

## การผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสโดย *Bacillus* sp. ที่ชอบต่างในอาหารเหลว

### Alkaline Protease Production from Alkalophilic *Bacillus* sp. by Submerged Culture

#### คำนำ

นับตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในการพัฒนาและปรับปรุงคุณภาพชีวิตและความเป็นอยู่ของมนุษย์ให้ดีขึ้นมากมาย ผลิตภัณฑ์หรือผลิตภัณฑ์หลายชนิดถูกพัฒนาขึ้น โดยอาศัยกระบวนการทางชีวเคมีจากสิ่งมีชีวิตเล็กๆที่เรียกว่าจุลินทรีย์ เอนไซม์จากจุลินทรีย์เป็นสารเมแทบอลิท์หนึ่งที่มีการศึกษากันมาก เนื่องจากมีข้อดี คือ ผลิตได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาอันรวดเร็ว มีความจำเพาะเจาะจงกับสับสเตรท ทำงานได้ในสภาวะที่ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบบรุนแรง (mild condition) สามารถนำไปใช้ทดแทนในกระบวนการทางเคมีได้ดีกว่า และเนื่องจากจุลินทรีย์มีอยู่เป็นจำนวนมากหลายสายพันธุ์ ทำให้มีความหลากหลายของชนิดเอนไซม์และนำไปสู่การคัดเลือกเพื่อนำไปใช้งานได้ตรงตามวัตถุประสงค์ได้มากขึ้น

เอนไซม์เป็นสารประเภทโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นจากสิ่งมีชีวิตทั่วไป ทำหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการเมแทบอลิซึมทั้งภายในและภายนอกเซลล์ มีสมบัติเป็นตัวเร่งทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูง โดยทำหน้าที่ลดพลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยา แบ่งออกได้ 6 ชนิดตาม International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) โดยอาศัยกลไกในการเร่งปฏิกิริยาเป็นเกณฑ์ จากการศึกษาค้นคว้าพบว่ามีเอนไซม์หลายชนิดสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระดับอุตสาหกรรม มีการผลิตและนำเอนไซม์ออกจำหน่ายหลายชนิดในรูปแบบต่าง ๆ กัน (Gupta *et al.*, 2002)

อัลคาไลน์โปรติเอสเป็นเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่มีการนำไปใช้ประโยชน์และผลิตออกมาเป็นระดับอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง ทำหน้าที่ย่อยสลายหรือสังเคราะห์พันธะเปปไทด์หรือโปรตีน ก่อให้เกิดผลผลิตที่สามารถนำมาปรับปรุงเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆที่เป็นประโยชน์มากมาย เอนไซม์ชนิดนี้มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมในสภาวะที่เป็นด่าง และบางชนิดทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี จึงเหมาะต่อกระบวนการทางอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมสารทำความสะอาด การผลิตยา การฟอกหนัง อาหาร เป็นต้น จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการศึกษาส่วนใหญ่

เป็นแบคทีเรียพวก bacilli ซึ่งพบว่าไม่เป็นโทษกับมนุษย์ และยังมีพวกเชื้อรา เช่น *Rhizopus* spp. และ *Aspergillus* spp. เป็นต้น การศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากจุลินทรีย์เหล่านี้ให้ได้ประสิทธิภาพสูงส่วนใหญ่นอกจากจะมีการพัฒนาสายพันธุ์แล้ว ยังมีการปรับปรุงความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ การให้อากาศ การกวน พีเอช และปัจจัยอื่นๆ ให้มีความเหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ นอกจากนี้เทคนิคในการเพาะเลี้ยง เช่น การเพาะเลี้ยงแบบเติมอาหารก็มีส่วนสำคัญเช่นเดียวกัน เนื่องจากสามารถหลีกเลี่ยงการเกิด glucose effect หรือ catabolite repression ที่มีผลให้การเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสต่ำลง เนื่องจากความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ซึ่งการทดลองจะประสบผลสำเร็จได้ ต้องอาศัยอุปกรณ์หลักที่สำคัญนั่นคือถังหมักพร้อมด้วยอุปกรณ์เสริมที่ใช้ในการควบคุมปัจจัยต่างๆตามที่กำหนด

จากประโยชน์และแนวโน้มดังกล่าว หากมีการส่งเสริมการค้นคว้าวิจัยในด้านการเพิ่มผลผลิตจนสามารถเป็นแนวทางหนึ่งในการขยายกำลังการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ ก็น่าจะเป็นประโยชน์อย่างมาก ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จะทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่สังเคราะห์จากแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อนที่คัดเลือกได้ในประเทศไทย ซึ่งได้เคยรายงานไปแล้ว โดยใช้อาหารเหลวที่มีการปรับปรุงสูตรอาหารและปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องให้เหมาะสม รวมถึงวิธีการเพาะเลี้ยงด้วย

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อหาค่าประกอบของอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกไว้แล้ว
2. เพื่อศึกษาผลของปัจจัยต่างๆต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกไว้แล้ว
3. เพื่อศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกไว้แล้ว

## การตรวจเอกสาร

### 1. บทนำ

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ประเภทไฮโดรไลติกเอนไซม์ (hydrolytic enzyme) มีความสามารถในการตัดหรือสังเคราะห์พันธะเปปไทด์ของสายโพลีเปปไทด์หรือโปรตีน โดยกระบวนการที่เรียกว่าโปรติโอไลซิส (proteolysis) ใช้น้ำเข้าร่วมในปฏิกิริยา เป็นตัวเร่งทางชีวภาพที่มีประสิทธิภาพสูง มีความจำเพาะเจาะจงกับสับสเตรท โปรติเอสพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั่วไปเนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเจริญและการดำรงชีวิตอยู่ของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ โดยเฉพาะกับแบคทีเรียที่มีรายงานการวิจัยอย่างกว้างขวาง

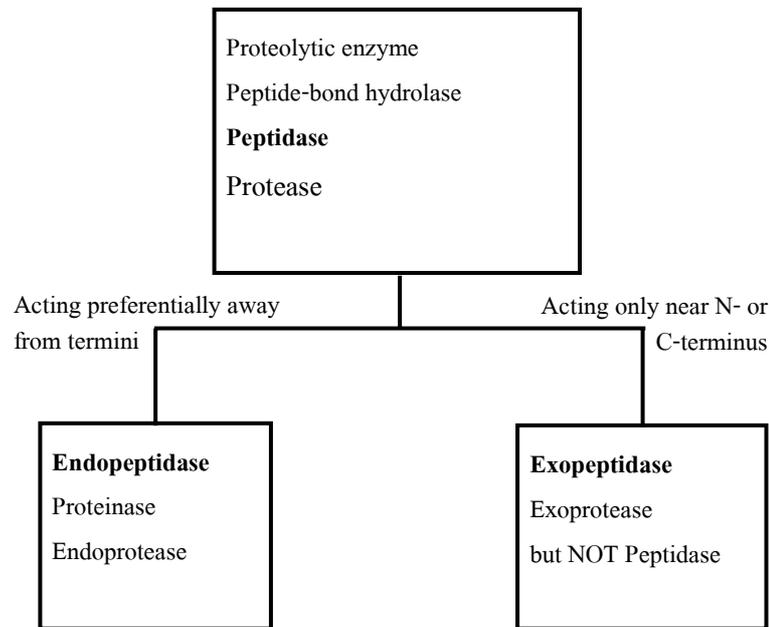
เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส (alkaline protease) เป็นเอนไซม์โปรติเอสประเภทหนึ่งที่สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มีความเป็นด่าง และหลายชนิดที่ผลิตได้สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง (thermostable) เหมาะกับกระบวนการทางอุตสาหกรรมหลายประเภท ตัวอย่างที่มีการผลิตเป็นการค้าที่เป็นหลักในอุตสาหกรรมสารทำความสะอาด เช่น subtilisin Carlsberg, subtilisin BPN และ Sarvinase เป็นต้น (Kumar and Takagi, 1999)

### 2. รายละเอียดเอนไซม์โปรติเอส

#### 2.1 ประวัติและความเป็นมาของเอนไซม์โปรติเอส

คำว่าโปรติเอสปรากฏขึ้นครั้งแรกในบทความของเยอรมัน สาขาทางเคมีสรีรวิทยา (physiological chemistry) ในช่วงปลายศตวรรษที่ 19 โดยอ้างอิงถึงโปรติโอไลติกเอนไซม์ (proteolytic enzyme) และใช้เป็นคำทั่วไปที่ใช้เรียกกลุ่มเอนไซม์ไฮโดรเลสที่ย่อยสารโปรตีนหรือบางส่วนของโปรตีน ประมาณปี ค.ศ. 1930 เริ่มมีความต้องการที่จะจัดแบ่งหรือจัดหมวดหมู่เอนไซม์ตามประเภทของกิจกรรม มีการริเริ่มใน 2 ประเทศ คือ เยอรมันและสหรัฐอเมริกา ในประเทศเยอรมันเริ่มโดย Grassman และ Dyckerhoff เสนอให้เรียกเอนไซม์ทั้งหมดที่ย่อยโปรตีนว่าโปรติเนส (proteinase) และพวกที่ย่อยสารโอลิโกเปปไทด์ (oligopeptides) ว่าเปปติเดส (peptidase) ต่อมา Bergman และ Ross ใช้คำว่า “เปปติเดส” สำหรับเอนไซม์ไฮโดรเลสที่สามารถไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์ได้ ซึ่งมีความหมายกว้างกว่า แต่แบ่งเอนไซม์ออกเป็น 2 พวก คือ เอนโดเปปติเดส (endopeptidases) และเอกโซเปปติเดส (exopeptidases) ทำให้เกิดความสับสนระหว่างคำว่า

peptidase ของนักวิทยาศาสตร์ทั้ง 2 กลุ่ม Barret ชอบที่จะใช้ในทางความหมายที่กว้างมากกว่า ซึ่งเป็นแนวทางเดียวกับ International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) ได้แนะนำ ดังแสดงในภาพที่ 1 (Barret, 2001)



**ภาพที่ 1** คำที่มีความหมายคล้ายกันของเอนไซม์โปรติเอส ตัวหนา peptidase, endopeptidase และ exopeptidase เป็นสากลที่ใช้ตามหลัก IUBMB ส่วนคำอื่น ๆ ก็มีความหมายใช้เรียกตามรูปภาพ ยกเว้นที่จะมีความสับสนเล็กน้อย คือ คำว่า peptidases ที่บางครั้งถูกนำไปใช้เป็นคำที่มีความหมายเหมือนกับ exopeptidase

ที่มา: Barret (2001)

## 2.2 การจัดหมวดหมู่ของเอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์ในปัจจุบันแบ่งได้เป็น 6 ประเภทตาม IUBMB โดยแบ่งตามลักษณะการเข้าทำปฏิกิริยากับสับสเตรท แบ่งได้ดังนี้ ออกซิโดรีดักเตส (Oxidoreductases), ทรานเฟอร์ส (Transferases), ไฮโดรเลส (Hydrolases), ไลเอส (Lyases), ไอโซเมอเรส (Isomerases) และไลเกส (Ligases)

เอนไซม์โปรติเอสถูกจัดอยู่ในประเภทหมวดหมู่ (class) ที่ 3 เป็นเอนไซม์ประเภทไฮโดรไลติกเอนไซม์ และถูกจัดอยู่ในหมวดหมู่ย่อย (subclass) ตามลักษณะเฉพาะของการทำงาน

บนพันธะเปปไทด์ได้เป็น 3.4 เป็นการแบ่งเอนไซม์ตามระบบ Enzyme Classification (EC) สามารถแบ่งโปรติเอสออกเป็นหมวดหมู่ย่อย (sub-subclass) ได้เป็น 2 กลุ่ม มีรายละเอียดดังนี้

### 2.2.1 exopeptidases (EC 3.4.11 ถึง 19)

เป็นโปรติเอสที่ย่อยสลายหรือทำงานต่อพันธะเปปไทด์จากปลายสายของเปปไทด์หรือโปรตีนเข้ามา ซึ่งอาจเป็นทางด้านปลาย N- หรือ C-terminus ก็ได้แล้วแต่ชนิด ตัวอย่างและกลไกในการทำงานของ exopeptidases ดังแสดงไว้ในตารางที่ 1 และแบ่งออกได้ดังนี้

2.2.1.1 aminopeptidases (EC 3.4.11) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนโดยตัดทางด้านปลาย N-terminus เข้ามาทีละหนึ่งหน่วย

2.2.1.2 dipeptidases (EC 3.4.13) เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อลำดับที่ เป็น dipeptides บริเวณปลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีน

2.2.1.3 dipeptidyl-peptidases, tripeptidyl-peptidases (EC 3.4.14) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีน โดยตัดทางด้านปลาย N-terminus เข้ามาทีละ 2 หรือ 3 หน่วย ตามลำดับ

2.2.1.4 peptidyl-dipeptidases (EC 3.4.15) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีน โดยตัดทางด้านปลาย C-terminus เข้ามาทีละ 2 หน่วย

2.2.1.5 carboxypeptidases (EC 3.4.16 ถึง 18) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีน โดยตัดทางด้านปลาย C-terminus เข้ามาทีละหนึ่งหน่วย แบ่งออกเป็น 3 ชนิดตามกลุ่มในการเกิดปฏิกิริยา (catalytic group) คือ serine-type carboxypeptidases (EC 3.4.16) metallo-carboxypeptidases (EC 3.4.17) และ cysteine-type carboxypeptidases (EC 3.4.18)

2.2.1.6 omega peptidases (EC 3.4.19) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายทั้งปลายด้าน N- และ C-terminus

## 2.2.2 endopeptidases (EC 3.4.21 ถึง 24 และ 99)

เป็นโปรติเอสที่ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะภายในของสายโพลีเปปไทด์ของโปรตีน ตามการแบ่งของ IUBMB จะถูกแบ่งตามกลไกในการเกิดปฏิกิริยา (catalytic mechanism) ได้เป็นหมวดหมู่ย่อย 5 กลุ่ม ดังนี้ ตัวอย่างและกลไกในการทำงานของเอนไซม์แสดงไว้ในตารางที่ 2

2.2.2.1 serine endopeptidases (EC 3.4.21) เป็นเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโนฮิสติดีน (histidine) และเซรีน (serine) เป็นจุดศูนย์กลางในการทำงาน (active center) เป็นอัลคาไลน์โปรติเอสที่มีพีเอชเหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมอยู่ในช่วง 7 ถึง 11 เอนไซม์ในกลุ่มนี้ถูกยับยั้งโดย diisopropylfluorophosphate (DFP) และ phenylmethlysulphonyl fluoride (PMSF) ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ เช่น chymotrypsin, trypsin และ subtilisin เป็นต้น

2.2.2.2 cysteine endopeptidases (EC 3.4.22) เป็นเอนไซม์ที่มีซิสตีอีน (cysteine) เป็นจุดศูนย์กลางในการทำงาน เป็นเอนไซม์ที่สามารถเกิดกิจกรรมได้ดีในสภาวะพีเอชเป็นกลางในช่วง 6 ถึง 7.5 ถูกยับยั้งโดย sulfhydryl reagents หรือ sulfhydryl group (-SH) ทำให้เกิดการสูญเสียหรือไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ เอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถสกัดได้จากพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์ เช่น papain ได้จากมะละกอ ficin ได้จากมะเดื่อ bromelain ได้จากสับปะรด เป็นต้น

2.2.2.3 aspartic proteases (EC 3.4.23) เป็นเอนไซม์ที่มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานหรือเกิดกิจกรรมเป็นกรด คือ มีพีเอชน้อยกว่า 5 ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ gastric protease (pepsin, gastricsin, chymosin), renin และ pepsin เป็นต้น

2.2.2.4 metalloprotease (EC 3.4.24) เป็นเอนไซม์ที่มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานหรือเกิดกิจกรรมที่พีเอชเป็นกลางช่วง 6.5 ถึง 7.5 เป็นเอนไซม์ที่ใช้ไอออนของโลหะในการเกิด catalytic mechanism กล่าวคืออยู่ในลักษณะของโคแฟกเตอร์และถูกยับยั้งได้โดยสารจับไอออนโลหะ (metal-chelating agents) เช่น 1,10-phenantroline และ ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ carboxypeptidases A, carboxypeptidases B, glycyglycine-dipeptidases carnosinase prolidase และ iminopeptidases เป็นต้น

2.2.2.5 proteases บางชนิดที่ยังไม่ทราบถึง catalytic mechanism (EC 3.4.99)

**ตารางที่ 1** ตัวอย่างของ exopeptidases และการทำงานของเอนไซม์

Number	Name	Reaction
<b>3.4.11</b>	<b><math>\alpha</math>-Aminoacylpeptide hydrolases</b>	
3.4.11.1	Cytosol aminopeptidase (leucine aminopeptidase)	Aminoacyl-peptide + H <sub>2</sub> O = amino acid + peptide
3.4.11.2	Microsomal aminopeptidase (aminopeptidase M, aminopeptidase N)	Aminoacyl-peptide + H <sub>2</sub> O = amino acid + peptide
3.4.11.9	Aminopeptidase P	Aminoacyl-peptide + H <sub>2</sub> O = amino acid + peptide
<b>3.4.13</b>	<b>Dipeptide hydrolase</b>	
3.4.13.3	Aminoacyl-histidine dipeptidase (carnosinase)	Aminoacyl-histidine + H <sub>2</sub> O = amino acid + histidine
<b>3.4.14</b>	<b>Dipeptidylpeptide hydrolases</b>	
3.4.14.1	Dipeptidyl peptide peptidase I (cathepsin C)	Dipeptidyl-peptide + H <sub>2</sub> O = dipeptide + peptide
3.4.14.5	Dipeptidyl peptidase IV (Xaa-pro-Dipeptidyl-aminopeptidase)	Aminoacylprolyl-peptide + H <sub>2</sub> O = aminoacylproline + peptide
<b>3.4.15</b>	<b>Dipeptidyl dipeptide hydrolases</b>	
3.4.15.1	Dipeptidyl carboxypeptidase I (angiotensin converting enzyme, peptidase P, kininase II, carboxycathepsin)	Peptidyl-dipeptide + H <sub>2</sub> O = peptide + dipeptide
<b>3.4.16</b>	<b>Serine carboxypeptidases</b>	
3.4.16.1	Serine carboxypeptidase (carboxypeptidase Y, carboxypeptidase C, cathepsin A, phaseoline)	Peptidyl-amino acid + H <sub>2</sub> O = peptide + amino acid
<b>3.4.17</b>	<b>Metallo carboxypeptidases</b>	
3.4.17.1	Carboxypeptidases A	Peptidyl-amino acid + H <sub>2</sub> O = peptide + amino acid
3.4.17.2	Carboxypeptidases B	Peptidyl-lysine/arginine + H <sub>2</sub> O = peptide + lysine/arginine
<b>3.4.18</b>	<b>Cysteine carboxypeptidases</b>	
3.4.18.1	Lysosomal Carboxypeptidases B	Peptidyl-amino acid + H <sub>2</sub> O = peptide + amino acid

### ตารางที่ 1 (ต่อ)

Number	Name	Reaction
<b>3.4.19</b>	<b>Omega peptidases</b>	
3.4.19.3	5-Oxoprolyl-peptidase (pyroglutamyl amino-peptidase)	5-Oxoprolyl-peptide + H <sub>2</sub> O = 5-oxoproline + peptide

ที่มา: Polgar (1989)

### ตารางที่ 2 ตัวอย่างของ endopeptidases และการทำงานของเอนไซม์

Number	Name	Preferential cleavage at the carboxyl end of Xaa- or Xaa-Xaa bond
<b>3.4.21</b>	<b>Serine Proteinases</b>	
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 (thrombokinase)	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, <i>Aspergillus</i> alkaline proteinase, <i>Tritirachium</i> alkaline proteinase (proteinase K)	
3.4.21.19	<i>Staphylococcal</i> 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

## ตารางที่ 2 (ต่อ)

Number	Name	Preferential cleavage at the carboxyl end of Xaa- or Xaa-Xaa bond
3.4.21.35	Tissue kallikrein	Met↓Lys and Arg↓ Ser bonds in kininogen to produce lysylbradykinin (kallidin)
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 (mast cell protease I)	Similar to chymotrypsin
<b>3.4.22</b>	<b>Cysteine proteinases</b>	
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 <sup>2+</sup> -activated neutral protease)	
<b>3.4.23</b>	<b>Aspartic proteinases</b>	
3.4.23.1	Pepsin A (pepsin)	Phe (Tyr, 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 proteinases: <i>Aspergillus saitoi</i> aspartic proteinase (aspergillopeptidase A), <i>Penicillium</i>	
3.4.23.15	Renin (angiotensin-forming enzyme)	Leu↓Leu bond in angiotensinogen to generate angiotensin I
<b>3.4.24</b>	<b>Metalloproteinases</b>	
3.4.24.3	<i>Clostridium histolyticum</i> collagenase	Xaa↓Gly bond in the sequence –Pro-Xaa-Gly-Pro-

