 ถึง 0.4 ไมครอน หลังจากที่ลอกกาวแล้ว เส้นใยไฟบริลมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.04 ถึง 0.06 ไมครอน หรือเมื่อนำมาผ่าน H_2O_2 ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 ถึง 30 นาที จะพบเส้นใยไฟบริลมีรูปร่างแบน โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 ถึง 0.4 ไมครอน ซึ่งมีความกว้าง 0.6-0.8 ไมครอน เปลี่ยนเป็นไฟบริลลักษณะเหมือนสายรัด ที่มีความกว้าง 1 ถึง 1.2 ไมครอน หรือเมื่อนำเส้นใยไฟโบรอินจากชั้นนอกชั้นกลาง ชั้นใน ของรังไหมแช่ในโซดาไฟ 1 N ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ถึง 30 ชั่วโมง และเกิดยุบตัวลงจากการไฮโดรไลซิสบางส่วนที่รังไหมชั้นนอกและชั้นใน ซึ่งสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงของไฟบริลที่เส้นใยจากชั้นกลางได้ ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงส่วนประกอบโครงสร้างภายในของเส้นไหม

ที่มา: Lee (2008)

10.2 โครงสร้างทางเคมีของเส้นไหม

10.2.1 ส่วนประกอบทางเคมีของรังไหม

ความแตกต่างของรังไหมมีเพียงเล็กน้อยนั้นขึ้นอยู่กับชนิดและการเลี้ยงไหม แต่โดยทั่วไปแล้ว เส้นใยจากเส้นไหม 97 เปอร์เซ็นต์ เป็นโปรตีนบริสุทธิ์ และมีส่วนประกอบอื่นๆ เล็กน้อย เช่น ขี้ผึ้ง คาร์โบไฮเดรต วัตถุที่มีสี และสารอินทรีย์ เป็นต้น เส้นใยไหมเล็กลงมีสัดส่วนของ ไฟโบรอิน 75 เปอร์เซ็นต์ และเซรีซิน 20 ถึง 30 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเส้นใยไหมปามีสัดส่วนของ ไฟโบรอิน 75 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ และเซรีซิน 5 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงส่วนประกอบของชั้นรังไหมชนิด *Bombyx mori*

พันธุ์ไหม	ส่วนประกอบชั้นของรังไหม	น้ำ (%)	ไฟโบรอิน (%)	เซรีซิน (%)	แอลกอฮอล์ (%)	อีเทอร์ (%)	เถ้า (%)
N 122	ชั้นนอก (30%)	10.69	65.88	31.36	1.44	1.36	0.893
X	ชั้นกลาง (64%)	10.24	77.30	20.97	1.03	0.70	0.904
C 122	ชั้นใน (18%)	10.06	73.57	23.78	0.96	1.69	0.922
Shuka	ชั้นนอก (32%)	10.48	70.48	27.16	1.23	1.13	0.835
X	ชั้นกลาง (60%)	10.12	77.51	19.70	1.01	0.78	0.867
Girei	ชั้นใน (8%)	9.95	79.05	18.62	1.09	1.24	0.861
Koishi maru	ชั้นนอก (28%)	10.37	73.25	24.13	1.42	1.20	0.804
	ชั้นกลาง (66%)	9.92	76.49	21.10	1.13	1.28	0.831
	ชั้นใน (6%)	9.96	77.55	20.05	1.01	1.39	0.858

ที่มา: โมโตอิ และคณะ (2530)

10.2.2 โครงสร้างทางเคมีของเซรีซิน

เส้นใยของไหมเลี้ยงมีกรดอะมิโน 4 ชนิด คือ glycine, alanine, serine และ tyrosine รวม 83 เปอร์เซ็นต์ ของกรดอะมิโนทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 6 โดยปกติเราแบ่งเซรีซินเป็น 3 ส่วนตามความสามารถในการละลายในน้ำร้อนที่ต่างกัน คือ เซรีซิน I (ละลายได้ง่าย ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์) เซรีซิน II (ละลายง่ายกว่า ประมาณ 40 ถึง 50 เปอร์เซ็นต์) และเซรีซิน III (ละลายยาก ประมาณ 10 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์)

10.2.3 โครงสร้างทางเคมีของไฟโบรอิน

โมเลกุลไฟโบรอินเป็นโครงสร้าง β -form และโมเลกุลไฟโบรอินในโครงสร้าง β -form เหมือนกับยึดตัวไปตามแนวยาว เกิดเป็นโครงสร้าง β -form ที่ไม่อยู่ในแนวนาน และกลายเป็นโครงสร้าง 3 มิติ มีแรงระหว่างโมเลกุล คือ พันธะไฮโดรเจนที่บริเวณที่เป็นผลึกของไฟโบรอิน เกิดโมเลกุล β -form ที่ไม่อยู่ในแนวนาน ในไฟโบรอินของไหมเลี้ยงมีส่วนประกอบหลักเป็นกรดอะมิโน 4 ชนิด คือ glycine, alanine, serine และ tyrosine ประมาณ 85

เปอร์เซ็นต์ ของกรดอะมิโนทั้งหมด มี glycine มากกว่า alanine และมี serine มากกว่า tyrosine ส่วนในไหมปามี alanine 50 เปอร์เซ็นต์ ของทั้งหมด มากกว่า glycine เมื่อเทียบกับไหมเลี้ยงแล้วมีกรดอะมิโนที่เป็นเบสมากกว่า เช่น arginine เป็นต้น และกรดอะมิโนที่เป็นกรด เช่น กรดออกซี เป็นต้น กรดอะมิโนทั้งหมดของไฟโบรอินในไหมปามีน้อยกว่าในไหมเลี้ยง ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบของกรดอะมิโนของเซรีซินและไฟโบรอิน (กรดอะมิโนเป็นกรัมในโปรตีน 100 กรัม)

กรดอะมิโน		เซรีซิน	ไฟโบรอิน
Non-polar amino acid	Glycine	8.66	41.25
	Alanine	3.51	28.87
	Valine	3.14	2.63
	Leucine	1.02	0.32
	Isoleucine	0.77	0.44
	Proline	0.66	-
	Phenylalanine	0.50	0.58
Acid amino acid	Aspartic acid	17.03	0.76
	Glutamic acid	7.46	0.69
Basic amino acid	Arginine	6.07	0.86
	Histidine	1.88	-
	Lysine	4.95	0.17
Oxy amino acid	Serine	27.32	13.22
	Threonine	7.48	0.81
	Tyrosine	4.43	10.96
Sulfur-complex amino acid	Methionine	-	-
	Cystine	0.20	-
รวม		95.08	101.56

ที่มา: โมโตอิ และคณะ (2530)

ตารางที่ 7 ส่วนประกอบของกรดอะมิโนของไฟโบรอินในไหมป่า (กรดอะมิโนเป็นกรัมในโปรตีน 100 กรัม)

พันธุ์ไหม	ชั้นของไฟโบรอินในไหมป่า						
	Samia Cynthiaricini	Samia Cynthiapryeri	Antheraea pernyi	Antheraea mylitta	Antheraea yamamai	Antheraea assama	Saturnia pyretorum
กรดอะมิโน							
Glycine	26.34	26.50	24.86	23.61	21.82	22.91	19.36
Alanine	50.50	45.74	48.82	45.48	48.60	46.26	42.03
Valine	0.40	0.58	0.59	0.76	0.65	0.42	1.14
Leucine	0.38	0.45	0.46	0.70	0.61	0.61	2.50
Isoleucine	0.77	0.65	0.70	0.82	0.79	0.86	0.66
Proline	0.41	0.20	0.43	0.20	0.20	0.20	0.49
Phenylalanine	0.20	0.20	0.30	0.20	0.20	0.20	0.47
Aspartic acid	5.08	5.13	6.79	6.46	6.46	6.07	5.23
Glutamic acid	0.96	0.90	1.05	0.61	0.98	0.88	1.56
Arginine	3.27	2.93	5.53	5.17	6.67	6.21	6.45
Histidine	1.45	1.40	12.80	0.69	1.24	0.50	1.30
Lysine	0.20	0.20	0.20	0.53	0.40	0.44	0.20
Serine	7.11	7.08	12.08	11.80	10.99	12.90	11.01
Threonine	0.89	1.03	1.15	0.74	1.05	1.25	1.28

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ชั้นของไฟโบรอินในไหมป่า							
พันธุ์ไหม	Samia Cynthiaricini	Samia Cynthiapryeri	Antheraea pernyi	Antheraea mylitta	Antheraea yamamai	Antheraea assama	Saturnia pyretorum
กรดอะมิโน							
Tyrosine	10.64	9.02	8.57	8.40	8.33	8.62	8.71
Methionine	-	-	-	-	-	-	-
Cystine	-	-	-	-	-	-	-
รวม	108.60	102.01	112.81	106.17	108.99	108.24	103.39

ที่มา: โมโตอิ และคณะ (2530)

11. กระบวนการลอกกาไหม

กระบวนการลอกกาไหม เป็นกระบวนการพื้นฐานที่สำคัญในการผลิตเส้นไหม โดยนำเส้นไหม เส้นด้าย และผ้าไหมดิบ มาลอกกาเชรีซินที่เคลือบผิวของเส้นใย ซึ่งโดยทั่วไปเป็นการลอกเอาเชรีซินออก 100 เปอร์เซ็นต์ แต่บางครั้งมีการลอกกาเพียง 30, 50 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์ การลอกกาช่วยให้สามารถฟอก และย้อมสีผ้าไหมได้ดี และยังทำให้เส้นไหมมีความเงางามเป็นพิเศษ

ในปัจจุบัน การลอกกาใช้สบู่ และเกลือต่าง เช่น โซเดียมซัลเฟต โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต โซเดียมฟอสเฟต มีการลอกกาแบบใช้สบู่ แบบใช้โซเดียม และแบบผสมใช้สบู่และโซเดียม โดยอาศัยความสามารถในการละลายระหว่างเชรีซินและไฟโบรอิน

ชาวจีนใช้ทริปซินในตับอ่อนซึ่งสามารถละลายกาเชรีซินได้ หรือใช้พวกเอนไซม์จากจุลินทรีย์ เช่น *Bacillus*, *Actinomycetes*, *filamentous fungus* เป็นต้น และส่วนหนึ่งใช้เอนไซม์จากพืช เช่น papain เป็นต้น

การลอกกาของเส้นไหมป่า เช่น ไหมฟูจิ และเมอเชน มักจะใช้พวกจุลินทรีย์โดยตรงแทนที่จะใช้เอนไซม์ และใช้เอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากธรรมชาติในของเหลวที่ทำให้เน่าบูดหรือกระบวนการหมัก

วิธีการลอกกาโดยใช้ของเหลวบูดเน่าหรือกระบวนการหมักมีประโยชน์ในการประหยัดพลังงาน แต่ใช้เวลานาน 2 ถึง 7 วัน และมีข้อเสียบางอย่าง เช่น กลิ่นเหม็น และเกิดมลภาวะอันเกิดจากจุลินทรีย์ที่กระจายอยู่ แต่วิธีการลอกกาวิธีนี้สามารถลอกกาเชรีซินได้สม่ำเสมอที่อุณหภูมิต่ำ (40 ถึง 50 องศาเซลเซียส) และไม่ทำลายสมบัติของเส้นใยแต่อย่างใด ดังนั้นถ้าคำนึงถึงวัสดุราคาสูง วิธีนี้นับว่าเป็นวิธีการลอกกาที่ดีวิธีหนึ่ง

12. วิธีการลอกกาไหม

การลอกกาไหมมักมีการเตรียมการลอกกาไหมหรือการตกแต่งการลอกกาหลายครั้ง เพื่อลดความเป็นกรดต่าง ซึ่งเกิดจากสิ่งสกปรกของของเหลวที่ลอกออก ซึ่งประกอบด้วยเชรีซิน

จีฟี่ง กรดไขมัน สารอินทรีย์ สารสี น้ำมันที่ใช้ในการทอ เป็นต้น การเตรียมการลอกกาว ทำได้โดยการเติมสารอัลคาไลน์ (พีเอช 10 ถึง 11) ส่วนการลอกกาวแบบบริดจ์ ซึ่งใส่โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ มีวิธีการลอกกาวด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ วิธีการลอกกาวโดยใช้มือ เช่น การลอกกาวจากใจไหมโดยใช้แท่งไม้ไผ่ ในถุง ต้มเป็นห้วง เป็นต้น วิธีการลอกกาวโดยใช้เครื่องมือ เช่น เครื่องข้อมใจไหมแบบสเปรย์ เครื่องข้อมแบบวินช์ (winch) หรือจิก (jig) เครื่องลอกกาวแบบ foam แบบใช้ความดันสูง และเครื่องลอกกาวแบบต่อเนื่องโดยใช้ความดันสูง ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

12.1 การลอกกาวจากเส้นไหมแบบใช้ท่อนไม้ไผ่

วิธีการนี้อาจเรียกว่า การลอกกาวแบบใช้ท่อนไม้ (hank rod degumming) และการลอกกาวไหมที่แขวนบนท่อนไม้ไผ่ วิธีนี้ทำโดยการสอดใจไหมเข้าไปในท่อนไม้ไผ่จับไหม และใส่ลงในอ่างขจัดกาวไหม นำไหมมาลอกกาวที่อุณหภูมิสูง ทำให้เกิดการลอกกาวออกไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงต้องทำซ้ำให้ทั่วถึง

12.2 การลอกกาวในถุง (boiling in sack หรือ cloth bag degumming)

โดยการใส่ไหมดิบในถุงผ้าลินินหยาบหรือถุงผ้าหยาบ และจุ่มลงไปนึ่งในสารละลายสำหรับลอกกาวที่อุณหภูมิสูง

12.3 การลอกกาวโดยการต้มเป็นห้วง (boiling in loop degumming)

ทำได้โดยการพับผ้าไหมให้ได้ระยะที่พอเหมาะ และใส่ห้วงคล้องที่ปลายหนึ่งแล้วสอดท่อนไม้เข้าไปในห้วง และแขวนผ้าลงในอ่างลอกกาวไหม แต่วิธีนี้มีปัญหามากในเรื่องความสม่ำเสมอในการลอกกาว และเรื่องประหยัดพลังงาน

12.4 การลอกกาวด้วยเครื่องข้อมสีใจไหมแบบสเปรย์ (spray type hank dyeing machine)

ทำได้โดยการสเปรย์ของเหลวที่ใช้ลอกกาวจากท่อซึ่งใช้แขวนใจไหม และหมุนใจไหมไปเรื่อยๆ วิธีนี้สามารถลอกเส้นกาวไหมจำนวนมากได้ง่าย และลอกกาวได้สม่ำเสมอ ควร

ควบคุมจำนวนของน้ำที่สเปรย์โดยดูจากสภาพของเส้นไหมเพื่อที่จะป้องกันการเกิดปมปมอันเนื่องจากการขัดถูระหว่างเส้นไหม และลดความยืดหยุ่นของเส้นไหม

12.5 การลอกกาวโดยใช้ฟอง (foam degumming)

ใช้สบู่เหลวที่มีความเข้มข้นสูงและลอกกาวโดยอาศัยฟองเล็กๆ ของฟองที่ร้อน วิธีนี้ใช้เวลาสั้น และประหยัดพลังงาน เมื่อเทียบกับการลอกกาวโดยวิธีการที่ใช้มือ

12.6 การลอกกาวโดยใช้ความดันสูง (high pressure degumming)

การลอกกาวโดยใช้เครื่องข้อมสี่แบบสเปรย์ใช้ความดันสูง (120 องศาเซลเซียส 30 นาที) เป็นการลอกกาวออกจากไหมดิบโดยใช้เครื่องกำเนิดไอน้ำที่ให้ความดันสูงในการทำให้เดือด แต่ควรให้เส้นไหมอยู่ในรูปของวง (loop) วิธีนี้คาดว่าเหมาะในการประหยัดพลังงาน ประหยัดวัตถุดิบ วิธีนี้มีประโยชน์ในการลอกกาวของผ้าไหมที่มีน้ำหนักมากที่สภาพการลอกกาวที่แตกต่างกันทางเส้นยืนและเส้นพุ่ง

12.7 การลอกกาวแบบต่อเนื่อง (continuous degumming)

เป็นระบบเดียวกับอ่างลอกกาวที่ใช้ในปัจจุบัน มีอยู่ 2 แบบ คือ แบบดัมเป้นาง โดยอ่างลอกกาวแบบยาว อีกแบบเป็นแบบ pad steam ที่ละลายกาวเซรีซินด้วยไอน้ำอย่างต่อเนื่อง หลังจากที่ถูกต้มฟ้างในสารละลายเอนไซม์ที่มีปฏิกิริยาสูง และสารละลายของสบู่-โซดา

12.8 การลอกกาวแบบไมโครเวฟ (microwave degumming)

ใช้หลักการให้ความร้อนแก่วัตถุที่เป็นฉนวนในการลอกกาวของไหมดิบ และใช้ปรับปรุงคุณภาพของผ้าไหมโดยอาศัยการให้ความร้อนที่รวดเร็วและสม่ำเสมอ

12.9 การลอกกาบบนใช้สารละลาย

โดยใช้สารละลายคลอรีนสังเคราะห์ชนิดผสม เช่น เปอร์คลอโรเอธิลีน ไตรคลอโรเอธิลีน สำหรับกรณีที่โรงงานขาดน้ำ ป้องกันมลภาวะจากน้ำเสีย วิธีนี้ใช้อัตราส่วนของ น้ำต่อวัตถุต่ำ โดยใส่สารลดแรงตึงผิว (surfactant) ที่มีน้ำสูงมากมาผสมกันจำนวนเล็กน้อย และทำให้กาบเซรชันพองตัว ทำให้กาบเซรชันออกจากไฟโบรอินได้ง่าย

12.10 การลอกกาบด้วยสบู่

จุ่มไหมดิบลงในน้ำอุ่น 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเซรชันจะ อ่อนตัว แล้วเพิ่มอุณหภูมิมากกว่า 90 องศาเซลเซียส โดยใช้สารละลายสบู่ 15 ถึง 20% o.w.f. (original weight of fabric) เป็นเวลา 1 ถึง 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตกแต่งการลอกกาบอีก โดยใช้สบู่ ใหม่ 10 ถึง 15% o.w.f. อุณหภูมิมากกว่า 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วแยกสารละลาย ออกจากไหม นำมาล้าง 2 ถึง 3 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส ด้วยสารละลายโซดาซักผ้า 0.1 เปอร์เซ็นต์ และล้างน้ำอีกหลายครั้ง

12.11 การลอกกาบด้วยโซดา

นำเส้นไหมมาต้มแยกกาบด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 10 ถึง 12% o.w.f. หรือ โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต 12 ถึง 15% o.w.f. ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ถึง 3 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วยน้ำอุ่น (40 ถึง 50 องศาเซลเซียส) และน้ำธรรมดาหลายครั้ง แต่อัลคาไลน์มี ความรุนแรงมาก จึงทำให้การลอกกาบไหมมากเกินไป เป็นผลให้เกิดความเสียหายแก่เส้นใย และ บางครั้งเกิดการสูญเสียความโค้งงอ ความพองตัว และคุณภาพไหมเสียไป

12.12 การลอกกาบด้วยสบู่-โซดา

นำเส้นไหมมาต้มแยกกาบด้วยสารละลายสบู่ 8 ถึง 15% o.w.f. และโซเดียม คาร์บอเนต 5 ถึง 8% o.w.f. (30 ถึง 50 เท่าของน้ำหนักไหมดิบ) ที่อุณหภูมิสูงกว่า 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ถึง 3 ชั่วโมง หลังจากแยกเอาสารละลายออก นำมาล้างด้วยสารละลายโซเดียม คาร์บอเนต 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ 40 ถึง 50 องศาเซลเซียส และน้ำธรรมดาหลายๆ ครั้ง

12.13 การลอกกาวด้วยเอนไซม์

นำเส้นไหมมาแยกกาวในสารละลายเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่าง 0.1 ถึง 0.3 เปอร์เซ็นต์ ค่าพีเอชเท่ากับ 9 ถึง 10.5 ที่อุณหภูมิ 40 ถึง 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ถึง 2 ชั่วโมง กาวเซรีซินจะละลายออกมา แล้วล้างด้วยน้ำอุ่น ที่อุณหภูมิ 40 ถึง 50 องศาเซลเซียส และล้างน้ำธรรมดาหลายๆ ครั้ง วิธีนี้สามารถแยกเซรีซินได้อย่างสม่ำเสมอ

12.14 การลอกกาวโดยวิธีอื่น

การลอกกาวไหมโดยการทำให้เกิดฟองสบู่ โซเดียมฟอสเฟต โซเดียมอะซิเตท เป็นวิธีที่ไม่ได้รับความนิยม เพราะไหมที่ลอกกาวแล้วมีลักษณะไม่ดี นอกจากจะใช้เครื่องมือพิเศษ การลอกกาวด้วยกรด เช่น โซเดียมซัลเฟต และกรดกำมะถัน ไม่เป็นที่นิยมเพราะมักจะเกิดปัญหาด้านคุณภาพของไหมลอกกาว

12.15 การลอกกาวเส้นไหมบางส่วน

การลอกกาวโดยวิธีนี้ ใช้สารลอกกาวเพียงเล็กน้อย ที่อุณหภูมิต่ำและใช้เวลาน้อย ซึ่งปริมาณกาวที่ออกจากเส้นไหม 6 ถึง 8 เปอร์เซ็นต์ แต่สภาพของกาวบนผิวเส้นไหมไม่สม่ำเสมอ การลอกกาวโดยวิธีนี้จะทำให้ผ้ามีสีไม่สม่ำเสมอ เพราะดัดสีไม่เท่ากัน

12.15.1 วิธี Ecruing คือ การลอกกาวออกด้วยน้ำอุ่น หรือน้ำสบู่ 5 ถึง 10% o.w.f. อุณหภูมิ 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ถึง 2 ชั่วโมง

12.15.2 วิธี Soupling คือ การลอกกาวที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ด้วยสารละลาย โซเดียมซัลเฟต 6% o.w.f. และกรดซัลฟูริก 3% o.w.f. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

13. การลอกกาวไหมป่า

ปริมาณกาวเซรีซินของไหมป่ามีน้อยกว่าไหมบ้าน แต่มีสารอย่างอื่นผสมอยู่มากกว่า โดยมีสิ่งสกปรก เช่น โลหะ (lime), แทนนิน (tannin) และเรซิน (resin) อยู่ในส่วนของเซรีซิน จึงทำให้

สารละลายเซรีซินในสารละลายต่างได้ยาก ในปัจจุบันการแยกกาออกโดยการต้มนานๆ หรือโดยการต้มแยกกาช้า ใช้ต่างแก่ และสารลอกกาวมาก ดังนั้นจึงต้องระวังการสูญเสียความเงาเฉพาะของไหมป่าและการลอกกาวที่ไม่สม่ำเสมอ

13.1 การลอกกาวด้วยสบู่-โซดา

โดยการแช่เส้นไหมในน้ำอุ่นที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที แล้วแช่ในกรดเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำมาล้างน้ำ และแยกกาออกในสารละลายสบู่ 20% o.w.f. และโซเดียมซัลเฟต 2% o.w.f. (30 ถึง 50 เท่าของน้ำหนักเส้นไหม) ที่อุณหภูมิสูงกว่า 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ถึง 3 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำไหมไปแช่ในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 40 ถึง 50 องศาเซลเซียส จำนวนสองครั้ง แล้วล้างด้วยน้ำ

13.2 การลอกกาวด้วยเอนไซม์

ก่อนจะทำการลอกกาวไหม จะต้องทำการแช่เส้นไหมก่อนด้วยกรดเกลือเจือจางเป็นเวลา 1 คืน จากนั้นนำเส้นไหมที่ได้มาแช่ในโปรติเอสชนิดต่าง 0.1 ถึง 0.3 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 40 ถึง 65 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเท่ากับ 9 ถึง 10.5 (30 ถึง 50 เท่าของน้ำหนักเส้นไหม) เป็นเวลา 1 ถึง 3 ชั่วโมง และแยกกาเซรีซินออก ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.1 ถึง 0.2 เปอร์เซ็นต์ และสบู่ที่อุณหภูมิ 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำอุ่น 40 ถึง 50 องศาเซลเซียส และน้ำธรรมดาหลายๆ ครั้ง การลอกกาวด้วยวิธีนี้ไม่ทำให้ความเงาของเส้นไหมป่าสูญเสียไป และสามารถป้องกันการลอกกาวที่ไม่สม่ำเสมอ

14. การลอกกาวด้วยเอนไซม์โปรติเอส (protease degumming)

วิธีการลอกกาววิธีนี้ได้มีการนำมาใช้โดยอาศัยธรรมชาติจากสัตว์และพืช เช่น trypsin, chymotrysin ซึ่งได้มาจากตับอ่อนของสุกรและโค และ papain ที่ได้จากพืช แต่ในปัจจุบันวิธีการลอกกาววิธีนี้ใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ เช่น *Bacillus*, filamentous fungus และ Actinomycetes fungus โดยเฉพาะการลอกกาวของผ้าไหมที่มีไหมผสมกับขนแกะ และเรยอนซึ่งไม่ทนต่อด่าง เมื่อใช้เอนไซม์จะลอกกาวได้ผลดี โปรติเอสมีผลต่อโปรตีน และเปปไทด์ และเร่งให้เกิดการแยกตัวของพันธะเปปไทด์ แต่โปรติเอสไม่มีผลกับเส้นใยโปรตีนที่มีความเป็นระเบียบของโมเลกุลสูงในเส้น

ไหมและขนแกะ ในทางกลับกันโปรติเอสมีผลต่อโปรตีนซึ่งมีความไวระคายของโมเลกุลเซรีซินที่หุ้มเส้นไหมอยู่โดยทำให้โมเลกุลเล็กลง และยังช่วยเพิ่มการละลายของน้ำ และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการลอกกาของสบู่และเกลือต่าง จากการศึกษการลอกกาผ้าฮาบูตาอะ (Habutae) โดยโปรติเอสพบว่าอุณหภูมิมีผลต่อประสิทธิภาพในการลอกกา ดังแสดงในตารางที่ 8

จากการศึกษาผลของการลอกกา เนื่องจากการกระตุ้นของโปรติเอสในน้ำลอกกาที่มีโปรติเอส 4 ชนิด ซึ่งมีอัตราการลอกกาผ้าต่างกัน เช่น neutral *Bacillus* protease II, neutral *Bacillus* protease V และ alkaline *Bacillus* protease VI ความแตกต่างของอัตราการลอกกาไหมจะมีผลต่อการลอกกา โปรติเอสแต่ละชนิดเพิ่มผลของการลอกกาเมื่อเพิ่มการกระตุ้นของโปรติเอสในน้ำลอกกา และผลของการลอกจะถึงจุดสมดุลที่การกระตุ้นของโปรติเอสที่ 75 ถึง 100 units/ml

ในการลอกกาด้วยโปรติเอส กาวเซรีซินละลายได้ง่ายขึ้นเนื่องจากเซรีซินถูกย่อยจนมีขนาดโมเลกุลขนาดเล็กลง นอกจากนี้เซรีซินถูกละลายได้ง่ายเมื่อมีแรงกระตุ้นเพิ่มเติม (auxiliary action) จากสบู่และสารเคมีที่ใช้ร่วมในการลอกกาเป็นผลให้การลอกการวดเร็วขึ้น

ในการศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการลอกกาเส้นไหม พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการลอกกาด้วยเอนไซม์ neutral protease, alkaline protease และ acid protease เท่ากับ 6 ถึง 7, 9 ถึง 10 และ 3 ตามลำดับ ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการลอกกาไหมของโปรติเอส 3 ชนิด คือ neutral filamentous fungus protease I, alkaline *Bacillus* protease VII และ neutral *Bacillus* protease VI พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการลอกกาของโปรติเอส 3 ชนิดเท่ากับ 40, 60 และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

ตารางที่ 8 การลอกกาวไหมด้วยโปรติเอสและประสิทธิภาพในการลอกกาวไหม

โปรติเอส		ประสิทธิภาพในการลอกกาว (%)	
		40 ± 2 °C	65 ± 2 °C
โปรติเอสจากสัตว์และพืช	Papain	21.7	59.4
	Trypsin	80.2	30.1
	Pepsin	14.6	25.8
Neutral microorganism protease	<i>Bacillus</i> protease I	23.9	21.6
	<i>Bacillus</i> protease II	20.5	28.0
	<i>Bacillus</i> protease III	40.2	65.3
	<i>Bacillus</i> protease IV	25.5	48.6
	<i>Bacillus</i> protease V	91.7	84.5
	Filamentous protease I	83.2	31.0
	Filamentous protease II	80.9	46.2
	Actinomycetes protease I	39.8	27.1
	Actinomycetes protease II	6.4	7.5
Alkaline microorganism protease	<i>Bacillus</i> protease V	88.3	91.0
	<i>Bacillus</i> protease V	52.0	56.7
	<i>Bacillus</i> protease IX	14.1	16.4
	<i>Bacillus</i> protease X	37.6	20.0
	<i>Bacillus</i> protease X	53.1	48.9
	<i>Bacillus</i> protease XII	22.7	15.3
	<i>Bacillus</i> protease XIII	30.4	18.3
	<i>Bacillus</i> protease XIV	31.8	26.0
	<i>Bacillus</i> protease XV	22.5	11.7
	Filamentous protease III	54.0	46.2
	Filamentous protease IV	9.8	12.2
	Hamomorphous protease	52.5	46.9

ตารางที่ 8 (ต่อ)

โปรติเอส		ประสิทธิภาพในการลอกขาว (%)	
		40 ± 2 °C	65 ± 2 °C
Acid microorganism	Filamentous protease	17.1	13.8
protease			

ที่มา: โมโตอิ และคณะ (2530)

มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในการย่อยกาวไหม ดังนี้

Freddi *et al.* (2003) ศึกษาการใช้อัลคาไลน์ (3374-L, GC 897-H), นิวทรีล (3273-C) และ แอซิดโปรติเอส (EC 3.4 23.18) ในการย่อยกาวไหมจากเส้นไหม โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการ ทำงานของเอนไซม์ และใช้ปริมาณเอนไซม์อยู่ในช่วงระหว่าง 0.05 ถึง 2.00 หน่วยต่อกรัมของเส้นไหม และระยะเวลาที่ใช้ย่อยอยู่ในช่วงระหว่าง 5 ถึง 240 นาที พบว่าเซรีซินถูกลอกออกจากเส้นไหมโดยใช้เอนไซม์อัลคาไลน์ (3374-L, GC 897-H), นิวทรีล (3273-C) และแอซิดโปรติเอส (EC 3.4 23.18) เท่ากับ 17.6, 24 และ 19 wt.% ตามลำดับ ซึ่งใช้อัตราส่วนปริมาณเอนไซม์ต่อกรัมของ เส้นไหม ดังนี้ 2, 1 และ 0.1 หน่วยต่อกรัมของเส้นไหม ตามลำดับ โดยใช้ระยะเวลา 1 ชั่วโมง จะ เห็นได้ว่าแอซิดโปรติเอส (EC 3.4 23.18) มีประสิทธิภาพในการลอกกาวไหมสูงที่สุด

จันทิมา และ เปรมวดี (2548) พบว่าแบคทีเรีย LC-1-1 และ LC-1-6 สามารถผลิตเอนไซม์ โปรติเอสในการย่อยเซรีซินได้ดีกว่าไฟโรโบรินและโปรตีนจากนม โดยแบคทีเรีย LC-1-6 สามารถ ทำให้เส้นไหมนุ่มขึ้นและขาวกว่าการลอกกาวไหมด้วย Alcalase®, Silkoblanc® และ โซเดียม คาร์บอเนต

ดวงกมล และ เปรมวดี (2548) ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสใน การย่อยเซรีซิน โดยใช้วิธี Radial Diffusion and Thin-layer Enzyme Assay (RD-TEA) ที่ใช้ หลักการซึมผ่านวุ้นของเอนไซม์ไปยังพื้นผิวที่ฉาบไว้ด้วยโปรตีนเซรีซินหรือไฟโบริน พบว่า แบคทีเรีย GR-5-4, 4TS9-001 และ HIC-13-8 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสในการย่อยเซรีซิน

และการทำไซโมแกรม (Zymogram) ของเอนไซม์จากเชื้อเหล่านี้ แสดงให้เห็นว่า มีเอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์ที่สามารถย่อยเชรีซินได้ดีกว่าไฟโบริน

Vaithanomsat *et al.* (2008) ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส จากน้ำทิ้งจากกระบวนการลอกกวไหม พบว่า *B. licheniformis* TISTR 1010 และ *A. flavus* TISTR 3130, TISTR 3366, TISTR 3135 และ TISTR 3041 สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ ซึ่ง *B. licheniformis* TISTR 1010 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงที่สุด (6.34 units/ml) ค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 10 เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ซึ่งสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส คือ โปรตีนที่ได้จากน้ำทิ้งจากกระบวนการลอกกวไหม 6% (v/v), malt extract 1% (w/v), polypeptone 1% (w/v) และ Na_2CO_3 1% (w/v)

16. การจัดการทดลอง Plackett and Burman design

ในการทดลองที่มีตัวแปรหรือปัจจัยที่ต้องการศึกษาหลายปัจจัย จะมีอุปสรรคเกี่ยวกับสิ่งทดลอง (treatment) ที่มีเป็นจำนวนมาก เช่น ถ้าจัดสิ่งทดลองแบบ 2^n จะพบว่าถ้ามีปัจจัย 8 ปัจจัยจะมีสิ่งทดลองทั้งหมด 128 สิ่งทดลอง เป็นต้น จึงเป็นการยากที่จะทำการทดลองทั้ง 256 สิ่งทดลอง ดังนั้น Plackett and Burman Design จะใช้สำหรับการศึกษาเพื่อคัดเลือก (screening) ปัจจัยที่มีความสำคัญหรือมีอิทธิพลต่อการทดลองที่จะศึกษา กล่าวคือจากแผนการทดลองนี้จะทำให้สามารถวิเคราะห์ถึงผลกระทบหลักของปัจจัยที่ศึกษาเท่านั้น ซึ่งการทดลองแบบนี้เป็นส่วนหนึ่งของการจัดสิ่งทดลองแบบแฟกทอเรียล (factorial experiment) หรืออาจจัดให้เป็นแฟกทอเรียลบางส่วน (fractional factorial) ที่มีการจัดให้เป็นอิสระต่อกัน (orthogonal) ใช้เพื่อคัดเลือกปัจจัยในการพัฒนาสูตร หรือพัฒนากรรมวิธีการผลิตจาก 10 ถึง 20 ปัจจัยที่ได้จากการทดสอบเบื้องต้นให้เหลือ 1 ถึง 4 ปัจจัย โดยที่ไม่ต้องทำการทดลองในขนาดใหญ่ ซึ่งสามารถลดจำนวนการทดลองโดยใช้เทคนิคนี้ แต่มีข้อเสีย คือไม่สามารถศึกษาถึงผลของปฏิสัมพันธ์ (interaction) ต่างๆ ที่มีในการทดลองได้

การจัดการทดลองจะใช้ 2^k factorial arrangement เป็นพื้นฐานโดยจะมีแบบแผนมาตรฐาน ดังแสดงในตารางที่ 9 เป็นแถวแรกของการเริ่มต้นในการสร้างสิ่งทดลอง

ดังนั้นในการวางแผนการทดลองให้เลือกจำนวนสิ่งทดลอง (N) ที่มากกว่าจำนวนปัจจัยที่ต้องการศึกษาเพื่อสร้าง dummy effect สำหรับใช้คำนวณหาความแปรปรวนของ standard error

(SE) ซึ่งต้องใช้ในการคำนวณค่า t ต่อไป ซึ่งจำนวน dummy variables มากยิ่งทำให้การประมาณค่า SE ถูกต้องมากยิ่งขึ้น อย่างน้อยควรมีค่า dummy variables 2 ตัว เช่น ต้องการคัดเลือกปัจจัย 4 ถึง 5 ปัจจัย ให้เลือก N เท่ากับ 8 ต้องการคัดเลือกปัจจัย 6 ถึง 9 ปัจจัย ให้เลือก N เท่ากับ 12 และต้องการคัดเลือกปัจจัย 10 ถึง 13 ปัจจัย ให้เลือก N เท่ากับ 16 เป็นต้น

ในการใช้ Plackett and Burman design ต้องกำหนดสิ่งทดลองแรกเป็นดั่งเมตริกแถวแรก จากนั้นสิ่งทดลองต่อไป กำหนดในลักษณะโครงสร้างวน (cyclic construction) กล่าวคือ นำรหัสสุดท้ายของ initial block ขึ้นมาลำดับหน้าสุด และวนไปจนครบ $N-1$ รอบ ส่วนสิ่งทดลองสุดท้ายเป็น added block คือ ใช้ระดับต่ำสุดทุกปัจจัย อย่างไรก็ตามในการวนอาจนำรหัสหน้าสุดมาต่อท้าย และวนไปจนครบ $N-1$ รอบได้เช่นกัน เพียงแต่ในการทดลองให้ใช้ระดับสูงหรือต่ำให้ถูกต้องตามแผนที่กำหนดหรือวางไว้เป็นสำคัญ ดังแสดงในตารางที่ 10 ปัจจัยที่ต้องการกลั่นกรอง เท่ากับ 7 ซึ่งมีค่า N เท่ากับ 12 จะเห็นว่าเครื่องหมายในแถวต่อมาในเมตริกจะถูกสร้างขึ้นจากการเลื่อนไปทางซ้ายมือ $N-2$ ครั้ง โดยแถวสุดท้ายของเมตริกจะเป็นเครื่องหมายลบทั้งหมด (อิสรพงษ์, 2550)

ตารางที่ 9 แผนมาตรฐานสำหรับเมตริกแถวแรกในการทดลองที่คัดเลือก $N-1$ ปัจจัยในการทดลอง N ครั้ง

N	ปัจจัยที่ต้องการกลั่นกรอง, $k = N-1$														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
8	+	+	+	-	+	-	-								
12	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-				
16	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-

หมายเหตุ + หมายถึง ระดับของปัจจัยที่ทำการศึกษามีระดับสูง ซึ่งมีค่าเท่ากับ +1

- หมายถึง ระดับของปัจจัยที่ทำการศึกษามีระดับต่ำ ซึ่งมีค่าเท่ากับ -1

N หมายถึง จำนวนสิ่งทดลอง (treatment)

K หมายถึง จำนวนปัจจัยที่ต้องการกลั่นกรอง

ที่มา: คัดแปลงจาก Plackett and Burman (1946)

ตารางที่ 10 ตารางเมตริกของแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman ที่มีปัจจัยต้องกลั่นกรอง
จำนวน 7 ปัจจัย โดยมีจำนวนสิ่งทดลอง (N) ทั้งหมด 12 การทดลอง และมีจำนวน
dummy variables 4 ตัว

สิ่งทดลอง (treatment)	ปัจจัย (factor)										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-
2	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+
3	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
4	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-
5	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
6	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
7	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
8	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-
9	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-
10	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-
11	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ A-G หมายถึง ปัจจัยที่ต้องการกลั่นกรอง

H-K หมายถึง dummy variables

ที่มา: คัดแปลงจาก Plackett and Burman (1946)

ตัวอย่างสิ่งทดลองที่ 1 จะทำการทดลองที่ปัจจัย A มีระดับสูง (เครื่องหมาย +) ปัจจัย B มีระดับสูง (เครื่องหมาย +) ปัจจัย C มีระดับต่ำ (เครื่องหมาย -) ปัจจัย D มีระดับสูง (เครื่องหมาย +) ปัจจัย E มีระดับสูง (เครื่องหมาย +) ปัจจัย F มีระดับสูง (เครื่องหมาย +) และปัจจัย G มีระดับต่ำ (เครื่องหมาย -) โดยที่ไม่ต้องสนใจระดับของ dummy variables (H-K)

การคำนวณผลจากปัจจัยโดยใช้สูตร ดังนี้

ค่าเฉลี่ยของผลปัจจัยหลัก (average main effect; E_x)

$$= [\sum Y (+, \text{สิ่งทดลองที่เป็นระดับสูง}) - \sum Y (-, \text{สิ่งทดลองที่เป็นระดับต่ำ})] / n$$

ค่าเฉลี่ยของผล dummy variables (average dummy variables; Ed)

$$= [\sum Y (+, \text{สิ่งทดลองที่เป็นระดับสูง}) - \sum Y (-, \text{สิ่งทดลองที่เป็นระดับต่ำ})] / n$$

เมื่อ n = จำนวนของข้อมูลประกอบเป็นผลรวม

$$SE = \sqrt{\sum (Ed)^2 / n}$$

$$t = E_x / SE$$

การทดสอบนัยสำคัญของปัจจัยหลัก (main effect) โดยการเปรียบเทียบระหว่างค่า t ที่ได้จากการคำนวณ และค่า t จากตาราง ที่ degree of freedom (df) = n ถ้าค่า t ที่ได้จากการคำนวณมีค่ามากกว่าค่า t จากตาราง แสดงว่าปัจจัยดังกล่าวเป็นปัจจัยหลัก โดยระดับนัยสำคัญที่มักใช้ คือ 0.05 ถึง 0.3 (70 ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ความเชื่อมั่น) (อนุวัตร, 2549)

ตัวอย่างงานวิจัยที่นำเสนอแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman design มาประยุกต์ใช้สำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอส มีดังนี้

Chauhan and Gupta (2004) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. RGR-14 โดยใช้ Plackett and Burman design ในการกลั่นกรองปัจจัยทั้งหมด 8 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ คือ casamino acid แป้งมันสำปะหลัง ไอออนของฟอสเฟต ไอออนของโลหะ เปอร์เซนต์กลีเซอรีน อุณหภูมิ อัตราการกวน และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง พบว่าปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ คือ casamino acid แป้งมันสำปะหลัง ไอออนของฟอสเฟต

เปอร์เซ็นต์กล้าเชื้อเริ่มต้น และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง จากนั้นใช้ Face-centered Central Composite Design (FCCCD) และ RSM หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการหาสภาวะที่เหมาะสมเพิ่มขึ้นเท่ากับ 3,914 units/ml เพิ่มขึ้นจากเดิม 12.85 เท่า

Reddy *et al.* (2008) ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์ โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. RKY3 โดยใช้ Plackett and Burman design ในการกลั่นกรองปัจจัยทั้งหมด 7 ปัจจัย ที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ คือ กลูโคส แป้งข้าวโพด yeast extract น้ำแช่ข้าวโพด แอมโมเนียมซัลเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต ปริมาณกล้าเชื้อ และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง พบว่า ปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ คือ แป้งข้าวโพด น้ำแช่ข้าวโพด และปริมาณกล้าเชื้อ จากนั้นใช้ CCD และ RSM หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากการหาสภาวะที่เหมาะสมเพิ่มขึ้นเท่ากับ 939 units/ml เมื่อเปรียบเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้ก่อนการหาสภาวะที่เหมาะสมซึ่งเท่ากับ 417 units/ml

17. พื้นที่ผิวตอบสนอง

เป็นเทคนิคทางสถิติอย่างหนึ่งที่ใช้แผนภาพ surface plot ที่สร้างเป็นแผนภาพ 3 มิติ ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆ ที่เป็นที่น่าสนใจของนักวิจัย ซึ่งประกอบด้วยตัวแปรร่วม การทดลองหลายปัจจัย การตอบสนองที่เหมาะสมสามารถพิจารณาได้ใน 2 ลักษณะ คือ การตอบสนองที่มากที่สุด (maximum) หรือการตอบสนองที่ต่ำสุด (minimum) ขึ้นอยู่กับธรรมชาติการทดลอง วิธีการนี้ได้ถูกอธิบายและพัฒนาครั้งแรกโดย Box and Wilson (1951) ต่อมา Bradley (1958) ได้เขียนบทความเพื่ออธิบายในเชิงเป็นเครื่องมือทางคณิตศาสตร์และสถิติที่กำหนดวิธีการพื้นที่ผิวตอบสนองสำหรับหาสูตรหรือสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งเป็นการแสดงหรือตัวแทนทางเรขาคณิตที่ได้รับเมื่อผลตอบสนองของตัวแปร (response) ถูก plot เป็นฟังก์ชันของตัวแปรเหล่านั้น จากความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรดังกล่าวทำให้สามารถพิจารณาผลตอบสนองของ ตัวแปรและปัจจัยที่สนใจเหล่านั้นพร้อมๆ กัน โดยความรู้พื้นฐานที่ต้องใช้ คือ การวางแผนการทดลอง (experimental design) การวิเคราะห์สมการถดถอย (regression analysis) และความรู้ในการใช้โปรแกรมที่สร้างแผนภาพ surface plot

แบบจำลองทั่วไป;

$$Y = f(X_1 + X_2 + \dots X_n) + \varepsilon$$

โดย	Y	คือ ค่าตอบสนอง (response); dependent variable
	$X_1 + X_2 + \dots X_n$	คือ ตัวแปรที่สนใจ; independent variable
	ε	คือ เทอมของค่าคลาดเคลื่อนสุ่ม

แม้ว่ารูปแบบความเที่ยงตรงของฟังก์ชันการตอบสนอง f มักจะไม่ทราบเสมอ ประสบการณ์มักแสดงให้เห็นว่าโดยทั่วไปสามารถประมาณได้โดยฟังก์ชันเชิงเส้นตรงหรือเส้นโค้งของตัวแปรเชิงปริมาณ

ความสัมพันธ์ของสมการถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression relationship) เป็นดังนี้

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n + \varepsilon$$

ความสัมพันธ์ หรือฟังก์ชันของตัวแปรเหล่านี้มักใช้สมการลำดับที่หนึ่ง (first order) ซึ่งเป็นแบบจำลองโพลีโนเมียล (polynomial model) หรือสมการลำดับที่สอง (second order) สำหรับความสัมพันธ์ของสมการถดถอยเชิงเส้นโค้ง (quadratic regression relationship) เป็นตัวอธิบาย

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n + \beta_{11} X_1^2 + \dots + \beta_{nn} X_n^2 + \beta_{ij} X_1 X_2 + \dots + \beta_{n-1, n} X_{n-1} X_n + \varepsilon$$

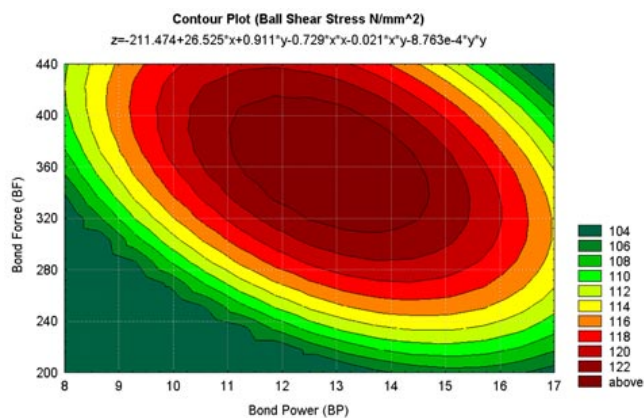
โดย	β_0	= จุดตัด (intercept) บนแกน y
	β_i	= เป็นผลเชิงเส้นตรง (linear effect) ของ X_i เมื่อ $i = 1, \dots, n$
	β_{ii}	= เป็นผลเชิงเส้นตรง (quadratic effect) ของ X_i เมื่อ $i = 1, \dots, n$
	β_{ij}	= เป็นผลของปฏิกริยาสัมพันธ์ (interaction effect) ของ X_i และ X_j เมื่อ $i < j; i = 1, \dots, n-1$ และ $j = 1, \dots, n$

ในทอมของความคลาดเคลื่อนโดยปกติจะถูกกำหนดให้มีการกระจายตัวเทียบกับค่าเฉลี่ยเป็นศูนย์ และมีค่าความแปรปรวนเป็น σ^2 ความแปรปรวนในเชิงปริมาณ σ^2 ในการกระจายตัวของค่าตอบสนองเกิดขึ้น เนื่องจากความแตกต่างระหว่างจุดต่างๆ ที่ออกแบบกับความคลาดเคลื่อนในการทดลองที่ไม่สามารถควบคุมได้ ความแปรปรวนเนื่องจากความแตกต่างระหว่างจุดต่างๆ ที่ออกแบบสามารถอธิบายได้โดยฟังก์ชันของการตอบสนอง ถ้าทราบความแปรปรวนดังกล่าว โดยปกติฟังก์ชันของการตอบสนองที่เป็นจริงไม่ค่อยทราบมาก่อน ดังนั้นจึงมักต้องประมาณการค่าดังกล่าว เป็นผลให้การกระจายตัวของความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อนไม่เฉพาะแต่เกิดจากความคลาดเคลื่อนจากการทดลองเพียงอย่างเดียว แต่เกิดเนื่องจากการขาดความสอดคล้องของสมการที่ประมาณการขึ้น ที่เรียกว่า “lack of fit of estimated model” ถ้าสมการที่ประมาณการขึ้นมา มีความสอดคล้องในการตอบสนองที่กำลังคาดคะเนแล้ว ผลรวมกำลังสอง (sum of square; SS) ของความคลาดเคลื่อนจะเกิดเนื่องจากความคลาดเคลื่อนในการทดลองเพื่อประเมินความเหมาะสมของสมการ

วิธีการทางสถิติที่ใช้ คือ วิธีกำลังสองน้อยที่สุด (the least square method) เพื่อประมาณค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ฟังก์ชันที่ใช้เรียกว่า ฟังก์ชันของการตอบสนองที่เหมาะสม (fitted response function) โดยถูกนำมาใช้ในการประมาณค่าพารามิเตอร์ของฟังก์ชันการตอบสนองของสมการถดถอยที่ตั้งสมมติฐานขึ้น เมื่อพารามิเตอร์ของฟังก์ชันการตอบสนองที่ถูกตั้งสมมติฐานขึ้นถูกแทนด้วยค่าประมาณ ผลลัพธ์คือ ฟังก์ชันการตอบสนอง จะถูกทำให้สอดคล้องขึ้น ดังนี้

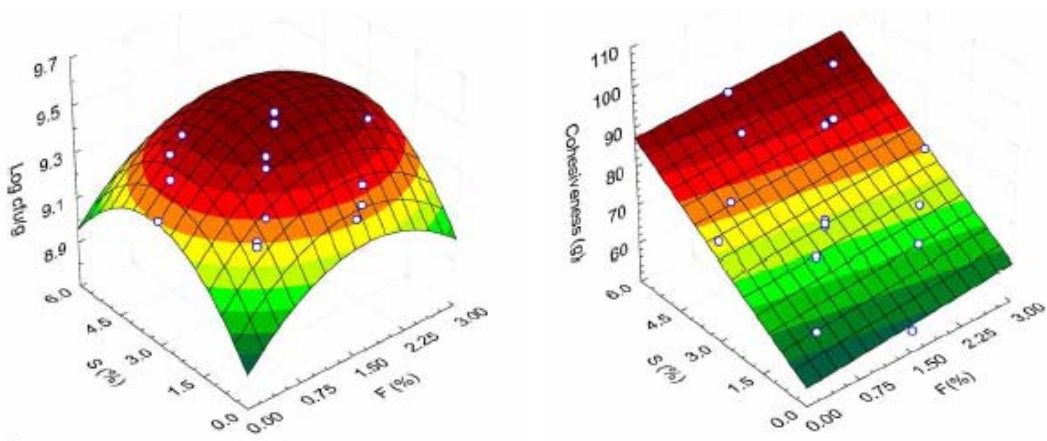
$$\hat{Y} = b_0 + b_1 X_1 + \dots + b_n X_n$$

สมการดังกล่าวเป็นฟังก์ชันการตอบสนองเชิงเส้นตรงที่ถูกทำให้สอดคล้อง ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการคาดคะเนการตอบสนองที่ต้องการของตัวแปรอิสระ (independent variables) เมื่อฟังก์ชันการตอบสนองที่ถูกทำให้สอดคล้อง ได้นำมาสร้างกราฟในลักษณะเป็นฟังก์ชันตัวแปรเชิงปริมาณ ผลลัพธ์ที่ได้จากการสร้างกราฟนี้ เรียกว่า response surface plot หรือ contour maps (ไพโรจน์, 2544) ดังภาพที่ 3 และ 4



ภาพที่ 3 แผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนองแบบ 2 มิติ (contour plot)

ที่มา: Anonymous (2008b)



ภาพที่ 4 แผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนองแบบ 3 มิติ (response surface plot)

ที่มา: Patrignani *et al.* (2006)

ขั้นตอนการทำ RSM

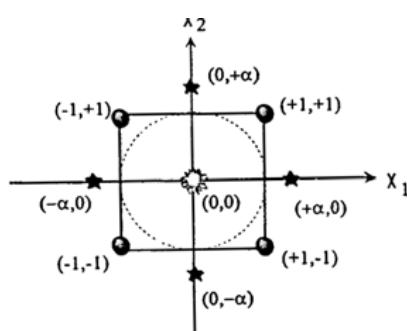
1. เลือกแผนการทดลองที่เหมาะสมที่สามารถให้ข้อมูลเพียงพอในการสร้างแผนภาพ surface plot คือ factorial in completely randomized design (CRD) หรือ randomized block design

(RBD), fractional factorial in CRD หรือ RBD, rotatable design, CCD, Box-Behnken design และ mixture design เป็นต้น

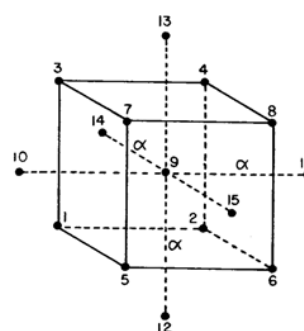
2. สร้างสมการ regression ที่ดีที่สุด สร้าง surface plot จากสมการที่หามาได้
3. ตรวจสอบ optimization
4. Verification โดยทำ independent run ภายใต้ขอบเขตของตัวแปรแต่ละตัว
5. ถ้าแบบจำลองไม่เหมาะสม (invalid) ให้สร้างแบบจำลองใหม่ (อนุวัตร, 2549)

