5. ผลการเพาะเลี้ยงแบบ constantly fed-batch culture ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์

การศึกษาการผลิตเอนไซมอัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. A39 โดยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture ในอาหารเหลว BMSM medium พบว่าควรใช้กลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ โดยเติม skimmed milk 0.25 เปอร์เซ็นต์ ควบคุมพีเอช 9.5 ค่า DO 80 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว โดยใช้อัตราการกวน 300 ถึง 550 rpm อัตราการให้อากาศ 1 VVM และควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง

ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์มีแนวโน้มเป็น growth associate pattern แต่เอนไซม์จะเริ่มผลิตอย่างรวดเร็วในช่วง deceleration phase และ stationary phase (ขึ้นกับปริมาณของสับสเตรท) ซึ่ง ณ ช่วงเวลานี้ค่า μ จะต่ำกว่าช่วง exponential phase มาก เมื่อใดที่แหล่งคาร์บอนซึ่งเป็น limiting substrate ถูกใช้หมดหรือต่ำกว่าประมาณ 5 g/L เอนไซม์และการเจริญของ *Bacillus* sp. A39 ก็จะหยุดชะงักอย่างรวดเร็ว แต่ก็พบว่าถ้ามวลเซลล์สูง ก็มีแนวโน้มที่จะให้เชื้อสายพันธุ์นี้ผลิตเอนไซม์ได้สูงตามไปด้วย การเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน (กลูโคส) สูงมากอาจเกิด overfeeding ขึ้นได้ ดังนั้นการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch culture เติมอาหารด้วยอัตราคงที่ ซึ่งเรียกว่า constantly fed-batch culture ควรเป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้เพราะ

1. การเติมอาหารด้วยอัตรา (Feed rate) คงที่เป็นการเพิ่มแหล่งอาหารอย่างต่อเนื่อง ทำให้ได้เซลล์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้การผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นด้วย (ดังการทดลองกลูโคส 3 ถึง 4.5 เปอร์เซ็นต์ และ skimmed milk 0.5 เปอร์เซ็นต์)

2. การเติมอาหารด้วยอัตราคงที่ ทำให้ค่า dilution rate ลดลง (D ลดลง) เป็นผลให้ค่า μ ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับสภาวะ deceleration phase ในการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture ซึ่งเป็นสภาวะที่ค่า q_p สูงสุดใน batch process

3. แก้ปัญหา overfeeding หากเป็นปัญหาที่เกิดกับการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจริง เพราะมีความเสี่ยงต่อการเกิด substrate inhibition และ catabolite repression

เนื่องจากการทดลองนี้มีระยะเวลาจำกัดและ working volume สูงสุด (5 L) ของถังหมักจำกัด จึงแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ส่วนคือ

1. ทดสอบหาช่วงเวลาที่เติมอาหาร โดยศึกษาช่วงเวลาการเติมอาหารใหม่เมื่อ *Bacillus* sp. A39 เจริญอยู่ที่ stationary phase หรือ deceleration phase

2. แปรค่าอัตราการเติมอาหาร (feed rate, F) หรืออัตราการเจือจาง (dilution rate, D) เริ่มต้น เพื่อให้ได้ค่า μ ที่เหมาะสม

3. เปรียบเทียบผลของกลูโคสที่เติมในอาหารเหลว BMSM medium ระหว่างกลุ่มที่ใช้กลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่ใช้ 4 เปอร์เซ็นต์ ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus* sp. A39

