

*Bacillus* sp. A39 เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากดินในประเทศไทย สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสได้ดี ในการทดลองนี้ได้นำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเอนไซม์นี้ โดยวิธีการหมักแบบเบ็ดเสร็จ (batch culture) ในอาหารเหลว BMSM medium การหมักใช้ถังหมักขนาด 5 L และควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 ถึง 550 rpm อัตราการให้อากาศที่ 1 VVM โดยมีการเติมแก๊สออกซิเจนเมื่อจำเป็น ผลการทดลองพบว่าการหมัก A39 ในอาหาร BMSM ที่มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์, skimmed milk 0.25 เปอร์เซ็นต์ โดยควบคุมพีเอชที่ 9.5 และค่า dissolved oxygen (DO) ที่ 80 เปอร์เซ็นต์ของอากาศคือตัวเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือ มีอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) และอัตราการผลิตเอนไซม์จำเพาะ ( $q_p$ ) เท่ากับ  $0.511 \text{ h}^{-1}$  และ  $23,556 \text{ unit/g cell.h}$  ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังพบว่า *Bacillus* sp. A39 ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสสูงสุดในช่วงการเจริญ deceleration phase และการเติมกลูโคสมากเกินไปจะทำให้การเจริญและการผลิตเอนไซม์ลดลง จากคุณลักษณะดังกล่าวการหมักแบบ constantly fed-batch มีแนวโน้มที่จะทำให้การผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ดี ผลการทดลองพบว่าการเติมอาหาร BMSM ที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าและมีกลูโคส 4 เปอร์เซ็นต์ ด้วยอัตราเจือจาง  $0.05 \text{ h}^{-1}$  ลงในถังหมักที่มีการหมักแบบเบ็ดเสร็จ และเริ่มเติมอาหารเมื่อ *Bacillus* sp. A39 เจริญอยู่ในช่วง deceleration phase จะทำให้ได้ค่า  $\mu$  และ  $q_p$  สูงสุด คือ  $0.048 \text{ h}^{-1}$  และ  $28,484 \text{ units/g cell.h}$  ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับวิธีการหมักแบบเบ็ดเสร็จ ในอาหาร BMSM ที่มีกลูโคส 2 และ 4.5 เปอร์เซ็นต์ จะพบว่าการหมักแบบ constantly fed-batch ด้วยสภาวะการหมักข้างต้นจะผลิตเอนไซม์ได้สูงกว่า 4.5 และ 1.18 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสามารถลดระยะเวลาการหมักลงประมาณครึ่งหนึ่ง (หรือประมาณ 38 ชั่วโมง) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการหมักแบบเบ็ดเสร็จที่มีกลูโคส 4.5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหาร BMSM อีกด้วย

*Bacillus* sp. A39, the alkaline protease producing bacteria isolated from soil in Thailand, was cultivated in BMSM liquid medium by batch culture. The study was carried out in 5 L jar fermentor, at 300-550 rpm agitation speed and 1 VVM aeration rate with addition of pure oxygen in some cases. The results revealed that cultivation of *Bacillus* sp. A39 in medium containing 2% glucose, 0.25% skimmed milk and controlling pH at 9.5 and dissolved oxygen concentration at 80% air saturation were the most suitable. Consequently, the specific growth rate ( $\mu$ ) and specific alkaline protease production rate ( $q_p$ ) of  $0.511 \text{ h}^{-1}$  and 23,556 units/g cell.h were obtained, respectively.

We also found that *Bacillus* sp. A39 produced the highest enzyme activity when its growth was deceleration phase. Overfeeding of glucose tended to suppress the growth as well as alkaline protease production. According to these characteristics, the constantly fed-batch culture may be well suited to increase its productivity. The results showed that addition of double strength BMSM medium containing 4% glucose at dilution rate of  $0.05 \text{ h}^{-1}$  into the batch system at deceleration phase provided the highest  $\mu$  and  $q_p$  of  $0.048 \text{ h}^{-1}$  and 28,484 units/g cell.h, respectively. As a result, total alkaline protease activity obtained was 4.5 and 1.18 times higher than that of batch culture containing 2% and 4.5% glucose in BMSM medium, respectively. Moverer, it could shorten the fermentation time by half (about 38 hours) when compared with batch culture operated in 4.5% glucose of BMSM medium.