## ตารางที่ 2 (ต่อ)

Number	Name	Preferential cleavage at the carboxyl end of Xaa- or Xaa-Xaa bond
3.4.24.4	Microbial metalloproteinases: <i>Bacillus thermoproteolyticus</i> neutral proteinase (thermolysin), <i>Bacillus subtilis</i> neutral proteinase, <i>Myxobacter</i> $\beta$ -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 $\alpha$ 1 and $\alpha$ 2 chains of procollagen

ที่มา: Polgar (1989)

### 2.3 กลไกการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส (mechanism of protease)

กลไกของเอนไซม์โปรติเอสในที่นี้จะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกจะเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีการสร้าง covalent enzyme complex ในช่วงที่เอนไซม์อยู่ในสภาวะทรานซิชัน (transition state) หรือภาวะของเอนไซม์ที่เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงที่พร้อมจะทำปฏิกิริยา ที่บริเวณ catalytic site จะมีกรดอะมิโนอยู่ที่ตำแหน่งจุดศูนย์กลางในการทำงาน มีความเป็น nucleophilic สูง เพื่อสร้างพันธะโควาเลนต์กับสับสเตรทกลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อน เอนไซม์โปรติเอสในกลุ่มนี้ได้แก่พวก serine และ cysteine proteases อีกกลุ่มหนึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่มีการสร้าง covalent enzyme complex เหมือนในกลุ่มแรก แต่จะใช้ปฏิกิริยาบางอย่าง เช่น มีน้ำหรือโลหะเข้ามาเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่พวก aspartic peptidases และ metallopeptidases ซึ่งมีรายละเอียดของแต่ละชนิดดังต่อไปนี้ (Dunn, 2001)

### 2.3.1 serine peptidases

กลไกการทำปฏิกิริยาของ serine peptidases ดังภาพที่ 2 ซึ่งมีลักษณะสำคัญ 2 ประการ คือ การสร้างเอสเตอร์ (ester) ระหว่างออกซิเจนตำแหน่งที่อยู่ติดกับกรดอะมิโนเซรีน 195 (ระบบการจัดการเรียงตัวของ chymotrypsin) ซึ่งเป็น functional group ของเอนไซม์กับส่วนที่เป็นหมู่ acyl ของสับสเตรท รวมตัวกันเป็นสารประกอบตัวกลาง (intermediate) ที่มีรูปทรงแบบ tetrahedral (tetrahedral complex) ทำให้สับสเตรทแตกตัว ส่วนแรกเป็นส่วนของสับสเตรทที่มี amino ติดอยู่เป็นผลผลิตแรกที่หลุดออกมา ลักษณะส่วนที่ 2 คือ มีโครงสร้างหลัก (backbone) 2 สาย ที่มีหมู่ -NH-group เป็นส่วนประกอบ ซึ่งแต่ละ group จะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับออกซิเจนหมู่ carbonyl ของพันธะเปปไทด์ที่เข้าทำปฏิกิริยา ทำให้ออกซิเจนมีประจุลบ และภายหลังแยกตัวมาเป็น acyl enzyme intermediate

### 2.3.2 cysteine peptidases

กลไกการทำงานของซิสทีอินเปปติเดสมีความคล้ายคลึงกับ serine peptidases มาก คือ มีการสร้าง covalent enzyme complex และการสร้าง tetrahedral complex เพื่อตัดพันธะเปปไทด์ของสับสเตรทโดยเอนไซม์นี้ ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ คือ papain ดังแสดงในภาพที่ 3 อะตอมที่เป็นผู้ให้อิเล็กตรอนหรือใช้อิเล็กตรอนร่วมกัน (nucleophilic) ในที่นี้คือซัลเฟอร์ ซึ่งอยู่ใน histidine side chain ซึ่งมีฮิสติดีน 25 (ระบบการจัดตำแหน่งของ papain) จากนั้น side chain ของฮิสติดีน 159 จะทำหน้าที่เป็นตัวรับไฮโดรเจน (hydrogen acceptor) และ -NH-group ของกลูตามีน 19 และซิสทีอิน 25 จะเข้ามาทำปฏิกิริยาด้วยกลายเป็น tetrahedral enzyme complex และกลายเป็น Thioacyl-enzyme intermediate

### 2.3.3 aspartic peptidases

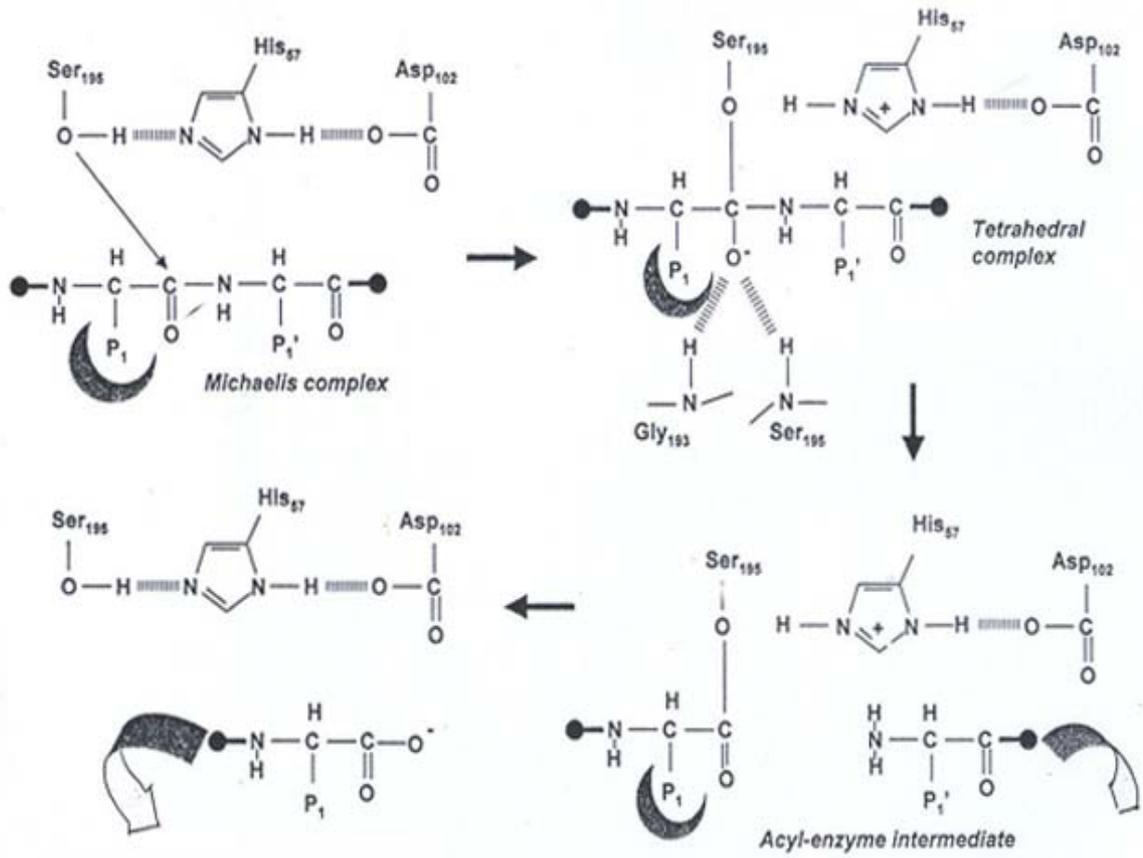
การตัดพันธะเปปไทด์ของสับสเตรทของเอนไซม์ในกลุ่มนี้เชื่อว่าจะไม่มีการสร้าง nucleophilic โดยหมู่ functional group ของเอนไซม์ จึงไม่มีการสร้างพันธะโควาเลนต์ หรือ covalent enzyme complex ระหว่างเอนไซม์กับส่วนของสับสเตรทเหมือนกับ serine และ cysteine peptidases ดังภาพที่ 4 กลไกในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ porcine pepsin ซึ่งเป็นตัวอย่างของเอนไซม์ aspartic peptidases ซึ่งประกอบด้วย side chain ของกรดแอสพาทิกจำนวน 2 side chain

(กรดอะมิโนลำดับที่ 32 และ 215 ของระบบการจัดเรียง porcine pepsin) เข้ามาจับกับสายสเตรทเพื่อตัดพันธะเปปไทด์ของสายสเตรท เกิด tetrahedral complex จากนั้นจะแยกออกได้เป็นผลผลิต 2 ชนิด

carboxyl group ของกรดแอสพาทิกของทั้ง 2 side chain มีความสำคัญต่อการย่อยพันธะเปปไทด์ของสายสเตรท เนื่องจาก carboxyl group ทั้ง 2 จะใช้พันธะไฮโดรเจนร่วมกัน นอกจากนี้ยังมีโมเลกุลน้ำมาจับแน่นมากกับกรดแอสพาทิกที่ active site ของเอนไซม์นี้ด้วยพันธะไฮโดรเจน

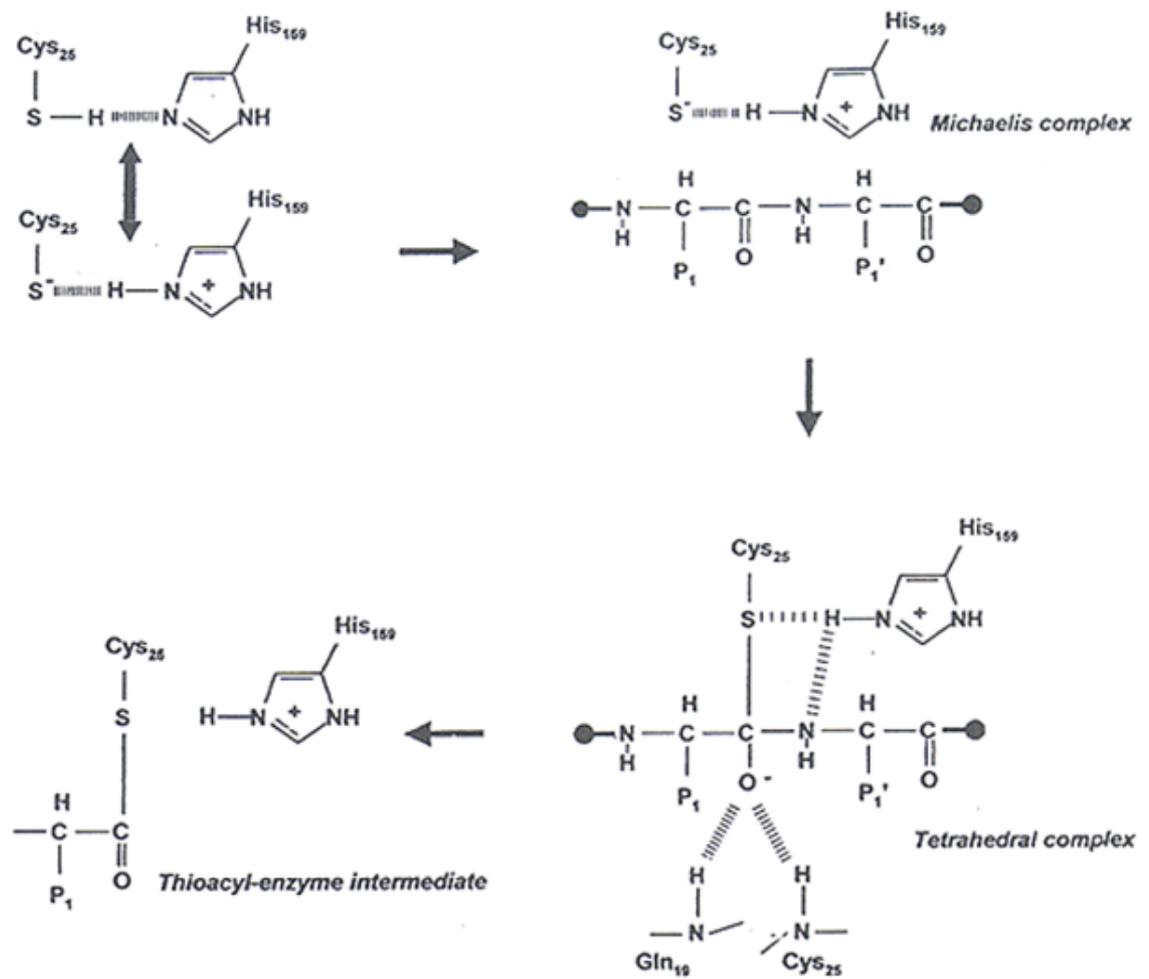
#### 2.3.4 metallopeptidases

เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีความคล้ายคลึงกับ aspartic peptidases โดยจะไม่มีโครงสร้าง intermediate ที่เกิดจากการสร้างพันธะโควาเลนต์ แต่ carboxyl group ของพันธะของสายสเตรทที่เอนไซม์ต้องการจะย่อยในกระบวนการย่อยสายสเตรทของเอนไซม์นี้จะมีโลหะที่ active site เข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งมักจะเป็น  $Zn^{2+}$  หรืออาจใช้ธาตุ transition อื่นๆแทนก็ได้ และในอนาคตอาจพบธาตุชนิดอื่นที่ active site ก็ได้ ดังภาพที่ 5

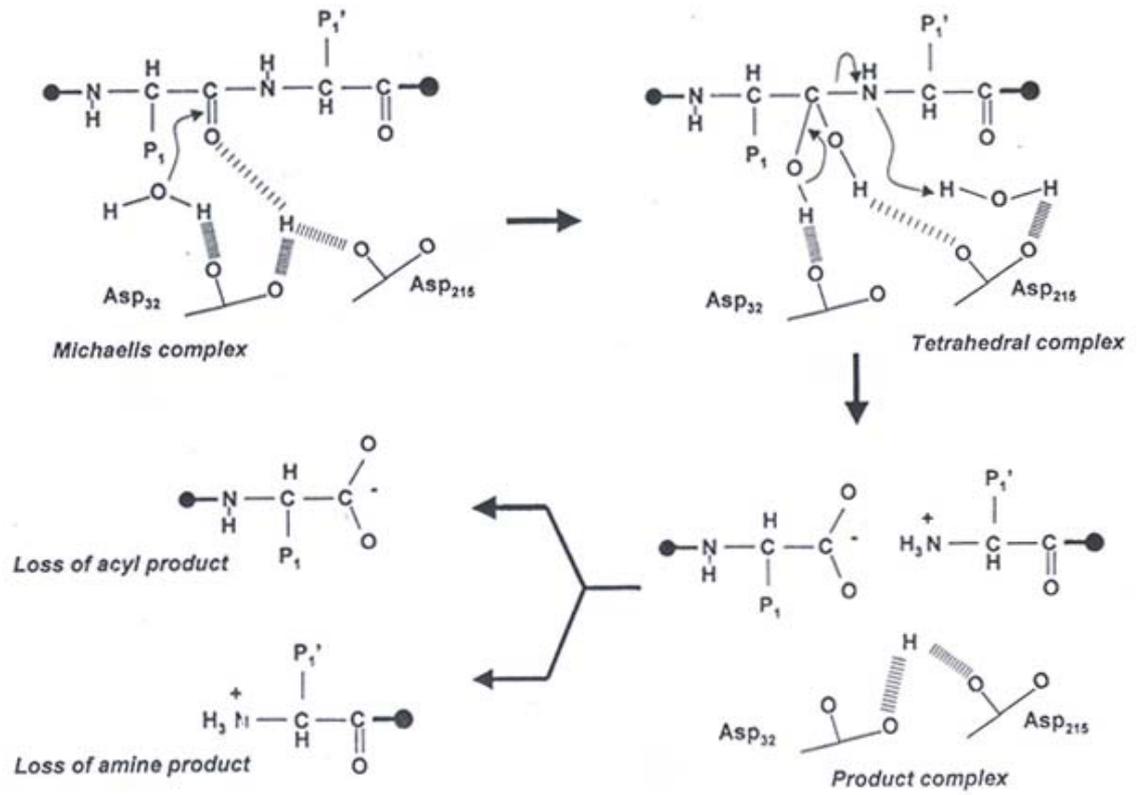


ภาพที่ 2 กลไกของ serine peptidases

ที่มา: Dunn (2001)

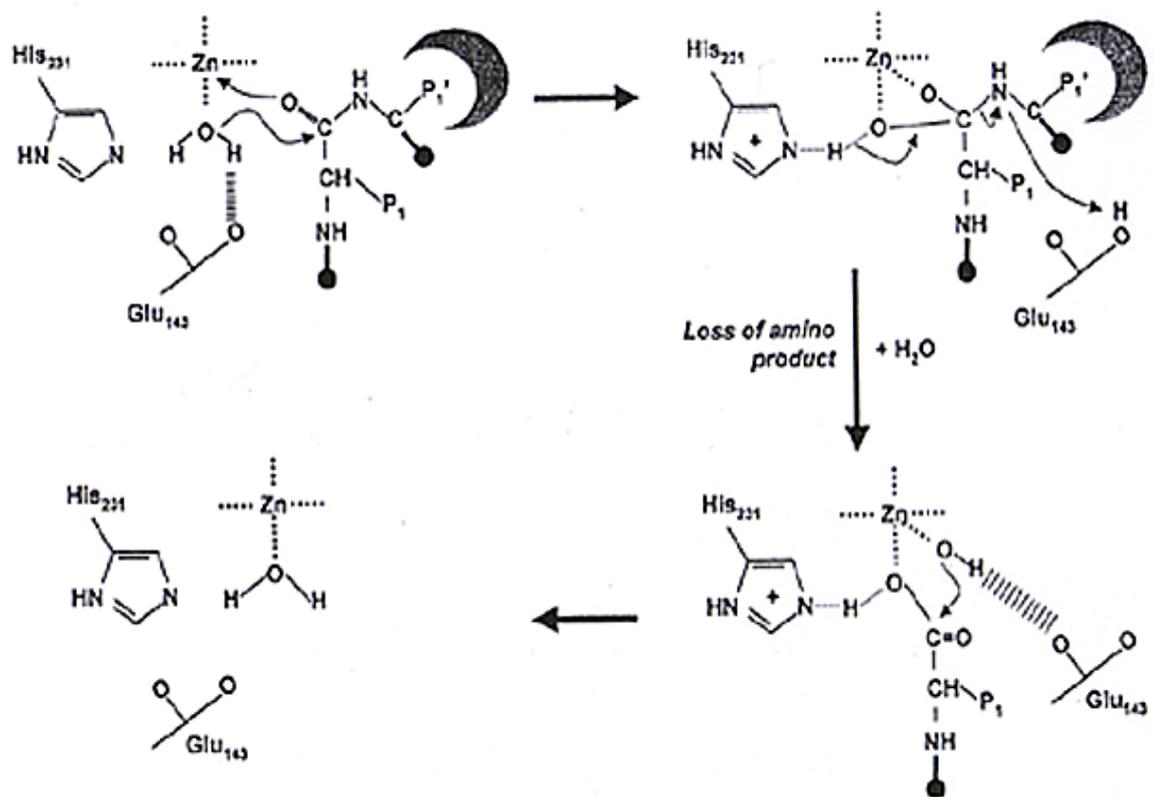


ภาพที่ 3 กลไกของ cysteine peptidases  
ที่มา: Dunn (2001)



ภาพที่ 4 กลไกของ aspartic peptidases

ที่มา: Dunn (2001)



ภาพที่ 5 กลไกของ metalloproteases

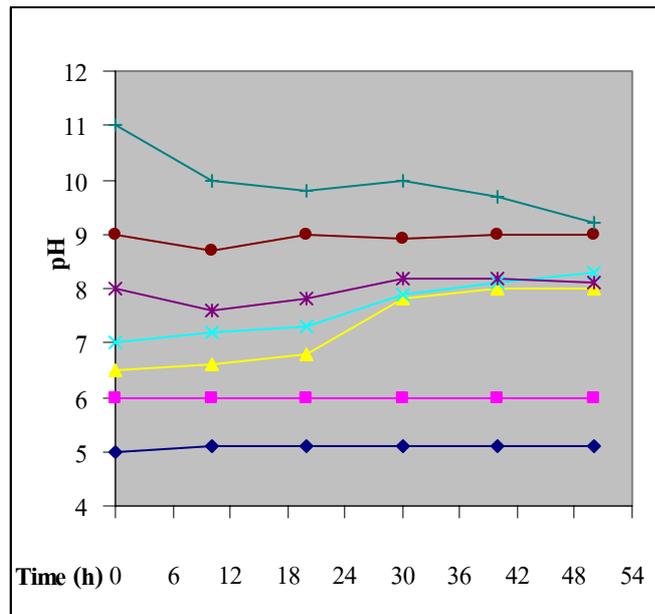
ที่มา: Dunn (2001)