สำหรับวิธีการทดลองการเพาะเลี้ยงแบบ constantly fed-batch culture เพื่อศึกษาทั้ง 3 หัวข้อที่กล่าวมาข้างต้นจะดำเนินการทดลองที่ใกล้เคียงกัน กล่าวคือเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. A39 ในอาหารเหลว BMSM medium ปริมาตร 2 L โดยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture ในถังหมักของ New Brunswick Bioflo 3000 (working volume สูงสุด 5 L) โดยเติม starter 2 เปอร์เซ็นต์ ขณะการเพาะเลี้ยงจะควบคุมพีเอช 9.5 ค่า DO 80 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว อัตราการกวนอยู่ระหว่าง 300 ถึง 550 rpm อัตราการให้อากาศ 1 VVM อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อ *Bacillus* sp. A39 เจริญจนถึงช่วงเวลาที่กำหนดไว้ (stationary และ deceleration phase) กำหนดให้เวลานี้เป็นเวลาเติมอาหาร (feeding time) เท่ากับ 0 ชั่วโมง เริ่มเติมอาหารใหม่ ซึ่งมีองค์ประกอบเหมือนกับใน BMSM medium ในถังหมัก (ยกเว้นในบางกรณี ซึ่งจะกล่าวต่อไป) โดยอัตราการเติมอาหารในแต่ละการทดลองต่างๆกัน เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ค่าความขุ่น ความเข้มข้นของกลูโคสและกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสทุก 2 ชั่วโมง การเติมอาหารจะดำเนินไปด้วยอัตราการเติมคงที่เป็นเวลา 14 ถึง 20 ชั่วโมง ขึ้นกับค่า dilution rate และวัดปริมาตรของ culture broth เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พร้อมๆกับการวิเคราะห์ค่าต่างๆดังที่กล่าวแล้ว เนื่องจากการปรับพีเอชเพื่อให้ได้ตามค่าที่ควบคุมใช้ปริมาณมาก จึงจำเป็น ต้องวัดปริมาตรทุกครั้งที่เก็บตัวอย่าง เพื่อนำมาคำนวณค่าทางจลนพลศาสตร์ต่างๆต่อไป สำหรับรายละเอียดของผลการทดลองมีดังต่อไปนี้

1. การวิเคราะห์ช่วงการเจริญที่เหมาะสมในการเติมอาหาร

ช่วงเวลาที่เริ่มเติมอาหารใหม่ จะเริ่มเติมอาหาร 2 ช่วง และเลือกเติมในอัตราใกล้เคียงกับค่า μ ใกล้เคียงกับผู้ทำการทดลองต้องการใน fed-batch culture เพื่อการเพาะเลี้ยงจะได้ถึง Quasi-steady state (dx/dt = 0) โดยเร็ว (Brown, 1990) โดยพยายามเติมอาหารใหม่ด้วยค่า dilution rate

เริ่มต้นใกล้เคียงกับค่า μ_{max} ของการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture ในอาหารที่มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.511 h^{-1} เท่ากับ 0.05 h^{-1} ต่ำกว่าประมาณ 10 เท่า ช่วงเวลาแรกที่นิยมใช้เติมอาหาร คือ เติมเมื่อ limiting substrate หรือกลูโคสถูก *Bacillus* sp. A39 ใช้หมดแล้วคือเริ่มเติมที่ระยะ stationary phase (Yamane and Shimizu, 1984) โดยให้เหตุผลว่าการเติมแบบนี้จะกำหนดค่า μ ได้ตามความต้องการเพราะไม่มี limiting substrate ในถังหมักมาเพิ่ม จากผลการทดลอง (ตารางที่ 12 และภาพที่ 28) พบว่าค่า μ เท่ากับ 0.046 h^{-1} และ q_p มีค่า 12,938 units/g cell.h ถ้าพิจารณาจากภาพที่ 28 จะเห็นว่าหลังจากที่เริ่มเติมอาหารกราฟการเจริญของเชื้อ (cell mass) เพิ่มในอัตราคงที่ ไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก แต่การผลิตเอนไซม์ชะงักประมาณ 6 ชั่วโมง ซึ่งเกิดจากการขาดสับสเตรทในการสังเคราะห์เอนไซม์ไประยะหนึ่ง ภายหลังจากเริ่มเติมอาหารเอนไซม์จะค่อยๆเพิ่มขึ้นด้วยอัตราการผลิตเอนไซม์ที่ต่ำกว่าใน batch process