18. แผนการทดลองแบบ CCD

เป็นแผนการทดลองที่ดัดแปลงมาจากการจัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียล ซึ่งเป็นการเพิ่มสิ่งทดลองระหว่างระดับของปัจจัย แต่เป็นการลดสิ่งทดลอง โดยจาก 3^3 factorial design จะมีสิ่งทดลองทั้งหมด 27 สิ่งทดลอง ในขณะที่ CCD 3 ปัจจัย จะมีการทดลองทั้งหมด $2^3 + (2 \times 3 + 1)$ โดยที่เทอม $(2n+1)$ เป็นจุดพิเศษที่เพิ่มขึ้นมา และเพิ่มการทดลองที่จุดตรงกลาง 3 ถึง 5 จุด จะได้เท่ากับ 20 สิ่งทดลอง (ไพโรจน์, 2544) ดังแสดงในภาพที่ 5 และตารางที่ 11



ก. แบบ 2 ตัวแปร



ข. แบบ 3 ตัวแปร

ภาพที่ 5 แสดงสิ่งทดลอง (design points) สำหรับสมการกำลังสอง

ที่มา: Gacula and Singh (1984), Hu (1999)

การคำนวณค่าระดับจริงที่ใช้ในการทดลอง ใช้สมการในการเปลี่ยนรหัส ดังนี้ (Neter *et al.*, 1996)

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i}$$

โดย x_i คือ ค่ารหัสของปัจจัยในการทดลอง

X_i คือ ค่าจริงของปัจจัยในการทดลอง

X_0 คือ ค่าเฉลี่ยของระดับของปัจจัยในการทดลอง

ΔX_i คือ ค่าช่วงกลางของระดับของปัจจัยในการทดลอง

ตารางที่ 11 ค่าของ code level ใน central composite design (CCD) สำหรับ 3 ปัจจัย

สิ่งทดลอง	ระดับของปัจจัย			สิ่งทดลอง	ระดับของปัจจัย		
	ปัจจัย A	ปัจจัย B	ปัจจัย C		ปัจจัย A	ปัจจัย B	ปัจจัย C
1	-1	-1	-1	11	0	-1.68	0
2	-1	-1	+1	12	0	+1.68	0
3	-1	+1	-1	13	0	0	-1.68
4	-1	+1	+1	14	0	0	+1.68
5	+1	-1	-1	15	0	0	0
6	+1	-1	+1	16	0	0	0
7	+1	+1	-1	17	0	0	0
8	+1	+1	+1	18	0	0	0
9	-1.68	0	0	19	0	0	0
10	+1.68	0	0	20	0	0	0

ที่มา: อนุวัตร (2549)

ตัวอย่างสิ่งทดลองที่ 1 ทำการทดลองที่ปัจจัย A มีระดับสูง (เครื่องหมาย -) ปัจจัย B มีระดับสูง (เครื่องหมาย -) และปัจจัย C มีระดับต่ำ (เครื่องหมาย -)

19. การวิเคราะห์สมการถดถอย

ในการแก้ปัญหาอาจมี 2 ตัวแปรหรือมากกว่ามาเกี่ยวข้องด้วย จึงมีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับการหาสมการสำหรับอธิบายความสัมพันธ์ของตัวแปรเหล่านั้นและค่าตอบสนอง ซึ่งสมการเหล่านี้ถูกนำไปใช้สำหรับทำนาย (prediction) หรือปรับกระบวนการให้เหมาะสม

โดยทั่วไปค่าตอบสนองหรือตัวแปรตามจะขึ้นกับตัวแปรอิสระ ความสัมพันธ์ของตัวแปรเหล่านี้ สามารถอธิบายได้โดยสมการทางคณิตศาสตร์ที่เรียกว่า สมการรีเกรสชัน หรือสมการถดถอย (regression equation)

วิธีการนี้อาจใช้วิเคราะห์ข้อมูลจากการทดลองที่ไม่ได้วางแผน เช่น อาจนำข้อมูลจากปรากฏการณ์ที่ไม่สามารถควบคุมได้ หรือข้อมูลทางประวัติศาสตร์ ใดๆก็ตามการวิเคราะห์นี้มีประโยชน์อย่างมากสำหรับการทดลองที่มีการวางแผนไว้ อาจกล่าวได้ว่าการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) เป็นการวางแผนการทดลองที่ช่วยในการจำแนกว่าปัจจัยใดสำคัญ ขณะที่สมการถดถอยใช้สำหรับสร้างสมการอธิบายความสัมพันธ์เชิงปริมาณของปัจจัยที่สำคัญต่อค่าตอบสนอง โดยโปรแกรมที่ใช้ในการวิเคราะห์ เช่น SPSS, SAS และ Microsoft Excel เป็นต้น

19.1 รีเกรสชันเส้นตรงแบบง่าย (simple linear regression)

หากต้องการหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระตัวแปรเดียว (X) และค่าตอบสนอง (Y) ตัวแปร X มักเป็นตัวแปรชนิดต่อเนื่อง นั่นคือสามารถควบคุมได้ด้วยผู้ทดลอง ซึ่งให้ค่าตอบสนองที่สังเกตได้หากความสัมพันธ์ระหว่าง X และ Y เป็นเส้นตรง สมการที่ได้จะเป็นดังนี้

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X + \varepsilon$$

โดย β_0 คือ ค่าคงที่
 β_1 คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของเส้นตรง
 ε คือ ค่าคลาดเคลื่อนสุ่ม

โดยค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (Coefficient of determination; R^2) เป็นการแสดงผลของตัวแปรต่อค่าตอบสนองที่สามารถอธิบายได้ และส่วนที่เหลือคือส่วนที่อธิบายไม่ได้ ดังนั้นหากสมการใดที่มีค่า R^2 ยิ่งสูงเท่าใด ความแม่นยำของการนำสมการไปใช้เพื่อทำนายหรือคาดคะเนผลลัพธ์ย่อมมีสูงยิ่งขึ้น โดยทั่วไปสมการที่มักนำไปใช้ ควรมีค่า R^2 อย่างน้อย 0.75 (Haaland, 1989; Hu, 1999) หากสูงกว่า 0.9 ถือว่าดีมาก (ค่า R^2 มีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1 โดยที่ 0 แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์ใดๆ ระหว่างตัวแปรอิสระ และค่าตอบสนอง และ 1 แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างสมบูรณ์)

ในการวิเคราะห์รีเกรสชัน ต้องทำการทดสอบสมมติฐาน ดังนี้

$$H_0 = \beta_1 = 0$$

$$H_1 = \beta_1 \neq 0$$

หากยอมรับ H_0 แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตาม และค่าตอบสนอง ($P > 0.05$) ในทิศทางตรงกันข้าม หากปฏิเสธ H_0 ($P \leq 0.05$) แสดงว่าย่อมมีความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตาม และค่าตอบสนอง หรือหากค่า $P > 0.05$ แสดงว่าสมการที่กำหนดไว้ไม่น่าสำคัญทางสถิติ

19.2 รีเกรสชันเส้นตรงแบบหลายตัวแปร (multiple linear regression)

ในการทดลองโดยทั่วไป มักมีตัวแปรอิสระที่สนใจศึกษามากกว่า 1 ตัวแปรหากความสัมพันธ์ระหว่าง X และ Y เป็นเส้นตรง สมการที่ได้จะเป็นดังนี้

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon$$

โดย β_0 คือ ค่าคงที่

β_1 คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของเส้นตรงของตัวแปร X_1

ε คือ ค่าคลาดเคลื่อนสุ่ม

โดยการทดสอบสมมติฐาน ดังนี้

$$H_0 = \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_k$$

$$H_1 = \beta_i \neq 0 \text{ อย่างน้อย 1 คู่}$$

หากผลการทดสอบสมมติฐาน ปฏิเสธ H_0 แสดงว่า มี β อย่างน้อย 1 ค่าที่ไม่เท่ากับ 0

เมื่อทำการวิเคราะห์หรีเกรสชัน ได้สมการแล้วจากสัมประสิทธิ์ของแต่ละตัวแปร ทำให้ทราบได้ว่าตัวแปรใดมีอิทธิพลสูงกว่า หากสัมประสิทธิ์ของตัวแปรสูงกว่าตัวแปรอื่น (ไม่คิดเครื่องหมายบวกหรือลบ โดยเครื่องหมายดังกล่าวแสดงถึงความสัมพันธ์ที่แปรผันตามหรือผกผัน) ย่อมแสดงว่าตัวแปรนั้นมีอิทธิพลต่อค่าตอบสนองสูงกว่าอีกตัวแปรหนึ่ง นอกจากนี้อาจสังเกตได้จากค่า P ของตัวแปร โดยยิ่งค่า P น้อยเท่าใด จะมีอิทธิพลมากขึ้นเท่านั้น (อิสรพงษ์, 2550)

ตัวอย่างงานวิจัยที่น่าแผนการทดลองแบบ CCD และ RSM มาประยุกต์ใช้สำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอส มีดังนี้

Adinarayana and Ellaiah (2002) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. EP-11 โดยใช้แผนการทดลองแบบ CCD และ RSM พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะ คือ กลูโคส 7.798 กรัมต่อลิตร เปปโตน 9.548 กรัมต่อลิตร และสารละลายเกลือ 8.757 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

Beg *et al.* (2002) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *B. mojavensis* โดยใช้แผนการทดลองแบบ face- central composite design และ RSM พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ casamino acid 12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กลูโคส 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อัตราการ

กวน 250 rpm ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น ($A_{550} \cong 0.250$) และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง โดยกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะดังกล่าวเท่ากับ 1,133 units/ml

Thys *et al.* (2006) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Microbacterium* sp. สำหรับย่อยขนนก โดยใช้แผนการทดลองแบบ 2^3 factorial design และ RSM พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 และใช้ feather meal เป็นสับสเตรทเท่ากับ 12.5 กรัมต่อลิตร โดยกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 202.7 units/ml

Tari *et al.* (2006) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. L21 โดยใช้แผนการทดลองแบบ Box-Behnken design, CCD และ RSM พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 306.5 units/ml เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะ คือ ถั่วเหลืองบด 3 กรัมต่อลิตร มอลโตส 50 ประมาณ 30 ถึง 40 กรัมต่อลิตร และ Tween 80 0.35 กรัมต่อลิตร

Rao *et al.* (2006) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Beauveria bassiana* โดยใช้แผนการทดลองแบบ CCD และ RSM พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ คือ เปลือกกุ้งบด 0.72 เปอร์เซ็นต์ (w/v) soy powder 0.6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ชูโครส 0.19 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และ yeast extract 0.68 เปอร์เซ็นต์ (w/v) โดยกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 280.72 units/ml

Guangrong *et al.* (2008) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ thermostable neutral protease จาก *Bacillus* sp. HS08 โดยใช้แผนการทดลองแบบ CCD และ RSM พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ คือ แป้งข้าวโพด 19.8 กรัมต่อลิตร ถั่วเหลืองบด 9.7 กรัมต่อลิตร กลูโคส 3.6 กรัมต่อลิตร และ yeast extract 3.9 กรัมต่อลิตร โดยกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้สูงสุดเท่ากับ 6,804 units/ml

Wang *et al.* (2008) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ cold-active protease จาก *Colwellia* sp. NJ341 โดยใช้แผนการทดลองแบบ 2^4 full factorial CCD และ RSM พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 183.21 units/ml เมื่อเพาะเลี้ยงในเคซีน 5.18 กรัมต่อลิตร sodium citrate 3.84 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 7.96 องศาเซลเซียส และ Tween 80 0.23 กรัมต่อลิตร

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1.1 ถังหมัก Biostat B (B. Braun Biotech International) ขนาด working volume สูงสุด 2 ลิตร พร้อมอุปกรณ์ควบคุม และตรวจวัดค่าพารามิเตอร์ที่จำเป็น ได้แก่ ค่าพีเอช ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายน้ำ (DO) และอุณหภูมิ เป็นต้น

1.2 เครื่องวัดค่าพีเอช (pH-meter; consort model C830)

1.3 เครื่องเขย่าแบบหมุนวน (rotary shaker)

1.4 เครื่องแก้วที่จำเป็นสำหรับการทดลอง

2. อุปกรณ์ในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส

2.1 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer; JENWAY, 6405 UV/Vis)

2.2 อ่างควบคุมอุณหภูมิน้ำ (water bath; JENO TECH, WBC-10W)

2.3 Automatic pipette (Socorex)

2.4 เครื่องแก้วที่จำเป็นสำหรับการทดลอง

วิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ *Bacillus* sp. C4 โดยสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสในการลอกกาไหมได้ ซึ่งคัดแยกมาจากน้ำทิ้งโรงงานผลิตเส้นไหม เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อซึ่งผสมกับกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์

1.2 การเตรียมกล้าเชื้อ

นำ *Bacillus* sp. C4 ซึ่งเก็บโดยวิธีแช่เยือกแข็ง (freezing) มาหลอมละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำมาจีดเชื้อ (streak) ลงบนอาหาร Davis minimal medium agar ที่เติมผงไหมดิบ (raw silk) พีเอช 7.5 (Davis and Mingioli, 1950; ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำซ้ำอีกครั้ง ถ่ายเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวมาเพาะเลี้ยงในอาหาร Basal medium (BMSM medium) พีเอช 7.5 (สุทธิดา, 2548) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติก ขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วบ่มบนเครื่องเขย่า 200 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อมา 1 หลอด มาทำซ้ำอีกครั้งตามขั้นตอนดังกล่าว แล้วปรับค่าความขุ่นของ culture broth ให้ได้ 0.3 ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ($OD_{660\text{ nm}}$) โดยใช้กล้าเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เพื่อใช้ในการทดลองการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับลอกกาไหมต่อไป

1.3 การเพาะเลี้ยงในพลาสติก

ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 1.2 จำนวน 2 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสูตรอาหารต่างๆ ตามแผนการทดลอง ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยบรรจุในพลาสติก ขนาด 500 มิลลิลิตร ส่วนสภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อนั้นแตกต่างกันไปตามแผนการทดลองเช่นกัน โดยเก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง และนำไปวิเคราะห์การเจริญโดยวิธี variable cell count อีกส่วนหนึ่งนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อแยกเซลล์ออก เก็บส่วนใสไว้

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (จุฑาพร, 2543; ภาคผนวก ข) และน้ำตาลกลูโคส (Nelson, 1944) โดยทำการบ่มเป็นเวลา 36 ชั่วโมง

2. การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเพาะเลี้ยง

2.1 การศึกษาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส สำหรับลอกกาวไหม จาก *Bacillus* sp. C4

ถ่ายกล้ำเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 1.2 ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM medium พีเอช 7.5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร เขย่า 200 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เพื่อนำมาวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ เช่นเดียวกับข้อ 1.3

2.2 การคัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และสารเหนียวน้ำ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส สำหรับลอกกาวไหม จาก *Bacillus* sp. C4

ทำการคัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และสารเหนียวน้ำ ที่ให้การผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด คือ แหล่งคาร์บอน 5 ชนิด ได้แก่ กลูโคส (glucose) ซูโครส (sucrose) แลคโตส (lactose) แป้งมัน (cassava starch) และแป้งมันไฮโดรไลซ์ (hydrolyzed cassava starch) แหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด ได้แก่ yeast extract แป้งข้าวโพด (corn starch) และแป้งถั่วเหลือง (soy flour) และสารเหนียวน้ำ 3 ชนิด ได้แก่ skim milk เซรีซิน และไหมดิบ โดยถ่ายกล้ำเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 1.2 ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ลงในอาหาร BSM medium จัดแปลงประกอบเป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 12 บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างมาวิเคราะห์ค่าต่างๆ เช่นเดียวกับข้อ 1.3 แล้ววิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Student's *t*-test เพื่อคัดเลือกแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และสารเหนียวน้ำ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสดังกล่าวโดย *Bacillus* sp. C4

ตารางที่ 12 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการคัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอน
ไนโตรเจนและสารเหนียวน้ำที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอส สำหรับ
ลอกกาไวม จาก *Bacillus* sp. C4

สิ่งทดลอง	สูตรดัดแปลงอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM medium
1	BSM medium (control)
2	BSM medium (ไม่เติมสารเหนียวน้ำ)
3	BSM medium (กลูโคส 1% (w/v) และแป้งถั่วเหลือง 0.5% (w/v))
4	BSM medium (กลูโคส 1% (w/v) และแป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))
5	BSM medium (ซูโครส 1% (w/v) และ Yeast extract 0.5% (w/v))
6	BSM medium (ซูโครส 1% (w/v) และแป้งถั่วเหลือง 0.5% (w/v))
7	BSM medium (ซูโครส 1% (w/v) และแป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))
8	BSM medium (แลคโตส 1% (w/v) และ Yeast extract 0.5% (w/v))
9	BSM medium (แลคโตส 1% (w/v) และแป้งถั่วเหลือง 0.5% (w/v))
10	BSM medium (แลคโตส 1% (w/v) และแป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))
11	BSM medium (แป้งมัน 2% (w/v) และ Yeast extract 0.5% (w/v))
12	BSM medium (แป้งมัน 2% (w/v) และแป้งถั่วเหลือง 0.5% (w/v))
13	BSM medium (แป้งมัน 2% (w/v) และแป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))
14	BSM medium (แป้งมัน 0.5% (w/v) ผสมกลูโคส 0.5% (w/v) และ Yeast extract 0.5 % (w/v))
15	BSM medium (แป้งมัน 0.5% (w/v) ผสมกลูโคส 0.5% (w/v) และแป้งถั่วเหลือง 0.5% (w/v))
16	BSM medium (แป้งมัน 0.5% (w/v) ผสมกลูโคส 0.5% (w/v) และแป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))
17	BSM medium (แป้งมันไฮโดรไลซ์ 2% (w/v) และ Yeast extract 0.5% (w/v))
18	BSM medium (แป้งมันไฮโดรไลซ์ 2% (w/v) และแป้งถั่วเหลือง 0.5% (w/v))
19	BSM medium (แป้งมันไฮโดรไลซ์ 2% (w/v) และแป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))
20	BSM medium (แป้งมันไฮโดรไลซ์ 0.5% (w/v) ผสมกลูโคส 0.5% (w/v) และ Yeast extract 0.5% (w/v))

ตารางที่ 12 (ต่อ)

สิ่งทดลอง	สูตรดัดแปลงอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM medium
21	BSM medium (แป้งมันไฮโดรไลซ์ 0.5% (w/v) ผสมกลูโคส 0.5% (w/v) และแป้งถั่วเหลือง 0.5% (w/v))
22	BSM medium (แป้งมันไฮโดรไลซ์ 0.5% (w/v) ผสมกลูโคส 0.5% (w/v) และแป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))
23	BSM medium (เติมเซรีซิน แทน skim milk)
24	BSM medium (เติมไหมดิบ แทน skim milk)
25	BSM medium (ไม่เติมแหล่งคาร์บอน)
26	BSM medium (ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน)

2.3 การกลั่นกรองปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับลอกกาเซรีซิน จาก *Bacillus* sp. C4 โดยใช้ Plackett and Burman design

เมื่อทำการคัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และสารเหนียวจากข้อ 2.2 จากนั้นทำการกลั่นกรองปัจจัย โดยใช้ Plackett and Burman design (Plackett and Burman, 1946) สำหรับคัดเลือกปัจจัยหลักที่ให้อิทธิพลของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด จากทั้งหมด 7 ปัจจัย ดังนี้ แหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน สารเหนียว ที่คัดเลือกจากข้อ 2.2 ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง ความเร็วรอบในการเขย่า และปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น ดังแสดงในตารางที่ 13 ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวนสิ่งทดลองทั้งหมด 12 สิ่งทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 14 โดยใช้การเพาะเลี้ยงเชื้อตามวิธีในข้อ 1.3 จากนั้นทำการคัดเลือกปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยเก็บตัวอย่างหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของการเจริญ เช่นเดียวกับข้อ 1.3 แล้ววิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยวิธี Student's *t*-test เพื่อนำมาศึกษาในขั้นต่อไป

ตารางที่ 13 ระดับของปัจจัยต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับลวกกวางไหม
จาก *Bacillus* sp. C4 โดยใช้ Plackett and Burman design

ปัจจัย	หน่วย	รหัสปัจจัย	ค่าปัจจัยในการทดลอง	
			ค่าสูง (+1)	ค่าต่ำ (-1)
แหล่งคาร์บอนที่คัดเลือกจากข้อ 2.2	g/l	X ₁	2.00	0.50
แหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกจากข้อ 2.2	g/l	X ₂	1.00	0.25
สารเหนียวน้ำที่คัดเลือกจากข้อ 2.2	g/l	X ₃	2.00	0.20
ค่าพีเอชเริ่มต้น	-	X ₄	9.50	6.50
อุณหภูมิ	°C	X ₅	37.00	30.00
ความเร็วรอบในการเขย่า	rpm	X ₆	250.00	100.00
ปริมาณกล้ายเชื้อ	% (v/v)	X ₇	5.00	2.00

ตารางที่ 14 ตารางเมตริกของการจัดการทดลอง Plackett and Burman design ที่มีปัจจัยต้อง
กลั่นกรอง จำนวน 7 ปัจจัย ที่ใช้ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับ
ลวกกวางไหมโดย *Bacillus* sp. C4

สิ่ง ทดลอง	ปัจจัย										
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	Dummy	Dummy	Dummy	Dummy
1	2.00	1.00	0.20	9.50	37.00	250.00	2.00	-	-	+	-
2	2.00	0.25	2.00	9.50	37.00	100.00	2.00	-	+	-	+
3	0.50	1.00	2.00	9.50	30.00	100.00	2.00	+	-	+	+
4	2.00	1.00	2.00	6.50	30.00	100.00	5.00	-	+	+	-
5	2.00	1.00	0.20	6.50	30.00	250.00	2.00	+	+	-	+
6	2.00	0.50	0.20	6.50	37.00	100.00	5.00	+	-	+	+
7	0.50	0.50	0.20	9.50	30.00	250.00	5.00	-	+	+	+
8	0.50	0.50	2.00	6.50	37.00	250.00	2.00	+	+	+	-
9	0.50	1.00	0.20	9.50	37.00	100.00	5.00	+	+	-	-
10	2.00	0.50	2.00	9.50	30.00	250.00	5.00	+	-	-	-
11	0.50	1.00	2.00	6.50	37.00	250.00	5.00	-	-	-	+
12	0.50	0.50	0.20	6.50	30.00	100.00	2.00	-	-	-	-

2.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส สำหรับลอกกาวไหมจาก *Bacillus* sp. C4 โดยใช้แผนการทดลอง CCD และ RSM

จากการกลั่นกรองปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยใช้ Plackett and Burman design ตามการทดลองในข้อ 2.3 ทำการคัดเลือกมา 3 ปัจจัย คือ แป้งถั่วเหลือง skim milk และความเร็วรอบในการเขย่า นำมาศึกษาต่อโดยใช้แผนการทดลอง CCD และสร้างแผนภาพพื้นผิวตอบสนอง เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพื่อลอกกาวไหม โดยแผนการทดลองนี้ประกอบด้วยระดับของปัจจัย คือ full 2^3 factorial design จำนวน 8 การทดลอง การทำซ้ำที่ระดับการทดลอง central points จำนวน 3 การทดลอง และระดับที่ถูกเพิ่มจากเดิมของแต่ละระดับของปัจจัย จำนวน 6 การทดลอง รวมเป็นจำนวนสิ่งทดลองทั้งหมด 17 การทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 15 และ 16 ซึ่งค่าของปัจจัยต่างๆ ถูกแทนด้วยรหัสของปัจจัย ซึ่งคำนวณ ดังนี้

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i}$$

โดย x_i คือ ค่ารหัสของปัจจัยในการทดลอง

X_i คือ ค่าจริงของปัจจัยในการทดลอง

X_0 คือ ค่าเฉลี่ยของระดับของปัจจัยในการทดลอง

ΔX_i คือ ค่าช่วงกลางของระดับของปัจจัยในการทดลอง

ตารางที่ 15 ค่าระดับของแต่ละปัจจัยที่เป็นตัวแปรอิสระต่างๆ ในแผนการทดลอง CCD ที่ใช้ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับลอกกาวไหม โดย *Bacillus* sp. C4

ปัจจัย	รหัสปัจจัย	ระดับของปัจจัย				
		- 1.68	-1	0	+1	+1.68
แป้งถั่วเหลือง	x_1	0.18	0.5	1.5	2.5	3.18
skim milk	x_2	0.032	0.1	0.2	0.3	0.368
ความเร็วรอบในการเขย่า	x_3	110	150	200	250	280

ตารางที่ 16 แผนการทดลอง CCD ที่ใช้ในการศึกษาปัจจัยจำนวน 3 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับลอกกาวยาไหมโดย *Bacillus* sp. C4 ซึ่งมีจำนวนหน่วยทดลองทั้งหมด 17 สิ่งทดลอง

สิ่งทดลอง	ค่าของปัจจัยในการทดลอง			ระดับของปัจจัยในการทดลอง
	x_1	x_2	x_3	
1	0.5	0.1	150	full 2^3 factorial design
2	2.5	0.1	150	
3	0.5	0.3	150	
4	2.5	0.3	150	
5	0.5	0.1	250	
6	2.5	0.1	250	
7	0.5	0.3	250	
8	2.5	0.3	250	
9	1.5	0.2	200	Center points
10	1.5	0.2	200	
11	1.5	0.2	200	
12	0.18	0.2	200	Axial points
13	1.5	0.032	200	
14	1.5	0.2	110	
15	3.18	0.2	200	
16	1.5	0.368	200	
17	1.5	0.2	280	

จากนั้นทำการตรวจวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส และค่าพารามิเตอร์ต่างๆ เช่นเดียวกับข้อ 1.3 แล้วนำค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้ทั้ง 17 สิ่งทดลองมาวิเคราะห์ผลการทดลอง และสร้างแผนภาพพื้นผิวตอบสนองสำหรับผลการทดลอง อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างผลตอบสนองของตัวแปร และปัจจัยของปัจจัย 3 ปัจจัย มีรูปแบบของสมการลำดับสองดังนี้

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3$$

โดย	Y	คือ ค่าทำนายของค่าตอบสนอง
	b_0	คือ ค่าระดับของ y เมื่อ x เท่ากับศูนย์ (y-intercept)
	b_1, b_2, b_3	คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของเส้นตรง (linear coefficients)
	b_{11}, b_{22}, b_{33}	คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของกำลังสอง (squared coefficients)
	b_{12}, b_{13}, b_{23}	คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของปฏิกริยาสัมพันธ์ (interaction coefficients)

2.5 การตรวจสอบ (validation) สมการอธิบายการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับลวกกวางไหม จาก *Bacillus* sp. C4

หลังจากทำการวิเคราะห์สมการถดถอย และสร้างแผนภาพพื้นผิวตอบสนอง เพื่อหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในข้อ 2.4 แล้ว จากนั้นทำการตรวจสอบสมการอธิบายการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยการสุ่มเลือกระดับปัจจัยจากแผนภาพพื้นผิวตอบสนองที่ให้ผลของกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด มาทดลองเพื่อเปรียบเทียบกับค่าทำนายที่ได้จากสมการ โดยทำการเติกกัวเชื้อที่ปรับความขุ่นตามวิธีในข้อ 1.2 จำนวน 2 เปอร์เซ็นต์ (v/v) โดยเก็บตัวอย่างจากการเพาะเลี้ยงที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ของการเจริญ เช่นเดียวกับข้อ 1.3