### 3. จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่เป็นด่าง (*alkalophilic microorganism*)

จุลินทรีย์ที่กระจายอยู่ตามที่ต่างๆจะมีการเจริญตามพีเอชที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ ซึ่งส่วนใหญ่จะเจริญที่พีเอชเป็นกลาง (*neutrophilic microorganism*) จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะพีเอชที่สูงกว่าเป็นกลางได้ จะเรียกว่าเป็น *alkalophilic microorganism* ซึ่งในโลกจะมีปริมาณเพียง 1/10 หรือ 1/100 เท่านั้น เมื่อเทียบกับ *neutrophilic microorganism* แต่ก็มี *neutrophilic microorganism* บางส่วนที่แม้ว่าจะอยู่ในสภาวะพีเอชที่รุนแรง (*extreme condition*) แต่ก็สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ โดยการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่รุนแรงนั้นได้ ซึ่งกลไกนั้นจะเกี่ยวข้องกับการทำงานในส่วนของ *bioenergetic membrane* และกลไกในการลำเลียง จึงสามารถทำให้ตัวมันดำรงชีพและสามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นได้ เรียกจุลินทรีย์เหล่านี้ว่า *pH dependent extremophile* (Krulwich *et al.*, 1983)

ในกรณีของ *alkalophilic bacteria* มีสมบัติที่น่าสนใจ คือ มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงพีเอชของสภาพแวดล้อมหรือในอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมต่อการเจริญได้ จากภาพที่ 6 (Horikoshi, 1991) เป็นการทดลองศึกษาการเปลี่ยนแปลงพีเอชในระหว่างการเจริญของ *alkalophilic bacteria* ชนิดหนึ่ง เริ่มจากการปลูกเชื้อในอาหารฐานพีเอชเริ่มต้นประมาณ 11 และทำการบ่มเป็นเวลาหลายวัน พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญอย่างช้าๆพร้อมกับการเปลี่ยนแปลงพีเอช ซึ่งท้ายที่สุดจะอยู่ที่ช่วงประมาณ 9 ถึง 10 แม้เริ่มต้นจะมีสภาวะที่ค่อนข้างจะเป็นกรดเล็กน้อยคือที่ประมาณ 6.5 ก็ยังสามารถเปลี่ยนพีเอชจนได้สุดท้ายประมาณ 8 ได้

สมบัติที่น่าสนใจเกี่ยวกับ *alkalophilic microorganism* นอกจากที่กล่าวมาแล้ว คือ ภายในเซลล์จะมีการรักษาสภาวะพีเอชให้ต่ำกว่าภายนอกเซลล์ได้ แม้ภายนอกจะมีพีเอชสูง ไม่พบการลำเลียงโดยใช้พลังงาน (*active transport*) ในพวก *bacilli* ต้องการโซเดียมไอออนในการเจริญ การงอก และการสร้างสปอร์ (*endospores*) กลไกในการสังเคราะห์โปรตีนไม่แตกต่างจากพวก *neutrophilic bacteria* แต่ผนังเซลล์ (*cell wall*) และเยื่อหุ้มเซลล์ (*cell membrane*) กลับมีความแตกต่าง และพบว่าเอนไซม์ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ (*intracellular and extracellular enzyme*) จะมีสมบัติเฉพาะตัว (Horikoshi, 1991)



**ภาพที่ 6** การเปลี่ยนแปลงพีเอชระหว่างการเจริญของ alkalophilic bacteria ชนิดหนึ่ง

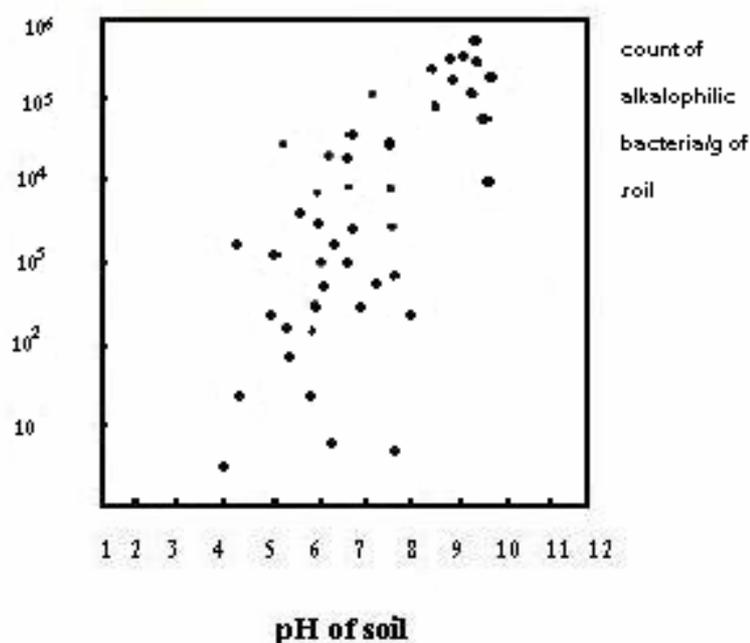
ที่มา: Horikoshi (1991)

alkalophilic microorganism สามารถแบ่งออกกว้างๆ ได้ 2 ประเภท ประเภทแรก คือ alkalophile เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะพีเอชมากกว่า 10 และที่เหมาะสมอยู่ที่ประมาณ 9 ไม่สามารถเจริญได้ที่พีเอช 7 หรือต่ำกว่า อีกประเภทหนึ่งคือ alkalotolerant สามารถเจริญได้ที่พีเอชมากกว่า 10 เช่นเดียวกัน แต่ที่เหมาะสมจะเป็นกลางหรือใกล้เคียง (Krulwich, 1986) นอกจากนี้ในระบบดังกล่าวแล้ว ก็ยังสามารถแบ่ง alkalophilic microorganism เป็น 2 กลุ่มย่อยได้อีก ได้แก่ facultative alkalophiles ซึ่งมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ที่ 10 แต่ก็สามารถเจริญได้ที่พีเอชเป็นกลางได้เช่นกัน อีกกลุ่มได้แก่ obligate alkalophiles มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ที่ 10 เช่นเดียวกัน แต่ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่เป็นกลาง (Krulwich and Guffanti, 1989)

### 3.1 สภาพแวดล้อมที่พบ (habitat)

alkalophilic microorganism สามารถพบกระจายได้ทั่วไปในธรรมชาติ ทั้งในสภาวะที่เป็นและไม่เป็นด่าง หรือแม้กระทั่งในสภาวะพีเอชที่เป็นกรดก็พบได้บ่อยครั้ง จากภาพที่ 7 แสดงให้เห็นถึงการกระจายตัวของแบคทีเรียประเภทนี้ในดินที่มีค่าพีเอชต่างๆกัน จะเห็นว่ามีการพบได้ทั่วไปในช่วงพีเอชกว้าง ไม่เฉพาะแต่พีเอชที่เป็นด่างเท่านั้น ในสภาพธรรมชาติที่เป็นด่างที่พบทั่วไป ได้แก่ ดิน ทะเลสาบ ทะเลทราย ที่มีพีเอชอยู่ที่ประมาณ 10 หรือมากกว่าและในสภาพแวดล้อมที่

มนุษย์เป็นผู้สร้างขึ้น ซึ่งบริเวณที่สามารถพบได้ เช่น บริเวณ โรงงานอุตสาหกรรมฟอกหนัง อาหาร กระบวนการทำกระดาษและสารทำความสะอาดต่างๆ alkalophilic microorganism บางชนิดต้องการเกลือ โซเดียมในการเจริญเรียกว่า haloalkalophiles (Kumar and Takagi, 1999)



**ภาพที่ 7** การกระจายตัวของ alkalophilic bacteria ที่สภาวะพีเอชต่างๆในดิน  
ที่มา: Horikoshi (1991)

### 3.2 การตรวจหาและการแยกเชื้อ (isolation and screening)

ในการแยก alkalophilic microorganism สามารถทำได้โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับสภาวะพีเอชเป็นด่าง ตัวอย่างที่จะนำมาคัดเลือกส่วนใหญ่ก็จะมาจากแหล่งที่คาดว่ามีตามหัวข้อ 3.1 ในการปรับสภาวะเป็นด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะใช้สารเคมี ที่นิยมได้แก่ โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate) เนื่องจากเป็นสารสำคัญในธรรมชาติที่ทำให้เกิดสภาวะความเป็นด่างได้ (Grant *et al.*, 1979) สารชนิดอื่นๆก็สามารถนำมาปรับพีเอชได้เช่นกัน เช่น โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodium bicarbonate) โซเดียมเซสควิคาร์บอเนต (sodium sesquicarbonate) โพแทสเซียมคาร์บอเนต (potassium carbonate) และ โซเดียมออร์โทฟอสเฟต (sodium orthophosphate) หรืออาจใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) ในกรณีของการเพาะเลี้ยงในระดับขนาดใหญ่ (Horikoshi, 1991) ในกรณีที่ต้องการแยกสายพันธุ์ที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิสูง (thermophiles) ต้องทำการบ่มจุลินทรีย์

ที่อุณหภูมิมากกว่า 70 องศาเซลเซียส สภาวะเช่นนี้มันไม่สามารถอยู่ในสภาพที่แข็งตัวได้ ต้องใส่สารที่เป็น gelling agent ลงไป เช่น geltrite ความเข้มข้นประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ (D'souza *et al.*, 1997)

### 3.3 จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

จากการตรวจเอกสารการวิจัยตีพิมพ์หลายฉบับ พบว่าจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสมีหลายประเภท ได้แก่ แบคทีเรีย เชื้อรา และแอคติโนมัยสิท ตัวอย่างดังต่อไปนี้

#### 3.3.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีรายงานมากที่สุดในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส แต่ละชนิดหรือแต่ละสายพันธุ์ก็จะสร้างเอนไซม์ที่มีสมบัติแตกต่างกัน ที่พบและถูกนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรมมากที่สุด คือ พวก bacilli เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นท่อน ดิคลีแกรม บวก อาจสร้างหรือไม่สร้างเอนโดสปอร์ (endospores) ตัวอย่างแบคทีเรีย bacilli ที่สามารถสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสได้ เช่น *Bacillus alkalophilus* ATCC 21522, *B. alkalophilus*, *B. alkalophilus* subsp. *Halodurans* KP1239, *B. amyloliquefaciens*, *B. cogulans* PB-77, *B. subtilis* var. *amylosacchariticus*, *B. proteolyticus* และ *B. pumilus* เป็นต้น (Kumar and Takagi, 1999)

นอกจากนี้แล้วยังมีแบคทีเรียอื่นๆอีก เช่น พวกแกรมลบรูปท่อน ได้แก่ *Pseudomonas maltophila*, *Pseudomonas* sp. strain B45, *Xanthomonas maltophila*, *Vibrio alginolyticus* และ *Vibrio metschnikovii* strain RH530 เป็นต้น ในพวก halophile ก็มีการศึกษาตัวอย่างเช่น *Halobacterium halobium* ATCC43214, *Halomonas* sp. ES-10 แบคทีเรียเหล่านี้บางชนิดสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่าเรียกว่า alkalopsychrophilic bacteria ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่สามารถทำงานในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำได้ (Kumar and Takagi, 1999)

Kobayashi *et al.* (1996) ศึกษาสมบัติเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ alkalophilic *Bacillus* sp. KSM-K-16 ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีการปรับสภาวะเป็นด่าง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อแยกเอนไซม์โดยวิธี polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) จะได้เอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ M-protease เป็นโปรตีนหลักและอีกสองชนิดคือ N- และ H-protease แต่ละชนิดจะมีสมบัติแตกต่างกันเล็กน้อยดังนี้ คือ M-protease มีมวลโมเลกุล 28 kDa มี 피เอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ 12.3 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ส่วน

H-protease มีมวลโมเลกุลและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมเท่ากับ M-protease แต่พีเอชจะต่ำกว่า คือ อยู่ที่ 11.0 ในส่วนของ N-protease จะประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ 2 สายที่แต่ละสายจะมีมวลโมเลกุล 12.5 และ 14.5 kDa มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่ 11.0 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Gupta *et al.* (1999) ศึกษาเชื้อ *Bacillus* sp. SB5 ที่ได้รับการคัดเลือกไว้แล้ว โดยแยกได้จากดินด้วยการ enrichment technique นำไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีเคซีนเป็นองค์ประกอบ 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่มีสมบัติคงทนต่อสารฟอกขาว (bleach-stable alkaline protease) และมีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่ 10 และ 60 ถึง 70 องศาเซลเซียส ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์จะมีกิจกรรมเพิ่มขึ้น 30 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำไปทดสอบกับสารเหล่านี้ ได้แก่ ผงซักฟอกที่มีและไม่มีประจุ (ionic และ non-ionic detergent) สารลดแรงตึงผิว (surfactant) รวมถึงสารฟอกขาวและผงซักฟอกที่ใช้ในทางการค้า

Banerjee *et al.* (2003) แยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากตัวอย่างน้ำที่เก็บจากน้ำพุร้อนประเทศอินเดีย โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยง nutrient agar ที่มีส่วนผสมของ skimmed milk 0.2 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอชระดับต่างๆ พบว่ามีเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้ 50 ชนิด และในจำนวนนี้แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ได้ดีที่สุด เมื่อตรวจสอบแล้วพบว่า เป็นเชื้อ *Bacillus brevis*

Elibol and Moreria (2003) ศึกษาการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อ *Teredinobacter turnirae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในน้ำ (marine bacterium) โดยใช้การตรึงเซลล์ (immobilized cell) ในแคลเซียมแอลจิเนต (calcium alginate)

### 3.3.2 เชื้อรา (fungi)

พบว่าในพวกเชื้อรา มีการสร้างเอนไซม์ที่มีประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมมากมายเช่นกัน เช่น เซลลูลูเลส (cellulase) อะไมเลส (amylase) รวมถึงเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสด้วย เชื้อราที่มีการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส เช่น *Aspergillus candidus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. melleus*, *A. niger*, *A. sulphureus*, *Cephalosporium* sp. KSM 388, *Fusarium graminearum*, *Scedosporium apiospermum* และ *Tritichium album* Limber เป็นต้น (Kumar and Takagi, 1999)

Chakabarti *et al.* (2000) เเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus terreus* (IJIRA 6.2) ซึ่งแยกมาจากดิน โดยการเพาะเลี้ยงแบบ solid-state fermentation (SSF) และทำการศึกษสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่เชื้อผลิตได้ โดยผ่านกระบวนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography แบบต่างๆและวิเคราะห์หามวลโมเลกุลโดยวิธี sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าเอนไซม์มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดกิจกรรมอยู่ที่ 8.5 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และมีความคงทนต่ออุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในช่วงพีเอชตั้งแต่ 5.5 ถึง 9.5

Dayanadan *et al.* (2003) ศึกษาสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสในการย่อยขนแพะ (dehairing) ในกระบวนการฟอกหนัง โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. tamarii* แบบ solid-state fermentation ในอาหารที่มีรำข้าวสาลี (wheat barn) เป็นองค์ประกอบ ผลการทดลองพบว่าการใช้เอนไซม์ชนิดนี้ทำให้คุณภาพของหนังแพะดีขึ้น

Tunga *et al.* (2003) ศึกษาสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ *A. parasiticus* โดยทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยอะซิโตนแล้วต่อด้วย column chromatography พบว่าเอนไซม์มีความคงทนต่อพีเอชและอุณหภูมิในช่วงกว้าง คือ พีเอชอยู่ในช่วง 6 ถึง 10 และอุณหภูมิอยู่ในช่วง 4 ถึง 40 องศาเซลเซียส มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมอยู่ที่ 8 และ 10 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และวิเคราะห์หามวลโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE พบว่ามีขนาดเท่ากับ 23 kDa นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ยังคงมีกิจกรรมในสภาวะที่มี oxidizing agent, reducing agent และมีความคงทนต่อผงซักฟอกชนิดต่างๆได้ดี เมื่อทดสอบกับสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ (inhibitor) พบว่าเอนไซม์ถูกยับยั้งโดย PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride) ซึ่งเป็นสารยับยั้ง serine protease แสดงให้เห็นว่าเป็นเอนไซม์ชนิดดังกล่าว

### 3.3.3 แอคติโนมัยสีท (actinomycetes)

Patke and Dey (1998) ศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง *Streptomyces megasporus* SDP4 พบว่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมคือ 8.0 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในสภาวะที่มีแคลเซียมจะทำให้เอนไซม์มีครึ่งชีวิต (half-life) นานขึ้น คือ อยู่ที่ 30 นาที อุณหภูมิ 85 องศา

เซลเซียส มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 30 ถึง 90 kDa เมื่อทดสอบกับสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าถูกยับยั้งด้วย PMSF แสดงให้เห็นว่าเป็น serine protease

Petinate *et al.* (1999) ศึกษาสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อ *Streptomyces cyaneus* สายพันธุ์หนึ่งที่แยกได้จากดินในประเทศบราซิล (Brazilian cerrado soil) โดยทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี apsinin-agarose affinity chromatography และหามวลโมเลกุลโดยวิธี gel filtration high performance liquid chromatography ได้เท่ากับ 120 kDa และวิธี SDS-PAGE ได้เท่ากับ 30 kDa เอนไซม์มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมอยู่ที่ 9.0 และ 25 องศาเซลเซียส ตามลำดับ กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งด้วย PMSF และ TPCK ซึ่งแสดงว่าเป็น serine protease

Moreira *et al.* (2003) ศึกษาสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสชนิดใหม่ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Nocardopsis* sp. สายพันธุ์หนึ่ง โดยแยกได้จากดินจากทางภาคเหนือของประเทศบราซิล โดยทำการศึกษาสมบัติของเอนไซม์ใน 2 ลักษณะ คือ แบบ crude extract (CE) และแบบ partial purified extract (PPE) (ใช้การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์) พีเอชที่ใช้ในการตรวจกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 2 ลักษณะ คือ 10.5 และ 8.0 สำหรับ CE และ PPE ตามลำดับ ส่วนอุณหภูมิใช้ค่าเดียวกันคือ 50 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่ากิจกรรมสูงสุดของ CE เท่ากับ 50 units/mg และของ PPE เท่ากับ 1,260 units/mg เมื่อทดสอบกับสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าทั้ง CE และ PPE ถูกยับยั้งโดย PMSF ซึ่งเป็นสารยับยั้ง serine protease แสดงว่าเป็นเอนไซม์ชนิดดังกล่าว

### 3.3.4 สิ่งมีชีวิตอื่นๆ

Joo *et al.* (2001) ศึกษาสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก invertebrate gut จาก Korean polychaeta มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Periserrula leucophyna* โดยการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต จากนั้นแยกด้วย gel filtration และ ion exchange chromatography วิเคราะห์หามวลโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์มีมวลโมเลกุล 28 kDa มีความคงทนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แต่ไม่คงทนที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่ 10.0 และถูกยับยั้งโดย PMSF แสดงให้เห็นว่าเป็นเอนไซม์ serine protease

#### 4. การผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส (production of alkaline proteases)

เอนไซม์เป็นสารเมแทบอลิท์ที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ดังนั้นจึงมีความสัมพันธ์กับการเจริญอย่างมาก การสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของจุลินทรีย์ก็เช่นเดียวกันที่ย่อมต้องเกี่ยวข้องกับการเจริญอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ ดังนั้นการพัฒนาการผลิตเอนไซม์ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ส่วนหนึ่งก็คือการพัฒนาการเจริญของเซลล์จุลินทรีย์ให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมนั่นเอง ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสมีหลายปัจจัย แต่ละปัจจัยมีความสำคัญมากน้อยต่างกันหรืออาจมีความสัมพันธ์ที่เกี่ยวข้องกัน ปัจจัยเหล่านี้ ได้แก่ ชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้การเพาะเลี้ยง ซึ่งมีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ เชื้อราและแอกติโนมัยสีท องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องมีทั้งแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจนและสารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญ (growth factor) ต่อจุลินทรีย์นั้นๆ สภาวะการเพาะเลี้ยงหรือรูปแบบในการเพาะเลี้ยงจะต้องเหมาะสมกับจุลินทรีย์แต่ละชนิด แบ่งได้เป็นการเพาะเลี้ยงแบบอาหารกึ่งแข็ง (solid-state fermentation, SSF) และการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (submerged culture) ซึ่งจะเหมาะสมกับจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน และจะได้ออกถึงรายละเอียดในหัวข้อต่อไป นอกจากนี้พีเอช อุณหภูมิ การให้อากาศ การเขย่า และการกวนก็เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสเช่นกัน รายละเอียดแต่ละปัจจัยดังต่อไปนี้