ช่วงเวลาที่สองจะเลือกเติมอาหารเมื่อ *Bacillus* sp. A39 เจริญเข้าสู่ deceleration phase โดยใช้ค่า dilution rate เริ่มต้น 0.05 h^{-1} เท่าเดิม และโดยธรรมชาติของการเพาะเลี้ยงแบบ constantly fed-batch culture ค่า dilution rate จะมีค่าลดลง ส่งผลให้ค่า μ ลดลงด้วย (ตารางที่ 12) จากภาพที่ 29 จะเห็นว่าการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *Bacillus* sp. A39 เป็นไปอย่างต่อเนื่อง ไม่สะดุดเลย ค่า μ จะต่ำกว่าการเติมแบบวิธีแรกเล็กน้อย คือ เท่ากับ 0.042 h^{-1} แต่ค่า q_p กลับสูงกว่า คือ เท่ากับ 15,744 units/g cell.h ซึ่งอาจเป็นเพราะเซลล์ได้รับสารอาหารอย่างต่อเนื่องที่จะนำไปใช้ในการผลิตเอนไซม์ และก็ส่งผลต่อค่า yield ที่สูงกว่าวิธีแรก ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะเริ่มเติมอาหารในระยะ deceleration phase

2. ผลของการเพิ่มอัตราการเติมอาหาร

เนื่องจากเวลาในการทดลองจำกัด การทดลองนี้จึงทดลองการเพิ่มอัตราการเติมอาหารจาก 0.10 เป็น 0.15 L/h ทำให้อัตราการเจือจางเริ่มต้นเพิ่มจาก 0.05 เป็น 0.075 h^{-1} ซึ่งไม่ต่างกันมากนัก เนื่องจากปริมาตรของถังหมักจำกัด หากค่า dilution rate สูงมาก จะเติมอาหารได้ไม่นานพอ

ผลการทดลองจากตารางที่ 12 และภาพที่ 30 พบว่าการเพิ่มอัตราการเติมอาหารจาก 0.10 เป็น 0.15 L/h จะได้ค่า μ 0.042 และ 0.044 h^{-1} และค่า q_p เท่ากับ 15,744 และ 21,713 units/g cell.h ตามลำดับ เซลล์มีการเจริญได้อย่างต่อเนื่อง เนื่องจากได้รับสารอาหารเพียงพอ แสดงว่าการเพิ่มอัตราการเติมอาหารหรือ dilution rate เริ่มต้น จะทำให้ทั้งค่า μ และ q_p สูงขึ้น ผลได้ของเซลล์และเอนไซม์ต่อ 1 g กลูโคส มีค่าเพิ่มขึ้นตามไปด้วย

เมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ในการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture จากตารางที่ 12 (ช่วง batch culture) จะพบว่าการเพิ่มกลูโคสในอาหาร BMSM medium จาก 2 เป็น 4.5 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ค่า μ ลดลงจาก 0.511 เป็น 0.454 h^{-1} ในขณะที่ค่า q_p ลดลงจาก 23,556 เป็น 17,124 units/g cell.h ตามลำดับ ดังได้กล่าวแล้วว่าสาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจาก overfeeding ซึ่งการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch culture จะช่วยแก้ปัญหานี้ได้หรือสาเหตุอีกอย่างหนึ่งอาจเกิดจากการขาดธาตุอาหารอื่นๆ เช่น แหล่งไนโตรเจนตลอดจน growth factor เพราะการทดลองแบบ batch culture มีเพียงปริมาณกลูโคสที่เพิ่มขึ้นเท่านั้น

3. การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็น 2 เท่าเป็นอาหารที่ใช้เติม