2.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักเพื่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับลวกกวางไหม จาก *Bacillus* sp. C4

ถ่ายกัวเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 1.2 จำนวน 2 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ลงในถังหมัก ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากข้อ 2.4 ปริมาตร 1.5 ลิตร โดยควบคุมอัตราการกวนที่ 350 rpm อัตราการให้อากาศ 2 vvm ค่า DO เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว ค่าพีเอช 7.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้คงที่ตลอดการทดลอง โดยเก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 30 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ค่าต่างๆ เช่นเดียวกับข้อ 1.3

3. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำผลค่าตอบสนองมาวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปร (ANOVA) สร้างสมการถดถอย ด้วยโปรแกรม SPSS for windows version 12.0 (SPSS Thailand., Inc.) และสร้างแผนภาพพื้นผิวตอบสนอง ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

สถานที่ทำการทดลอง

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

ระยะเวลาในการทดลอง

เดือนมกราคม 2551 ถึง มกราคม 2552 รวมระยะเวลาทั้งสิ้น 1 ปี

ผลและวิจารณ์

1. ผลการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับการลอกกาไหม

จากการศึกษาผลการเจริญและการผลิตโปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับการลอกกาไหม โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร BSM medium พีเอช 7.5 ปริมาณ 100 ml ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 rpm เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยแบ่งตัวอย่างออกเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำมานับปริมาณเซลล์โดย viable plate count และวัดค่าพีเอช ส่วนที่สองนำมาปั่นแยกส่วนใส เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. C4 พบว่าค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.42 h^{-1} และผลได้ของการผลิตต่อมวลของสับสเตรท (Yp/s) เท่ากับ 75.13 ภาพที่ 6 แสดงการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดย *Bacillus* sp. C4 พบว่าเชื้อจะเริ่มผลิตเอนไซม์โปรติเอสอย่างรวดเร็วหรืออยู่ในช่วง exponential phase และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด ในชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 729.0 units/ml โดยในระหว่างชั่วโมงที่ 12 ถึง 18 การเจริญค่อนข้างคงที่ ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ยังคงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่อัตราการเพิ่มต่ำกว่าช่วง log phase จากภาพจะเห็นว่าการเจริญของ *Bacillus* sp. C4 และการผลิตเอนไซม์มีแนวโน้มจะคล้อยตามกันหรือเป็นแบบ growth-associated pattern มีผู้รายงานว่าเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจะถูกหลั่งออกมาภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงแรกของการเจริญเช่นกัน (Kaur *et al.*, 2001; Uyar and Baysal, 2004; Reddy *et al.*, 2008) และแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* มักผลิตเอนไซม์โปรติเอสในช่วงระหว่างระยะสุดท้ายของ exponential phase จนถึงระยะ stationary phase (Schaeffer, 1969; Dawson and Kurz, 1969; Ward, 1985; Kole *et al.*, 1987) และหลังจากชั่วโมงที่ 24 การเจริญของเชื้อเข้าสู่ระยะ death phase กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและปริมาณเชื้อลดลง เนื่องจากน้ำตาลที่เป็นสับสเตรทมีปริมาณลดลง และเกิดการสะสมของสารเมแทบอลิต์ที่เป็นพิษ เกิด cell lysis รวมถึงการเกิด autolysis (Jang *et al.*, 2001) หรือเกิด protease degradation โดยเอนไซม์โปรติเอสบางชนิดบนพื้นผิวเซลล์ในสภาวะที่เซลล์ขาดไนโตรเจน (nitrogen-starved cell) (Chu *et al.*, 1992; Beg *et al.*, 2002) ทำให้จำนวนเชื้อลดลง จึงมีผลทำให้การผลิตเอนไซม์โปรติเอสลดลงด้วย

อย่างไรก็ตามมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. มีช่วงระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสแตกต่างกันไป คือ อยู่ในช่วง 24 ถึง 120 ชั่วโมง (Chu *et al.*, 1992; Mabrouk *et al.*, 1999; Beg and

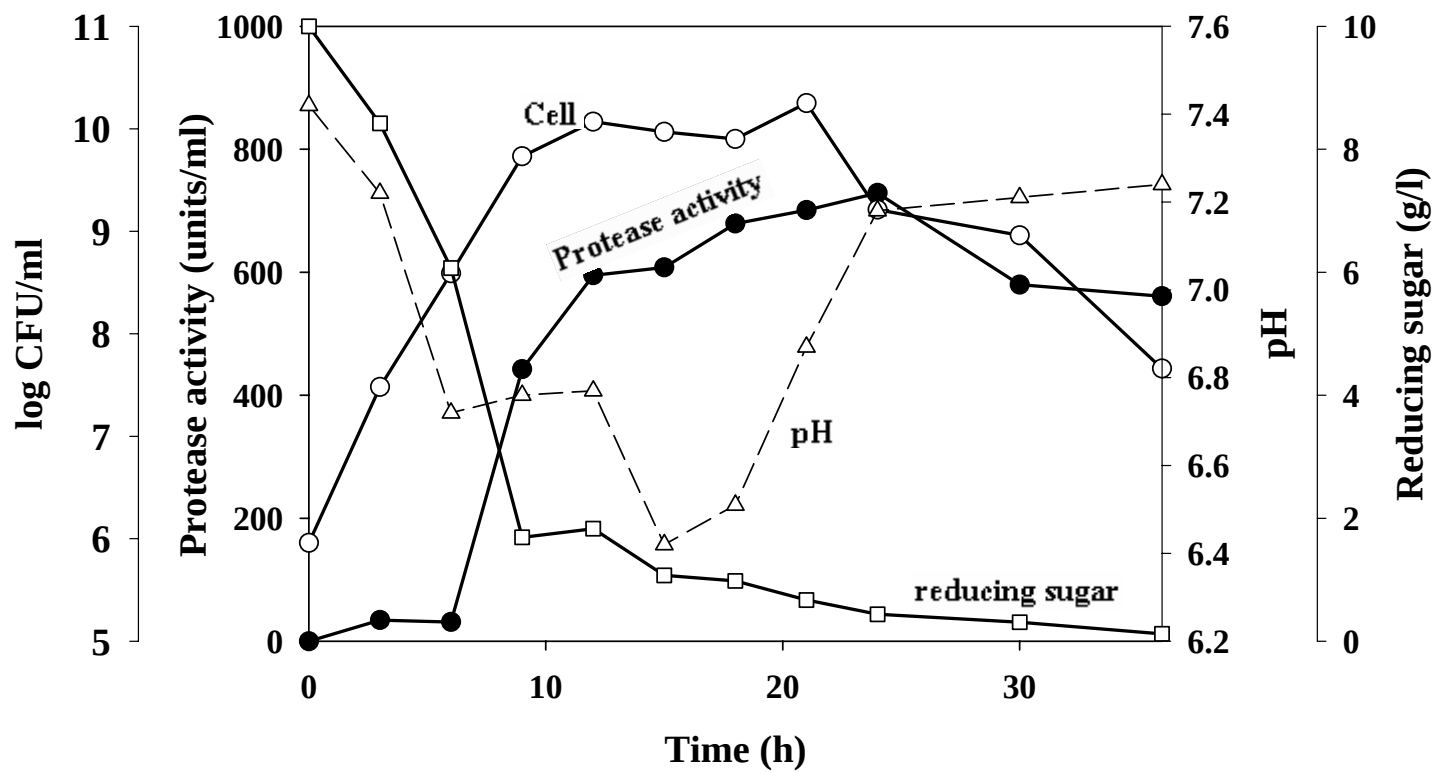
Gupta, 2003; Tari *et al.*, 2006)

เนื่องจาก *Bacillus* sp. C4 สามารถผลิตโปรตีนได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง ดังนั้นการทดลองต่อไปจะเก็บตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมง

2. การคัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีนจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับการลอกกาวยไหม

จากผลการศึกษาหาชนิดของแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีนโดย *Bacillus* sp. C4 สำหรับการลอกกาวยไหม ได้ทดลองเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. C4 ในอาหาร BSM medium ที่ใช้แหล่งคาร์บอน 5 ชนิด คือ กลูโคส ซูโครส แลคโตส แป้งมัน และแป้งมันไฮโดรไลซ์ ใช้แป้งข้าวโพด และแป้งถั่วเหลือง แทน yeast extract ใน BSM medium ทำให้ได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 23 สูตร (ตารางที่ 17) แล้วควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติจึงทำทั้งหมด 3 ซ้ำ พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้แป้งมันไฮโดรไลซ์ 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้แป้งถั่วเหลือง 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน ให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเกิดขึ้นสูงสุดเท่ากับ 850.9 units/ml และเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้แป้งมันเป็นแหล่งคาร์บอน และแป้งถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าได้กิจกรรมของเอนไซม์เกิดขึ้นน้อยที่สุดซึ่งเท่ากับ 8.2 units/ml ดังแสดงในตารางที่ 17

จากผลวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$; $R^2 = 0.996$) (ตารางผนวกที่ 1, 2) ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวสามารถอธิบายได้ว่าแป้งมันไฮโดรไลซ์ เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรตีนจาก *Bacillus* sp. C4 ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Fogarty and Griffin (1973) ที่กล่าวว่า แป้งมันไฮโดรไลซ์ส่งเสริมการเจริญของ *Bacillus polymyxa* และผลิตเอนไซม์โปรตีนสูงสุด ส่วนแป้งมันเป็นแหล่งคาร์บอนที่ไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรตีนจาก *Bacillus* sp. C4 อาจเนื่องมาจาก *Bacillus* sp. C4 สร้างเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยสลายแป้งพวกแป้งได้น้อย แม้ว่าจากรายงานที่พบว่า *Bacillus subtilis* สามารถผลิตได้ทั้งเอนไซม์อะไมเลส และโปรตีนก็ตาม (Debabov, 1982)



ภาพที่ 6 การเจริญ และการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *Bacillus* sp. C4 สำหรับลือกาวไหมในอาหารเหลว BMSM medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ 200 rpm เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง

2. การคัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับการลอกกาวยไหม

จากผลการศึกษาหาชนิดของแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดย *Bacillus* sp. C4 สำหรับการลอกกาวยไหม ได้ทดลองเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. C4 ในอาหาร BSM medium ที่ใช้แหล่งคาร์บอน 5 ชนิด คือ กลูโคส ซูโครส แลคโตส แป้งมัน และแป้งมันไฮโดรไลซ์ ใช้แป้งข้าวโพด และแป้งถั่วเหลือง แทน yeast extract ใน BSM medium ทำให้ได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด 23 สูตร (ตารางที่ 17) แล้วควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติจึงทำทั้งหมด 3 ซ้ำ พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้แป้งมันไฮโดรไลซ์ 2 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้แป้งถั่วเหลือง 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน ให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเกิดขึ้นสูงสุดเท่ากับ 850.9 units/ml และเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ใช้แป้งมันเป็นแหล่งคาร์บอน และแป้งถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าได้กิจกรรมของเอนไซม์เกิดขึ้นน้อยที่สุดซึ่งเท่ากับ 8.2 units/ml ดังแสดงในตารางที่ 17

จากผลวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$; $R^2 = 0.996$) (ตารางผนวกที่ 1, 2) ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวสามารถอธิบายได้ว่าแป้งมันไฮโดรไลซ์ เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Fogarty and Griffin (1973) ที่กล่าวว่า แป้งมันไฮโดรไลซ์ส่งเสริมการเจริญของ *Bacillus polymyxa* และผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด ส่วนแป้งมันเป็นแหล่งคาร์บอนที่ไม่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 อาจเนื่องมาจาก *Bacillus* sp. C4 สร้างเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยสลายแป้งพวกแป้งได้น้อย แม้ว่าจากรายงานที่พบว่า *Bacillus subtilis* สามารถผลิตได้ทั้งเอนไซม์อะไมเลส และโปรติเอสก็ตาม (Debabov, 1982)

ตารางที่ 17 ผลของแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *Bacillus* sp. C4 สำหรับการลอกกวไหม^{1/}

แหล่งคาร์บอน (% (w/v))	แหล่งไนโตรเจน (0.5% (w/v)) ^{2/}		
	Yeast extract	แป้งถั่วเหลือง	แป้งข้าวโพด
กลูโคส 1% (w/v)	725.3 ± 10.40 ^f	756.4 ± 28.29 ^f	26.4 ± 2.67 ^a
ซูโครส 1% (w/v)	721.8 ± 24.82 ^f	637.7 ± 62.99 ^e	28.4 ± 1.98 ^a
แลคโตส 1% (w/v)	440.5 ± 18.14 ^c	539.5 ± 52.59 ^d	33.9 ± 1.83 ^a
เป้งมัน 2% (w/v)	43.8 ± 0.63 ^a	8.2 ± 0.12 ^a	20.4 ± 3.24 ^a
เป้งมัน 0.5% (w/v)	498.9 ± 5.53 ^{cd}	18.8 ± 0.35 ^a	561.4 ± 21.31 ^d
ผสมกลูโคส 0.5% (w/v)			
เป้งมันไฮโดรไลซ์ 2% (w/v)	684.2 ± 9.25 ^{ef}	850.9 ± 72.12 ^g	722.8 ± 16.93 ^f
เป้งมันไฮโดรไลซ์ 0.5% (w/v)	755.6 ± 25.33 ^f	356.1 ± 65.17 ^d	645.0 ± 40.79 ^f
ผสมกลูโคส 0.5% (w/v)			
BMSM medium (ไม่เติมแหล่งคาร์บอน)		201.9 ± 9.80 ^b	
BMSM medium (ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน)		119.7 ± 2.93 ^a	

หมายเหตุ ^{1/}อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง คือ BMSM medium สูตรดัดแปลงที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนแทนที่จากสูตรอาหารเดิมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 200 rpm เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

^{2/}ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± standard deviation)

a, b, c, d, e, f ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P ≤ 0.05)

นอกจากแป้งมันสำปะหลังแล้ว ยังมีสับสเตรทจำพวกแป้งที่เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีกว่า กลูโคส เพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. เช่น *Bacillus* sp. JB-99 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากการใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสูงกว่าเมื่อใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน (Johnversly and Naik, 2001) เหมือนกับรายงานการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. 2-5 ซึ่งพบว่าเมื่อใช้แป้ง 5% (w/v) เป็นสับสเตรท ให้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 2,500.0 units/ml ในขณะที่ กลูโคส 1% (w/v) ให้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 1,600.0 units/ml (Falahatpishe *et al.*, 2007) เช่นเดียวกับรายงานที่พบว่า แป้งสาลีให้การผลิตเอนไซม์โปรติเอส ใน *Bacillus* sp. เท่ากับ 1,110.0 units/ml ซึ่งสูงกว่าน้ำตาลกลูโคส (850.0 units/ml) (Chu, 2007) ซึ่งสอดคล้องกับ Saurabh *et al.* (2007) ที่กล่าวว่า การผลิตเอนไซม์โปรติเอสใน *Bacillus* sp. พบว่าเมื่อใช้รำข้าวสาลีเป็นสับสเตรท ให้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 1,373.0 units/ml ซึ่งสูงกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส (1,100.0 units/ml)

นอกจากนี้มีรายงานว่าแป้ง (Puri *et al.*, 2002) แป้งสาลี (Joo and Chang, 2005) เป็นแหล่งคาร์บอนเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากพวกเชื้อรา

ส่วนงานที่ศึกษาเกี่ยวกับแหล่งคาร์บอนอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. ได้แก่ อะราบีโนส (Phadatare *et al.*, 1993) กลูโคส (Mehrotara *et al.*, 1999; Joo *et al.*, 2002; Scigubabu *et al.*, 2006) มอลโตส (Tari *et al.*, 2006) กรดซิตริก (Johnversly and Naik, 2001) แลคโตส (Joo *et al.*, 2002) ฟรุคโตส (Mehrotara *et al.*, 1999) นอกจากนี้มีรายงานว่า การผลิตเอนไซม์โปรติเอสจะถูกยับยั้งเมื่อมีสารพวกคาร์โบไฮเดรต (กลูโคส ซูโครส และแลคโตส เป็นต้น) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิด “catabolic repression” ที่ถูกอธิบายใน *Pseudomonas maltophilia* (Boething, 1975) และ *Yersinia ruckeri* (Secades and Guijarro, 1999) ซึ่งสอดคล้องกับการอธิบายของ Hanlon *et al.* (1982) และ Kole *et al.* (1988b) ที่กล่าวว่า แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนเชิงซ้อน เป็นสับสเตรทที่เหมาะสมกว่าสับสเตรทพวกน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส เป็นต้น

สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกาวไหม คือ แป้งถั่วเหลือง ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานต่างๆ ที่กล่าวว่า ถั่วเหลือง เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอส คือ soyatose และ soyapeptone ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. brevis* (Banerjee *et al.*, 1999) อีกทั้ง

soybean meal ส่งเสริมการผลิตเอนไซม์โปรติเอส (Joo and Chang, 2005; Tari *et al.*, 2006; Chu, 2007; Nadeem *et al.*, 2008) แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส กล่าวคือ แหล่งอินทรีย์ในโตรเจน ได้แก่ ทรีปโตน (Phadatare *et al.*, 1993) beef extract (Naidu and Davi, 2005) ส่วนแหล่งอนินทรีย์ในโตรเจน ได้แก่ ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Scigubabu, 2006) NaNO_3 และโพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) (Johnvesly and Naik, 2001) หรือรำข้าวสาลี (Naidu and Davi, 2005; Sandhya *et al.*, 2005)

สำหรับการทดลองนี้ พบว่าแป้งข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่สามารถส่งเสริมการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยเฉพาะเมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. C4 ในอาหารที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ ซึ่งอาจเกิดจาก catabolic repression เพราะแป้งข้าวโพดมีแป้งเป็นองค์ประกอบเช่นกัน หรืออาจเกิดจากความไม่สมดุลระหว่างปริมาณแป้ง และไนโตรเจน แต่เมื่อใช้แป้งข้าวโพดผสมกับแป้งมันไฮโดรไลซ์ และแป้งมัน *Bacillus* sp. C4 สามารถผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้น จึงอธิบายได้ว่าการใช้แหล่งคาร์บอนดังกล่าว ทำให้มีปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่สูงมาก ทำให้ไม่เกิด catabolic repression และเชื้อใช้โมเลกุลแป้งที่ละน้อย ทำให้สร้างเอนไซม์โปรติเอสได้อย่างต่อเนื่อง

เมื่อพิจารณาในเรื่องของต้นทุนการผลิต และปริมาณผลผลิตที่ได้ของเอนไซม์โปรติเอสในระดับอุตสาหกรรมแล้ว การคัดเลือกสับสเตรทที่มีราคาต้นทุนต่ำ และสามารถหาได้ง่าย ให้ผลผลิตที่สูง นับว่าเป็นสิ่งที่สำคัญ ดังนั้นด้วยเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้นแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับลอกกาวไหม จาก *Bacillus* sp. C4 คือ แป้งมันไฮโดรไลซ์ และแป้งถั่วเหลือง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า แลคโตส แป้ง soy meal และซูโครส ถูกพิจารณาว่าเป็นแหล่งสับสเตรทที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส (Sonnleither, 1983) เช่นเดียวกัน

3. การคัดเลือกสารเหนียวหน้าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับการลอกกาวไหม

ในการคัดเลือกสารเหนียวหน้าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับการลอกกาวไหม โดยเติม skim milk เซรีซิน หรือไหมดิบ ลงใน BMSM medium ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารเหนียวหน้าที่ให้

กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด คือ skim milk เท่ากับ 805.2 units/ml และสารเหนียวน้ำที่เกิดการผลิตเอนไซม์น้อยที่สุด คือ ไหมดิบ เท่ากับ 399.4 units/ml ดังแสดงในตารางที่ 18

จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า สารเหนียวน้ำมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$; $R^2 = 0.997$) โดยสามารถอธิบายได้ว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ BSM medium ที่เติมสารเหนียวน้ำต่างชนิดกัน (ตารางผนวกที่ ง3, ง4) ส่งผลให้ *Bacillus* sp. C4 ผลิตเอนไซม์โปรติเอสแตกต่างกัน แสดงว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ *Bacillus* sp. C4 ผลิตนั้นจัดเป็น inducible enzyme

ตารางที่ 18 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของ *Bacillus* sp. C4 สำหรับการลอกกาวไหมจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BSM medium ที่เติมสารเหนียวน้ำต่างชนิดกัน^{1/}

สารเหนียวน้ำ	ปริมาณเซลล์ (log CFU/ml)	พีเอช	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส ^{2/} (units/ml)
skim milk	8.6	6.8	805.2 ± 12.00 ^d
เซรีซิน	8.0	6.8	785.0 ± 26.62 ^c
ไหมดิบ	8.0	6.0	399.4 ± 5.95 ^a
BSM medium (ไม่เติมสารเหนียวน้ำ)	9.0	6.3	504.1 ± 7.5 ^b

หมายเหตุ ^{1/}อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง คือ BSM medium สูตรดัดแปลงที่มีการเติมสาร

เหนียวน้ำแทน skim milk จากสูตรอาหารเดิมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เขย่า 200 rpm เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

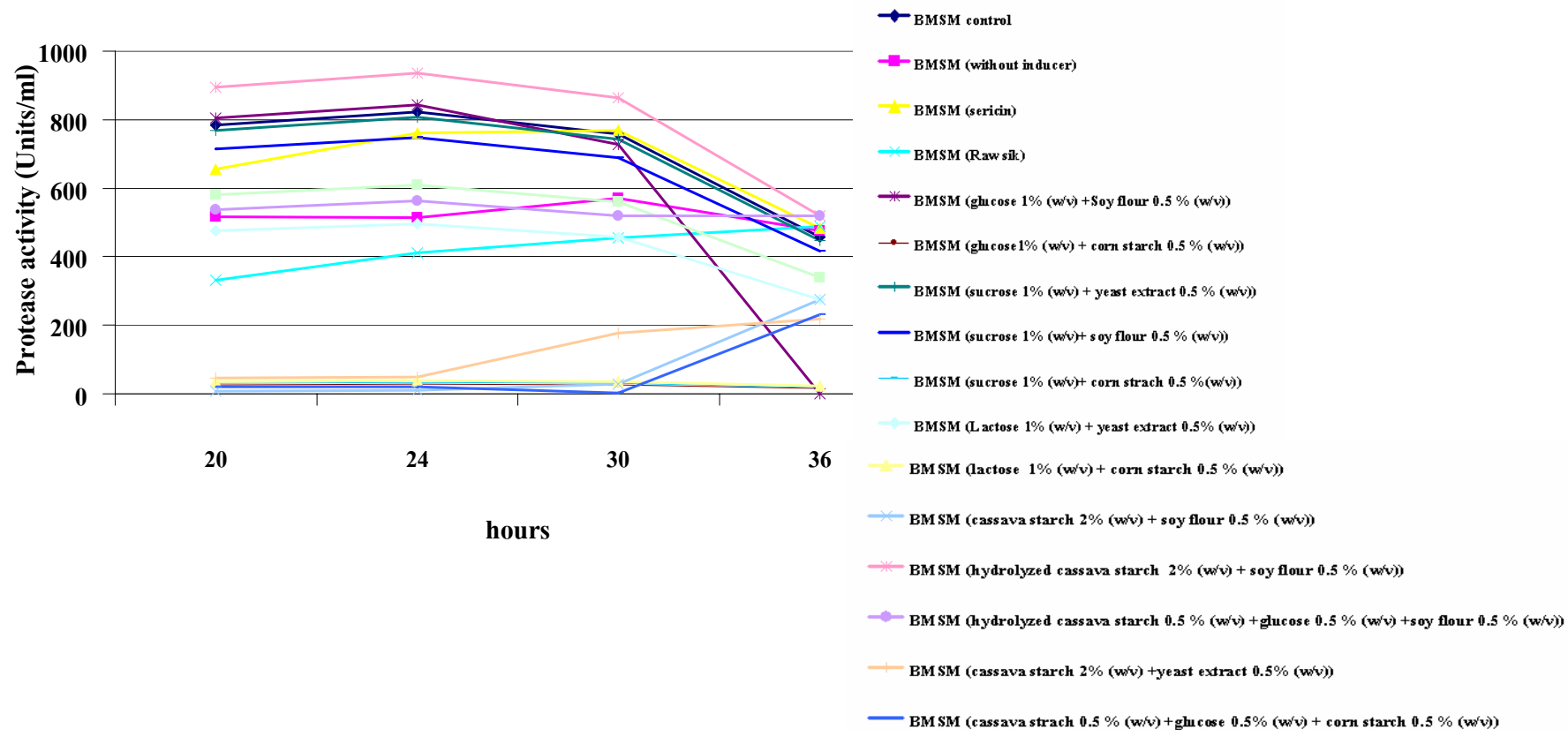
^{2/}ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± standard deviation)

a, b, c, d ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($P \leq 0.05$)

นอกจากนี้มียางานว่าแหล่งไนโตรเจนบางชนิดมีคุณสมบัติเป็นสารเหนียวนำของการผลิตเอนไซม์โปรติเอส เช่น soybean meal เป็นสารเหนียวนำที่ดีที่สุด สำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Conidiobolus coronatus* (Laxman *et al.*, 2005) หรือ *Bacillus* sp. (Saurabh *et al.*, 2007) casamino acid เป็นสารเหนียวนำในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในพวกจุลินทรีย์ที่มีถิ่นกำเนิดในทะเล (Daatsellar and Harder, 1974; Chauhan and Gupta, 2004) ในขณะที่เคซีนเป็นสารเหนียวนำสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *A. oryzae* IAM2704 เช่นกัน (Ogawa *et al.*, 1995)

เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยงชั่วโมงที่ 20 24 30 และ 36 (ตารางผนวกที่ ค5) จากข้อมูลดังกล่าวสามารถอธิบายได้ว่า ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสมีความแตกต่างกันไปตามแต่ละชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยผลการทดลองที่ได้สามารถแบ่งกลุ่มชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดจากการศึกษาในครั้งนี้ได้ ดังนี้ กลุ่มแรกคืออาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ เพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 24 ชั่วโมง ประกอบด้วย BSM medium (control), BSM medium (กลูโคส 1% (w/v) และแป้งข้าวเหลือง 0.5% (w/v)), BSM medium (กลูโคส 1% (w/v) และแป้งข้าวโพด 0.5% (w/v)), BSM medium (ซูโครส 1% (w/v) และ yeast extract 0.5% (w/v)), BSM medium (ซูโครส 1% (w/v) และแป้งข้าวเหลือง 0.5% (w/v)), BSM medium (ซูโครส 1% (w/v) และแป้งข้าวโพด 0.5% (w/v)), BSM medium (แลคโตส 1% (w/v) และ yeast extract 0.5% (w/v)), BSM medium (แลคโตส 1% (w/v) และแป้งข้าวเหลือง 0.5% (w/v)), BSM medium (แลคโตส 1% (w/v) และแป้งข้าวโพด 0.5% (w/v)), BSM medium (แป้งมัน 2% (w/v) และแป้งข้าวเหลือง 0.5% (w/v)), BSM medium (แป้งมันไฮโดรไลส์ 2% (w/v) ผสมกลูโคส 0.5% (w/v) และแป้งข้าวเหลือง 0.5% (w/v)) ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้จะลดลงภายหลังจากระยะเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนอีกกลุ่มคือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดคือ มากกว่า 24 ชั่วโมง ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ BSM medium ที่ไม่เติมสารเหนียวนำ และ BSM medium ที่เติมเชรีซินแทน skim milk มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 30 ชั่วโมง ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อ BSM medium ที่เติมไหมดิบแทน skim milk, BSM medium (แป้งมัน 2% (w/v) และแป้งข้าวเหลือง 0.5% (w/v)), BSM medium (แป้งมัน 2% (w/v) และ yeast extract 0.5% (w/v)) และ BSM medium (แป้งมัน 0.5% (w/v) ผสมกลูโคส 0.5% (w/v) และแป้งข้าวเหลือง 0.5% (w/v)) มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด ในระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 36 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 การผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกาไหมจากกาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM medium สูตรดัดแปลงต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 200 rpm เป็นระยะเวลา 20 24 30 และ 36 ชั่วโมง