##### 4.1 สายพันธุ์ของจุลินทรีย์และการปรับปรุงสายพันธุ์ (strains and improvement of strains)

ชนิดและสายพันธุ์เป็นปัจจัยสำคัญที่สุดในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส จุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีประสิทธิภาพในการผลิตต่างกัน สายพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกมาแล้วจากธรรมชาติ สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งอาจไม่เพียงพอหรือคุ้มค่าที่จะนำมาผลิตในระดับอุตสาหกรรม จึงมีการนำวิธีการปรับปรุงสายพันธุ์เข้ามาช่วยในการสร้างเอนไซม์ให้ดีขึ้น

การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อเพิ่มผลผลิต (product) เป็นหลักการพื้นฐานของกระบวนการเพาะเลี้ยง สายพันธุ์ที่ปรับปรุงโดยใช้วิธีการดั้งเดิมและเป็นที่ยอมรับกันมาตลอด คือ การใช้สารก่อกลายพันธุ์ (mutagen) การคัดเลือก (selection) และการใช้ genetic recombination เป็นต้น ปัจจุบันเริ่มมีการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) เข้ามาประยุกต์ใช้มากขึ้น โดยการโคลนยีน (clone gene) ที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ได้เข้าสู่จุลินทรีย์ที่สามารถควบคุมการเจริญได้ดีและมีความปลอดภัยต่อมนุษย์ เช่น *E. coli* หรือ *Bacillus* spp. ข้อดีอีกประการในการปรับปรุงสายพันธุ์ คือ สามารถลดต้นทุนในการผลิตได้ในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยง สายพันธุ์ที่ได้อาจ

เพิ่มความสามารถในการใช้สับสเตรทที่มีราคาถูกลงแทนที่จะใช้กลูโคสแต่เพียงอย่างเดียว เช่น แป้ง หรือน้ำเชื่อมจากข้าวโพด (corn syrup) (Parekh *et al.*, 2000)

จุฬาพร (2543) แยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. WD6 ที่เจริญได้ในสภาวะเป็นด่างสูง (พีเอช 11) ในอาหาร BMSM medium และสามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสได้ในปริมาณสูง โดยแยกได้จากตลาดสดตัวเมือง จ.ขอนแก่น สามารถผลิตเอนไซม์ได้มากถึง 334 units/ml ในอาหารที่มี skimmed milk เป็นแหล่งไนโตรเจนและสารเหนียวสำหรับการสร้างเอนไซม์ มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอช 11 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อทำการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้ N-methyl-N'-nitrosoguanidine (NTG) จะได้สายพันธุ์กลาย P65 ที่มีการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 400 units/ml มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมเท่ากับของ WD6

Jorgensen *et al.* (2000) ศึกษาการพัฒนาและปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรีย *B. lentus* ที่สามารถเจริญและผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสได้ในสภาวะเป็นด่าง โดยระดับแรกทำการโคลนยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์และควบคุมเอนไซม์ชนิดนี้ (S-309 gene) ที่อยู่บนโครโมโซม ด้วยการใช้วิธี transformation เข้าไปในเชื้อ *B. subtilis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทราบลักษณะทางพันธุกรรมเป็นอย่างดี ทำให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีการผลิตเอนไซม์ได้ดีขึ้น และในระดับต่อมายังทำการปรับปรุงวิธีการให้ดีขึ้น โดยใช้เทคนิคการขยายหรือเพิ่มยีน (gene amplification technique) ของยีนตัวนี้ใน *B. lentus* โดยตรง ทำให้รุ่นต่อๆมามีจำนวนของยีนตัวนี้มี copy number มากขึ้น สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงขึ้นตามไปด้วย

Feng *et al.* (2001) ทำการโคลนยีน amy gene ที่สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้เข้าไปในแบคทีเรีย *B. pumilus* C172 ซึ่งสามารถเจริญได้ในสภาวะที่เป็นด่างและสามารถสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสได้ในปริมาณสูง โดยใช้วิธีการ transformation ได้เป็นสายพันธุ์ใหม่คือ *B. pumilus* C172-14 (pBX96) ทำให้แบคทีเรียชนิดนี้สามารถใช้แป้ง (starch) หรือแป้งที่ได้รับการย่อยสลายพันธะแล้ว (starch hydrolysate) เป็นสับสเตรทแทนกลูโคส ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้หาได้ง่าย เนื่องจากเป็นผลผลิตทางการเกษตรโดยตรง สามารถประหยัดค่าใช้จ่ายในส่วนของการเลี้ยงเชื้อลงไปได้ เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตได้นี้มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมอยู่ที่พีเอช 11 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อทดสอบกับสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์พบว่า PMSF สามารถยับยั้งได้ แสดงให้เห็นว่าเป็นเอนไซม์ชนิด serine protease

Fu *et al.* (2003) ทำการโคลนยีนที่สร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ทนต่ออุณหภูมิสูงจากแบคทีเรีย *B. stearothermophilus* F1 ที่แยกได้จากก้อนของไบตันปาล์มน้ำมัน โดยใช้วิธี polymerase chain reaction (PCR) เข้าสู่แบคทีเรีย *E. coli* TOPO 10 โดยอาศัยเวกเตอร์ 2 ชนิด คือ pTrcHis-TOPO ซึ่งอยู่ติดกับยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์และ pJL3 ที่สามารถสร้าง bacteriocin release proteins (BRPs) ช่วยในการแสดงออกและส่งเอนไซม์ออกมาภายนอกเซลล์ *E. coli* TOPO 10 จากการศึกษาสมบัติของเอนไซม์พบว่าเอนไซม์มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 9 และ 80 องศาเซลเซียส ตามลำดับ มีความคงทนต่ออุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ในช่วงพีเอช 8.0 ถึง 10.0 มีครึ่งชีวิตที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ส่วนที่ 90 องศาเซลเซียส จะมีครึ่งชีวิตลดลงเหลือเพียง 25 นาทีเท่านั้น เอนไซม์ถูกยับยั้งกิจกรรมโดย PMSF แสดงให้เห็นว่าเป็นเอนไซม์ชนิด serine protease

Calik *et al.* (2003) ทำการโคลนยีน sub C gene ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสและอยู่บนโครโมโซมของเชื้อ *B. licheniformis* DSM 1969 โดยการใช้วิธี PCR (polymerase chain reaction) แล้วนำไปทำการ transformation กับ *Bacillus* spp. ที่ใช้เป็น host หลายชนิด ด้วยการใส่ pRS316 plasmid, pHV plasmid และ restriction enzyme ที่เหมาะสมผ่านกระบวนการจนได้ plasmid ที่มี sub C gene เรียกว่า pHV1431::sub C plasmid *Bacillus* spp. host ที่ใช้ในการทดลองมี 9 ชนิด ได้แก่ *B. alvei*, *B. amyloliquefaciens*, *B. badius*, *B. cereus*, *B. cogulans*, *B. firmus*, *B. licheniformis*, *B. sphericus* และ *B. subtilis* หลังการทำ transformation แล้ว จึงทำการทดสอบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของ recombinant (r-) *Bacillus* spp. เหล่านี้ ผลคือมีความแตกต่างกันในแต่ละการทดลอง เช่น เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส 20 g/L เท่ากัน ในด้านการเจริญ r-*B. cogulans* มีมวลเซลล์สูงสุด แต่กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดอยู่ที่ r-*B. amyloliquefaciens* ในด้านการเปรียบเทียบความคงตัวของ recombinant plasmid ในระหว่างการเก็บรักษาพบว่า r-*B. alvei* และ r-*B. amyloliquefaciens* จะมีการสูญเสีย recombinant plasmid ไป ส่วนที่มีความคงตัวมากที่สุดได้แก่ r-*B. licheniformis* และ r-*B. sphericus* ตามลำดับ

#### 4.2 อาหารเพาะเลี้ยง (culture medium)

อาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจะคล้ายกับสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์ทั่วไป ซึ่งประกอบด้วย น้ำ แหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ วิตามินและออกซิเจน (ออกซิเจนสำหรับจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการเจริญ) บางครั้งอาจต้องการสารเหนี่ยวนำ (inducer) ในการกระตุ้นให้มีการสร้าง

เอนไซม์ในกรณีที่เป็น inducible enzyme แม้จะเป็นจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน แต่องค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างกัน ก็ทำให้การสร้างเอนไซม์ต่างกัน

ในกรณีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตในระดับปริมาณมาก (large scale) หรือระดับอุตสาหกรรม การเลือกใช้ชนิดของอาหารให้เหมาะสมมีหลักเกณฑ์ คือ สามารถสร้างผลผลิตหรือมวลชีวภาพ (biomass) ต่อมวลสับสเตรทที่ใช้มากที่สุด ให้ความเข้มข้นผลผลิตหรือมวลชีวภาพสูงสุด สามารถให้อัตราการสร้างผลผลิตสูงสุด ให้ผลผลิตที่ไม่ต้องการน้อยที่สุด ต้องมีคุณภาพดี สามารถหาได้ตลอดทั้งปี มีปัญหาน้อยที่สุดระหว่างการเตรียมอาหารและการนิ่งมาเชื้อ (sterilization) และสุดท้ายคือมีปัญหาน้อยที่สุดในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะการให้อากาศและการกวน การสกัดและการทำให้บริสุทธิ์ รวมถึงปัญหาของเสียที่จะเกิดขึ้น (Stanbury *et al.*, 1999)

สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสมีการศึกษาทั้งในแบบ synthetic medium และ complete medium แต่ละชนิดก็ให้ผลแตกต่างกันไปดังต่อไปนี้

#### 4.2.1 แหล่งคาร์บอน (C-source)

เซลล์จุลินทรีย์จะใช้แหล่งคาร์บอนในกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ของเซลล์ เป็นสารที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์องค์ประกอบและพลังงานของเซลล์ โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะไม่มีอากาศ (anaerobic microorganism) จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ในการสังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ ในขณะที่จุลินทรีย์กลุ่มเจริญในสภาวะที่มีอากาศ (aerobic microorganism) จะใช้ถึง 50 ถึง 55 เปอร์เซ็นต์ (สมาใจ, 2537) จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการเพาะเลี้ยงทั่วไป โดยมากจะใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตส มอลโตส และเซลลูโลส เป็นต้น จากรายงานที่มีการศึกษามาพบว่ามีแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสหลายชนิด เช่น กลูโคส กาแลคโตส ราฟิโนส มอลโตส และแป้ง เป็นต้น แต่ละชนิดให้ผลที่แตกต่างกันในจุลินทรีย์ที่ต่างชนิดกัน และแม้จะเป็นจุลินทรีย์ชนิดเดียวกัน สกุลเดียวกัน แต่ต่างสายพันธุ์ก็ให้ผลที่แตกต่างกัน

กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและเซลล์จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ง่ายที่สุด สามารถนำผ่านเข้ามาภายในเซลล์ได้ผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์ โดยการใช้พลังงานจากสารพลังงานเรียกว่า active transport และวิธีเปลี่ยนกลูโคสเป็นกลูโคส-6-ฟอสเฟต เรียก

กระบวนการนี้ว่า group translocation หรือ phosphotransferase (กัญจนา, 2537) อาจมีผลทำให้มีการเจริญค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น แต่จากเอกสารวิจัยตีพิมพ์บางฉบับ พบว่ากลูโคสยับยั้ง (repression) การสังเคราะห์เอนไซม์ ซึ่งเข้าใจว่าเกิดจากกระบวนการ catabolite repression แต่ก็มีหลายฉบับเช่นกันที่แสดงให้เห็นว่ากลูโคสเสริมสร้างการสร้างเอนไซม์

Ferrero *et al.* (1996) ศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ทนต่ออุณหภูมิสูง (thermostable alkaline protease) จาก *B. licheniformis* MIR 29 พบว่าเคซีนเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์ โดยให้กิจกรรมเอนไซม์มากถึง 76 units/ml และพบว่าการเจริญดีที่สุดเช่นเดียวกัน ผลรองลงมาได้แก่ แป้ง (starch) อินนูลิน (innulin) แลคโตส (lactose) เมลิไบโอส (melibiose) ราฟฟิโนส (raffinose) กาแลคโตส (galactose) ในขณะที่อีก 5 ชนิดยับยั้งการสร้างเอนไซม์ ได้แก่ กลูโคส ไซโลส (xylose) กลีเซอรอล (glycerol) และมอลโตส (maltose)

Banerjee *et al.* (1999) ศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากแบคทีเรีย *B. brevis* ในอาหาร complete medium พีเอช 10.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ พบว่าแลคโตสสามารถทำให้เชื้อมีการสร้างเอนไซม์ได้สูงสุดถึง 3,455 units/ml ผลรองลงมาได้แก่ ซูโครส กลูโคส แป้งและมอลโตส และที่ต่ำที่สุดคือกาแลคโตส ได้เพียง 650 units/ml เท่านั้น

Mehrotra *et al.* (1999) ศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์หนึ่งที่แยกได้จากดินที่มีสภาพเป็นด่าง เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหาร complete medium โดยมีการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน พบว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดมีกิจกรรมเอนไซม์ 28 units/ml ผลรองลงมาได้แก่ ฟรุคโตส แลคโตส ส่วนมอลโตสและแป้งจะได้กิจกรรมเอนไซม์ต่ำมาก

Calik *et al.* (2001) ศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อ *B. licheniformis* MIR 29 โดยใช้ความรู้เกี่ยวกับ biochemical reaction network ของกระบวนการ central carbon pathway ที่มีการศึกษามาแล้วเข้ามาประยุกต์ใช้ และมีการนำการวิเคราะห์ที่เรียกว่า metabolic capacity analysis มาใช้ในการคำนวณค่าความเหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อ biochemical reaction network ภายในเซลล์ ในส่วนของการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนพบว่า

กลูโคสและอะซิเตตมีความเหมาะสมที่สุดต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ โดยมีค่า reduction degree ( $\gamma$ ) สูงสุดเท่ากับ 4 ทั้ง 2 ชนิด

Johnversly and Naik (2001) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนหลายชนิดที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus* sp. JB-99 ในอาหาร synthetic medium โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาวะพีเอช 10 พบว่าการลดซิทริก (citric acid) และแป้งให้กิจกรรมเอนไซม์ได้สูงสุด ผลรองลงมาได้แก่ ราฟไฟโนส อะราบิโนสและฟรุคโตส ส่วนที่ยับยั้งการสร้างเอนไซม์ได้แก่ กลูโคสและไซโลส

Beg *et al.* (2002) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. mojavensis* ในอาหาร synthetic medium ที่มี casamino acid เป็นตัวเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส พบว่าที่ความเข้มข้นของกลูโคสมากกว่า 10 mg/ml จะทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างเอนไซม์โดยกระบวนการ catabolite repression จึงมีการปรับปรุงกระบวนการเพาะเลี้ยงเป็นแบบเดิมอาหาร โดยทำการเพาะเลี้ยงไประยะหนึ่งจนปริมาณกลูโคสลดต่ำลงน้อยกว่า 10 mg/ml จึงเติม casamino acid ลงไป พบว่ามีการสร้างเอนไซม์มากกว่าปกติ 2 เท่า เป็นการหลีกเลี่ยงกระบวนการ catabolite repression ในระหว่างการเพาะเลี้ยง

#### 4.2.2 แหล่งไนโตรเจน (N-source)

เซลล์จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณ 8 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป บางชนิดจะใช้ในรูปของสารอินทรีย์ (organic nitrogen) หรือบางชนิดจะใช้ในรูปของสารอนินทรีย์ (inorganic nitrogen) เซลล์จุลินทรีย์จะนำไนโตรเจนไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม เพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์กรดอะมิโน โปรตีน และส่วนประกอบของผนังเซลล์ (สมใจ, 2537) ในส่วนของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส ตัวเอนไซม์ประกอบด้วยไนโตรเจน 15 เปอร์เซ็นต์ (Kumar and Takagi, 1999) ดังนั้นการเลือกใช้ชนิดของแหล่งไนโตรเจนจึงมีความสำคัญ จากเอกสารวิจัยตีพิมพ์หลายฉบับ แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์ต่างชนิดกันหรือแม้กระทั่งชนิดเดียวกันก็สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนที่ต่างกันได้

Ferrero *et al.* (1996) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* MIR-29 เพื่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน พบว่าโซเดียมไนเตรท (sodium nitrate) ซึ่งเป็นสารอนินทรีย์สามารถทำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ได้สูงสุด ผลรอง

ลงมาได้แก่แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) ส่วนเปปโตน (peptone) ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ในโตรเจนมีกิจกรรมเอนไซม์ต่ำสุด

Banerjee *et al.* (1999) ศึกษาการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *B. brevis* MTCCB0016 ในอาหาร complete medium โดยมีการเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ 12 ชนิด ผลคือ soybean meal ได้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด ส่วนในระดับปานกลางได้แก่ไบโอเปปโตน (biopeptone), มีทเอกซ์แทรค (meat extract), ทรีปโตน (tryptone), มอลท์เอกซ์แทรค (malt extract), ยีสต์เอกซ์แทรค (yeast extract), ทรีปโตน (tryptone) และยีสต์ออโตไลเซต (yeast autolysate) และที่ให้กิจกรรมต่ำสุดได้แก่เปปโตน

Merhotra *et al.* (1999) พะเอียดเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. ในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส โดยใช้แหล่งไนโตรเจนทั้งสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ พบว่าแอมโมเนียมคลอไรด์จะให้ผลผลิตเอนไซม์สูงสุด ในขณะที่แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมไนเตรท เคซีนและยีสต์เอกซ์แทรคผสมกับเปปโตน มีการสร้างเอนไซม์อยู่ในช่วงใกล้เคียงกันและน้อยกว่าแอมโมเนียมคลอไรด์ 16 เปอร์เซ็นต์

Beg *et al.* (2001) ศึกษาการเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อ *B. mojavensis* โดยใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งแอมโมเนียมคลอไรด์นี้หากมีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่า 0.0093 mmol/ml จะยับยั้งการสร้างเอนไซม์ จึงปรับปรุงการทดลองโดยพะเอียดเลี้ยงเชื้อไประยะหนึ่ง เพื่อให้ปริมาณสารตัวนี้ลดลงจนต่ำกว่าระดับดังกล่าว จึงเติม casamino acid ซึ่งเป็นสารเหนี่ยวนำการสร้างเอนไซม์ลงไป จะทำให้มีการสร้างเอนไซม์ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับในกรณีที่ไม่ใส่ลงไป ในขณะที่ยังมีปริมาณแอมโมเนียมคลอไรด์สูงอยู่

#### 4.2.3 ไอออนของโลหะและเกลือ (metal ion and salt)

Moon and Parulekar (1991) รวบรวมข้อมูลว่าฟอสเฟตจะทำหน้าที่เป็นสารกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ในระดับปฐมภูมิ รวมถึงการสังเคราะห์ deoxyribonucleic acid (DNA) ribonucleic acid (RNA) และโปรตีน มีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต การหายใจของเซลล์และการควบคุมระดับของ ATP ฟอสเฟตส่วนใหญ่จะถูกใช้ในการสังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ เช่น เป็นโคเอนไซม์ (co-enzyme) กรดนิวคลีอิก (nucleic acid) นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ฟอสโฟลิปิด (phospholipid) และโพลีเมอร์ของผนังเซลล์ ส่วนของฟอสเฟตที่ถูกใช้

ไปจะยังคงอยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์ฟอสเฟตที่ละลายน้ำ เช่น ATP เป็นต้น มีรายงานว่า ปริมาณของสารอินทรีย์ฟอสเฟตที่มากเกินไปจนถึงระดับหนึ่งจะมีผลต่อการใช้กลูโคส (glucose utilization) การเจริญและการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ในจุลินทรีย์สายพันธุ์ wild-type และ recombinant ชนิดหนึ่ง Moon and Parulekar ทำการทดลองศึกษาผลของสารอินทรีย์ฟอสเฟต คือ ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ ) ที่มีต่อการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ *B. firmus* ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1, 2 และ 4 g/L พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.5 g/L จะจำกัดการเจริญและการสร้างเอนไซม์ ในขณะที่ความเข้มข้น 2 g/L จะกระตุ้นให้เกิดการสร้างเอนไซม์ได้ดีที่สุด ซึ่งเป็นผลมาจากการกระตุ้นในระดับการสังเคราะห์และการส่งเอนไซม์ออกนอกเซลล์

Tunga *et al.* (1998) ศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ROITRB-13 (NRRL-21498) ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบ solid-state fermentation ศึกษาปัจจัยต่างๆรวมถึงส่วนประกอบของเกลือที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส พบว่าในชุดของสารละลายเกลือที่มีโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 12.8 g/L โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 g/L โซเดียมคลอไรด์ 0.5 g/L แมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 g/L และแคลเซียมคลอไรด์ 0.01 g/L ทำให้มีการสร้างเอนไซม์สูงสุด

Banerjee *et al.* (1999) ศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส จากเชื้อ *B. brevis* MTCCB0016 โดยการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาस्कและทำการเปรียบเทียบปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้อง ในส่วนของเกลือพบว่าเมื่อใช้แคลเซียมอะซิเตต 0.01 g/L, แคลเซียมคลอไรด์ 0.01 g/L และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.01g/L ใส่ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตอยู่แล้ว 0.1g/L จะมีการสร้างเอนไซม์สูงขึ้น ซึ่งสูงกว่าการใช้เกลือแต่ละชนิดแต่เพียงชนิดเดียว อธิบายได้ว่าแคลเซียมอะซิเตตและแคลเซียมคลอไรด์จะป้องกันการเกิด autolysis ของเอนไซม์ในระหว่างการเพาะเลี้ยงได้

Kumar and Takagi (1999) รายงานว่าโพแทสเซียมฟอสเฟตจะใช้เป็นแหล่งฟอสเฟตในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ทั่วไป เนื่องจากมีความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยส่วนใหญ่จะใช้ที่ความเข้มข้น 2 g/L พบว่าหากใช้ในปริมาณเข้มข้นกว่านี้ จะยับยั้ง (inhibit) การเจริญและยับยั้ง (repression) การสร้างเอนไซม์เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส ปัญหาประการหนึ่งของการใช้สารชนิดนี้ คือ เมื่อใช้ในความเข้มข้นมากกว่า 4 g/L จะเกิดการตกตะกอนภาย หลังการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน (autoclave) แต่ก็สามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้โดยการเติม ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) นอกจากนี้ไอออนของโลหะบางชนิดมีผลต่อการ

สังเคราะห์เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส เช่น ไอออนของโลหะที่มีประจุ+2 เช่น แคลเซียม (calcium) โคบอลต์ (cobalt) โบรอน (boron) คอปเปอร์ (copper) เหล็ก (iron) แมกนีเซียม (magnesium) แมงกานีส (manganese) และ โมลิบดีนัม (molybdenum) เป็นต้น

#### 4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในระหว่างการเพาะเลี้ยง

##### 4.3.1 พีเอช

Horikoshi (1991) รวบรวมรายงานเกี่ยวกับการเจริญของ alkalophilic microorganism จุลินทรีย์เหล่านี้มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญประมาณ 9 ถึง 10.5 มีน้อยมากที่พบว่าสามารถเจริญได้ในสภาวะพีเอชเป็นกลางหรือใกล้เคียง แม้ว่าภายนอกเซลล์จะมีสภาวะเช่นไร แต่ภายในเซลล์จะมีกระบวนการที่ทำให้พีเอชต่ำกว่าภายนอกเซลล์เสมอ เนื่องจากเมแทบอลิซึมภายในเซลล์มีความเหมาะสมที่จะเกิดปฏิกิริยาอยู่ในช่วงนี้ โดยเฉพาะเอนไซม์ (intracellular enzyme) และ โปรตีนต่างๆ ที่มีความเหมาะสมต่อสภาวะเป็นกลางมากกว่า กระบวนการนี้เรียกว่า homeostasis เมื่อพิจารณาตามหลักการสร้าง ATP ในระบบลูกโซ่การขนส่งอิเล็กตรอน (Electron Transport System, ETS) ทั่วไปที่ต้องอาศัยความต่างศักย์ระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ (ความเข้มข้น proton ( $H^+$ ) ภายนอกเซลล์จะต้องสูงกว่าภายในเซลล์) จนทำให้เกิดแรง proton motive force proton จากภายนอกเซลล์จะลำเลียงผ่านเข้ามาภายในเซลล์ ผ่านหน่วยโครงสร้างที่ทำหน้าที่สร้าง ATP จาก ADP เรียกว่า ATPase แต่ในกรณีของ alkalophilic microorganism โดยเฉพาะ obligate alkalophilic microorganism จะมีสภาวะที่ตรงข้ามกับที่กล่าวมา ทำให้ไม่สามารถเกิดกระบวนการได้ตามปกติ ดังนั้นในการเจริญจึงต้องการ  $Na^+$  ช่วยในการลำเลียง proton ผ่านเข้าออกเซลล์ให้เป็นไปอย่างเหมาะสม โดยใช้การลำเลียงที่เรียกว่า  $Na^+/H^+$  antiporter เป็นการลำเลียงสารทั้ง 2 ชนิดผ่านเมมเบรนแบบสวนทางกัน ทำให้เกิดสภาวะ proton gradient ส่งผลให้เกิด proton motive force ทำให้มีการสร้าง ATP ได้

Johnvesly and Naik (2001) ศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. JB-99 ในอาหาร synthetic medium ที่มีกรดซิตริกและแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ โดยทำการเพาะเลี้ยงในฟลาस्कขนาด 250 ml เขย่าที่ 180 rpm อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในส่วนของพีเอชเริ่มต้นพบว่าที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อยู่ที่ 9.0

Calik *et al.* (2002) อธิบายว่าระบบลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอน (ETS) ในกระบวนการหายใจที่เกิดขึ้นที่เซลล์เมมเบรน เกิดจากการ oxidation-reduction ทำให้เกิดเป็น electrochemical gradient proton ในแบคทีเรียพวก bacilli ใช้ proton gradient นี้ในการขับเคลื่อนปฏิกิริยาที่ต้องใช้พลังงาน เช่น การขนส่งสารหรือสังเคราะห์ ATP (ATP synthetase) จากกระบวนการ oxidative phosphorylation และการเคลื่อนที่ของเซลล์ เซลล์จุลินทรีย์มีกลไกในการรักษาพีเอชภายในให้คงที่ แม้ว่าภายนอกจะมีพีเอชแตกต่างกันมากก็ตาม ทำให้ต้องใช้พลังงานในการรักษา proton gradient ผ่านเซลล์เมมเบรนได้ตามปกติ ดังนั้นพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงสำคัญและมีผลต่อการเจริญของ bacilli มาก Calik *et al.* จึงทำการศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อ *B. licheniformis* DSM 1969 ในอาหาร synthetic medium โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ค่าพีเอชที่ศึกษาคือ 7.0, 7.25 และ 7.5 ทั้งที่มีการควบคุมและไม่ควบคุม วิเคราะห์มวลเซลล์ การสร้างเอนไซม์ ความเข้มข้นกลูโคส และความเข้มข้นของ proton โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ช่วง คือ ช่วง growth phase (0-20 h) และ enzyme production phase (20 ถึง 43 h) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอัตราการใช้กลูโคสขึ้นกับพีเอชเริ่มต้นในช่วง growth phase ที่พีเอช 7.5 อัตราการใช้กลูโคสสูงสุด แต่ proton gradient ต่ำสุด และที่พีเอช 7.0 กลับให้ผลตรงข้าม คือ อัตราการใช้กลูโคสต่ำสุด แต่ proton gradient กลับสูงสุด ในสภาวะที่ไม่มีการควบคุมพีเอชทั้งหมด พีเอชในอาหารเหลวจะลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 18 และหลังจากชั่วโมงที่ 20 จะเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีการลำเลียง proton กลับเข้าไปในเซลล์ ใน 20 ชั่วโมงแรกนี้พบว่า proton gradient เพิ่มขึ้น การที่ค่า proton gradient มีค่าสูงต่ำเช่นนี้เกิดจากความแตกต่างของเมแทบอลิซึม ในระยะ enzyme production phase อัตราการใช้กลูโคสและมวลเซลล์จะลดลง อัตราการสร้างเอนไซม์สูงขึ้น proton gradient ลดลง พีเอชที่เหมาะสมต่อ enzyme production phase เท่ากับ 7.25 อธิบายผลการทดลองได้ คือ ที่สภาวะพีเอช 7.5 proton gradient ต่ำสุดเนื่องจากต้องใช้พลังงานไปในการรักษาความเข้มข้นของ proton gradient นี้ไว้ ทำให้ต้องใช้กลูโคสบางส่วนไปในการให้พลังงานกับส่วนดังกล่าว จึงเหลือนำไปใช้ในการสังเคราะห์ building block ของเซลล์ได้น้อยลง มวลเซลล์ต่ำ ในขณะที่สภาวะพีเอช 7.0 ให้ผลในทางตรงข้าม ทำให้ใช้กลูโคสไปในการสร้างเซลล์ได้มากกว่า มวลเซลล์จึงสูงกว่า

#### 4.3.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในกระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ มีความเหมาะสมแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ ตัวอย่างในตารางที่ 3 แสดงอุณหภูมิที่เหมาะสมของจุลินทรีย์บางชนิดในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส กลไกในการควบคุมการสร้างเอนไซม์โดยอุณหภูมียังไม่ทราบแน่ชัด แต่จากรายงานของ Frankena *et al.* (1986) พบว่ามีความสัมพันธ์กัน

ระหว่างการสังเคราะห์เอนไซม์และเมแทบอลิซึมของพลังงาน ซึ่งถูกควบคุมโดยอุณหภูมิและปริมาณออกซิเจนอีกชั้นหนึ่ง

### ตารางที่ 3 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของจุลินทรีย์บางชนิด

Optimum temperature (°C)	Organisms
28	<i>Penicillium griseoflvin</i>
30	<i>Bacillus</i> sp.B21-2
32	<i>Aspergillus flavus</i>
35	<i>Bacillus</i> sp.Y
36	<i>B. licheniformis</i>
37	<i>B. alcalophilus</i> subsp.halodrans KP1239
39.5	<i>B. licheniformis</i>
40	<i>Bacillus</i> sp.strain B18
45	<i>B. thermorber</i>
52	<i>Thermoactinomyces</i> sp. HS682
55	<i>B. stearothermophilus</i> AP-4
60	<i>B. stearothermophilus</i> F1

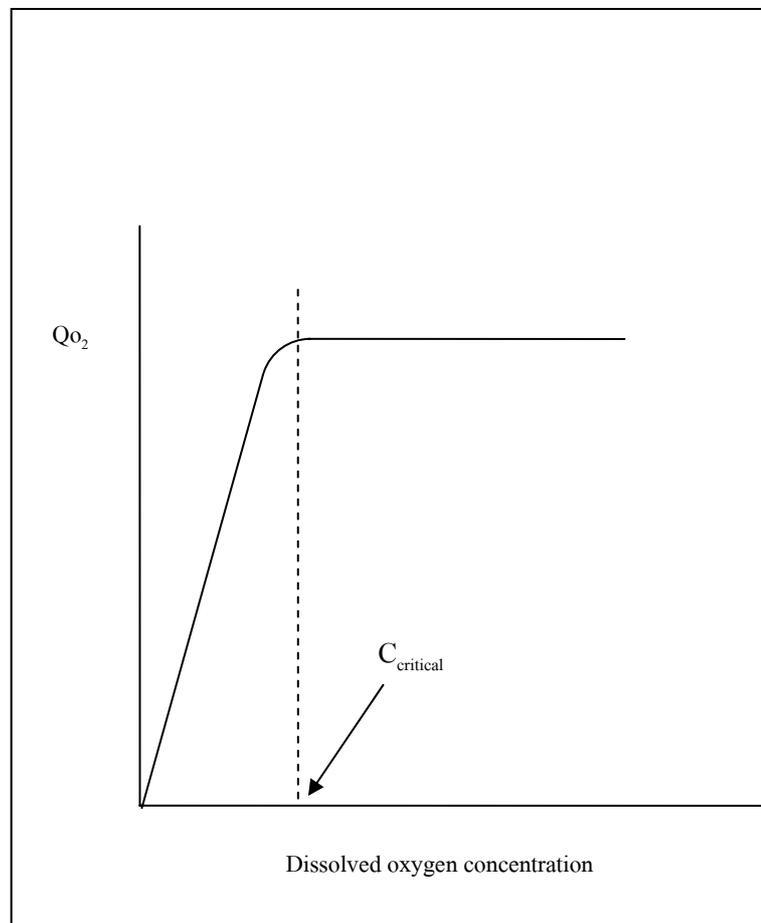
ที่มา: Kumar and Takagi (1999)

#### 4.3.3 การให้อากาศและการกวน (aeration and agitation)

กระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังหมักส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ประเภทที่ต้องการอากาศหรือออกซิเจนในการเจริญ คือ strictly aerobe หรือ facultative anaerobe จึงต้องมีการให้อากาศในระหว่างการเพาะเลี้ยง เพื่อใช้ในการออกซิไดส์กลูโคสหรือแหล่งคาร์บอนอื่นๆ โดยออกซิเจนที่ใช้ในการออกซิไดส์กลูโคสมีค่าประมาณ 192 g ต่อกลูโคส 180 g แต่ปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (dissolved oxygen, DO) จะละลายได้สูงสุดประมาณ 7.6 mg/dm<sup>3</sup> (ppm) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเนื่องจากออกซิเจนมีความสามารถในการละลายต่ำกว่ากลูโคสประมาณ 6,000 เท่า การให้อากาศในระหว่างการเพาะเลี้ยงจึงมีความจำเป็น ซึ่งทำได้โดยการให้อากาศและการกวน (Stanbury *et al.*, 1999)

ออกซิเจนจะเข้าไปช่วยเซลล์จุลินทรีย์ในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆเพื่อนำไปใช้ในการสร้างส่วนประกอบเซลล์และพลังงาน ปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยง

เชื้อจึงมีความสัมพันธ์กับการเจริญ ซึ่งสามารถอธิบายได้จากภาพที่ 8 จะเห็นค่าอัตราการใช้ออกซิเจนจำเพาะ (specific oxygen uptake rate,  $Q_{O_2}$ ) แปรผันตรงกับความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จนเมื่อถึงจุดจุดหนึ่งที่ค่านี้จะคงที่ไม่ว่าความเข้มข้นของออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นเท่าไร เรียกค่าความเข้มข้นของออกซิเจนที่จุดนี้ว่าความเข้มข้นวิกฤต (critical concentration,  $C_{crit}$ ) ถ้าความเข้มข้นออกซิเจนสูงกว่าความเข้มข้นวิกฤต จุลินทรีย์จะมีอัตราการใช้ออกซิเจนจำเพาะในการดูดซึมออกซิเจนสูงสุด ทำให้มีการสร้างมวลเซลล์ได้สูงสุดด้วย ในทางตรงข้ามถ้าค่านี้ต่ำกว่าความเข้มข้นวิกฤตจะมีการสร้างมวลเซลล์ต่ำลงและมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเมแทบอลิซึม (สมใจ, 2537)



**ภาพที่ 8** ผลของความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเหลวต่ออัตราการใช้ออกซิเจนจำเพาะของเซลล์จุลินทรีย์

ที่มา: สมใจ (2537)

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังหมักจะมีการให้อากาศโดยใช้เครื่องอัดอากาศ (air compressor) ฟองอากาศจะออกจากรูเล็กๆของท่อนำอากาศเรียกว่า sparger เข้าสู่อาหารเลี้ยงเชื้อจนถึงเซลล์จุลินทรีย์ มีลำดับกระบวนการส่งถ่ายออกซิเจน 3 ขั้นตอนดังนี้ คือ การส่งผ่านออกซิเจนจากฟองอากาศเข้าสู่อาหารเหลว การส่งผ่านออกซิเจนจากอาหารเหลวไปยังเซลล์จุลินทรีย์ และการดูดซึมออกซิเจนจากอาหารเหลวเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์ การกวนและการให้อากาศมีผลต่อการส่งผ่านออกซิเจนเป็นอย่างมาก โดยการกวนจะทำให้ฟองอากาศถูกตีเป็นฟองเล็กๆที่มีพื้นที่ผิวสัมผัสมากกว่า ทำให้ฟองอากาศลอยขึ้นสู่วิวหน้าของอาหารช้าลง จึงเป็นการเพิ่มระยะเวลาในการสัมผัสกับอาหารได้นาน ทำให้การส่งผ่านออกซิเจน (O<sub>2</sub> transfer) ดีขึ้น การให้อากาศก็เช่นเดียวกัน ถ้าสูงก็ทำให้ค่าการส่งผ่านออกซิเจนดีขึ้น แต่ถ้าสูงเกินไปจนถึงจุดที่ใบพัด (impeller) ไม่สามารถตีฟองได้ทัน ฟองอากาศจะพุ่งขึ้นมาอย่างรวดเร็ว เวลาในการสัมผัสกับอาหารน้อยกว่า ค่าการส่งผ่านออกซิเจนก็จะต่ำลง ถังหมักแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันหรือแม้แต่ในถังหมักชนิดเดียวกันแต่สภาวะแวดล้อม เช่น การกวน การให้อากาศต่างกัน ก็จะทำให้ค่าการส่งผ่านออกซิเจนต่างกันด้วย จึงมีการศึกษาและกำหนดค่าที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการส่งผ่านออกซิเจนของถังหมัก คือ สัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจนต่อหน่วยปริมาตร (volumetric oxygen-transfer coefficient, h<sup>-1</sup>) และจากขั้นตอนการส่งผ่านออกซิเจนที่กล่าวมาพบว่าขั้นตอนแรกสุด คือ การส่งผ่านออกซิเจนจากฟองอากาศไปสู่อาหารเหลวเป็นขั้นตอนจำกัด สมการที่ 1 แสดงถึงอัตราการส่งผ่านออกซิเจนจากฟองอากาศให้ละลายเข้าไปในอาหารเหลว ดังนี้

$$dC_L/dt = K_L a(C^* - C_L) \dots \dots \dots (1) \quad \text{เมื่อ}$$

C<sub>L</sub> คือความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเหลว (mmol/L)

C\* คือความเข้มข้นอิ่มตัวของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเหลว (mmol/L)

t คือเวลา (h)

dC<sub>L</sub>/dt คืออัตราการส่งผ่านออกซิเจน (mmol/L.h)

K<sub>L</sub> คือสัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจน (cm/h)

a คือพื้นที่ผิวที่อยู่ระหว่างฟองอากาศและของเหลวต่อปริมาตรของของเหลว ( $\text{cm}^2/\text{cm}^3$ )

ในทางปฏิบัติการวัดค่า  $K_L$  และ a ในกระบวนการเพาะเลี้ยงทำได้ยาก จึงรวมค่าทั้งสองเข้าด้วยกันเป็น  $K_L a$  (สมใจ, 2537)