อย่างไรก็ตามในการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch culture ครั้งนี้ได้ทดลองเติมอาหารโดยใช้อาหารเหลว BMSM medium ชนิด double strength ซึ่งมีกลูโคส 4 เปอร์เซ็นต์ โดยยังคงเติมอาหารด้วยอัตรา 0.10 L/h และเริ่มเติมอาหารที่ช่วง deceleration phase ผลการทดลองในตารางที่ 12 และภาพที่ 31 จะเห็นว่าการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของ *Bacillus* sp. A39 เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในขณะที่ปริมาณกลูโคสที่เหลือในอาหารเพาะเลี้ยง ใกล้เคียงกับการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture ที่มีกลูโคสเริ่มต้น 2 เปอร์เซ็นต์ คือไม่เกิน 1.1 เปอร์เซ็นต์ ต่างจากการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture ที่มีกลูโคสเริ่มต้น 4.5 เปอร์เซ็นต์ จะมีกลูโคสใน culture broth ระหว่าง stationary phase สูงถึง 33 g/L ดังนั้นการเติมอาหารแบบ double strength ที่มีกลูโคสเริ่มต้น 4 เปอร์เซ็นต์ จึงไม่ต้องมีปัญหาของ overfeeding ทำให้เพิ่มค่า μ เป็น 0.048 h^{-1} และค่า q_p ก็เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน คือ เพิ่มจาก 15,744 เป็น 28,484 units/g cell.h หรืออาจเกิดจากเซลล์ได้รับสารอาหารอื่นที่จำเป็นเพิ่มขึ้นไปด้วยนอกเหนือจากกลูโคส ทำให้ความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้นเกือบ 2 เท่า (5.34 g/L) ของสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture ส่งผลให้เอนไซม์ที่เป็นเมทาบอไลท์ของเซลล์เพิ่มขึ้น หรือสาเหตุอาจเป็นเช่นเดียวกับการเพิ่มค่า dilution rate จาก 0.05 เป็น 0.075 h^{-1} จากผลการทดลองนี้ยังไม่อาจบอกสาเหตุที่แน่ชัดว่าสาเหตุที่ค่า μ และค่า q_p ลดลง เมื่อในอาหารเลี้ยงเชื้อมีกลูโคสเพิ่มขึ้น (ใน batch culture) เกิดจาก overfeeding หรือเกิดจากการขาดสาร อาหารอื่นๆ ถ้ามีการทดลองเติมอาหารโดยใช้อาหารเหลว BMSM medium ที่เติมเฉพาะกลูโคส 4 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำผลมาเปรียบเทียบ จึงจะอธิบายให้ชัดเจนมากกว่านี้ เมื่อพิจารณาถึงผลได้ของเซลล์และเอนไซม์ จะพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของอาหาร BMSM medium และกลูโคสเป็น 2 เท่า ซึ่งทำให้มีกลูโคสเพิ่มจาก 2 เป็น 4 เปอร์เซ็นต์ ก็ทำให้ผลได้ของเซลล์และเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสมีค่าเพิ่มขึ้นด้วย

อย่างไรก็ตามการทดลองที่กล่าวมาพอจะสรุปได้ว่าการเพาะเลี้ยงแบบ constantly fed-batch culture เป็นวิธีการหนึ่งที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส การเพิ่มค่า μ จะทำให้ค่า q_p เพิ่มขึ้นด้วยดังแสดงในภาพที่ 32 ซึ่งโดยทั่วไปการเพิ่มค่า μ ไม่เกินค่าของ μ_{max} ดังนั้นการศึกษานี้จะสมบูรณ์ขึ้น หากมีการศึกษาการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch culture ที่มีค่า μ สูงกว่า 0.075 h^{-1} จากผลการทดลองนี้จะพบว่าการใช้ constantly fed-batch culture โดยใช้กลูโคส 4 เปอร์เซ็นต์ และ BMSM medium ที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าจะทำให้กิจกรรมเอนไซม์ (total enzyme activity) สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture ที่มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ 4.3 เท่าและมากกว่า batch culture ที่มีกลูโคส 4.5 เปอร์เซ็นต์ 1.18 เท่า ขณะที่เวลาในการเพาะเลี้ยงของ batch culture เมื่อกลูโคสเริ่มต้น 2 และ 4.5 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 28 และ 68 ชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่ fed-batch culture ใช้เวลา 30 ชั่วโมง แต่ได้เอนไซม์ปริมาณมากกว่า ดังนั้นการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch culture จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสโดย *Bacillus* sp. A39 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Singh *et al.* (2004) ที่ทดลองการผลิตเอนไซม์จากเชื้อ *B. spaericus* และการผลิตเอนไซม์โดยวิธี constantly fed-batch culture เช่นเดียวกัน