ดังนั้นจะเห็นว่าส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสัมพันธ์ต่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสมีความแตกต่างกันไป ตามแต่ละชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ อาจเป็นไปได้ว่า สับสเตรทที่ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยสับสเตรทบางชนิด เช่น แป้งจะมีโครงสร้างของสารประกอบที่ซับซ้อน หรือมีโมเลกุลขนาดใหญ่ ทำให้จุลินทรีย์จำเป็นต้องสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยสับสเตรทดังกล่าวให้อยู่ในรูปที่นำมาใช้ได้ จึงต้องใช้ระยะเวลานานกว่าพวกสับสเตรทที่มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน ซึ่งจุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ได้อย่างรวดเร็ว

สรุปได้ว่าแหล่งคาร์บอน ในโตรเจน และสารเหนียวนาที่จะนำมาศึกษาต่อ คือ แป้งมันไฮโดรไลซ์ แป้งถั่วเหลือง และ skim milk ตามลำดับ โดยใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสำหรับผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่เวลา 24 ชั่วโมง

4. ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับการลอกกาวยไหม

4.1 การกลั่นกรองปัจจัยหลักสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับการลอกกาวยไหมด้วย Plackett and Burman design

เมื่อศึกษาการกลั่นกรองปัจจัยหลักสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับการลอกกาวยไหมด้วย Plackett and Burman design ซึ่งปัจจัยที่นำมาศึกษา คือ ปริมาณของ แป้งมันไฮโดรไลซ์ (% (w/v), X_1) ปริมาณของแป้งถั่วเหลือง (% (w/v), X_2) ปริมาณของ skim milk (% (w/v), X_3) ค่าพีเอช (X_4) อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง (องศาเซลเซียส, X_5) ความเร็วรอบในการเขย่า (rpm, X_6) และปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น (% (v/v), X_7) โดยสิ่งทดลองทั้งหมด 12 สิ่งทดลอง ทดลองจำนวน 2 ชั่วโมง จากตารางที่ 19 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก Plackett and Burman design มีค่าที่แตกต่างกันไปในแต่ละสิ่งทดลอง โดยสิ่งทดลองที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด (1,282.5 units/ml) คือ สิ่งทดลองที่ 5 ซึ่งสิ่งทดลองดังกล่าวมีสถานะในการเพาะเลี้ยง คือ ปริมาณแป้งมันไฮโดรไลซ์ 2% (w/v) ปริมาณแป้งถั่วเหลือง 1% (w/v) ปริมาณ skim milk 0.2% (w/v) ค่าพีเอช 6.5 อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 250 rpm และปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 2% (v/v) ส่วนสิ่งทดลองที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสต่ำสุด (203.4 units/ml) คือ สิ่งทดลองที่ 8 โดยการทดลองดังกล่าวมีสถานะในการ

เพาะเลี้ยง คือ ปริมาณแป้งมันไฮโดรไลซ์ 0.5% (w/v) ปริมาณแป้งถั่วเหลือง 0.25% (w/v) ปริมาณ skim milk 2% (w/v) ค่าพีเอช 6.5 อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 250 rpm และปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 2% (v/v)

ตารางที่ 19 กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากการจัดแบบการทดลอง Plackett and Burman design สำหรับกลั่นกรองปัจจัยการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับการลอกกวาไหม^{1/}

สิ่ง ทดลอง	ปัจจัยในการทดลอง							กิจกรรมเอนไซม์ โปรติเอส (units/ml) ^{2/}
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	
1	2.00	1.00	0.20	9.50	37.00	250.00	2.00	1,170.7 ± 8.63
2	2.00	0.25	2.00	9.50	37.00	100.00	2.00	366.1 ± 0.37
3	0.50	1.00	2.00	9.50	30.00	100.00	2.00	540.4 ± 0.91
4	2.00	1.00	2.00	6.50	30.00	100.00	5.00	429.4 ± 0.11
5	2.00	1.00	0.20	6.50	30.00	250.00	2.00	1,282.5 ± 50.05
6	2.00	0.25	0.20	6.50	37.00	100.00	5.00	232.6 ± 1.40
7	0.50	0.25	0.20	9.50	30.00	250.00	5.00	798.7 ± 1.78
8	0.50	0.25	2.00	6.50	37.00	250.00	2.00	203.4 ± 1.78
9	0.50	1.00	0.20	9.50	37.00	100.00	5.00	586.1 ± 1.80
10	2.00	0.25	2.00	9.50	30.00	250.00	5.00	777.3 ± 2.38
11	0.50	1.00	2.00	6.50	37.00	250.00	5.00	710.5 ± 1.57
12	0.50	0.25	0.20	6.50	30.00	100.00	2.00	562.3 ± 2.72

หมายเหตุ ^{1/}อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง คือ BSM medium สูตรดัดแปลงที่มีการเติมแป้งมันไฮโดรไลซ์ แป้งถั่วเหลือง และ skim milk ในปริมาณแตกต่างกัน และเพาะเลี้ยงในสภาวะต่างๆ กันไปตามแต่ละสิ่งทดลอง

^{2/}ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± standard deviation)

เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการจัดการทดลอง Plackett and Burman design มาวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่า ค่า R^2 เท่ากับ 0.923 (ตารางผนวกที่ 6) แสดงว่า สัดส่วนของความแปรปรวนที่สามารถอธิบายได้เท่ากับ 92.3 เปอร์เซ็นต์ โดยจากตารางที่ 20 พบว่าปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) คือ ปริมาณแป้งถั่วเหลือง และปริมาณ skim milk ส่วนปัจจัยรองที่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส ได้แก่ ปริมาณแป้งมันไฮโดรไลซ์ ค่าพีเอชเริ่มต้น อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง ความเร็วรอบในการเขย่า และปริมาณกล้ายเชื้อเริ่มต้น ดังนั้นแสดงว่าระดับของค่าปัจจัยรองจากการจัดการทดลอง Plackett and Burman design ในครั้งนี้ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนในการจัดการทดลอง Plackett and Burman design เพื่อกลั่นกรองปัจจัยการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับการลอกกาวไหม ที่ระดับความมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

ปัจจัย	ค่าเฉลี่ยผลรวมกำลังสอง	ค่าF	นัยสำคัญ
แป้งมันไฮโดรไลซ์	61,232.65	2.56	0.19
แป้งถั่วเหลือง	263,796.05	11.03	0.03
Skim milk	214,882.80	8.99	0.04
ค่าพีเอช	55,842.16	2.34	0.20
อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง	104,757.45	4.38	0.10
ความเร็วรอบในการเขย่า	412,997.20	17.27	0.01
ปริมาณกล้ายเชื้อเริ่มต้น	29,087.05	1.22	0.33

อย่างไรก็ตาม มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยทางกายภาพต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ดังนี้ ในกรณีของปริมาณกล้ายเชื้อพบว่า การใช้กล้ายเชื้อ *B. alcalophilus* อายุเชื้อ 24 ชั่วโมง ปริมาณ 2 % (v/v) จะให้ผลผลิตของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด (Kaneekar *et al.*, 2002) ขณะที่ *B. subtilis* PCSIR-5 อายุเชื้อ 24 ชั่วโมง ปริมาณ 10 % (v/v) จะให้ผลผลิตของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด (Nadeem *et al.*, 2006) ส่วน Reddy *et al.* (2008) ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. RKY3 กล่าวว่า เมื่อเพิ่มปริมาณกล้ายเชื้อส่งผลให้ผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้น แต่ถ้าใช้ปริมาณกล้ายเชื้อมากเกินไป อาจส่งผลให้ผลผลิตของเอนไซม์โปรติเอสลดลง เนื่องจากปริมาณเชื้อมากจะมีการแย่งแย่งแหล่งอาหาร ทำให้มีการใช้สารอาหารหมดไปอย่างรวดเร็ว และในทำนองเดียวกันถ้าใช้

ปริมาณกล้ำเชื่อน้อยเกินไป ส่งผลให้การผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้น้อยเช่นกัน ส่วน Beg *et al.* (2002) กล่าวถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกล้ำเชื้อ อัตราการกวน และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง *B. mojavensis* ว่าเมื่อใช้ปริมาณกล้ำเชื้อในปริมาณที่น้อย และใช้อัตราการกวนที่สูงจะช่วยลดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอส และพบว่าเมื่อให้อัตราการกวนมากกว่า 200 rpm สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุด และเมื่อลดอัตราการกวน ทำให้ปริมาณเอนไซม์โปรติเอสลดลง

ส่วนกรณีการศึกษาอัตราการกวน พบว่าการใช้อัตราการกวนเท่ากับ 200 rpm เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* (Chu *et al.*, 1992) และ *B. licheniformis* (Sen and Satyanarayana, 1993) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การผลิตโปรติเอสโดยใช้อัตราการกวนที่สูงประมาณ 360 ถึง 600 rpm ในเชื้อ *Bacillus* sp. B21-2 (Fujiwara and Yamamoto, 1987) และ *B. firmus* (Moon and Parulekar, 1991) อย่างไรก็ตาม การเพิ่มอัตราการกวนสูงเกินไป อาจมีผลในทางลบต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ คือ เซลล์อาจฉีกขาด (cell rupture) การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา และการเกิด autolysis ในที่สุด (Calik *et al.*, 2000a, 2000b; Kim *et al.*, 2003) ในระหว่างกระบวนการหมักอัตราการให้อากาศมีส่วนช่วยในการผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเพาะเลี้ยงในฟลาสก์หรือในถังหมัก อัตราการให้อากาศมีส่วนช่วยให้จุลินทรีย์ได้รับสารอาหารอย่างเพียงพอ (Moon and Parulekar, 1991; Hameed *et al.*, 1999)

ในกรณีการศึกษาค่าพีเอช และอุณหภูมิ พบว่าพีเอชมีผลอย่างมากต่อกระบวนการขนส่งสารประกอบข้ามผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Naidu and Davi, 2005) ส่วนอุณหภูมิ มีรายงานว่า การผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อกลุ่ม *Bacillus* ซึ่งส่วนใหญ่เป็น mesophile อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์จะอยู่ในช่วง 30 ถึง 37 องศาเซลเซียส (Joo *et al.*, 2002; Puri *et al.*, 2002) ส่วนกลไกของอุณหภูมิในการผลิตเอนไซม์ยังไม่แน่ชัด (Chaloupka, 1985) แต่มีรายงานเกี่ยวกับความเชื่อมโยงระหว่างการสังเคราะห์ (enzyme synthesis) และเมแทบอลิซึมของเอนไซม์ใน *Bacillus* ซึ่งถูกควบคุมโดยอุณหภูมิ และ oxygen uptake (Frankena *et al.*, 1986)

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น ปัจจัยหลักที่นำมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยแผนการทดลอง CCD และสร้าง RSM ต่อไป คือ ปริมาณแป้งถั่วเหลือง และปริมาณ skim milk อย่างไรก็ตาม แม้ว่าความเร็วรอบในการเขย่า จัดเป็นปัจจัยรองที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส แต่ก็

ถือว่ามีความสำคัญต่อการถ่ายเทออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย จำพวกต้องการออกซิเจนในการเจริญ (aerobic bacteria) จึงจำเป็นที่นำปัจจัยนี้มาศึกษาขั้นต่อไป

4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับการลอกกาไหมด้วย CCD และ RSM

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับการลอกกาไหม โดยใช้แผนการทดลอง CCD มีปัจจัยที่นำมาศึกษาจำนวน 3 ปัจจัย คือ ปริมาณแป้งถั่วเหลือง ปริมาณ skim milk และความเร็วรอบในการเขย่า ประกอบด้วยสิ่งทดลองจำนวน 17 สิ่งทดลอง พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 ผลิตขึ้นในแผนการทดลองดังกล่าว มีค่าแตกต่างกันในแต่ละสิ่งทดลอง โดยสิ่งทดลองที่ 6 ให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 1,638.6 units/ml ส่วนสิ่งทดลองที่ 1 ให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสน้อยที่สุดเท่ากับ 172.9 units/ml ดังแสดงในตารางที่ 21

เมื่อวิเคราะห์ผลการทดลอง พบว่า ปัจจัยและค่าตอบสนองมีความสัมพันธ์กัน (ตารางผนวกที่ 9) โดยค่าสัมประสิทธิ์ที่ได้จากการวิเคราะห์ผลการทดลองจากตารางที่ 22 แสดงถึงขนาดและทิศทางของปัจจัยต่างๆ และปฏิกริยาสัมพันธ์ ระหว่างปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส พบว่า ค่าสัมประสิทธิ์ของเส้นตรงของปริมาณ skim milk (X_2) และความเร็วรอบในการเขย่า (X_3) มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ค่าสัมประสิทธิ์ของกำลังสองของทั้ง 3 ปัจจัย มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ค่าสัมประสิทธิ์ของปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ skim milk และความเร็วรอบในการเขย่า (X_2X_3) และระหว่างปริมาณแป้งถั่วเหลือง และความเร็วรอบในการเขย่า (X_1X_3) มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ตารางที่ 21 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสำหรับลือกาวไหมที่ *Bacillus* sp. C4 ผลิตขึ้นโดยใช้
แผนการทดลอง CCD และนำไปใช้ในการสร้าง RSM และกิจกรรมของเอนไซม์
โปรติเอสที่ได้จากการสมการทำนาย^{1/}

สิ่ง ทดลอง	ปัจจัย			กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (units/ml)		RMSE (root means square error)
	แป้งถั่ว เหลือง (% w/v)	skim milk (% w/v)	ความเร็วรอบ ในการเขย่า (rpm)	ค่าสังเกต ^{2/}	ค่าทำนาย	
1	0.50	0.10	150.0	172.9 ± 2.62	149.7	23.2
2	2.50	0.10	150.0	200.8 ± 2.80	124.9	75.9
3	0.50	0.30	150.0	486.1 ± 3.57	610.2	124.1
4	2.50	0.30	150.0	692.2 ± 11.46	795.2	103.4
5	0.50	0.10	250.0	1,238.6 ± 16.14	1,073.6	165.5
6	2.50	0.10	250.0	1,638.6 ± 16.14	1,452.6	186.5
7	0.50	0.30	250.0	534.8 ± 11.50	548.7	16.8
8	2.50	0.30	250.0	1,176.4 ± 8.08	1,137.6	39.4
9	1.50	0.20	200.0	1,175.3 ± 6.00	1,146.2	29.5
10	1.50	0.20	200.0	1,159.0 ± 21.81	1,146.2	21.9
11	1.50	0.20	200.0	1,153.2 ± 31.12	1,146.2	26.3
12	0.18	0.20	200.0	632.3 ± 2.90	632.3	2.4
13	1.50	0.032	200.0	417.2 ± 3.00	655.2	238.0
14	1.50	0.20	110.0	443.6 ± 3.84	352.3	91.3
15	3.18	0.20	200.0	764.3 ± 3.18	852.1	87.8
16	1.50	0.368	200.0	927.5 ± 12.37	777.3	150.6
17	1.50	0.20	280.0	1,263.4 ± 45.49	1,475.6	215.5

หมายเหตุ ^{1/}อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง คือ BSM medium สูตรดัดแปลงที่เติมแป้งถั่วเหลือง
และ skim milk ในปริมาณแตกต่างกัน และความเร็วรอบในการเขย่าต่างกันไปตามแต่ละ
สิ่งทดลอง

^{2/}ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± standard deviation)

ตารางที่ 22 การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยจากค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส ในแผนการทดลอง CCD เพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกาวไหม

เทอมของสมการ	ค่าสัมประสิทธิ์	ความคลาดเคลื่อน มาตรฐาน	ค่า t	นัยสำคัญ
(Constant)	-3,780.73	505.32	-7.48	0.000
X ₁	206.06	158.88	1.30	0.202
X ₂	15,603.63	1,562.12	9.99	0.000
X ₃	24.34	3.84	6.33	0.000
X ₁ X ₁	-188.69	26.76	-7.05	0.000
X ₂ X ₂	-15,259.87	2,280.78	-6.69	0.000
X ₃ X ₃	-0.03	0.01	-3.12	0.003
X ₁ X ₂	513.32	281.21	1.83	0.075
X ₂ X ₃	-49.50	5.62	-8.80	0.000
X ₁ X ₃	1.97	0.56	3.55	0.001

ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ต่างๆ นี้ถูกนำมาใช้ในการสร้างสมการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย และผลของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 ได้ ดังนี้

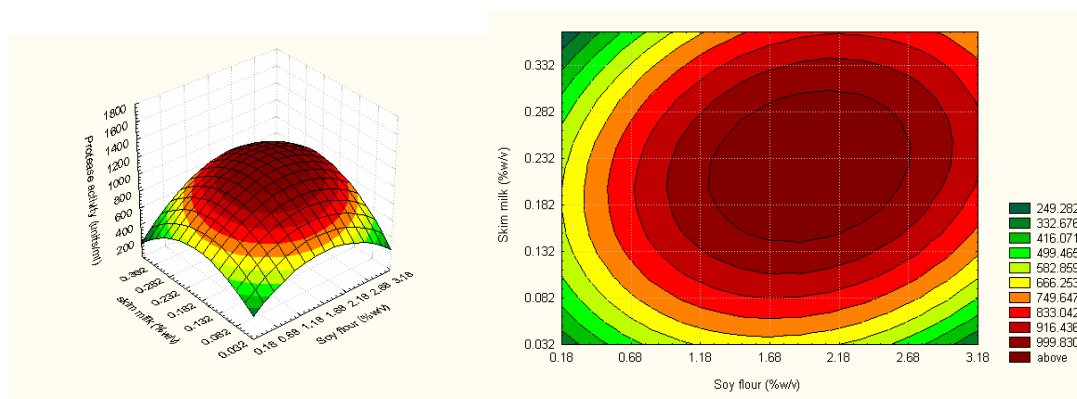
$$Y = -3,780.73 + 206.06x_1 + 15,603.63x_2 + 24.34x_3 - 188.69x_1^2 - 15,259.87x_2^2 - 0.03x_3^2 + 513.32x_1x_2 - 49.50x_2x_3 + 1.97x_1x_3$$

โดย

Y	คือ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (ค่าตอบสนอง; units/ml)
X ₁	คือ แป้งถั่วเหลือง (% (w/v))
X ₂	คือ skim milk (% (w/v))
X ₃	คือ ความเร็วรอบในการเขย่า (rpm)

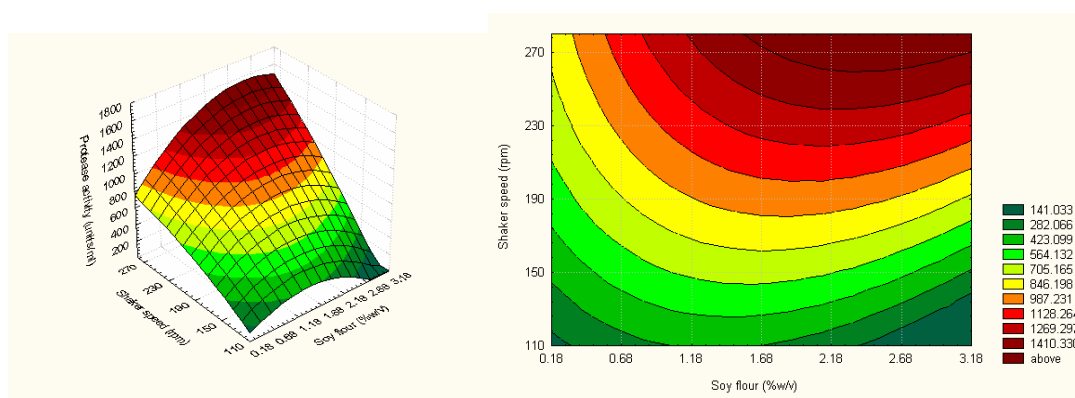
เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของตัวแปร พบว่า ค่า R^2 เท่ากับ 0.912 (ตารางผนวกที่ 8) แสดงว่า สมการดังกล่าวสามารถอธิบายตัวแปรในค่าตอบสนองได้ 91.2 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

แผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนองถูกนำมาใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ สำหรับหาค่าที่เหมาะสมในแต่ละปัจจัย ที่ส่งผลให้ได้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด จาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลวกกาวไหม จากภาพที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยของปริมาณแป้งถั่วเหลือง และปริมาณ skim milk ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตามแผนการทดลองต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส โดยความเร็วรอบในการเขย่าอยู่ที่ระดับ center point (200 rpm) พบว่า พื้นที่ผิวตอบสนองแสดงการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสได้อย่างชัดเจน โดยเห็นได้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจะค่อยๆ เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณแป้งถั่วเหลือง และ skim milk จนกระทั่งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสมีค่าสูงสุด เมื่อใช้ปริมาณแป้งถั่วเหลืองในช่วงระหว่าง 1.3 ถึง 2.7 % (w/v) และใช้ปริมาณ skim milk ในช่วงระหว่าง 0.14 ถึง 0.28 % (w/v) และเห็นได้ชัดว่า เมื่อเพิ่มปริมาณแป้งถั่วเหลือง และ skim milk สูงขึ้นไปอีก กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจะลดลง ทั้งนี้เนื่องจากการใช้ปริมาณแป้งถั่วเหลืองที่มากเกินไป ทำให้เพิ่มความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้การถ่ายเทออกซิเจนไม่ดีพอ ส่งผลให้เชื้อได้รับออกซิเจนไม่เพียงพอต่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ในขณะที่การใช้ปริมาณ skim milk ที่มากเกินไป จะยับยั้งการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเช่นกัน



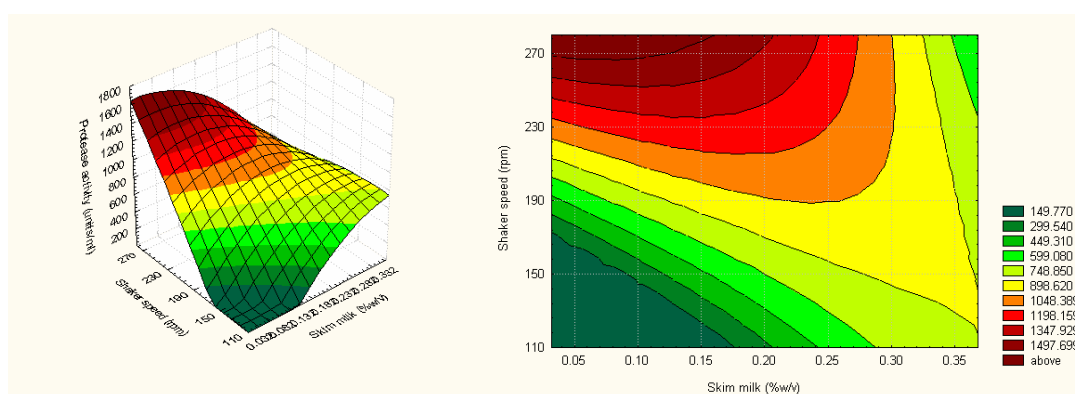
ภาพที่ 8 แผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแป้งถั่วเหลือง และ skim milk ต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลวกกาวไหม โดยความเร็วรอบในการเขย่าอยู่ที่ระดับ center point (200 rpm)

จากภาพที่ 9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยของปริมาณแป้งถั่วเหลือง และความเร็วรอบในการเขย่าที่ระดับต่างๆ ตามแผนการทดลอง ต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส โดยปริมาณ skim milk อยู่ที่ระดับ center point (0.2 % (w/v)) จะเห็นได้ว่า พื้นที่ผิวตอบสนองแสดงการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสได้อย่างชัดเจน จากแผนภาพดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความเร็วรอบในการเขย่าส่งผลต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสอย่างมาก ซึ่งเมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่า (มากกว่า 260 rpm) และปริมาณแป้งถั่วเหลือง (มากกว่า 1.6 % (w/v)) จะให้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด โดยจากสมการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย และผลของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 ข้างต้น พบว่า มีปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแป้งถั่วเหลือง และความเร็วรอบในการเขย่า ดังนั้นปัจจัยทั้งสองดังกล่าวส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสร่วมกัน ซึ่งเป็นข้อสนับสนุนในเรื่องของปริมาณถั่วเหลือง ที่ส่งผลต่อความหนืดของสารในอาหารเลี้ยงเชื้อเกี่ยวข้องกับการถ่ายเทออกซิเจน



ภาพที่ 9 แผนภาพพื้นผิวตอบสนองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแป้งถั่วเหลือง และความเร็วรอบในการเขย่า ต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลวกถั่วไหม โดยปริมาณ skim milk อยู่ที่ระดับ center point (0.2 % (w/v))

จากภาพที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยของปริมาณ skim milk และความเร็วรอบในการเขย่าที่ระดับต่างๆ ตามแผนการทดลอง ต่อผลกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส โดยปริมาณแบ่งหัวเหลือง อยู่ในระดับ center point (0.2 % (w/v)) จะเห็นได้ว่าพื้นที่ผิวตอบสนองแสดงการเปลี่ยนแปลงผลของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสได้อย่างชัดเจน จากแผนภาพดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความเร็วรอบในการเขย่า และปริมาณ skim milk ส่งผลต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสอย่างมาก ซึ่งเมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่า (มากกว่า 260 rpm) และลดปริมาณ skim milk (น้อยกว่า 0.2 % (w/v)) จะให้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด โดยจากสมการอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยและกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 ข้างต้น พบว่ามีปฏิริยาสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ skim milk และความเร็วรอบในการเขย่า ดังนั้นปัจจัยทั้งสองดังกล่าวส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสร่วมกัน



ภาพที่ 10 แผนภาพพื้นที่ผิวตอบสนองแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง skim milk และความเร็วรอบในการเขย่าต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลวกกาวไหม โดยปริมาณแบ่งหัวเหลือง อยู่ในระดับ center point (1.5 % (w/v))

4.3 การตรวจสอบสมการอธิบายการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับลอกกาวไหมจาก *Bacillus* sp. C4

จากการตรวจสอบสมการอธิบายการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับลอกกาวไหมจาก *Bacillus* sp. C4 โดยการสุ่มเลือกสิ่งทดลองจากแผนการทดลอง CCD มาทดลองซ้ำอีกครั้งหนึ่ง เพื่อทดสอบความแม่นยำของสมการในการทำนายกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส จากตารางที่ 23 พบว่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดที่ได้จากค่าสังเกตการตรวจสอบสมการ (1,536.9 units/ml) มีค่าใกล้เคียงกับค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการทำนายโดยสมการ (1,575.5 units/ml) ดังนั้นแสดงว่าสมการที่ได้จากแผนการทดลอง CCD ข้างต้น สามารถนำมาใช้ในการอธิบายการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกาวไหมได้อย่างแม่นยำ

ตารางที่ 23 เปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส สำหรับลอกกาวไหม จาก *Bacillus* sp. จากการตรวจสอบสมการจากแผนการทดลอง CCD และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการสมการทำนาย^{1/}

สิ่ง ทดลอง	ปัจจัย			กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (units/ml)		RMSE (root means square error)
	แป้งถั่ว เหลือง (% w/v)	skim milk (% w/v)	ความเร็วรอบ ในการเขย่า (rpm)	ค่าสังเกต ^{2/}	ค่าทำนาย	
1	2.0	0.15	280.0	1,499.8 ± 9.5	1,522.3	23.8
2	2.0	0.10	280.0	1,536.9 ± 16.6	1,575.5	40.9
3	2.5	0.15	280.0	1,511.8 ± 32.0	1,561.0	55.7
4	2.5	0.10	280.0	1,489.0 ± 12.5	1,520.7	33.3
5	1.5	0.10	280.0	1,435.9 ± 39.9	1,495.9	68.3

หมายเหตุ ^{1/}อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง คือ BSM medium สูตรดัดแปลงที่มีการเติมแป้งถั่วเหลือง และ skim milk ในปริมาณแตกต่างกัน และความเร็วรอบในการเขย่าต่างกันไปตามแต่ละสิ่งทดลอง

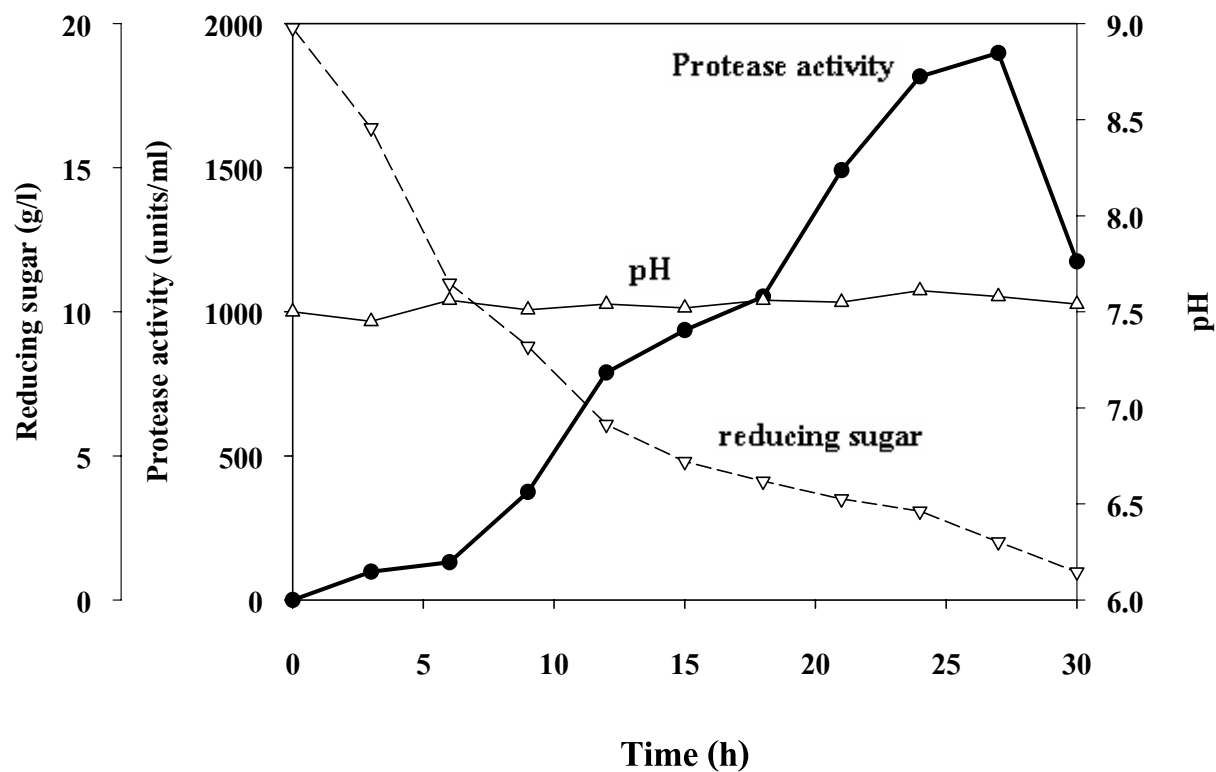
^{2/}ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean ± standard deviation)

ดังนั้นสรุปได้ว่าสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลือกาวไหมในพลาสติก คือ แป้งถั่วเหลือง 2.0 % (w/v) skim milk 0.1 % (w/v) และความเร็วรอบในการเขย่าเท่ากับ 280 rpm โดยสภาวะดังกล่าวให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด เท่ากับ 1,575.5 units/ml ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้น 2.2 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร BSM medium สูตรเดิม

5. ศึกษาการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ (batch fermentation) ในถังหมักสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลือกาวไหม

จากการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จในถังหมักที่มีอาหารเหลว BSM medium สูตรดัดแปลง (เติมแป้งถั่วเหลือง 2.0 % (w/v) skim milk 0.1 % (w/v)) ปริมาตร 1.5 ลิตร โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร BSM medium สูตรดัดแปลงที่มีสภาวะเหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการทำนายโดยสมการอธิบายการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากข้อ 4.3 โดยควบคุมอัตราการกวนที่ 350 rpm อัตราการให้อากาศ 2 vvm ค่าการละลายของออกซิเจนในถังหมัก เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว ค่าพีเอช 7.5 ตลอดการทดลอง เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 30 ชั่วโมง แล้วนำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส จากภาพที่ 11 พบว่าเชื้อเริ่มผลิตเอนไซม์โปรติเอสในชั่วโมงที่ 6 และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 1,898.2 units/ml ที่ชั่วโมงที่ 27 หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสลดลงในชั่วโมงที่ 30 ของการเพาะเลี้ยง เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่าลดลงอย่างรวดเร็ว โดยที่ชั่วโมงที่ 27 ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือ เท่ากับ 2.01 g/l จากนั้นในชั่วโมงที่ 30 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือเท่ากับ 0.97 g/l ในขณะที่ค่าการละลายของออกซิเจนในถังหมัก จะควบคุมไว้ที่ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ของอากาศอิ่มตัว ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9 ของการหมัก จนเสร็จสิ้นการทดลอง (ชั่วโมงที่ 27) อย่างไรก็ตาม หลังจากชั่วโมงที่ 27 ค่าการละลายของออกซิเจนลดต่ำลงเท่ากับ 18.9 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากในช่วงระยะเวลาการเพาะเลี้ยงดังกล่าวปริมาณเชื้อในถังหมักมีปริมาณที่สูงเกินไปจนไม่สามารถเพิ่มค่าการละลายของออกซิเจนให้เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว ได้ แม้จะเพิ่มปริมาณออกซิเจนลงไปถังหมักแล้วก็ตาม ดังนั้นแสดงว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสลดลงภายหลังระยะเวลาชั่วโมงที่ 27 อาจมีสาเหตุ คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีปริมาณน้อย และค่าการละลายของออกซิเจนในถังหมักที่อยู่ในระดับต่ำเกินไปไม่เพียงพอต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสต่อไปได้ (Fabian, 1970) หรือการสะสมสารเมแทบอลิต์ที่เป็นพิษ จึงเกิด cell lysis รวมถึงการเกิด autoprotoleolysis หรือเกิด protease degradation โดยเอนไซม์

โปรตีนบางชนิดดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นทำให้จำนวนเชื้อลดลง จึงมีผลทำให้การผลิตเอนไซม์
โปรตีนลดลงในที่สุด



ภาพที่ 11 ผลการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกวไหมจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM medium สูตรดัดแปลงที่สภาวะเหมาะสม (optimized medium) ในถังหมัก ปริมาตร 1.5 ลิตร โดยควบคุมอัตราการกวน เท่ากับ 350 rpm อัตราการให้อากาศ 2 vvm ค่าการละลายของออกซิเจนในถังหมัก เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว ค่าพีเอช 7.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง เป็นระยะเวลา 30 ชั่วโมง

อย่างไรก็ตามมีรายงานเกี่ยวกับค่าการละลายของออกซิเจนในถังหมักต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ดังนี้ การผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *B. subtilis* โดยวิธีครั้งคราว (fed-batch fermentation) ควบคุมอัตราการเติมน้ำตาลกลูโคสในถังหมัก โดยอาศัยระดับของค่าการละลายของออกซิเจนในถังหมักต่อการเปิดและปิดของปั๊มที่เติมน้ำตาลกลูโคส ซึ่งจะทำให้การเติมกลูโคสเมื่อค่าการละลายของออกซิเจนในถังหมักต่ำกว่า 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว โดยพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เมื่อควบคุมค่าการละลายของออกซิเจนในถังหมักไม่ให้ต่ำกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว มีค่าสูงกว่าเปรียบกับการควบคุมการละลายของออกซิเจนในถังหมักไม่ให้ต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว (Kole *et al.*, 1988b) หรือในกรณีการศึกษาผลของการถ่ายเทออกซิเจน (oxygen transfer) ต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *B. licheniformis* ในกระบวนการหมักโดยใช้กรดซิตริกเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อใช้อัตราการกวนในระดับต่ำ (150 rpm) เหมาะสมต่อปริมาณของชีวมวล และเมื่อใช้อัตราการกวนในระดับปานกลาง (500 rpm) จะให้กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสสูงสุด (Calik *et al.*, 2000b)

ดังนั้นสรุปได้ว่า การเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกขาวไหม ในถังหมักที่มีอาหารเหลว BMSM medium สูตรดัดแปลงที่เดิมแบ่งตัวเหลือง 2.0 % (w/v) skim milk 0.10 % (w/v) โดยมีปริมาตร 1.5 ลิตร และควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงในถังหมักคือ อัตราการกวน 350 rpm อัตราการให้อากาศ 2 vvm ค่าการละลายของออกซิเจนในถังหมักเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว พีเอช 7.5 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถเพิ่มผลผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ โดยพบว่า กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังหมักเท่ากับ 1,898.1 units/ml ในช่วงเวลาที่ 27 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้เพิ่มขึ้น 1.20 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับค่าการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ (1,575.5 units/ml) หรือคิดเป็น 2.6 เท่าของอาหารเลี้ยงเชื้อ BMSM medium สูตรเดิมที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์ (729.0 units/ml)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การศึกษาการเจริญ และการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับการลอก กาวไหม จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. C4 สำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในอาหาร BMSM medium พีเอช 7.5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ $0.42\ h^{-1}$ และผลได้ของผลผลิตต่อมวลของสับสเตรท (Yp/s) เท่ากับ 75.13 โดยกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดได้เท่ากับ 729.0 units/ml ในชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง และการผลิตเอนไซม์โปรติเอสนี้ถูกผลิตอยู่ในช่วง late log phase จนถึงระยะ stationary phase และรูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์เป็นแบบ growth- associated pattern

2. ผลการคัดเลือกแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส จาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกาวไหม ได้ผลการทดลอง ดังนี้

2.1 การคัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน ที่เหมาะสมต่อการผลิต เอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกาวไหม พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BMSM medium สูตรดัดแปลง โดยใช้แป้งมันไฮโดรไลซ์ 2.0 % (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และแป้งถั่ว เหลือง 0.5 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน ให้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด เท่ากับ 850.9 units/ml

2.2 สารเหนียวน้ำที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกาวไหม ที่เติม skim milk ปริมาณ 0.25 % (w/v) เป็นสารเหนียวน้ำ ให้กิจกรรมเอนไซม์ โปรติเอสสูงสุด เท่ากับ 805.2 units/ml

2.3 การศึกษาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอส *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกาวไหม จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BMSM medium สูตรดัดแปลงสูตรต่างๆ พบว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด คือ ชั่วโมงที่ 24 ในอาหาร BMSM medium สูตรดัดแปลง ที่ใช้แป้งมันไฮโดรไลซ์ปริมาณ 2.0 % (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้

แป้งถั่วเหลืองปริมาณ 0.5 % (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน และใช้ skim milk ปริมาณ 0.25 % (w/v) เป็นสารเหนียว นำให้กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด เท่ากับ 935.7 units/ml

3. การกลั่นกรองปัจจัยหลักสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกาไหม โดยใช้ Plackett and Burman design ซึ่งมีปัจจัยที่นำมาศึกษาทั้งสิ้น 7 ปัจจัย คือ ปริมาณของแป้งมันไฮโดรไลซ์ (% w/v) ปริมาณของแป้งถั่วเหลือง (% w/v) ปริมาณของ skim milk (% w/v) ค่าพีเอช อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง (องศาเซลเซียส) ความเร็วรอบในการเขย่า (rpm) และปริมาณกล้ำเชื้อเริ่มต้น (% v/v) พบว่า ปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) คือ ปริมาณแป้งถั่วเหลือง ส่งผลในทางบวกต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส และปริมาณ skim milk ส่งผลในทางลบต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดที่ได้จากการทดลอง เท่ากับ 1,282.5 units/ml โดยใช้สภาวะในการเพาะเลี้ยง คือ ปริมาณแป้งมันไฮโดรไลซ์ 2 % (w/v) ปริมาณแป้งถั่วเหลือง 1 % (w/v) ปริมาณ skim milk 0.2 % (w/v) ค่าพีเอช 6.5 อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 250 rpm ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้เพิ่มขึ้น 1.8 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร BSM medium สูตรเดิม

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกาไหม เมื่อเพาะเลี้ยงในพลาสติก โดยใช้แผนการทดลอง CCD และ RSM ซึ่งปัจจัยที่นำมาศึกษาจำนวน 3 ปัจจัย คือ ปริมาณแป้งถั่วเหลือง ปริมาณ skim milk และความเร็วรอบในการเขย่า ได้ผลการทดลอง ดังนี้

4.1 สมการอธิบายความสัมพันธ์ของปัจจัยต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส มีรูปแบบดังนี้

$$Y = -3,780.73 + 206.06x_1 + 15,603.63x_2 + 24.34x_3 - 188.69x_1^2 - 1,5259.87x_2^2 - 0.03x_3^2 + 513.32x_1x_2 - 49.50x_2x_3 + 1.97x_1x_3$$

โดย Y คือ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (ค่าตอบสนอง; units/ml), X_1 , X_2 และ X_3 คือ ปริมาณแป้งถั่วเหลือง (% w/v) ปริมาณ skim milk (% w/v) และความเร็วรอบในการเขย่า (rpm) ตามลำดับ

สมการข้างต้น มีค่า R^2 เท่ากับ 0.912 แสดงว่าสมการดังกล่าวสามารถอธิบายตัวแปรในค่าตอบสนองได้ 91.2 เปอร์เซ็นต์

4.2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกาวไหม คือ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร BMSM medium สูตรดัดแปลงที่เติมแป้งหัวเหลือง 2.0 % (w/v) skim milk 0.1 % (w/v) และความเร็วรอบในการเขย่า 280 rpm โดยให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด เท่ากับ 1,536.9 units/ml ส่วนค่าทำนายกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุด โดยสมการข้างต้น เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวเท่ากับ 1,575.5 units/ml ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้เพิ่มขึ้น 2.2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร BMSM medium สูตรเดิม

5. การเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จในถังหมักเพื่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกาวไหม ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร BMSM medium สูตรดัดแปลงที่เติมแป้งหัวเหลือง 2.0 % (w/v) skim milk 0.1 % (w/v) โดยควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงในถังหมัก คือ อัตราการกวน 350 rpm อัตราการให้อากาศ 2 vvm ค่าการละลายของออกซิเจนในถังหมัก เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ ของอากาศอิ่มตัว พีเอช 7.5 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้คงที่ตลอดการทดลองเป็นระยะเวลา 30 ชั่วโมง พบว่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดที่ได้เท่ากับ 1,898.1 units/ml ในชั่วโมงที่ 27 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้เพิ่มขึ้น 1.2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงในพลาสติก (1,575.5 units/ml) หรือ 2.6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร BMSM medium สูตรเดิม (729.0 units/ml)

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาและการทดลองดังกล่าวมาข้างต้น สามารถพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกาวไหม โดยนำวิธีทางสถิติมาประยุกต์ใช้ ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในระดับหนึ่ง โดยการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ด้วยแผนการทดลอง CCD และ RSM ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย และค่าตอบสนองได้ ซึ่งแผนภาพจะแสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของค่าตอบสนอง เมื่อปัจจัยต่างๆ มีค่าเปลี่ยนแปลง โดยความสัมพันธ์ดังกล่าวได้ถูกอธิบายด้วยสมการอธิบายการผลิตเอนไซม์โปรติเอส และค่าสัมประสิทธิ์ในแต่ละเทอมของสมการ เป็นตัวบ่งชี้ถึงขนาด และทิศทางของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์

ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการทำนายการผลิตเอนไซม์โปรติเอส เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะต่างๆ ได้อย่างแม่นยำ สามารถนำมาเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงอื่นๆ ต่อไป

2. การเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จในถังหมักเพื่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกาไหม ซึ่งเพาะเลี้ยงในอาหาร BSM medium สูตรดัดแปลงที่เติมแป้งหัวเหลือง 2.0 % (w/v) skim milk 0.1 % (w/v) โดยควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบ batch fermentation ปริมาตร 1.5 ลิตร เป็นเวลา 30 ชั่วโมง มีข้อจำกัดในเรื่องของสัปดาห์ที่ปลูกใช้หมดไป ในระยะเวลาสุดท้ายของการเพาะเลี้ยง ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสลดลง คาดว่าการใช้การเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch fermentation สามารถนำมาแก้ไขปัญหาดังกล่าวได้ เนื่องจากเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch fermentation เป็นการเติมสัปดาห์เป็นระยะๆ ทำให้สามารถควบคุมอัตราการเจริญจำเพาะ รวมถึงควบคุมหรือคาดการณ์ผลการผลิตเอนไซม์ได้ แต่การเติมสัปดาห์ควรเตรียมในความเข้มข้นที่ไม่สูงจนเกินไป เพื่อป้องกันปัญหา “catabolic repression” อันส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสได้ หรือการเพาะเลี้ยงแบบ continuous culture ซึ่งสามารถควบคุมค่าอัตราการเจริญจำเพาะได้ น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถปรับปรุงการเพาะเลี้ยงเพื่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์ให้มีประสิทธิภาพต่อไป

3. *Bacillus* sp. C4 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงกว่านี้ หากทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในถังหมักแทนการเพาะเลี้ยงในพลาสติก เพราะการเพาะเลี้ยงในพลาสติกไม่สามารถควบคุมสภาวะการหมักให้คงที่ได้ ทำให้เกิดการคาดเคลื่อนมากกว่า วิธีการเพาะเลี้ยงในถังหมักโดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเหลว มีความสำคัญมากต่อการหมักของจุลินทรีย์กลุ่มต้องการออกซิเจนในการเจริญ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- จันทิมา เกยานนท์ และ เปรมวดี วงษ์แสงจันทร์. 2548. การลอกกาวใหม่ไทยโดยใช้เอนไซม์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรีย, น. L0004. ใน รายงานการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 31. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา.
- จุฑาทพร แสงแก้ว. 2543. การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ดวงกมล เสนาธรรม และ เปรมวดี วงษ์แสงจันทร์. 2548. การตรวจลักษณะเฉพาะเบื้องต้นของเอนไซม์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรีย GR_5_4, 4TS9-001, และ H1C_13_8, น. L0005. ใน รายงานการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 31. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- พัชรา วีระกะลัศ. 2541. เอนไซม์. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- ไพโรจน์ วิริยาริ. 2544. การออกแบบพื้นที่การตอบสนอง. พิมพ์ครั้งที่ 1. ภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนาลิขิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมและการเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- โมโตอิ มินะกาวะ, เออิชิชิ คาวาอิ และ เข็มชัย เหมะจันทร์. 2530. วิทยาการไหมเล่ม 1. คณะกรรมการส่งเสริมสินค้าไหมไทย กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ.
- สมใจ ศิริโชค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ, กรุงเทพฯ.
- สุทธิดา แสงยนต์. 2548. สมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อนุวัตร แจ่มชัด. 2549. สถิติสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์และการประยุกต์. ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อิสรพงษ์ พงษ์ศิริกุล. 2550. การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับอุตสาหกรรมเกษตร. พิมพ์ครั้งที่ 4. ภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนากล้าภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

Adinarayana, K. and P. Ellaiah. 2002. Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by newly isolated *Bacillus* sp. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.** 5 (3): 272-278.

Ambrose, N.C., M.S. Mijinyawa and J.H.D. Mendoza. 1998. Preliminary characterization of extracellular serine protease of *Dermatophilus congolensis* isolated from cattle, sheep and horses. **Vet. Microbial.** 62: 321-335.

Anonymous. 2008a. **Nylon, extremis tools for togetherness.** Available Source: http://www.extremis.be/EXTREMIS_products/Materials/nylon.html, August 3, 2008.

_____. 2008b. **Typical wire bond process optimization, process optimization.** Available Source: <http://www.smallprecisiontools.com/typical-wire-bond-process-optimization?sprache=en>, August 3, 2008.

Bakhtiar, S., M.M. Anderson and A. Gessesse. 2003. Stability characteristics of a calcium-independent alkaline protease from *Nesterenkonia* sp. **Enzyme Microb. Technol.** 6252: 1-7.

Banerjee, U.C., R.K. Sani, W. Azmi and R. Soni. 1999. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as laundry detergent additive. **Process Biochem.** 35: 213-219.

- Barrett, A.J. 2001. Proteolytic enzymes: nomenclature and classification, pp. 1-21. *In* R. Beynon, J.S. Bond, eds. **Proteolytic enzymes**. 2nd ed. Oxford University Press, New York.
- Beg, Q.K. and R. Gupta. 2003. Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. **Process Biochem.** 39: 203-209.
- _____, R.K. Saxen and R. Gupta. 2002. De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed-batch operations. **Process Biochem.** 37: 1103-1109.
- Beyon, R. and J.S. Bond. 2001. **Proteolytic enzymes**. 2nd ed. Oxford University Press Inc., New York.
- Boething, R.S. 1975. Regulation of extracellular protease secretion in *Pseudomonas maltophilia*. **J. Biotechnol.** 123: 954-961.
- Box, G.E.P. and K.B. Wilson. 1951. Experimental attainment of optimum conditions. **J. Royal Statistical Society.** 13: 1-45.
- Bradley, R.A. 1958. Determination of operating conditions by experimental methpds. Part I. Mathematics and statistics fundamental to the fitting of response surfaces. **Ind. Qual. Control.** 15 (1): 16-20.
- Calik, P., E. Bilir, G. Calik and T.H. Ozadamar. 2000a. Serine alkaline protease over production capacity of *Bacillus licheniformis*. **Enzyme Microb. Technol.** 26: 45-60.
- _____, G. Calik and T.H. Ozdamar. 2000b. Oxygen-transfer strategy and its regulation effects in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. **Biotechnol. Bioeng.** 69: 301–311.

- Chakrabarti, S.K., N. Matsumura and R.S. Ranu. 2000. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease from *Aspergillus terreus* (IJIRA 6.2). **Curr. Microbiol.** 40: 239-244.
- Chaloupka, J. 1985. Temperature as a factor regulating the synthesis of microbial enzymes. **Microbial. Sci.** 2: 59-90.
- Chandrasekaran, S. and S.C. Dhar. 1983. A low cost method for the production of extracellular alkaline proteinase using tapioca starch. **J. Ferment. Bioeng.** 61: 511-514.
- Chaphalkar, S. and S. Dey. 1994. Some aspects of production of extracellular protease from *Streptomyces diastaticus*. **J. Microb. Technol.** 9: 85-100.
- Chauhan, B. and R. Gupta. 2004. Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14. **Process Biochem.** 39: 2115-2122.
- Chi, Z., C. Ma, P. Wang and H.F. Li. 2006. Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. **Bioresour. Technol.** 88 (3):534-538.
- Chu, I.M., C. Lee and T.S. Li. 1992. Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. **Enzyme Microb. Technol.** 14: 755-761.
- Chu, W.H. 2007. Optimization of extracellular alkaline protease production from species of *Bacillus*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 34: 241-245.
- Daatsellar, M.C.C. and W. Harder. 1974. Some aspects of the regulation of the production of extracellular proteolytic enzyme by a marine bacterium. **Arch. Microbiol.** 101: 21-34.

- Davis, B.D. and E.S. Mingioli. 1950. Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine of vitamin B12. **J. Bacteriol.** 60: 17-28.
- Dawson, P.S.S. and W.G.W. Kurz. 1969. Continuous phased culture - a technique for growing, analyzing and using microbial cells. **Biotech. Bioeng.** 11: 843-851.
- Dayanandan, A., J. Kanagaraj, L. Sonderraj, R. Govindaraj and G.S. Rajkuma. 2003. Application of an alkaline protease in leather processing: an ecofriendly approach. **J. Clean Prod.** 11: 533-536.
- Debaboy, V.G. 1982. Industrial use of Bacilli, pp. 331-370. In D. Dubnau, ed. **The molecular biology of the Bacilli**. Vol. 1. Academic Press, New York.
- Donaghy, J.A. and A.M. McKay. 1993. Production and properties of alkaline protease by *Aureobasidium pullulans*. **J. Appl. Bacteriol.** 74: 662-666.
- Eijsink, V.G.H., B.V. den Burg, G. Vriend, H.J.C. Berendsen and G. Venema. 1991. Thermostability of *Bacillus subtilis* neutral protease. **Biochem. Int.** 24: 517-525.
- Fabian, J. 1970. Synthesis of extracellular protease by *Bacillus subtilis* in a two stage fermentor. **Biotech. Bioeng.** 16: 647-662.
- Falahatpishe, H., M. Jalali, N. Badami, N. Mardani and K.K. Darani. 2007. Production and purification of a protease from an alkalophilic *Bacillus* sp. 2-5 strain isolated from soil. **Iran J. Biotechnol.** 5 (2): 110-113.
- Feder, J., K. Ladenburg, J. Delente and B.S. Wildi. 1971. Intracellular proteases of *Bacillus stearothermophilus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 22 (6): 1055-1057.