Calik *et al.* (2000a) ศึกษาผลของสภาวะอัตราการส่งผ่านออกซิเจนที่มีต่อการเจริญ การใช้สับสเตรท และการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อแบคทีเรีย *B. licheniformis* MIR 29 โดยใช้การวิเคราะห์แบบ theoretical data-base (TDA) และ theoretical data-base capacity ที่อาศัย intracellular metabolic network ภายในเซลล์เข้ามาใช้ในการวิเคราะห์ โดยมีการศึกษาที่ช่วงเวลาต่างๆของเซลล์ ในการทดลองใช้กรดซิตริกเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าที่สภาวะการส่งผ่านออกซิเจนต่ำ (Low Oxygen Transfer, LOT) อัตราการสร้างเซลล์และไลซีนสูงสุด อัตราการใช้กรดซิตริกต่ำสุด ไม่พบการสร้างเอนไซม์ที่สภาวะนี้ ที่สภาวะการส่งผ่านออกซิเจนปานกลาง (Medium Oxygen Transfer, MOT) อัตราการสร้างเซลล์จะต่ำสุด อัตราการใช้กรดซิตริกสูงกว่า LOT แต่ต่ำกว่าสภาวะการส่งผ่านออกซิเจนสูง (High Oxygen Transfer, HOT) ที่ MOT นี้ค่าสัมประสิทธิ์ที่เกี่ยวข้องที่วิเคราะห์ได้ แสดงให้เห็นว่ากลไกในการควบคุมภายในเซลล์จะยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ในระยะ lag และ early exponential phase และสุดท้ายที่สภาวะ HOT อัตราการใช้กรดซิตริกสูงสุด อัตราการสร้างเซลล์สูงกว่า MOT แต่ต่ำกว่า LOT อัตราการสร้างเอนไซม์ต่ำมาก เนื่องจาก metabolic reaction flux ภายในเซลล์จะใช้กรดซิตริกในการสร้างอะซิเตทแทนการสร้าง building block ของเอนไซม์ ทำให้มีการสร้างเอนไซม์ต่ำ

## 5. จลนพลศาสตร์การเจริญของจุลินทรีย์ (microbial growth kinetics)

จลนพลศาสตร์การเจริญของจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในรูปแบบต่างๆกันมีดังนี้

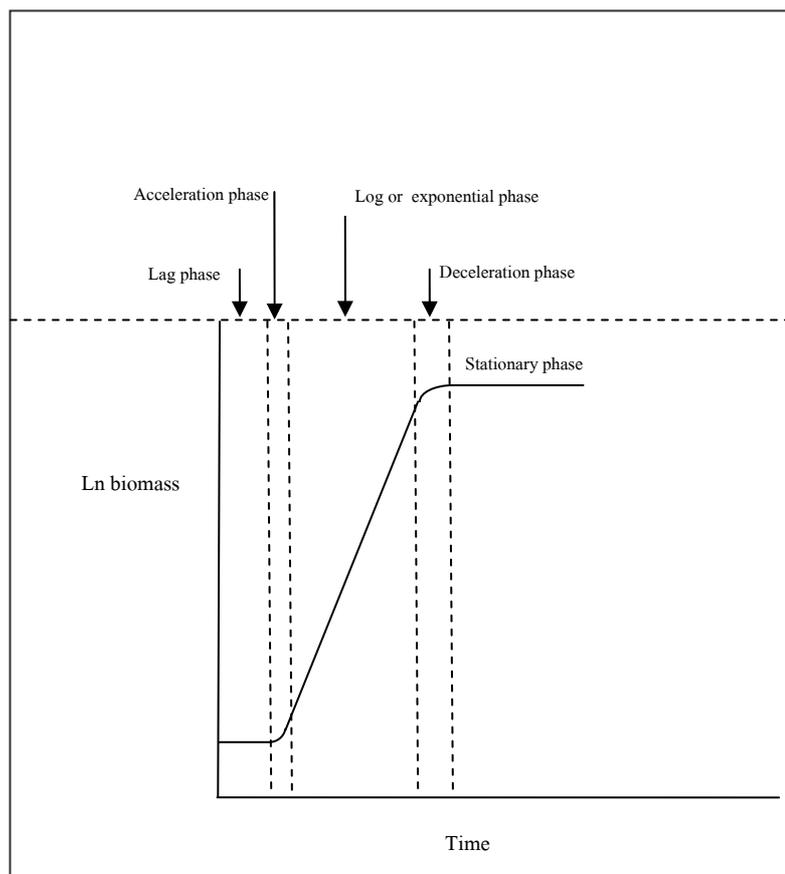
### 5.1 การเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ (batch culture)

การเพาะเลี้ยงในลักษณะนี้เป็นการเพาะเลี้ยงในระบบปิด (closed culture system) มีปริมาณสารอาหารจำกัด เมื่อถ่ายกล้าเชื้อ (starter) ลงไป ระยะแรกเซลล์จะยังไม่มีการเพิ่มจำนวน เนื่องจากเป็นระยะที่เซลล์ปรับตัวหรือเริ่มสร้างความพร้อมในระดับชีวโมเลกุลกับสารอาหารเรียกระยะนี้ว่า lag phase ระยะนี้สามารถลดลงได้โดยใช้กล้าเชื้อที่เหมาะสม มีความสมบูรณ์ หลังจากนั้น

เซลล์จะมีการเจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อยๆจนอัตราการเจริญจะสูงสุด ซึ่งเรียกว่าระยะ log หรือ exponential phase ต่อมาอัตราการเจริญจะเริ่มคงที่ในที่สุด อัตราการเจริญและอัตราการตายของเซลล์เท่ากัน มีการสะสมสารที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึม เรียกระยะนี้ว่า stationary phase และเมื่อมีการสะสมสารเหล่านี้มากขึ้นเรื่อยๆทำให้มีอัตราการตายของเซลล์มากขึ้นและมากกว่าอัตราการแบ่งเซลล์เรียกว่าระยะ death phase รายละเอียดดังภาพที่ 9 (Stanbury *et al.*, 1999)

### 5.1.1 ระยะปรับตัว (lag phase)

เป็นระยะที่เซลล์พบกับสิ่งแวดล้อมใหม่ อาหารเพาะเลี้ยงใหม่ เป็นระยะที่ไม่มี การแบ่งเซลล์ แต่จะมีการเพิ่มขนาดของเซลล์ มีการสร้างเอนไซม์และเมทาบอลิท์อื่นๆที่จำเป็น สำหรับกระบวนการทางชีวเคมี ระยะนี้ใช้เวลาแตกต่างกันขึ้นกับสภาพแวดล้อมและสามารถลดเวลา ให้สั้นลงได้โดยใช้กล้าเชื้อที่เหมาะสม



**ภาพที่ 9** รูปแบบการเจริญของจุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture  
ที่มา: ดัดแปลงจาก Stanbury *et al.* (1999)

5.1.2 ระยะเวลาเพิ่มจำนวน (logarithmic หรือ exponential phase)

ระยะนี้เซลล์จะเพิ่มจำนวนด้วยอัตราคงที่และในอัตราที่สูงสุดเมื่อเทียบกับระยะอื่นๆ กราฟระหว่าง Ln biomass ต่อเวลาจะเป็นเส้นตรง ดังภาพที่ 9 เป็นระยะที่เหมาะสมต่อการศึกษาระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์จุลินทรีย์ เนื่องจากมีสมบัติทางสรีรวิทยาเป็นแบบเดียวกันทั้งหมด ดังสมการที่เกี่ยวข้อง

เนื่องจากอัตราการเพิ่มของเซลล์เป็นปฏิภาคกับความเข้มข้นของเซลล์ ดังนั้น

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \dots \dots \dots (2) \quad \text{เมื่อ}$$

x คือความเข้มข้นของเซลล์จุลินทรีย์ (g/L)

t คือเวลาที่ใช้ในเพาะเลี้ยง (h)

$\mu$  คืออัตราการเจริญจำเพาะ ( $h^{-1}$ )

จากสมการที่ 2 เมื่อทำการ integrate จะได้

$$x_t = x_0 e^{\mu t} \dots \dots \dots (3) \quad \text{เมื่อ}$$

$x_t$  คือความเข้มข้นของจุลินทรีย์ ณ เวลา t ชั่วโมง (g/L)

$x_0$  คือความเข้มข้นของจุลินทรีย์เริ่มต้น (g/L)

e คือ natural logarithm

จากสมการที่ 3 เมื่อใส่ natural log เข้าไปทั้ง 2 ข้างจะได้

$$\ln x_t = \ln x_0 + \mu t \dots \dots \dots (4)$$

ในระยัะ exponential phase นี้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะจะเป็นค่าที่สูงสุดเรียกว่าค่า  $\mu_{max}$  และยังมีค่าพารามิเตอร์ต่างๆที่สำคัญในการศึกษาได้แก่

$Y_{x/s}$  คือผลได้ของเซลล์จุลินทรีย์ต่อมวลสับสเตรท

$Y_{p/s}$  คือผลได้ของผลผลิตต่อมวลสับสเตรท

$Y_{p/x}$  คือผลได้ของผลผลิตต่อมวลเซลล์จุลินทรีย์

$dP/dt = q_p \cdot X \dots\dots\dots(5)$  เมื่อ

$dP/dt$  คืออัตราการผลิตผลผลิตต่อหน่วยเวลา (Units/h)

$q_p$  คืออัตราการเกิดผลผลิตจำเพาะ (specific production rate, units product /g cell.h) ค่านี้อาจเรียกว่าค่า  $\rho$  (Rho) ก็ได้ ซึ่งค่านี้มีค่าเท่ากับ

$q_p = Y_{p/x} \mu \dots\dots\dots(6)$

ค่า  $q_p$  หรือ Rho นี้เป็นค่าทางจลนพลศาสตร์ที่สำคัญ ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์กับมวลเซลล์และเวลา

### 5.1.3 ระยะเวลาคงที่ (stationary phase)

เป็นระยะต่อจาก exponential phase เส้นกราฟของ growth curve จะเริ่มโค้งลงจนเป็นเส้นตรงขนานกับแกนเวลา เส้นกราฟที่โค้งลงนี้เป็นระยะ deceleration ซึ่งเป็นช่วงรอยต่อระหว่างระยะ exponential และ stationary phase ที่ระยะ stationary phase นี้ จุลินทรีย์จะหยุดการเจริญหรือเจริญในอัตราที่ต่ำลง อัตราการเจริญเท่ากับอัตราการตาย สาเหตุเนื่องมาจากปริมาณสับสเตรทน้อยลง และมีการสะสมสารพิษจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์มากขึ้น

#### 5.1.4 ระยะลดจำนวน (death phase)

เป็นระยะสุดท้ายของการเจริญของจุลินทรีย์ โดยอัตราการตายมากกว่าอัตราการเพิ่มจำนวน เป็นผลมาจากการที่สับสเตรทในอาหารเลี้ยงเชื้อหมดลงและหรือมีการสะสมสารพิษเช่นเดียวกับระยะก่อนนี้

กล่าวได้ว่าการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบเบ็ดเสร็จ (batch culture) จะพบอยู่ 2 ระดับ คือ ระดับฟลอสก์และระดับถังหมัก ในระดับฟลอสก์จะเป็นการเริ่มทดลองให้เห็นภาพได้ชัดเจนในขั้นแรก จากนั้นจึงจะเป็นระดับถังหมักต่อไป ซึ่งในระดับถังหมักมีข้อดีกว่าคือสามารถควบคุมปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญได้

#### 5.2 การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว (Fed-batch culture)

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในลักษณะนี้จะมีการเติมสับสเตรท ซึ่งอาจมีมากกว่าหนึ่งชนิดลงไปในช่วงการเพาะเลี้ยง ผลผลิตที่ได้จะยังคงอยู่ภายในถังหมัก บางครั้งในภาษาอังกฤษใช้คำว่า semibatch หรือ Zulaufverbren ในภาษาเยอรมัน และในภาษาญี่ปุ่นใช้คำว่า Ryukaho เทคนิคแบบ fed-batch สามารถหลีกเลี่ยงการเกิดปัญหาหระหว่างการเพาะเลี้ยงได้หลายประการ เช่น การยับยั้งการเจริญเนื่องจากความเข้มข้นของสับสเตรทมากเกินไป การเกิด glucose effect เช่น การผลิตยีสต์ขนมปังจาก malt wort ซึ่งถ้าปริมาณของกลูโคสมากเกินไป เซลล์จะเปลี่ยนจากการเจริญไปเป็นการสร้างเอทานอลแทน สามารถยับยั้งการเกิดกระบวนการ catabolite repression ในการสร้างเอนไซม์ได้ กล่าวคือในสถานะที่มีความเข้มข้นของกลูโคสสูง จุลินทรีย์จะมีการใช้กลูโคสอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิด ATP (adenosine-triphosphate) ภายในเซลล์ปริมาณมาก ซึ่งจะไปมีผลให้มีการยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ นอกจากนี้ยังสามารถยืดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงออกไป ทำให้เก็บเกี่ยวผลผลิตได้มากขึ้นและยังทดแทนปริมาตรของน้ำที่ระเหยออกไปได้ ลดความหนืดที่เกิดจากผลผลิตของจุลินทรีย์บางชนิด เช่น dextran, pullulan หรือ xanthan gum เป็นต้น (Yamane and Shimizu, 1984)

การจำแนกการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch culture อาจแบ่งได้ตามการควบคุม คือ การควบคุมแบบย่อนและไม่ย่อนกลับ และแต่ละการควบคุมยังแบ่งเป็นข้อย่อยได้อีก ดังตารางที่ 4

#### ตารางที่ 4 การจำแนกแบบ batch culture ในกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

1. Without feedback control	2. With feedback control
1.1 Intermittent addition	2.1 With feedback control
1.2 constant rate	2.2 Direct feedback control
1.3 exponential increase rate	2.2.1 Constant value control
1.4 Optimized	2.2.2 Optimal control
1.5 Other	

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Yamane and Shimizu. (1984)

##### 5.2.1 constantly fed-batch culture

เป็นระบบการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบเติมอาหารที่ง่ายที่สุด มีการเติมสับสเตรท ซึ่งอาจเป็น growth-limiting substrate ในอัตราที่คงที่ ค่าที่บ่งบอกจะเรียกว่าอัตราการเจือจาง (dilution rate, D) มีค่าเท่ากับ  $F/V$  ดังสมการ

$$D = F/V \dots\dots\dots(7) \quad \text{เมื่อ}$$

D คืออัตราการเจือจาง ( $h^{-1}$ )

F คืออัตราการเติมอาหาร (L/h)

V คือปริมาตรเริ่มต้นของอาหารเหลวในถังหมักก่อนเติมอาหาร (L)

##### 5.2.2 Exponential fed-batch culture

เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้อยู่ในช่วงเพิ่มจำนวนแบบ exponential phase เพื่อควบคุมค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate,  $\mu$ ) ให้คงที่ เพื่อประโยชน์ในการรักษาหรือเพิ่มผลผลิตที่มีความสัมพันธ์กับการเจริญ อัตราการเติมอาหารจะใช้สมการดังต่อไปนี้

$$F = \frac{[X_0 V_0 \mu \exp(\mu t)]}{[Y_x/s \cdot S_f]} \dots \dots \dots (8) \quad \text{เมื่อ}$$

F คืออัตราการเติมอาหารที่เวลา t ชั่วโมง (L/h)

$X_0$  คือความเข้มข้นเซลล์จุลินทรีย์เริ่มต้นก่อนเติมอาหาร (g/L)

$V_0$  คือปริมาตรเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยงในถังหมักก่อนเติมอาหาร (L)

$\mu$  คือค่าอัตราการเจริญจำเพาะที่ต้องการควบคุม ( $h^{-1}$ )

$Y_x/s$  คือผลได้ของเซลล์จุลินทรีย์ต่อมวลสับสเตรท

$S_f$  คือความเข้มข้นของ limiting substrate ที่ใช้เติมในถังหมักในช่วง fed-batch culture (g/L)

สำหรับตัวอย่างรายงานการวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่เพาะเลี้ยงแบบ fed-batch culture มีดังนี้

Moon and Parulekar (1991) ศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อ *B. firmus* NSR 783 หรือ NRRL B1107 พบว่าปริมาณกลูโคส แอมโมเนียมคลอไรด์และยีสต์ เอกซ์แทรคต์ที่มากเกินไปในอาหารเหลว มีผลทำให้มีการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ จึงใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch culture แทน โดยควบคุมการเติมในอัตราคงที่ ค่าอัตราการเจริญอยู่ที่  $0.05 h^{-1}$  ศึกษาการเปรียบเทียบความเข้มข้นสารอาหารในอาหารเหลวที่แตกต่างกัน ผลการทดลองนอกจากสามารถจะยืนยันการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ในการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture ได้แล้ว ยังสามารถแก้ไขปัญหานี้ได้ โดยเลือกใช้ความเข้มข้นสารอาหารที่เหมาะสม พบว่ามีผลให้มีการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นได้ 36 เปอร์เซ็นต์

Ulrich *et al.* (1991) ศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของเชื้อ *B. licheniformis* DSM 641 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ synthetic medium มีกลีเซอรอลและแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ตามลำดับ ในถังหมักแบบ Biostat E พบว่าปริมาณ

แอมโมเนียมที่มากเกินไป จะยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ ซึ่งอาจเกิดจากกระบวนการ catabolite repression จึงมีการใช้เทคนิค fed-batch culture เข้ามาใช้เพื่อควบคุมปริมาณแอมโมเนียมให้อยู่ในระดับที่ต่ำกว่า 1 mM ส่งผลให้มีการสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้นเป็น 4.6 เท่า

Beg *et al.* (2001) พบว่าปริมาณกลูโคสและแอมโมเนียมไอออนที่มากกว่า 5 mg/ml และ 0.093 mmol/ml ตามลำดับ จะยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ *B. mojavensis* ในสถานะที่มี casamino acid เป็นสารเหนียวน้ำ จึงมีการแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ระยะ ระยะแรกเป็นการเพิ่มจำนวนของเซลล์เพียงอย่างเดียว ระยะที่สองจะมีการเหนียวน้ำการสร้างเอนไซม์ โดยการเติม casamino acid ลงไปเป็นระยะๆ (intermittent fed-batch culture) ผลคือมีการสร้างเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 440 เป็น 1,170 units/ml คิดเป็น 4 เท่าของสถานะการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture

Singh *et al.* (2004) ศึกษาการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของแบคทีเรีย *B. sphaericus* ที่แยกได้จากดิน Himalayan พบว่าปริมาณกลูโคสที่มากกว่า 3.3 g/L และปริมาณไบโอเปปโตนและยีสต์เอกซ์แทรคที่รวมกันแล้วมากกว่า 10 g/L จะยับยั้งการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของเซลล์ จึงมีการทดลองใช้เทคนิคแบบ constantly fed-batch culture โดยเติมอาหารที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน โดยควบคุมอัตราการเติมคงที่ที่ 90 ml/h พบว่าที่ความเข้มข้นของอาหารที่ใช้เติมในปริมาตร 500 ml ที่ประกอบด้วยกลูโคส 5 g ไบโอเปปโตน (biopeptone) และยีสต์เอกซ์แทรครวมกัน 50 g มีความเหมาะสมที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเลี้ยงแบบ batch culture ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าการเติมอาหารลงไปจะรักษาสภาพให้เซลล์มีการเจริญได้อย่างต่อเนื่องและเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับการสร้างเอนไซม์ โดยมีการผลิตเอนไซม์มากกว่าการเพาะแบบ batch culture 44 เปอร์เซ็นต์

### 5.3 การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (continuous culture)

เป็นระบบการเพาะเลี้ยงที่มีการเติมสับสเตรทลงไปตามเวลาด้วยอัตราคงที่ค่าหนึ่ง พร้อมกันนั้นก็มีการดึงเซลล์ออกไปด้วยในอัตราเดียวกัน เมื่อให้สับสเตรทลงในอัตราค่าหนึ่งที่เหมาะสมจะทำให้เกิดสถานะที่เรียกว่าสถานะคงตัว (steady state) ในสถานะนี้จะมีอัตราในการสร้างหรือเพิ่มจำนวนเซลล์เท่ากับอัตราการไหลออกจากถังหมัก ค่าอัตราการเจริญจำเพาะจะถูกควบคุมด้วยค่าอัตราการเจือจาง ซึ่งค่าอัตราการเจือจางนี้มีความสัมพันธ์กับค่าอัตราการเติมสับสเตรทกับปริมาตรของถังหมัก ดังสมการที่ 9 (Stanbury *et al.*, 1999)

$$D = F/V \dots\dots\dots(9) \quad \text{เมื่อ}$$

D คืออัตราการเจือจาง ( $h^{-1}$ )

F คืออัตราการเติมอาหารหรือสับสเตรท (L/h)

V คือปริมาตรของถังหมัก (L)

การเปลี่ยนแปลงสุทธิ (net change) ของความเข้มข้นของเซลล์ต่อเวลาจะเขียนได้ดังสมการที่ 10

$$dx/dt = \text{growth} - \text{output} \dots\dots\dots(10) \quad \text{หรือ}$$

$$dx/dt = \mu x - Dx \dots\dots\dots(11)$$

ณ สภาวะคงตัว (steady state) ความเข้มข้นของเซลล์จะมีค่าคงที่หรือการเพิ่มของเซลล์ ( $dx/dt$ ) มีค่าเป็นศูนย์ ดังนั้น

$$\mu x = Dx \quad \text{จะได้}$$

$$\mu = D \dots\dots\dots(12)$$

ดังนั้น ณ สภาวะคงตัวค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ( $\mu$ ) จะถูกควบคุมด้วยอัตราการเจือจาง (Dilution rate, D) ซึ่งเป็นค่า variable ที่สามารถเปลี่ยนแปลงได้ขณะทำการทดลอง ซึ่งค่าอัตราการเจือจางนี้จะต้องมีค่าต่ำกว่า  $\mu_{\max}$  มิฉะนั้นจะทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า wash out หรือเซลล์ไม่สามารถใช้อาหารได้ทัน ทำให้อาหารที่เติมลงไปล้างเซลล์ออกจากระบบจนหมด

จากหัวข้อจลนพลศาสตร์การเจริญของจุลินทรีย์ ตัวอย่างที่นำมาเสนอจะเป็นการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (submerged culture) ซึ่งมีส่วนประกอบแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ทั้งแบบละลายและไม่ละลายน้ำ เหมาะที่จะดำเนินการในถังหมักได้ดี เก็บเกี่ยวผลผลิตง่ายและสะดวกต่อการ

ควบคุม แต่ก็ยังมีการเพาะเลี้ยงอีกรูปแบบหนึ่งที่เป็นที่นิยมและใช้กันทั่วไป โดยเฉพาะกับเชื้อราเส้นใย (mold) เรียกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง (solid-state fermentation)

#### 5.4 การเพาะเลี้ยงแบบอาหารกึ่งแข็ง (solid-state fermentation, SSF)

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารกึ่งแข็งได้รับความสนใจเมื่อไม่นานมานี้ เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนวัสดุที่เป็นของแข็ง ไม่ละลายน้ำ มีความชื้นในลักษณะดูดซับประมาณ 12 ถึง 18 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีน้ำอิสระ วัสดุแต่ละชนิดจะมีประสิทธิภาพในการดูดซับน้ำไม่เท่ากัน ดังนั้นความชื้นสูงสุดสำหรับการเพาะเลี้ยงลักษณะนี้จึงแตกต่างกันไปตามชนิดของวัสดุที่ใช้ จุลินทรีย์ที่ใช้การเพาะเลี้ยงส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อราเส้นสาย (mold) การเพาะเลี้ยงลักษณะนี้มีข้อดีคือได้ผลผลิตต่อมวลวัสดุสูง มีกระบวนการไม่ซับซ้อน ราคาถูกเนื่องจากส่วนหนึ่งของสับสเตรทที่ใช้เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร มีราคาถูก หาได้ง่าย ใช้พลังงานน้อย ข้อเสียคือควบคุมสภาวะได้ยาก มีการเจริญที่ช้า และวัดค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ได้ยาก (Tunga *et al.*, 1998)

ในปี ค.ศ. 1999 Tunga *et al.* ศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ROIRB-13 หรือ NRRL-21498 ที่แยกได้จากดินในอาหารแข็งที่มีรำข้าวสาลี (wheat bran) เป็นแหล่งคาร์บอน มีการควบคุมและศึกษาปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ พบว่าสภาวะที่เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุด คือ ที่ความชื้นของสับสเตรท 140 เปอร์เซ็นต์ ความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศ 90 ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของกล้าเชื้อ  $2 \times 10^5$  spore/g substrate พีเอช 5.5 ถึง 6.0 และอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

### 6. ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของจุลินทรีย์ (Correlation between growth and alkaline protease production)

ในการสังเคราะห์เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของจุลินทรีย์พบว่าจะมีความสัมพันธ์กับการเจริญ โดยทั่วไปลักษณะการสังเคราะห์เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสมี 2 แบบ คือ แบบถูกเหนี่ยวนำให้มีการสร้าง (inducible enzyme) และแบบที่มีการสร้างอยู่ตลอดเวลา (constitutive enzyme) ซึ่งจะถูกควบคุมด้วยกลไกที่ซับซ้อนหลายขั้นตอน (Strach *et al.*, 1993)

Moon and Parulekar (1991) รวบรวมรายงานการทดลองที่ลงพิมพ์ในเอกสารวิจัยหลายฉบับแสดงให้เห็นว่าการสังเคราะห์เอนไซม์โปรติเอสจะขึ้นกับปัจจัยดังต่อไปนี้

1. การสังเคราะห์เริ่มในระยะเวลา growth phase, termination growth phase หรือ sporulation
2. ระดับการเกิด catabolite repression เนื่องจาก C-source บางชนิด เช่น กลูโคส
3. กรดอะมิโนที่อาจเป็นสารเหนี่ยวนำหรือสารยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์

4. ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญจำเพาะ อัตราการถอดและการแปลรหัสพันธุกรรมของ mRNA ที่ใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์ชนิดนี้ คือ จุลินทรีย์ (แบคทีเรีย) ใช้สารตั้งต้นของกรดนิวคลีอิกเพื่อสังเคราะห์ Ribosomal RNA หรือ rRNA (มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ จึงสังเคราะห์มากในช่วง growth phase) และ messenger RNA หรือ mRNA (ซึ่งใช้สำหรับสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีน) ดังนั้นในช่วง growth phase สารตั้งต้นของ nucleic acid ใน metabolic pool ของแบคทีเรียส่วนใหญ่จึงถูกใช้สำหรับการเจริญ (หรือสังเคราะห์ rRNA นั่นเอง) จึงเหลือสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนน้อย แต่ในช่วงหยุดการเจริญ สารตั้งต้น nucleic acid ใช้เพื่อการเจริญน้อย จึงมี nucleic acid เหลือสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนมากกว่าช่วงที่มีการเจริญ

Moon and Parulekar (1991) ศึกษาการเพาะเลี้ยง *B. firmus* NRS 783 (NRRL B1107) ในอาหาร semidefined medium โดยเพาะเลี้ยงในถังหมักที่มีปริมาตรของอาหาร 1 L แบบ batch culture พบว่าเซลล์เริ่มมีการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนระหว่าง growth phase และอัตราในการสร้างจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆเมื่อเจริญเข้าใกล้ระยะปลายสุดของ growth phase กิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์อยู่ในระยะ post growth phase

Calik *et al.* (2000b) ศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีนจากเชื้อ *B. licheniformis* DSM 69 โดยใช้ mass-flux-balance-based stoichiometric model ซึ่งเป็นแบบจำลอง (model) ที่อาศัย metabolic reaction network ภายในเซลล์ ที่ประกอบด้วย 147 reactions และ 105 เมแทบอลิไทต์ในการวิเคราะห์ การทดลองใช้กรดซิตริกเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็นสารที่เข้าสู่ Tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) ได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการ glycolysis pathway แต่จะใช้กระบวนการ gluconeogenesis pathway, pentose phosphate pathway และ anaplerotic reaction แทนผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการสังเคราะห์เอนไซม์จะเริ่มสร้างเมื่อค่า specific growth rate ( $\mu$ ) ต่ำลงและจะสูงสุดเมื่อค่า  $\mu$  มีค่าเท่ากับ  $0 \text{ h}^{-1}$  มีค่า specific enzyme production rate ( $q_p$ ) เท่ากับ  $0.0260 \text{ mmol/g DW}\cdot\text{h}$  สามารถอธิบายได้ว่าเมื่ออัตราการเจริญ ( $\mu$ ) สูง เซลล์จะใช้แหล่งพลังงาน

(ATP) แหล่งคาร์บอน nucleotide, fatty acid และ cofactor ในการสร้างส่วนประกอบของเซลล์ในอัตราสูง ส่งผลให้การสร้างเอนไซม์ลดลง ในขณะที่เมื่อค่า  $\mu$  ต่ำจะให้ผลในทางตรงข้าม

Singh *et al.* (2001) ศึกษาการเจริญ การผลิตและการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus* sp. SSR1 ในการเพาะเลี้ยงในอาหาร complete medium ในพลาสติกขนาด 250 ml ที่ประกอบด้วยแลคโตส beef extract ยีสต์เอกซ์แทรค และไบโอเปปโตนเป็นส่วนประกอบสำคัญ ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 10.0 ด้วยโซเดียมคาร์บอเนต 10 เปอร์เซ็นต์ เขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm พบว่าการสร้างเอนไซม์เริ่มขึ้นไปพร้อมๆกับการเจริญและจะมีกิจกรรมสูงสุดเมื่อเซลล์เจริญอยู่ในระยะ stationary phase ซึ่งน่าจะกล่าวได้ว่าการสร้างเอนไซม์ลักษณะนี้เป็นแบบ growth associate pattern เมื่อทดสอบเอนไซม์กับสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าถูกยับยั้งโดย PMSF และ DFP แสดงให้เห็นว่าเป็น serine protease

Feng *et al.* (2001) ศึกษาการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสในแบคทีเรีย *B. pumilus* ที่ได้รับการโคลนยีนที่สามารถสร้างเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสเข้าสู่เซลล์ ทำให้สามารถใช้เป็นสับสเตรทได้ โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร complete medium พีเอช 7.0 พบว่าในระยะแรกของการเจริญซึ่งเป็นระยะ early exponential phase พบปริมาณเอนไซม์น้อยมาก และจะเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในกลางระยะ exponential phase โดยจะสังเคราะห์เอนไซม์หลังจากที่มีการเจริญไปแล้วระยะหนึ่งและมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ระยะ stationary phase

Singh *et al.* (2004) ศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *B. sphaericus* ในอาหาร complete medium ปริมาตร 5 L ในถังหมัก โดยควบคุมการให้อากาศอยู่ที่ 5 L/mim (1 VVM) กวนด้วยอัตราคงที่ 300 rpm พบว่า *B. sphaericus* เริ่มมีการสังเคราะห์เอนไซม์ในระยะ exponential phase หลังจากเริ่มมีการเจริญไปแล้ว 2 ถึง 3 ชั่วโมง ซึ่งอธิบายได้ว่าต้องมีความเข้มข้นของเซลล์ในระดับหนึ่ง (critical cell mass) จึงเริ่มการสังเคราะห์ อัตราในการสร้างเอนไซม์จะสูงสุดที่ระยะ deceleration phase (ชั่วโมงที่ 9) ซึ่งเป็นระยะที่ค่า  $\mu$  ต่ำลง พบว่ากลูโคสมีความจำเป็นต่อการสร้างเอนไซม์ในระยะ post growth phase เมื่อปริมาณกลูโคสหมด อัตราการสร้างเอนไซม์เท่ากับศูนย์ เมื่อนำค่าทางจลนพลศาสตร์มาสร้างสมการ โดยใช้รูปแบบจำลองของ Kono และ Asai สรุปได้ว่าการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากแบคทีเรียชนิดนี้เป็นทั้งแบบ growth และ non-growth associate

## 7. สมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส (properties of alkaline protease)

ความแตกต่างของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส ทำให้เอนไซม์ที่ผลิตได้มีสมบัติแตกต่างกัน จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาถึงสมบัติต่างๆ เพื่อเป็นพื้นฐานในการนำไปใช้ประโยชน์ที่ถูกต้อง เช่น สมบัติทางด้านฟิสิกส์เคมี (physicochemical properties) ซึ่งได้แก่ พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรม มวลโมเลกุล ผลของไอออนโลหะ สารยับยั้ง และความจำเพาะต่อสับสเตรท เป็นต้น

### 7.1 พีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ (optimum pH)

Phadtare *et al.* (1997) ศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อรา *Conidiobolus colonatus* NCL 86.8.20 ที่แยกได้จากดินที่บริเวณ National Chemical Laboratory ในประเทศอินเดีย โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร complete medium พบว่ามีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ในช่วงพีเอช 9.7 ถึง 10.0 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

Beg *et al.* (2003) ศึกษาสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสจากเชื้อแบคทีเรีย *B. mojavensis* โดยทำให้บริสุทธิ์โดย anion exchange chromatography พบว่ามีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่ 10.5 และมีความคงทนต่อพีเอชในช่วงกว้างตั้งแต่ 7.5 ถึง 11.5 เป็นเวลามากกว่า 48 ชั่วโมง โดยยังคงมีกิจกรรมอยู่ถึง 70 เปอร์เซ็นต์

### 7.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ (optimum temperature)

โดยทั่วไปจะพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่สร้างขึ้นจากจุลินทรีย์และสิ่งมีชีวิตอื่นๆจะอยู่ในช่วง 50 ถึง 70 องศาเซลเซียส และมีความคงทนได้แตกต่างกันไป

Aoyama *et al.* (2000) ศึกษาสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสที่สามารถตกตะกอนน้ำนมถั่วเหลืองได้จากเชื้อแบคทีเรีย *B. pumilus* TYO-67 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่อทดสอบกับสารยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ พบว่าเป็นเอนไซม์ชนิด serine protease

Gessesse *et al.* (2003) ทดลองแยกเชื้อจากทะเลสาบที่มีความเป็นด่างสูงของประเทศ เอธิโอเปีย เพื่อค้นหาแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่มีสมบัติพิเศษ คือ สามารถย่อยสลายพันธะไดซัลไฟด์ในขนสัตว์ปีกได้ ได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพสูง 2 ชนิด คือ *Nesterkonkia* sp. และ *B. pseudofirmus* ที่ใช้ชื่อรหัสว่า AL-20 และ AL-89 ตามลำดับ เมื่อทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี ion exchange chromatography และ gel filtration พบว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดมี อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมสูง โดยของ AL-20 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 70 องศาเซลเซียส ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีแคลเซียมไอออน 5 mM ส่วนของ AL-89 จะอยู่ที่ 60 องศาเซลเซียส และจะเพิ่มเป็น 70 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีแคลเซียมไอออน

### 7.3 มวลโมเลกุล (molecular masses)

Chakrabarti *et al.* (2000) ทำการสกัดแยกเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อรา *Aspergillus terreus* (IJIRA 6.2) ให้มีความบริสุทธิ์โดยใช้วิธีทาง chromatography แบบ DEAE-Sephadex A25, phosphocellulose, hydroxyapatite, casein-sephalose, gel filtration และใช้ SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เพื่อวิเคราะห์ห้มวลโมเลกุล พบว่าเอนไซม์มีมวลโมเลกุล 37 kDa

Tunga *et al.* (2003) ทำการสกัดแยกเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อรา *A. parasiticus* KGJR 3313 หรือ MTCC 3558 ให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี ion exchange chromatography แบบ DEAE-Sephadex A-50 และ gel filtration เมื่อวิเคราะห์ห้มวลโมเลกุลโดยวิธี SDS-PAGE พบว่าเอนไซม์มีมวลโมเลกุล 23 kDa

### 7.4 ผลของไอออนของโลหะที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (metal ion requirement)

ไอออนของโลหะ โดยเฉพาะไอออนประจุบวกที่มีจำนวนประจุเป็น +2 เช่นแคลเซียม ไอออน แมกนีเซียมไอออน และแมงกานีสไอออน ชนิดใดชนิดหนึ่งหรืออาจมากกว่า 1 ชนิด จะมีผลทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมที่ดีขึ้น สามารถทนความร้อนได้มากขึ้น ซึ่งสันนิษฐานว่าเกิดจากไอออนเหล่านี้ไปเพิ่มความเสถียรที่โครงสร้างของเอนไซม์ แต่ก็มีรายงานว่าไอออนของโลหะบางชนิดก็มีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้ เช่น เมอร์คิวรีไอออน เป็นต้น (Kumar and Takagi, 1999)

Kobayashi *et al.* (1994) ศึกษาสมบัติเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus sp.* KSM-K16 โดยทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี column chromatography ได้เอนไซม์ที่มีลักษณะเป็น homogeneity เรียกว่า M-protease มีลำดับของกรดอะมิโนทางด้าน N-terminus คือ Ala-Gln-Ser-Val-Pro-Trp-Gly-Ile-Ser-Arg-Val-Gln-Ala-Pro-Ala-Ala-His-Arg-Gly-Leu-Thr-Gly เมื่อวิเคราะห์หามวลโมเลกุลโดยวิธี PAGE พบว่าเอนไซม์มีมวลโมเลกุล 28 kDa แคลเซียมคลอไรด์มีผลทำให้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นจากเดิม 55 องศาเซลเซียสเป็น 60 องศาเซลเซียส

### 7.5 สารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ (inhibitor)

สารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ประเภทแรกเป็นพวกที่มีความจำเพาะต่อ active site มีมวลโมเลกุลต่ำ ไม่สามารถผันกลับ (irreversible) มาเป็นโครงสร้างเดิมได้หลังทำปฏิกิริยาที่บริเวณ amino acid residue ตัวอย่างที่สำคัญในกลุ่มนี้เป็นชนิด serine protease inhibitors ได้แก่ diisopropylphosphorofluoridate (DFP) และ phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) โดยจะเข้าทำปฏิกิริยาที่บริเวณกรดอะมิโนเซรีนที่บริเวณ active site หรือพวก aspartic protease inhibitors ซึ่งได้แก่ diazoacetyl compound และ acetyl pentapeptide pepstatin ที่มีความสามารถยับยั้งได้ดีพอกัน ส่วน metalloprotease inhibitor จะเป็นพวก methyl chelating agent สารยับยั้งประเภทที่สองจะเป็นสารโปรตีนที่ได้จากธรรมชาติ (natural protein protease inhibitors) พวกนี้แยกได้จากพืชและสิ่งมีชีวิตหลายชนิด ที่ทำหน้าที่คล้ายสับสเตรทของเอนไซม์เรียกว่า pseudosubstrate ทำให้เกิดภาวะแข่งขัน โดยแย่งเอนไซม์จับกับสับสเตรท สารยับยั้งทั้ง 2 ประเภทอาจมีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงหรือหมดไป (Neurath, 1989)

Petinate *et al.* (1999) ศึกษาสารยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ *Streptomyces cyaneus* ซึ่งแยกจากดิน พบว่า PMSF สามารถยับยั้งกิจกรรมได้ถึง 99 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ tosylamido-2-phenylethylchloromethyl ketone (TPCK) ยับยั้งได้ 96 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าเป็น serine protease

### 7.6 ความจำเพาะต่อสับสเตรท (substrate specificity)

ความจำเพาะต่อสับสเตรทเป็นสมบัติหนึ่งที่ใช้ในการศึกษาเอนไซม์ชนิดใหม่ๆ วิธีการที่ใช้ในการศึกษามี 2 วิธี คือ หาความจำเพาะโดยใช้โปรตีนธรรมชาติเป็นสับสเตรท เช่น อินซูลิน-B

(insulin-B) เคซีน(casein) ฮีโมโกลบิน (haemoglobin) หรือ โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin, BSA) และอีกวิธีหนึ่งคือการใช้โปรตีนสังเคราะห์ (synthetic peptide substrate) (Neurath, 1989)

เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสมีกิจกรรมกับสับสเตรทที่เป็นสารสังเคราะห์และสารจากธรรมชาติได้ดีในระดับใกล้เคียงกัน คือ มีกิจกรรมในช่วงกว้าง ในกรณีของสับสเตรทจากธรรมชาติ พบว่าจะมีกิจกรรมในเคซีนมากกว่าหรือดีกว่าในฮีโมโกลบินและโบวีนซีรัมอัลบูมิน เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสส่วนใหญ่จะมีความจำเพาะกับสับสเตรทที่ตำแหน่งกรดอะมิโนจำพวก aromaticity หรือ hydrophobicity เช่น ไทโรซีน (tyrosine) ฟีนีลอลานีน (phenylalanine) หรือลิวซีน (leucine) ที่ตำแหน่งทางด้านปลาย C-terminus เป็นต้น ยกเว้น chymotrypsin (Moriyama, 1974)

Joo *et al.* (2001) ศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาแล้วจาก *Periserrula lecophyryna* ซึ่งเป็น invertebrate gut จาก Korean polychaeta โดยใช้สับสเตรททั้งแบบสังเคราะห์และแบบธรรมชาติ โดยแบบสังเคราะห์จะใช้ Benz-Ile-Glu (x-OR)-Gly-Arg-pNA (para-nitroanilide) เป็นสับสเตรทที่ใช้เป็นตัวควบคุม พบว่า สับสเตรทที่มีความจำเพาะกับเอนไซม์ได้แก่ Tos-Gly-Pro-Lys-pNA, Val-Leu-Lys-pNA และ pyroGlu-Gly-Arg-pNA ซึ่งจากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์จะมีกิจกรรมได้ดีกับ Arg-X หรือ Lys-X และจะไม่ทำงานหรือทำได้ แต่ประสิทธิภาพไม่ดีกับสับสเตรทที่ไม่มีขั้ว ส่วนสับสเตรทที่เป็นโปรตีนธรรมชาติพบว่าเคซีนจะมีกิจกรรมที่ดีที่สุด โดยมี BSA และ egg albumin อยู่ในระดับปานกลาง ส่วนเจลาตินจะมีความจำเพาะต่ำที่สุด