- Feng, Y.Y., W.B. Yang, S.L. Ong, J.Y. Hn and W. J. Gg. 2001. Fermentation of starch for enhanced alkaline protease production by constructing an alkalophilic *Bacillus pumilus* strain. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 57: 153-160.
- Ferrero, M.A., G.R. Cartro, C.M. Abate, M.B. Baigori and F. Sineriz. 1996. Thermostable alkaline protease of *Bacillus licheniformis* MIR 29: Isolation production and characterization. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 45: 327-332.
- Fogarty, W.M. and P.J. Griffin. 1973. Production and purification of the metalloprotease of *Bacillus polymyxa*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 26 (2): 185-190.
- Frankena, J., C.M. Koningstein, H.W. van Verseveld and A.H. Stouthamer. 1986. Effect of different limitations in chemostat cultures on growth and production of exocellular protease by *Bacillus licheniformis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 24: 106-112.
- Freddi, G., R. Mossotti, R. Innocenti. 2003. Degumming of silk fabric with several proteases. **Biotechnol. J.** 106: 101-112.
- Fujio, Y. and S. Kume. 1990. Characteristics of a highly thermostable neutral protease produced from *Bacillus stearothermophilus*. **Microb. Biotechnol.** 7: 12-16.
- Fujiwara, N. and K. Yamamoto. 1987. Production of an alkaline protease in a low-cost medium by alkalophilic *Bacillus* sp. and properties of the enzyme. **J. Ferment. Technol.** 65: 345-348.
- Gacula, M.C. and J. Singh. 1984. **Statistical methods in food and consumer research.** Applied science, London.
- Gessesse, A. and B.A. Gashe. 1997. Production of alkaline protease by an alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline soda lake. **Biotechnol. Lett.** 19: 479-481.

- Ghorbel, B., A.S. Kamoun and M. Nasri. 2003. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. **Enzyme Microb. Technol.** 32: 513-518.
- Guangrong, H., D. Dehui, H. Weilian and J. Jiaying. 2008. Optimization of medium composition for thermostable protease production by *Bacillus* sp. HS08 with a statistical method. **Afr. J. Biotechnol.** 7 (8): 1115-1122.
- _____, Y. Tiejing, H. Po and J. Jiaying. 2006. Purification and characterization of protease from *Thermophilic bacillus* strain HS08. **Afr. J. Biotechnol.** 5 (24): 2433-2438.
- Gupta, R., R.K. Saxzana and S. Knan. 1999. Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus* sp. **Biotechnol. Lett.** 21: 135-138.
- Haaland, P.D. 1989. **Experimental design in biotechnology.** Marcel Dekker Inc., New York.
- Hameed, A., T. Keshavarz and C.S. Evans. 1999. Effect of dissolved oxygen tension and pH on the production of extracellular protease from a new isolate of *Bacillus subtilis* K2, for use in leather processing. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 74: 5-8.
- Hanlon, G.W., N.A. Hodges and A.D. Russel. 1982. The influence of glucose, ammonium and magnesium availability on the production of protease and bacitracin by *Bacillus licheniformis*. **J. Gen. Microbiol.** 128: 845-851.
- Hashimoto, H., Y. Kaneko, T. Iwaasa and T. Yokotsuka. 1973. Production and purification of acid protease from the thermophilic fungus, *Penicillium duponti* K1014. **Appl. Microbiol.** 25 (4): 584-588.
- Holmes, M.G., C.S. Beggs, M. Jabben and E. Schäfer. 1982. Hypocotyl growth in *Sinapis alba* L.: the roles of light quality and quantity. **Plant Cell Environ.** 5: 45-51.

- Horikoshi, K. 1991. **Microorganisms in alkaline environments**. Kodansha, Tokyo.
- Hu, R. 1999. **Food Product Design: A Computer-Aided Statistical Approach**. Technomic Publishing Co., Ltd., Pennsylvania.
- Hughes, M.N. and R.K. Poole. 1989. **Metal and Microorganisms**. Chapman and Hall, London.
- _____ and R.K. Poole. 1991. Metal speciation and microbial growth-the hard (and soft) facts. **J. Gen. Microbiol.** 137: 725-734.
- Jang, J.W., H.K. Jun, E.K. Kim, W.H. Jang, J.H. Kang and O.J. Yoo. 2001. Enhance thermal stability of an alkaline protease, AprP, isolated from a *Pseudomonas* sp. by mutation at an autoproteolytic site, ser.-331. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 34: 81-84.
- Jasvir, S., N. Gill, G. Devasahayam and D.K. Sahoo. 1999. Studies on alkaline protease produced by *Bacillus* sp. NG 312. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 76:57-63.
- Johnversly, B. and G.R. Naik. 2001. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. **Process Biochem.** 37: 139-144.
- Joo, H.S. and C.S. Chang. 2005. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochem.** 40: 1263-1270.
- _____, C.G. Kumar, G.C. Park, K.T. Kim, S.R. Paik and C.S. Chang. 2002. Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. **Process Biochem.** 38: 155-159.

- Joo, H.S., G.C. Park, K.M. Kim, S.R. Paik and C.S. Chang. 2001. Novel alkaline protease from the polychaeta, *Periserrula leucophryna*: Purification and characterization. **Process Biochem.** 36: 839-900.
- Kanekar, P.P., S.S. Nilegaonkar and S.S. Sarnaik. 2002. Optimization of protease activity of alkalophilic bacteria isolated from an alkaline lake in India. **Bioresour. Technol.** 85: 87-93.
- Kaur, S., R.M. Vohra, M. Kapoor, Q.K. Beg and G.S. Hoondal. 2001. Enhanced production and characterization of high thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. P-2. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 17: 125-129.
- Kembhavi, A.A., A. Kulkarni and A. Pant. 1993. Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM No. 64. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 38: 83-92.
- Kim, S.W., H.J. Hwang, C.P. Xu, J.W. Choi and J.W. Yun. 2003. Effect of aeration and agitation on the production of mycelial biomass and exopolysaccharides in an entomopathogenic fungus *Paecilomyces sinclairii*. **Lett. Appl. Microbiol.** 36: 321-326.
- Kim, W., K. Choi, Y. Kim, H. Park, J. Choi, Y. Lee, H. Oh, I. Kwon and S. Lee. 1996. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. Strain CK1 1-4 screened from Chungkook-Jang. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 2482-2488.
- Kobayashi, M., T. Nagasawa and H. Yamada. 1992. Enzymatic synthesis of acrylamide; a success story not yet over. **Trends Biotech.** 10: 402-408.

- Kobayashi, T., Y. Hakamada, K. Koike and S. Ito. 1996. Purification of alkaline protease from a *Bacillus* strain and their possible interrelationship. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 45: 63-71.
- _____, Y. Hakamada, S. Adachi, J. Hitomi, T. Yoshimatsu, K. Koike, S. Kawai and S. Ito. 1995. Purification and properties of and alkaline protease from alkaophilic *Bacillus* sp. KSM-16. **Appl. Microbial. Biotechnol.** 43: 473-481.
- Kole, M.M., I. Draper and D.F. Gerson. 1987. Production of protease by *Bacillus subtilis* using simulataneous control of glucose and ammonium concentrations. **J. Chem. Tech. Biotech.** 41: 197-206.
- _____, I. Draper and D.F. Gerson. 1988a. Production of protease by *Bacillus subtilis* using simultaneous control of glucose and ammonium concentrations. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 41:197-206.
- Kole, M.M., I. Draper and D.F. Gerson. 1988b. Protease production by *Bacillus subtilis* in oxygen controlled, glucose fed-batch cultivation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 28: 404-408.
- Kumar, C.G. and H. Takagi. 1999. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnol. Adv.** 17: 561-594.
- Laxman, R.S., A.P. Sonawane, S.V. More, B.S. Rao, M.V. Rele, V.V. Jogdand, V.V. Deshpande and M.B. Rao. 2005. Optimization and scale up to the production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. **Process Biochem.** 40: 3152-3158.
- Lee, Y.W. 2008. **Characteristics of the cocoon, silk reeling and testing manual**. Available Source: www.fao.org/docrep/x2099E/x2099e03.htm, August 3, 2008.

- Lowry, O.H., J.N.J., Rosebrough, L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.
- Mabrouk, S.S., A.M. Hashem, N.M.A. El-Shayeb, A.M.S. Ismail and A.F. Abdel-Fattah. 1999. Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. **Bioresour. Technol.** 69: 155-159.
- Manachini, P.L. and M.G. Fortina. 1998. Production in sea-water of thermostable alkaline proteases by a halotolerant strain of *Bacillus licheniformis*. **Biotechnol. Lett.** 20: 565-568.
- McKeller, R.C. and H. Cholette. 1984. Synthesis of extracellular proteinase by *Pseudomonas fluorescens* under conditions of limiting carbon, nitrogen and phosphate. **Appl. Environ. Microbiol.** 47: 1224-1227.
- Mehrotra, S., P.K. Pandey, R. Gaur and N.S. Darmwal. 1999. The production of alkaline protease by a *Bacillus* species isolate. **Bioresour. Tecchonol.** 67: 201-203.
- Moon, S.H. and S.J. Parulekar. 1991. A parametric study of protein production in batch and fed batch culture of *Bacillus firmus*. **Biotechnol. Bioeng.** 37:467-483.
- _____ and _____. 1993. Some observations on protease production in continuous suspension cultures of *Bacillus firmus*. **Biotechnol. Bioeng.** 41: 43-54.
- Moormann, M., A. Schlochtermeyer and H. Schrempf. 1993. Biochemical characterization of a protease involved in the processing of a *Streptomyces reticuli cellulase* (avicelase). **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 1573-1578.

- Nadeem, M., J.I. Qazi, Q.A. Syed and S. Baig. 2006. Studies on commercially important alkaline protease from *Bacillus licheniformis* N-2 isolated from decaying organic soil. **Turk. J. Biochem.** 32: 171-177.
- _____, J.I. Qazi, Q.A. Syed and S. Baig. 2008. Optimization of process parameters for alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* N-2 and kinetics studies in batch fermentation. **Turk. J. Biol.** 32: 243-251.
- Naidu, K.S.B. and K.L. Davi. 2005. Optimization of thermostable alkaline protease production from species of *Bacillus* using rice bran. **Afr. J. Biotechnol.** 4 (7): 724-726.
- Nehete, P.N., V.D. Shah and R.M. Kothari. 1985. Profiles of alkaline protease production as a function of composition of the slant, age, transfer and isolate number and physiological state of culture. **Biotechnol. Lett.** 7: 413-418.
- Nelson, N. 1944. A photometric adaption of somogyi method for the determinations of glucose. **J. Biol. Chem.** 153: 375-380.
- Neter, J., M.H. Kutner, C.J. Nachtsheim and W. Wasserman. 1996. Applied linear statistical models. 4th ed. WBC McGaw-Hill, New York.
- Neuath, H. 1989. Proteolytic enzymes: nomenclature and classification, pp. 1-12. *In* R. Beynon and J. S. Bond, eds. **Proteolytic Enzymes**. Oxford University Press Inc, New York.
- Nilegaonka, S.S., P.P. kanekar, S.S. Sarnaik and A.S. Kelkar. 2002. Production, isolation and characterization of extracellular protease an alkaliphilic strain *Arthrobacter ramosus*, MCM B -351 isolated from the alkaline lake of Lonar, India. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 18: 785-789.

- Niu, X., R. Vardavas, R.E. Caflisch and C. Ratsch. 2006. Level set simulation of directed self assembly during epitaxial growth. **Phys. Rev. B** 74 (19): 193403-193406.
- Ogawa, Y., S. Toyosawa, T. Inagaki, S.S. Hong and N. Ijuhin. 1995. Carbonic anhydrase isozyme VI in rat lacrimal gland. **Histochem.** 103: 387-394.
- Oyama, H., M. Kinjoh, M. Watari and S. Murao. 1997. Purification and characterization of alkaline proteinase produced by *Primelobacter* sp. Z-483. **J. Ferment. Bioeng.** 84: 351-353.
- Parekh, S., V.A. Vinci and R.J. Strobul. 2000. Improvement of microbial strains and fermentation process. **Appl. Microbial. Biotechnol.** 54: 287-301.
- Patrignani, F., R. Lanciotti, J.M. Mathara, M.E. Guerzoni, W.H. Holzapfel. 2006. Potential of functional strains, isolated from traditional Maasai milk, as starters for the production of fermented milks. **Int. J. Food Microbiol.** 107: 1-11.
- Phadatare, S.U., V.V. Deshpande and M.C. Srinivasan. 1993. High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): enzyme production and compatibility with commercial detergents. **Enzyme Microbiol. Technol.** 15: 72-76.
- Plackett, R.L. and J.P. Burman. 1946. The design of optimum multifactorial experiments, **Biometrika** 33: 305-325.
- Polgar, L. 1989. **Mechanisms of protease action: proteolytic enzymes.** CRC Press, Boca Raton, Fla.

- Potumarthi, R., C. Subhakar, A. Pavani and J. Annapurna. 2007. Evaluation of various parameters of calcium-alginate immobilization method for enhanced alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* NCIM-2042 using statistical methods. **Bioresour. Technol.** 99 (6): 1776-1786.
- Puri, S., Q.K. Beg and R. Gupta. 2002. Optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. by Response Surface Methodology. **Curr. Microbiol.** 44: 286-290.
- Rao, M.B., A.M. Tankasale, M.S. Ghatage and V.V. Deshpande. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial protease. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 63: 597-635.
- Rao, Y.K., S.C. Lu, B.L. Liu and Y.M. Tzeng. 2006. Enhanced production of an extracellular protease from *Beauveria bassiana* by optimization of cultivation processes. **Biochem. Eng. J.** 28: 57-66.
- Ray, M.K., K.U. Devi, G.S. Kumar and S. Shivaji. 1992. Extracellular protease from the Antarctic yeast *Candida humicola*. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 1918-1923.
- Reddy, L.V.A., Y.J. Wee, J.S. Yun and H.W. Ryu. 2008. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches. **Bioresour. Technol.** 99: 2242-2249.
- Sandhya, C., A. Sumantha, G. Szakacs and A. Pandey. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid- state fermentation. **Process Biochem.** 40: 2689-2694.
- Saurabh, S., I. Jasmine, G. Pritesh, S.R. Kumar. 2007. Enhanced productivity of serine protease by *Bacillus* sp. using soybean as substrate. **Malaysian J. Microbiol.** 3 (1): 1-6.

Schaeffer, P. 1969. Sporulation and the production of antibiotics, exoenzymes and exotoxins.

Bacteriol. Rev. 33: 48-71.

Scigubabu, G., N. Lokeswari and K. Jayaraju. 2006. Screening of nutritional parameters for the production of protease from *Aspergillus oryzae*. **J. Chem.** 4 (2): 208-215.

Secades, P. and J.A. Guijarro. 1999. Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckeri* and effect of culture conditions on production. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 3969-3975.

Sen, S. and T. Satyanarayana. 1993. Optimization of alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis* S-40. **Indian J. Microbiol.** 33: 43-47.

Shikha, A. Sharan and N.S. Darmwal. 2007. Improved production of alkaline protease from a mutant of alkalophilic *Bacillus pantotheneticus* using molasses as a substrate. **Bioresour. Technol.** 98: 881-885.

Singh, J., N. Batra and R.C. Sobiti. 2001. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSP1. **Process Biochem.** 36: 781-785.

_____, R.M. Vohra and D.K. Sahoo. 2004. Enhanced productions of alkaline protease by *Bacillus sphaericus* using fed-batch culture. **Process Biochem.** 39: 1093-1101.

Sonnleither, B. 1983. Biotechnology of thermophilic bacteria-growth, products, and application, pp. 69-138. In A. Fiechter, ed. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**. Springer-verlag.

Sousa, F., S. Jus, A. Erbel, V. Kokol, A.C. Paulo and G.M. Gubitz. 2007. A novel metalloprotease from *Bacillus cereus* for protein fibre processing. **Enzyme Microb. Technol.** 40:1772-1781.

- Stanbury, P.F., A. Whitaker and S.J. Hall. 1999. **Principle of fermentation technology**. 7th ed. MPG Book Ltd., Bodmin, Cornwall.
- Steele, D.B., M.J. Fiske, B.P. Steele and V.C. Kelley. 1992. Production of a low molecular weight, alkaline active, thermostable protease by a novel spiral-shaped bacterium, *Kurthia spiroforme* sp. nov. **Enzyme Microb. Technol.** 14: 358-360.
- Strach, M.A. and J.A. Hoch. 1993. Transition-state regulators: sentinels of *Bacillus subtilis* post exponential phase gene expression. **Mol. Microbiol.** 7: 337-342.
- Tamai, Y., K. Saeki, J. Iwata and Y. Watanabe. 1994. Purification and characterization of an alkaline protease from *Oerskovia xanthineolytica* TK-1. **J. Ferment. Bioeng.** 77:554-556.
- Tari, C., H. Genckel, F. Tokatli. 2006. Optimization of growth medium using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21. **Process Biochem.** 41: 659-665.
- Thys, R.C.S., S.O. Guzzon, F.C. Olivera and A. Brandeli. 2006. Optimization of protease production by *Microbacterium* sp. in feather meal using response surface methodology. **Process Biochem.** 41: 67-73.
- Titani, K., M.A. Hermodson, L.H. Ericsson, K.A. Walsh and H. Neurath. 1972. Amino acid sequence of thermolysin. **Nature (London) New Biol.** 238: 35-37.
- Tob, S., T. Takami, S. Ikeda and K. Horikoshi. 1976. Production and enzymatic properties of proteinase of *Candida lipolitica*. **Agric. Biol. Chem.** 40: 1087-1092.

- Tsuchiya, K., Y. Nakamaru, H. Sakashita and T. Kimura. 1992. Purification and characterization of the most stable alkaline protease from alkalophilic *Thermoactinomyces* sp. HS682. **Biosci. Biotech. Biochem.** 56: 246-250.
- Tunga, R., B. Shrivastava and R. Banerjee. 2003. Purification and characterization of protease from solid state culture of *Aspergillus parasiticus*. **Process Biochem.** 38: 1553-1558.
- Uyar, F. and Z. Baysal. 2004. Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus* sp. under solid state fermentation. **Process Biochem.** 39: 1893-1898.
- Vaithanomsat, P., T. Malapant and W. Apiwattanapiwat. 2008. Silk degumming solution as substrate for microbial protease production. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 42: 543-551.
- Varela, H., M.D. Ferrari, L. Belobradjic, R. Weyrauch and M.L. Loperena. 1996. Effect of medium composition on the production by a new *Bacillus subtilis* isolate of protease with promising unhairing activity. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 2: 643-645.
- Wang, H.L., J.B. Vespa and C.W. Hesseltine. 1974. Acid protease production by fungi used in soybean food fermentation. **Appl. Microbiol.** 27 (5): 906-911.
- Wang, Q., Y. Hou, Z. Xu, J. Miao and G. Li. 2008. Optimization of cold-active protease production by the psychrophilic bacterium *Colwellia* sp. NJ341 with response surface methodology. **Bioresour. Technol.** 99: 1926-1931.
- Ward, O.P. 1983. Proteases, pp. 251-305. In W.M., Fogarty, ed. **Microbial enzymes and biotechnology**. Applied Science Publ., New York.
- _____. 1985. Proteolytic enzymes, pp. 789-818. In M. Moo-Young, H.W. Blanch, S. Drew and D.I.C. Wang, eds. **Comprehensive Biotechnology**. Pergamon Press, New York.

- Wu, L.C. and Y.D. Hang. 2000. Acid protease production from *Neosartorya scheri*. **Lebensm. Wiss. u.-Technol.** 33: 44-47.
- Yang, P., K.N. Liou, M.I. Mishchenko and B.-C. Gao. 2000. Efficient finite-difference time-domain scheme for light scattering by dielectric particles: Application to aerosols. **Appl. Opt.** 39: 3727-3737.
- Yum, D.Y., H.C. Chung, D.H. Bai, D.H. Oh and J.H. Yu. 1994. Purification and characterization of alkaline serine protease from an alkalophilic *Streptomyces* sp. **Biosci. Biotech. Biochem.** 58 :470-474.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเพาะเลี้ยงและถังหมักที่ใช้ในการทดลอง

1. Davis minimal medium (ดัดแปลงจาก Davis and Mingioli (1950))

ผงไหม	1.0	กรัม
K_2HPO_4	7.0	กรัม
KH_2PO_4	3.0	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.5 ด้วย 3 N NaOH แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2. Basal medium agar (BMSM agar) (ดัดแปลงจาก Horikoshi (1991))

Glucose	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัม
Skim milk	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.5 ด้วย 3 N NaOH แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3. Basal medium broth (BMSM broth) (ดัดแปลงจาก Horikoshi (1991))

Glucose	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
K ₂ HPO ₄	1.0	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2	กรัม
Skim milk	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

ปรับพีเอชเท่ากับ 7.5 ด้วย 3 N NaOH แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4. Nutrient agar (NA)

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. การเตรียม phosphate buffer

สารละลาย A: 0.2 M monobasic sodium phosphate (NaH₂PO₄·2H₂O 31.2 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B: 0.2 M dibasic sodium phosphate (Na₂HPO₄·7H₂O 53.65 กรัม หรือ Na₂HPO₄·12H₂O 71.7 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	พีเอช	A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	พีเอช
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.7	91.5	7.8
56.5	46.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

6. ถังหมักที่ใช้ในการทดลอง



ภาพผนวกที่ ก1 ถังหมัก Biostat B (B. Braun Biotech International) ขนาด working volume สูงสุด 2 ลิตร

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์ทางเคมี

1. การหากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (สุทธิดา (2548))

1.1 สารเคมี

1.1.1 สารละลายเคซีน ใช้สารละลายเคซีนเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นสับเซตท โดยชั่งเคซีน 2 กรัม ต้มด้วย NaOH 0.1 M 25 มิลลิลิตร จนกระทั่งเคซีนละลายหมด ปรับพีเอชให้เป็น 8 และปรับปริมาตรด้วย phosphate buffer ให้เป็น 100 มิลลิลิตร

1.1.2 สารละลาย trichloroacetic acid (TCA) 10 เปอร์เซ็นต์ ใช้เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ เตรียมโดยชั่ง TCA 10 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร

1.2 การวิเคราะห์

1.2.1 นำสารละลายเอนไซม์มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย phosphate buffer พีเอช 8

1.2.2 ปิเปตสารละลายเคซีนเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ 250 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง และอุ่นสารละลายเคซีน ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

1.2.3 นำเอนไซม์ที่เจือจางมา 250 ไมโครลิตร เติมลงในสารละลายเคซีน ในข้อ 1.2.2 บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย TCA 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อให้โปรตีนตกตะกอนหมด

1.2.4 ทำหลอดควบคุม โดยปิเปตสารละลายเอนไซม์ 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย TCA 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติมสารละลายเคซีน 250 ไมโครลิตร

1.2.5 นำสารละลายจากข้อ 1.2.3 และ 1.2.4 มาปั่นแยกตะกอนโปรตีนออกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพ

ของเอนไซม์ในการย่อยโปรตีน โดยวัดปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นเทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซีน (standard curve) โดยวิธีของ Lowry (Lowry *et al.*, 1951)

1.2.6 การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)} = \frac{(T_1 - T_2) \times D}{t \times V}$$

T_1 คือ ความเข้มข้นของไทโรซีนที่วัดได้จากหลอดทดลองตัวอย่าง ($\mu\text{g/ml}$)

T_2 คือ ความเข้มข้นของไทโรซีนที่วัดได้จากหลอดควบคุม ($\mu\text{g/ml}$)

V คือ ปริมาตรทั้งหมดในหลอดทดลอง ซึ่งเท่ากับ 1 มิลลิลิตร

t คือ เวลาที่ใช้ปฏิกิริยาเอนไซม์กับสับสเตรท ซึ่งเท่ากับ 10 นาที

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ เท่ากับปริมาณของเอนไซม์โปรติเอสที่สามารถย่อยเคซีนแล้วเกิดไทโรซีน 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ทดลอง

2. การวิเคราะห์หาปริมาณไทโรซีน (ดัดแปลงจาก Lowry *et al.*, 1951)

2.1 สารเคมี

2.1.1 สารละลายไทโรซีนมาตรฐาน ชั่งไทโรซีนด้วยเครื่องชั่งสารอย่างละเอียด 0.1000 กรัม ละลายด้วยสารละลาย HCl 0.1 M จนกระทั่งไทโรซีนละลายหมด จากนั้นเทลงใน volumetric flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บเป็น stock solution จากนั้นนำไปเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐาน ที่มีความเข้มข้นของไทโรซีน ตั้งแต่ 20 ถึง 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1.2 การเตรียมสารละลาย Lowry

สารละลาย A: ละลาย copper sulfate 0.5 กรัม และ sodium citrate 1 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร

สารละลาย B: ละลาย sodium carbonate 20 กรัม และ NaOH 4 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร

สารละลาย C: นำสารละลาย A มา 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B 50 มิลลิลิตร

สารละลาย D: สารละลาย 1 N Folin-ciocalteu

2.2 วิธีวิเคราะห์

2.2.1 หากกราฟมาตรฐานของไทโรซีน โดยเจือจางสารละลายมาตรฐานไทโรซีนให้มีความเข้มข้น 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2.2.2 ปิเปตสารละลายตัวอย่างสารละลายมาตรฐาน และสารละลายในหลอดควบคุมลงในหลอดทดลอง หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วน blank จะใช้น้ำกลั่น

2.2.3 เติมสารละลาย C หลอดละ 2.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองตามข้อ 2.2.2 ทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย D หลอดละ 0.25 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับปริมาณไทโรซีนแล้วนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับหาความเข้มข้นของไทโรซีนจากกราฟมาตรฐาน และคำนวณหาปริมาณไทโรซีนที่มีในตัวอย่าง

3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีดัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์ของ Nelson-Somogyi (Nelson, 1944)

3.1 สารเคมี

3.1.1 Somogyi reagent (copper reagent; solution A)

ก. ละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตต (sodium potassium tartate) 12 กรัม โซเดียมคาร์บอเนต 24 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร

ข. เติมคอปเปอร์ซัลเฟต 4 กรัม ที่ละลายในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

ค. เติมโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต 16 กรัม ผสมให้เข้ากัน

ง. เติมโซเดียมซัลเฟต 180 กรัม ที่ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร เก็บสารละลายนี้ไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ขวดสีชา) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนนำไปใช้ (ถ้ามีตะกอนให้กรองออก)

3.1.2 Nelson reagent (solution B)

ก. ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต (ammonium molybdate) 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร

ข. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4) และไดโซเดียมไฮโดรเจนอาซิเนต (disodium hydrogen arsenate) 3 กรัม ที่ละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

ค. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ขวดสีชา) ประมาณ 24 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้

3.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส

3.2.1 เตรียม D-กลูโคส (D-glucose) ความเข้มข้น 20 40 100 120 140 และ 160 $\mu\text{g/ml}$ จากสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่เก็บแบบแช่เยือกแข็ง

3.3 วิธีวิเคราะห์

3.3.1 ดูดสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลในช่วง 20 ถึง 160 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

3.3.2 เติมสารละลาย A ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที นำไปแช่ในน้ำเย็น เพื่อหยุดปฏิกิริยา

3.3.3 เติมสารละลาย B ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกันทันที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที

3.3.4 เติมน้ำกลั่นปริมาณ 6 มิลลิลิตร ผสมกันแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

ภาคผนวก ค
ข้อมูลการทดลอง

ตารางผนวกที่ ค1 การเจริญ และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในอาหาร BMSM medium ของ *Bacillus* sp. C4 สำหรับลือกาวไหม

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	น้ำตาลรีดิวซ์ (g/l)	ปริมาณเซลล์ (log CFU/ml)	กิจกรรมของ เอนไซม์โปรติเอส (units/ml)
0	7.42	10.00	5.96	0.0
3	7.22	8.42	7.48	34.3
6	6.72	6.07	8.59	31.2
9	6.76	1.69	9.73	442.4
12	6.77	1.83	10.07	595.0
15	6.42	1.07	9.97	607.9
18	6.51	0.98	9.90	679.1
21	6.87	0.67	10.25	700.9
24	7.18	0.44	9.21	729.0
30	7.21	0.31	8.96	580.0
36	7.24	0.12	7.66	561.1

ตารางผนวกที่ ค2 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของ *Bacillus* sp. C4 สำหรับการลอกกาวยไหมดจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 200 rpm เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

อาหารเลี้ยงเชื้อ ^{1/}	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (units/ml)		
	ทดลอง ครั้งที่ 1	ทดลอง ครั้งที่ 2	ทดลอง ครั้งที่ 3
1. BMSM medium (control)	732.2	713.4	730.4
2. BMSM medium (กลูโคส 1% (w/v) และแป้งถั่วเหลือง 0.5% (w/v))	787.5	732.1	749.6
3. BMSM medium (กลูโคส 1% (w/v) และแป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))	25.8	24.1	29.4
4. BMSM medium (ซูโครส 1% (w/v) และ yeast extract 0.5% (w/v))	748.8	700.0	716.7
5. BMSM medium (ซูโครส 1% (w/v) และแป้งถั่วเหลือง 0.5% (w/v))	694.3	649.0	569.8
6. BMSM medium (ซูโครส 1% (w/v) และแป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))	30.4	28.4	26.4
7. BMSM medium (แลคโตส 1% (w/v) และ yeast extract 0.5% (w/v))	461.4	431.3	428.8
8. BMSM medium (แลคโตส 1% (w/v) และแป้งถั่วเหลือง 0.5% (w/v))	596.8	528.3	493.5
9. BMSM medium (แลคโตส 1% (w/v) และแป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))	35.9	33.6	32.3
10. BMSM medium (แป้งมัน 2% (w/v) และแป้งถั่วเหลือง 0.5% (w/v))	8.3	8.1	8.3
11. BMSM medium (แป้งมันไฮโดรไลซ์ 2% (w/v) และแป้งถั่วเหลือง 0.5% (w/v))	914.6	812.6	825.4
12. BMSM medium (แป้งมันไฮโดรไลซ์ 0.5% (w/v) ผสมกลูโคส 0.5% (w/v) และแป้งถั่วเหลือง 0.5% (w/v))	580.3	488.1	534.6
13. BMSM medium (แป้งมัน 2% (w/v) และ yeast extract 0.5% (w/v))	44.2	43.1	44.1
14. BMSM medium (แป้งมัน 0.5% (w/v) ผสมกลูโคส 0.5% (w/v) และแป้งถั่วเหลือง 0.5% (w/v))	18.9	18.5	18.9
15. BMSM medium (แป้งมัน 2% (w/v) และแป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))	31.6	29.5	25.3
16. BMSM medium (แป้งมัน 0.5% (w/v) ผสมกลูโคส 0.5% (w/v) และ yeast extract 0.5% (w/v))	505.3	497.5	493.8
17. BMSM medium (แป้งมัน 0.5% (w/v) ผสมกลูโคส 0.5% (w/v) และแป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))	584.4	554.2	545.8
18. BMSM medium (แป้งมันไฮโดรไลซ์ 2% (w/v) และ yeast extract 0.5% (w/v))	648.3	732.1	672.1

ตารางผนวกที่ ค2 (ต่อ)

อาหารเลี้ยงเชื้อ ^{1/}	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (units/ml)		
	ทดลอง ครั้งที่ 1	ทดลอง ครั้งที่ 2	ทดลอง ครั้งที่ 3
19. BSM medium (น้ำมันไฮโดรไลซ์ 2% (w/v) และแป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))	742.2	718.2	708.0
20. BSM medium (น้ำมันไฮโดรไลซ์ 0.5% (w/v) ผสมกลูโคส 0.5% (w/v) และ yeast extract 0.5% (w/v))	781.6	745.7	739.3
21. BSM medium (น้ำมันไฮโดรไลซ์ 0.5% (w/v) ผสมกลูโคส 0.5% (w/v) และแป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))	676.4	618.7	640.1
22. BSM medium (ไม่เติมแหล่งคาร์บอน)	309.8	295.9	265.6
23. BSM medium (ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน)	44.6	48.8	50.2

หมายเหตุ ^{1/}อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง คือ BSM medium สูตรดัดแปลงเติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน แทนที่จากสูตรอาหารเดิมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 200 rpm เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางผนวกที่ ค3 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของ *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกาวไหม จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อ ^{1/}	ปริมาณเซลล์ (log CFU/ml)	น้ำตาลรีดิวซ์ (g/l)	พีเอช	กิจกรรมของ เอนไซม์โปรติเอส (units/ml)
1. BMSM medium (control)	8.602	0.80	6.82	725.3 ± 10.40 ^f
2. BMSM medium (กลูโคส 1% (w/v) และแป้งข้าวเหลือง 0.5% (w/v))	9.037	3.00	6.45	756.4 ± 28.29 ^f
3. BMSM medium (กลูโคส 1% (w/v) และแป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))	8.531	8.50	6.45	26.4 ± 2.67 ^a
4. BMSM medium (ซูโครส 1% (w/v) และ yeast extract 0.5% (w/v))	7.519	1.70	6.06	721.8 ± 24.82 ^f
5. BMSM medium (ซูโครส 1% (w/v) และแป้งข้าวเหลือง 0.5% (w/v))	9.591	8.00	6.50	637.7 ± 62.99 ^c
6. BMSM medium (ซูโครส 1% (w/v) และแป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))	8.193	4.81	6.53	28.4 ± 1.98 ^a
7. BMSM medium (แลคโตส 1% (w/v) และ yeast extract 0.5% (w/v))	8.903	4.60	8.22	440.5 ± 18.14 ^c
8. BMSM medium (แลคโตส 1% (w/v) และแป้งข้าวเหลือง 0.5% (w/v))	8.940	7.30	6.60	539.5 ± 52.59 ^d
9. BMSM medium (แลคโตส 1% (w/v) และแป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))	7.477	5.50	6.77	33.9 ± 1.83 ^a
10. BMSM medium (แป้งมัน 2% (w/v) และแป้งข้าวเหลือง 0.5% (w/v))	9.568	4.30	6.59	8.2 ± 0.12 ^a
11. BMSM medium (แป้งมันไฮโดร ไลซ์ 2% (w/v) และแป้งข้าวเหลือง 0.5% (w/v))	8.881	0.23	6.45	850.9 ± 72.12 ^g
12. BMSM medium (แป้งมันไฮโดร ไลซ์ 0.5% (w/v) ผสมกลูโคส 0.5% (w/v) และแป้งข้าวเหลือง 0.5% (w/v))	8.145	0.91	6.41	356.1 ± 65.17 ^d

ตารางผนวกที่ ค3 (ต่อ)

อาหารเลี้ยงเชื้อ ^{1/}	ปริมาณเซลล์ (log CFU/ml)	น้ำตาลรีดิวิซ์ (g/l)	พีเอช	กิจกรรมของ เอนไซม์โปรติเอส (units/ml)
13. BSM medium (น้ำมัน 2% (w/v) และ yeast extract 0.5% (w/v))	7.182	5.69	6.50	43.8 ± 0.63 ^a
14. BSM medium (น้ำมัน 0.5% (w/v) ผสมกลูโคส 0.5% (w/v) และ แป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))	7.017	3.28	6.65	18.8 ± 0.35 ^a
15. BSM medium (น้ำมัน 2% (w/v) และแป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))	7.238	2.61	6.26	20.4 ± 3.24 ^a
16. BSM medium (น้ำมัน 0.5% (w/v) ผสมกลูโคส 0.5% (w/v) และ yeast extract 0.5% (w/v))	8.654	4.15	6.12	498.9 ± 5.53 ^{cd}
17. BSM medium (น้ำมัน 0.5% (w/v) ผสมกลูโคส 0.5% (w/v) และ แป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))	8.566	2.19	6.41	561.4 ± 21.31 ^d
18. BSM medium (น้ำมันไฮโดร ไลซ์ 2% (w/v) และ yeast extract 0.5% (w/v))	9.017	1.98	6.26	684.2 ± 59.25 ^{ef}
19. BSM medium (น้ำมันไฮโดร ไลซ์ 2% (w/v) และแป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))	9.182	0.65	6.64	722.8 ± 16.93 ^f
20. BSM medium (น้ำมันไฮโดร ไลซ์ 0.5% (w/v) ผสมกลูโคส 0.5% (w/v) และ yeast extract 0.5% (w/v))	9.176	0.97	6.41	755.6 ± 25.33 ^f
21. BSM medium (น้ำมันไฮโดร ไลซ์ 0.5% (w/v) ผสมกลูโคส 0.5% (w/v) และแป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))	8.096	1.14	6.44	645.0 ± 40.79 ^f

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

อาหารเลี้ยงเชื้อ ^{1/}	ปริมาณเซลล์ (log CFU/ml)	น้ำตาลรีดิวซ์ (g/l)	พีเอช	กิจกรรมของ เอนไซม์โปรติเอส (units/ml)
22. BSM medium (ไม่เติมแหล่งคาร์บอน)	8.115	5.83	6.34	201.9 ± 9.80 ^b
23. BSM medium (ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน)	8.091	6.71	6.56	119.7 ± 2.93 ^a

หมายเหตุ ^{1/}อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง คือ BSM medium สูตรดัดแปลงที่เติมแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนแทนที่จากสูตรอาหารเดิมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 200 rpm เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

a, b, c, d, e, f ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P ≤ 0.05)

ตารางผนวกที่ ค4 กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกาวยไหมดจากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BSM medium ที่เติมสารเหนียวต่างชนิดกัน

สารเหนียว ^{1/}	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (units/ml)		
	ทดลองครั้งที่ 1	ทดลองครั้งที่ 2	ทดลองครั้งที่ 3
1. BSM medium (control)	799.8	819.0	796.8
2. BSM medium (เติมเซรีซิน แทน skim milk)	786.4	753.9	733.6
3. BSM medium (เติมไหมดิบ แทน skim milk)	396.8	406.3	395.3
4. BSM medium (ไม่เติมสารเหนียว)	500.7	512.7	498.8

หมายเหตุ ^{1/}อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง คือ BSM medium สูตรดัดแปลง ที่มีการเติมสารเหนียวแทน skim milk จากสูตรอาหารเดิม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 200 rpm เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางผนวกที่ ค5 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับการลอกกาวยไหมดจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ เป็นระยะเวลา 20 24 30 และ 36 ชั่วโมง

อาหารเลี้ยงเชื้อ ^{1/}	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (units/ml)			
	20 h	24 h	30 h	36 h
1. BMSM medium (control)	784.6	821.5	757.7	456.8
2. BMSM medium (ไม่เติมสารเหนียวน้ำ)	517.7	514.2	571.1	475.0
3. BMSM medium (เติมเซรีซินแทน skim milk)	655.2	761.5	767.8	483.9
4. BMSM medium (เติมไหมดิบแทน skim milk)	332.1	410.2	455.8	488.4
5. BMSM medium (กลูโคส 1% (w/v) และ แป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))	805.3	843.1	728.3	0.7
6. BMSM medium (กลูโคส 1% (w/v) และ แป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))	26.6	27.8	25.6	15.5
7. BMSM medium (ซูโครส 1% (w/v) และ yeast extract 0.5% (w/v))	769.9	806.0	743.5	448.2
8. BMSM medium (ซูโครส 1% (w/v) และ แป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))	713.9	747.3	689.4	415.6
9. BMSM medium (ซูโครส 1% (w/v) และ แป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))	31.3	32.7	30.2	18.2
10. BMSM medium (แลคโตส 1% (w/v) และ yeast extract 0.5% (w/v))	474.4	496.7	458.2	276.2
11. BMSM medium (แลคโตส 1% (w/v) และ แป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))	581.1	608.4	561.2	338.3
12. BMSM medium (แลคโตส 1% (w/v) และ แป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))	36.9	38.7	35.7	23.3
13. BMSM medium (แป้งมัน 2% (w/v) และ แป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))	8.9	9.3	28.3	276.2
14. BMSM medium (แป้งมันไฮโดรไลซ์ 2% (w/v) และ แป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))	893.8	935.7	863.1	520.3
15. BMSM medium (แป้งมันไฮโดรไลซ์ 0.5% (w/v) ผสมกลูโคส 0.5% (w/v) และ แป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))	536.9	562.1	518.4	520.3

ตารางผนวกที่ ค5 (ต่อ)

อาหารเลี้ยงเชื้อ ^{1/}	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (units/ml)			
	20 h	24 h	30 h	36 h
16. BSM medium (น้ำมัน 2% (w/v) และ yeast extract 0.5% (w/v))	47.4	49.6	177.0	219.5
17. BSM medium (น้ำมัน 0.5% (w/v) ผสม กลูโคส 0.5% (w/v) และแป้งข้าวโพด 0.5% (w/v))	20.3	21.3	3.5	230.2

หมายเหตุ ^{1/}อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง คือ BSM medium สูตรดัดแปลงที่เติมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนแทนที่จากสูตรอาหารเดิมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 200 rpm

ตารางผนวกที่ ค6 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับการลอกกาวยไหม
จากการเพาะเลี้ยงในการจัดการทดลอง Plackett and Burman Design^{1/}

สิ่ง ทดลอง	ทดลองครั้งที่ 1				ทดลองครั้งที่ 2			
	ปริมาณเซลล์ (log CFU/ml)	น้ำตาล รีดิวซ์ (g/l)	ฟิเอช	กิจกรรม เอนไซม์ โปรติเอส (units/ml)	ปริมาณเซลล์ (log CFU/ml)	น้ำตาล รีดิวซ์ (g/l)	ฟิเอช	กิจกรรม เอนไซม์ โปรติเอส (units/ml)
1	8.83	6.80	6.60	1,164.6	8.74	6.54	5.98	1,176.8
2	7.48	9.00	6.37	365.8	7.56	8.91	6.54	366.3
3	8.73	3.90	6.38	539.8	8.81	4.00	6.32	541.1
4	8.15	8.30	5.95	429.3	8.00	7.80	5.52	429.5
5	9.15	4.90	5.56	1,247.1	8.98	5.00	5.31	1,317.9
6	8.36	9.40	6.29	233.6	8.19	8.99	5.70	231.6
7	8.89	1.70	6.79	797.5	8.59	1.50	6.43	800.0
8	6.89	5.10	6.25	204.6	6.53	5.32	6.19	202.1
9	8.72	4.60	5.24	584.8	7.64	4.30	6.30	587.4
10	8.11	8.90	5.86	775.6	8.68	7.82	6.32	778.9
11	8.11	1.60	6.19	709.4	7.54	2.20	5.89	711.6
12	8.04	4.30	5.49	560.4	8.00	4.46	6.37	564.2

หมายเหตุ ^{1/}อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง คือ BSM medium สูตรดัดแปลงที่เติมแป้งมันไฮโดไลซ์
แป้งถั่วเหลือง และสภาวะการเพาะเลี้ยงต่างกันตามการจัดการทดลอง Plackett and
Burman Design เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางผนวกที่ ค7 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกวไหมจากการเพาะเลี้ยงในแผนการทดลอง CCD^{1/}

สิ่งทดลอง	ทดลองครั้งที่ 1				ทดลองครั้งที่ 2				ทดลองครั้งที่ 3			
	ปริมาณเซลล์	น้ำตาล	ฟิเอช	กิจกรรม	ปริมาณเซลล์	น้ำตาล	ฟิเอช	กิจกรรม	ปริมาณเซลล์	น้ำตาล	ฟิเอช	กิจกรรม
	(log CFU/ml)	รีคิวซ์		เอนไซม์	(log CFU/ml)	รีคิวซ์		เอนไซม์	(log CFU/ml)	รีคิวซ์		เอนไซม์
		(g/l)		โปรติเอส		(g/l)		โปรติเอส		(g/l)		โปรติเอส
				(units/ml)				(units/ml)				(units/ml)
1	9.19	5.50	6.31	175.9	8.84	4.56	6.45	171.0	8.82	5.30	6.38	171.8
2	8.84	3.20	6.25	200.0	8.90	3.12	6.35	198.4	8.72	3.32	6.36	203.9
3	8.81	7.30	6.32	488.6	8.79	7.12	6.32	487.7	8.66	6.71	6.37	482.0
4	8.48	8.30	5.67	696.6	8.56	7.30	5.64	700.8	8.62	7.90	5.65	679.2
5	9.05	2.90	6.39	1,221.1	9.04	3.21	6.78	1,241.9	9.00	3.00	6.56	1,252.8
6	9.48	1.30	6.34	1,621.1	9.30	1.18	6.53	1,641.9	9.18	0.87	6.12	1,652.8
7	8.80	7.30	6.09	543.6	8.68	6.98	6.00	521.8	8.74	7.11	7.00	539.0
8	9.18	5.20	6.21	1,179.1	9.01	5.04	6.32	1,167.3	9.04	5.12	6.29	1,182.7
9	8.89	5.50	5.95	1,178.0	8.23	4.50	5.87	1,168.5	8.65	6.00	5.97	1,179.5
10	8.48	5.80	5.93	1,137.8	8.35	5.61	5.91	1,157.8	8.34	5.87	5.91	1,181.4
11	8.48	6.00	5.27	1,117.7	8.89	6.58	5.34	1,165.6	9.00	6.32	5.44	1,176.1
12	8.05	5.20	6.01	634.9	8.08	4.80	6.11	632.8	8.11	5.08	6.21	629.2

ตารางผนวกที่ ๗ (ต่อ)

สิ่งทดลอง	ทดลองครั้งที่ 1				ทดลองครั้งที่ 2				ทดลองครั้งที่ 3			
	ปริมาณเซลล์	น้ำตาล	ฟิเอช	กิจกรรม	ปริมาณเซลล์	น้ำตาล	ฟิเอช	กิจกรรม	ปริมาณเซลล์	น้ำตาล	ฟิเอช	กิจกรรม
	(log CFU/ml)	รีควิซ์		เอนไซม์	(log CFU/ml)	รีควิซ์		เอนไซม์	(log CFU/ml)	รีควิซ์		เอนไซม์
		(g/l)		โปรตีนเอส		(g/l)		โปรตีนเอส		(g/l)		โปรตีนเอส
				(units/ml)				(units/ml)				(units/ml)
13	8.00	5.30	6.15	416.0	7.89	5.27	6.25	415.0	8.01	5.11	6.32	420.6
14	8.84	12.70	6.41	442.2	8.76	11.62	6.31	447.9	8.66	10.90	6.28	440.6
15	8.48	7.70	5.35	763.0	9.14	6.80	5.27	767.9	8.68	7.50	5.44	761.9
16	8.48	6.50	5.7	941.8	8.76	6.74	5.65	921.3	8.71	6.69	5.71	919.6
17	8.60	3.00	5.88	1,212.0	8.60	2.85	5.78	1,298.5	8.45	3.14	5.82	1,279.6

หมายเหตุ ^{1/}อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง คือ BSM medium สูตรดัดแปลงที่เติมแป้งข้าวเหลือง และ skim milk และสภาวะการเพาะเลี้ยงต่างกันตามแผนการทดลอง CCD เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางผนวกที่ ค8 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับการลอกกาไหม
จากการเพาะเลี้ยงในการตรวจสอบสมการ (validation)^{1/}

สิ่ง	ทดลองครั้งที่ 1	ทดลองครั้งที่ 2	ทดลองครั้งที่ 3
ทดลอง	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (units/ml)	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (units/ml)	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (units/ml)
1	1489.00	1503.86	1506.54
2	1532.45	1522.98	1555.327
3	1488.67	1498.43	1548.30
4	1477.32	1487.59	1502.09
5	1456.27	1461.53	1389.9

หมายเหตุ ^{1/}อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง คือ BSM medium สูตรดัดแปลงที่เติมแป้งมันไฮโดไลซ์
แป้งถั่วเหลือง และสภาวะการเพาะเลี้ยงต่างกันตามการตรวจสอบสมการ
(validation) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางผนวกที่ ค9 การเจริญและกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากการเพาะเลี้ยงแบบเปิดเสรี
ในถังหมักของ *Bacillus* sp.C4 สำหรับลอกกวไหม

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอช	ค่าการละลายของออกซิเจน ในถังหมัก	น้ำตาลรีดิวซ์ (g/l)	กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (units/ml)
0	7.50	96.45	19.85	0.0
3	7.45	85.45	16.38	98.2
6	7.56	83.32	10.99	130.9
9	7.51	70.01	8.80	374.6
12	7.54	72.09	6.09	789.1
15	7.52	71.36	4.80	936.4
18	7.56	73.67	4.12	1,052.7
21	7.55	75.00	3.50	1,490.9
24	7.61	69.00	3.08	1,816.4
27	7.58	65.00	2.01	1,898.2
30	7.54	18.90	0.97	1,174.6

หมายเหตุ เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM medium สูตรดัดแปลงที่สภาวะเหมาะสม

(optimized medium) โดยควบคุมอัตราการกวน เท่ากับ 350 rpm อัตราการให้อากาศ 2 vvm ค่าการละลายของออกซิเจนในถังหมัก เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว ค่าพีเอช 7.5 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง เป็นระยะเวลา 30 ชั่วโมง

ภาคผนวก ง
ข้อมูลที่น่าสนใจวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางผนวกที่ ง1 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส จาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับการลอกกวไหม เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเชื้อ 23 สูตร ที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 200 rpm เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และใช้ Student's *t*-test ที่ ระดับความมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

Source	df	Sum of Squares	Mean Square	F	Significance
อาหารเลี้ยงเชื้อ	22	6,440,385.78	292,744.81	498.02	0.000
REP	2	10,794.94	5,397.49	9.18	0.000
Error	44	25,864.00	587.82		
Total		18,500,418.77	69.00		

หมายเหตุ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) = 0.996

ตารางผนวกที่ ๑๒ การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของ *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกาวไหม จากการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Tukey's test

	TRT	N	Subset						
			1	2	3	4	5	6	7
Tukey HSD	10.00	3	8.21						
	14.00	3	18.76						
	3.00	3	26.44						
	6.00	3	28.41						
	15.00	3	28.79						
	9.00	3	33.94						
	13.00	3	43.77						
	23.00	3	47.86						
	22.00	3		290.42					
	7.00	3			440.54				
	16.00	3			498.88	498.88			
	12.00	3				534.37			
	8.00	3				539.54			
	17.00	3				561.44			
	5.00	3					637.71		
	21.00	3					645.02		
	18.00	3					684.19	684.19	
	4.00	3						721.82	
	19.00	3						722.79	
	1.00	3						725.34	
	20.00	3						755.55	
	2.00	3						756.42	
	11.00	3							850.85
Sig.			0.919	1.000	0.353	0.240	0.751	0.082	1.000

หมายเหตุ Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square (Error) = 587.818

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000, b. Alpha = 0.05

ตารางผนวกที่ ง3 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส จาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกาวไหม เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเชื้อ BSM medium ที่เติมสารเหนียวต่างกัน 4 ชนิด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 200 rpm เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และใช้ Student's *t*-test ที่ระดับความมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

Source	df	Sum of Squares	Mean Square	F	Significance
สารเหนียว 4 ชนิด	3	346,163.21	115387.74	569.94	0.000
REP	2	673.66	336.83	1.66	0.266
Error	6	1,214.73	202.46		
Total		4,911,532.94			

หมายเหตุ ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) = 0.997

ตารางผนวกที่ ง4 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส จาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกาวไหม จากการเพาะเลี้ยงในอาหาร BMSM medium ที่เติมสารเหนียวต่างชนิดกัน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 200 rpm เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากการทดลอง 3 ซ้ำ ด้วยวิธี Tukey's test

TRT	N	Subset			
		1	2	3	4
3.00	3	399.4433			
4.00	3		504.0600		
2.00	3			757.9967	
1.00	3				805.2067
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

หมายเหตุ Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares

The error term is Mean Square (Error) = 202.455

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000, b. Alpha = 0.05

ตารางผนวกที่ ง5 การวิเคราะห์ผลการทดลองของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกาวไหม ในการจัดการทดลอง Plackett and Burman design ที่ระดับความมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

Model	df	Sum of Squares	Mean Square	F	Significance
Regression	7	1142,739.92	163,248.56	6.83	0.041
Residual	4	95,644.18	23,911.04		
Total	11	1,238,384.10			

ตารางผนวกที่ ๖ การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลือกาวไหม ในการจัดการทดลอง Plackett and Burman design โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และใช้ Student's *t*-test ที่ระดับความมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimated
	0.961	0.923	0.79	154.63

ตารางผนวกที่ ๗ การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการจัดการทดลอง Plackett and Burman design ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลือกาวไหม

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Significance
Corrected Model	1,142,595.38	7	163,227.91	6.83	0.041
Intercept	4,889,633.33	1	4,889,633.33	204.46	0.000
Hydrolyzed cassava starch	61,232.65	1	61,232.65	2.56	0.185
Soy flour	263,796.05	1	263,796.05	11.03	0.029
Skim milk	214,882.80	1	214,882.80	8.99	0.040
pH	55,842.16	1	55,842.16	2.36	0.201
Temperature	104,757.45	1	104,757.45	4.38	0.104
Shaker speed	412,997.20	1	412,997.20	17.27	0.014
Innoculum	29,087.05	1	29,087.05	1.22	0.332
Error	95,657.80	4	23,914.45		
Total	6127,886.52	12			
Corrected Total	1,238,253.19	11			

หมายเหตุ $R^2 = 0.923$ (Adjusted $R^2 = 0.788$)

ตารางผนวกที่ 8 การวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกาวใหม่ จากแผนการทดลอง CCD โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และใช้ Student's *t*-test ที่ระดับความมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimated
	0.955	0.912	0.893	134.18

ตารางผนวกที่ 9 การวิเคราะห์สมการถดถอยค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส จากแผนการทดลอง CCD ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. C4 สำหรับลอกกาวใหม่ ที่ระดับความมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

Model	df	Sum of Squares	Mean Square	F	Significance
Regression	9	750,4291.95	833,810.216	46.315	0.000
Residual	40	720,128.837	18,003.221		
Total	49	8,224,420.782			

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ – นามสกุล	นางสาว นิสารัม สัมช่า
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 17 สิงหาคม 2525
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก
ประวัติการศึกษา	- มัธยมศึกษาตอนต้นและตอนปลาย โรงเรียนเฉลิมขวัญสตรี อ.เมือง จ.พิษณุโลก พ.ศ. 2544 - วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุฬารัตนาวิทยา) มหาวิทยาลัยนเรศวร พ.ศ. 2547
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	--
ผลงานทางวิชาการ	นำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 34 (วทท.34) ณ ศูนย์การประชุมแห่งชาติสิริกิติ์ กรุงเทพมหานคร