Takami *et al.* (1992) ศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. No AH-101 พบว่าเอนไซม์สามารถย่อยสับสเตรทสังเคราะห์ที่เป็น เปปไทด์ (synthetic peptide substrate) ได้หลายชนิดรวมทั้งสามารถย่อยสายอินซูลิน A และ B ได้นอกจากนี้เอนไซม์จากเชื้อสายพันธุ์นี้ยังสามารถย่อยสับสเตรทที่มีความจำเพาะต่อ subtilisin (Z-Ala-Ala-Lue-pNA, Z-Gly-Gly-Leu-pNA และ Z-Gly-Pro-Cit-pNA); elastase (Suc-Ala-Pro-Leu-pNA และ Suc-Ala-Ala-Ala-pNA) และ collagenase (PZ-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg) แต่ไม่พบการย่อยสับสเตรทจำเพาะของปาเปน (papain) ทริปซิน (trypsin) หรือ ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) (Ac-Phe-Gly-pNA และ Suc-Gly-Gly-Phe-pNA)

## 8. ประโยชน์และการประยุกต์ใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอสมีปริมาณทางการค้าถึง 40 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเอนไซม์ทั้งหมดที่มีการใช้งานในระบบอุตสาหกรรม เช่น ผงซักฟอก การฟอกหนัง ยา อาหาร และการนำโลหะเงินกลับไปใช้ใหม่ เป็นต้น (Gupta *et al.*, 2002) ตารางที่ 5 แสดงเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่มีการผลิตในทางการค้า

**ตารางที่ 5** การผลิตทางการค้าของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

<b>Organism</b>	<b>Trade names</b>	<b>Manufacturer</b>
<i>Bacillus licheniformis</i>	Alcalase	Novo Nordisk, Denmark
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp.	Savinase, Esperase	Novo Nordisk, Denmark
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp.	Maxacal, Optimase	Gist-brocades, The Netherlands
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp.	Opticlean, Opitimase	Solvay Enzymes GmbH, Germany
Alkalophilic <i>Bacillus</i> sp.	Proleather	Amano Pharmaceuticals Ltd., Japan
<i>Aspergillus</i> sp.	Protease P	Amano Pharmaceuticals Ltd., Japan
Protein engineered variant of Savanase®	Drazym	Novo Nordisk, Denmark
Protein engineered variant of alkalophilic <i>Bacillus</i> sp.	Maxaperm	Solvay Enzymes GmbH, Germany
Genetic engineered Donor- <i>B. lentus</i>	Prafect	
Expressed in <i>Bacillus</i> sp.		Genencor International, Inc., USA

ที่มา: Kumar and Takagi (1999)

### 8.1 อุตสาหกรรมสารทำความสะอาด (detergent additive industries)

ในปัจจุบันสารทำความสะอาดหลายประเภท เช่น ผงซักฟอก (laundry detergent) น้ำยาล้างจาน (dishwashing detergent) มีการเติมเอนไซม์ลงไปเป็นส่วนประกอบหลายชนิดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดคราบสกปรกได้ดีขึ้น เช่น เอนไซม์อะไมเลส (amylase) ไลเปส (lipase) รวมถึงโปรติเอส โปรติเอสจะทำหน้าที่ย่อยสลายคราบโปรตีน เช่น คราบเลือดที่เกาะกับเนื้อผ้าให้หลุดออก ข้อดีของการใช้เอนไซม์คือ ไม่มีสารฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบ จึงไม่ส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม นอกจากนี้ในการซักผ้าด้วยเครื่องซักผ้าจะใช้อุณหภูมิสูงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดคราบสกปรก ซึ่งเป็นการสิ้นเปลืองพลังงานและอาจทำลายสิ่งแวดล้อม การใช้เอนไซม์ที่มีความสามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิประมาณ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส จะช่วยลดเวลาและอัตราการกวนและอุณหภูมิให้ต่ำลงได้ เป็นการประหยัดพลังงานและเป็นการถนอมเนื้อผ้าให้มีอายุยาวนานขึ้น (Tramper and Poulsen, 2000)

เนื่องจากสารทำความสะอาดเหล่านี้มีสถานะเป็นต่างโดยเฉพาะผงซักฟอก ดังนั้นเอนไซม์ที่ใช้ต้องมีกิจกรรมที่ดีในสภาวะดังกล่าว นอกจากนี้ในผงซักฟอกยังมีสารพวก oxidizing agent และสารลดแรงตึงผิว (surfactive agent) ดังตารางที่ 6 ซึ่งอาจทำให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์ลดลง อย่างไรก็ตามกิจกรรมที่ลดลงอาจเป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงไม่ได้ แต่ก็ไม่ควรต่ำกว่า 0.4 ถึง 0.8 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้อายุการเก็บรักษาจะต้องยาวนาน และควรมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมในช่วงกว้าง นอกจากนี้ผงซักฟอกแล้วยังมีการใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสในการล้างทำความสะอาดแผ่นเมมเบรนของกระบวนการ ultrafiltration และ reverse osmosis ที่ใช้ในอุตสาหกรรมนมและเครื่องดื่ม (Kumar and Takagi, 1999)

Banerjee *et al.* (1999) ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. brevis* ในการกำจัดคราบเลือดมนุษย์บนเนื้อผ้า โดยเปรียบเทียบระหว่างสภาวะที่มีผงซักฟอกแต่เพียงอย่างเดียว และสภาวะที่มีเอนไซม์เป็นส่วนผสมด้วย มีน้ำเป็นตัวเปรียบเทียบผลคือสภาพที่มีเอนไซม์เป็นส่วนผสมอยู่สามารถกำจัดคราบเลือดได้ดีที่สุด

## ตารางที่ 6 องค์ประกอบของเอนไซม์ในผงซักฟอก

Constituent	Composition (%)
Sodium tripolyphosphate (water softener, loosens dirt)	30.8
Sodium alkane sulphonate (surfactant)	25.0
Sodium perborate tetrahydrate (oxidising agent)	25.0
Soap (sodium alkane carboxylates)	3.0
Sodium sulphate (filler, water softener)	2.5
Sodium carboxymethyl cellulose (dirt-suspending agent)	1.6
Sodium metasilicate (binder, loosens dirt)	1.0
<i>Bacillus</i> protease (3% active)	0.8
Florescent brighteners	0.3
Foam-controlling agents	Trace
Perfume	Trace
Water	to 100%

ที่มา : Chaplin and Bucke (1990)

### 8.2 อุตสาหกรรมฟอกหนัง (Tannery industries)

ในกระบวนการฟอกหนังแต่เดิมหรือแบบทางการค้าใช้สารเคมีชื่อ โซเดียมซัลไฟต์และ ปูนขาวในกระบวนการ ซึ่งก่อให้เกิดของเสียเหลือใช้ที่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม การใช้เอนไซม์ อัลคาไลน์โปรติเอสจึงเริ่มเข้ามามีบทบาท เนื่องจากสมบัติที่สามารถย่อยสลาย elastin และ keratin ได้ดี การใช้เอนไซม์มีข้อดี คือ เป็นสถานะที่ไม่รุนแรง (mild condition) ควบคุมง่าย รวดเร็ว ผลผลิตมีคุณภาพดี และที่สำคัญ ไม่ทำลายสภาพแวดล้อม (Kumar and Takagi, 1999)

ในการฟอกหนังกระบวนการทางเอนไซม์เริ่มจากในสถานะที่เป็นด่างทำให้เกิดการ พองตัวของรากขน (hair root) จากนั้นเอนไซม์จึงเข้าทำปฏิกิริยากับ hair follicle protein ทำให้ง่าย ต่อการกำจัดออก ต่อมาเกิดการย่อยสลายของ elastin และ keratin ทำให้กำจัดขนที่เหลือออกไปได้หมด จากนั้นก็จะเกิดการหดตัวของคอลลาเจน จากกระบวนการเหล่านี้ก่อให้เกิดคุณภาพที่ดีของ หนัง มีความอ่อนนุ่ม (Gupta *et al.*, 2002)

Dayanandan *et al.* (2003) ศึกษาการฟอกหนังแพะด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตได้จากเชื้อรา *Aspergillus tamarii* พบว่ามีศักยภาพในการกำจัดขน (unhairing) ได้ดี ให้คุณภาพหนังสูงและยังลดค่า BOD และ COD ได้อีกด้วย

### 8.3 อุตสาหกรรมอาหาร (food and feed industries)

เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารหลายอย่าง เช่น การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต (protein hydrolysate) เป็นอาหารที่มีคุณค่าทางอาหารสูง ช่วยในการควบคุมแรงดันของเลือด เป็นส่วนประกอบในอาหารที่ใช้เลี้ยงทารก หรืออาหารสำหรับผู้ป่วย กระบวนการได้มาจากการใช้ย่อยสลายสับสเตรทที่เป็นโปรตีนธรรมชาติ เช่น เคซีน (Miprodan; MD Foods, Viby Germany) หางนม (Lacprodan; MD Foods) soy protein (Proup; Novo Nordisk, Bagsaerd, Denmark) เป็นต้น (Gupta *et al.*, 2002)

Takagi *et al.* (1992) ทดลองการย่อยเนื้อวัวให้มีสภาพนุ่มโดยใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก alkalophilic *Bacillus* strain ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสามารถทำให้เนื้อมีความนุ่มได้จริง ตัวเอนไซม์จะทำหน้าที่ย่อยโปรตีนในส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ได้ดีเช่นเดียวกับโปรตีนไฟเบอร์ ซึ่งเป็นโปรตีนในส่วนกล้ามเนื้อ

การทำเนื้อโดยเฉพาะเนื้อวัวให้มีความอ่อนนุ่ม (meat tenderization) โดยเอนไซม์จะเข้าไปย่อยสลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) และโปรตีนกล้ามเนื้อ (muscle fibre protein) ทำให้เนื้อมีความอ่อนนุ่ม กระบวนการทางอุตสาหกรรมทำได้หลายแบบ เช่น จุ่มเนื้อลงไปในการละลายเอนไซม์หรือใช้การฉีดเข้าไปในระบบไหลเวียนโลหิตก่อนที่จะทำการฆ่าและชำแหละ (Kumar and Takagi, 1999)

Gessesse *et al.* (2003) ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตอาหารสัตว์ (feed) จากแหล่งโปรตีนเหลือทิ้งต่างๆ เช่น เขา ขน เล็บ ของสัตว์ โดยเฉพาะสัตว์ปีก จากข้อมูลจากโรงฆ่าสัตว์ พบว่าขนของสัตว์ปีกมีเหลือทิ้งเป็นจำนวนมาก คิดเป็นประมาณหลายล้านตันต่อปี เมื่อพิจารณาให้ดีจะเห็นว่า เป็นแหล่งโปรตีนที่ดีแหล่งหนึ่งในการใช้ทำเป็นอาหารสัตว์ ในบางประเทศนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยผ่านกระบวนการภายใต้อุณหภูมิและความดันสูง ทำให้คุณค่าทางอาหารลดลงและสิ้นเปลืองพลังงานมาก ขนสัตว์ปีกเป็นโปรตีนที่สร้างขึ้นจากพันธะไดซัลไฟด์และ keratin เป็นองค์ประกอบ ทำให้ยากต่อการนำมาใช้งานเนื่องจากย่อยสลายได้ยาก Gessesse *et al.* จึงทำการทดลองแยกเชื้อที่

สามารถย่อยสลายขนสัตว์ปีกได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพดี 2 ชนิด คือ *Bacillus pseudofirmus* และ *Nesterokonia* sp.

#### 8.4 การนำโลหะเงินกลับมาใช้ใหม่ (silver recovery)

ฟิล์ม x-ray และฟิล์มถ่ายภาพประกอบไปด้วยโลหะเงิน 1.5 ถึง 2.0 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก โดยอยู่ในชั้นของเจลาติน (gelatin) กระบวนการนำโลหะเงินกลับมาใช้ใหม่โดยทั่วไปทำโดยการเผา ซึ่งนอกจากจะทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมแล้วยังสูญเสียชั้นของโพลีเอสเตอร์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักไปด้วย ต่างจากการใช้วิธีทางเอนไซม์ที่สามารถนำกลับมาใช้ได้ทุกส่วน (Jasvir *et al.*, 1999)

#### 8.5 การใช้ประโยชน์ทางยา (medical use)

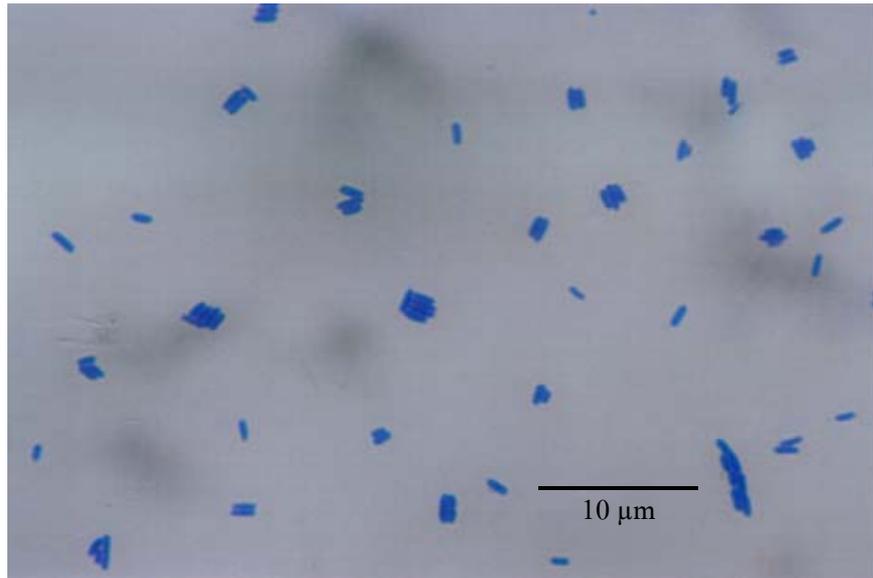
มีการนำเอนไซม์ collagenase เข้ามาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ โดยทำหน้าที่ควบคุมปริมาณยาให้มีการปล่อยออกมาอย่างช้าๆ เอนไซม์อีกชนิดหนึ่ง คือ elastoterase ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย elastin ได้ดี จะถูกนำไปใช้ตรงกับผ้าพันแผลที่นำไปรักษาแผลไฟไหม้ แผลกดทับหนองได้ดี (Gupta *et al.*, 2002)

นอกจากประโยชน์ที่กล่าวมาแล้วของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส ยังสามารถนำเอนไซม์ไปใช้ในอุตสาหกรรมผ้าไหมในการย่อยสลายเซอริซิน (seriscin) ที่เป็นองค์ประกอบประมาณ 25 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักไหมดิบแทนกรรมวิธีเดิมที่ใช้เป่าเข้ามาเกี่ยวข้อง และเป็นกระบวนการที่ยุงยาก เสียค่าใช้จ่ายสูง การนำเอนไซม์ไปใช้ในการสังเคราะห์เปปไทด์ (peptide synthesis) โดยอาศัยกระบวนการย้อนกลับของปฏิกิริยา (reverse-enzyme reaction) ซึ่งมีความจำเพาะดีกว่าการใช้สารเคมี (Gupta *et al.*, 2002)

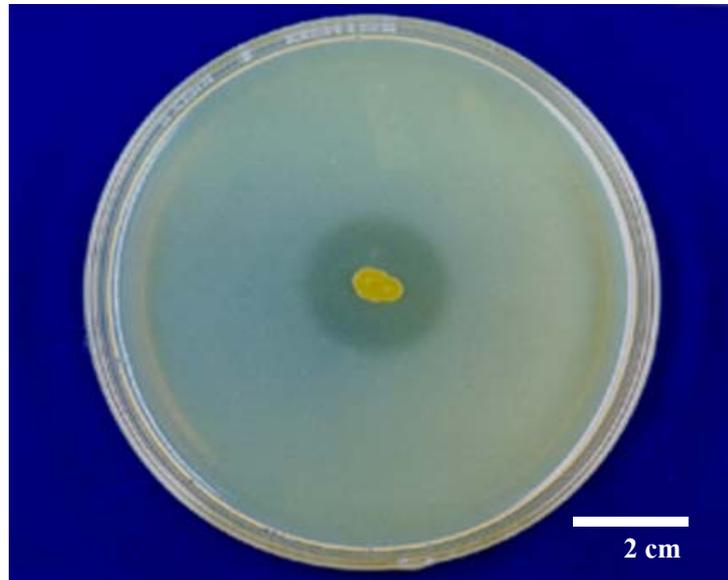
### 9. แบคทีเรีย *Bacillus* sp. A39 ที่ใช้ในการทดลอง

*Bacillus* sp. A39 ที่ใช้ในการทดลองเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนที่ได้รับการคัดเลือกไว้แล้ว (สุทธิดา, 2545) มีความกว้างประมาณ 0.3 ถึง 0.4  $\mu\text{m}$  ความยาวประมาณ 1.2 ถึง 1.6  $\mu\text{m}$  มีการเรียงตัวแบบติดกันแนวด้านข้างของเซลล์ (palisade) หรือติดกันเป็นสายประมาณ 3-4 เซลล์ (คาดว่าเป็นระยะที่กำลังมีการแบ่งเซลล์ทางด้าน elongation) ย้อมติดสีแกรมบวก ไม่พบการสร้างสปอร์

(endospore) ดังภาพที่ 10 ลักษณะโคโลนีของ A39 ในอาหาร BMSM agar pH 10.0 มีลักษณะตรงกลางนูนขึ้นมา รอบๆแผ่ออกคล้ายไข่ดาว มีสีขาวนูนเมื่ออายุไม่เกิน 24 ชั่วโมงหรือน้อยกว่า และสร้างวงใสรอบโคโลนี ดังแสดงในภาพที่ 11 ซึ่งใช้การเพาะเชื้อโดยวิธี point inoculation เมื่อโคโลนีมีอายุมากขึ้น จะแผ่ขยายออกกว้างกว่าเดิม มีขอบสีขาวรอบโคโลนี ในขณะที่ภายในมีสีเหลืองเข้ม ดังภาพที่ 12 ซึ่งแสดงโคโลนีที่ได้จากการทำ dilution plate count



**ภาพที่ 10** ลักษณะแบคทีเรีย *Bacillus* sp. A39 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ข้อมด้วยวิธี Gram's stain



ภาพที่ 11 ลักษณะ โคลินี้ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. A39 บนอาหาร BMSM agar อายุ 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 12 ลักษณะ โคลินี้ของแบคทีเรีย *Bacillus* sp. A39 บนอาหาร BMSM agar อายุ 48 ชั่วโมง

การศึกษาการจัดจำแนกเชื้อ A39 โดยใช้การวิเคราะห์ partial 16s rDNA sequence แล้วนำมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลที่มีอยู่ ปรากฏได้ผลดังตารางที่ 7 ซึ่งคาดว่าจะเป็น *Bacillus* sp. ก่อนข้างแน่นอน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสในอาหาร BMSM medium ที่มีปริมาณ skimmed milk แตกต่างกัน พบว่าการเติม skimmed milk 0.25 เปอร์เซ็นต์ จะกระตุ้นให้ A39 สังเคราะห์เอนไซม์มากที่สุดคือ 467 units/ml (สุคติดา, 2548)

**ตารางที่ 7** เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของ 16s rDNA sequence ของเชื้อสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับ  
แบคทีเรีย *Bacillus* sp. A39

Strains	%16s rDNA sequence similarity A39
<i>Bacillus gibsonii</i> DMS 8722 (X76446)	100
<i>Bacillus holikoshi</i> DMS 8719 (X76443)	100
<i>Bacterium</i> sp. K30 (AY345477)	100
<i>Bacillus gibsonii</i> strain SAFN-015 (AY167815)	100
<i>Bacillus gibsonii</i> strain T32 (AB111933)	99
<i>Bacillus</i> sp. LMG 21005 (AJ316316)	99

ที่มา: สุคติดา (2548)

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### 1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่ผ่านการคัดเลือกและมีการรายงานแล้ว คือ สายพันธุ์ A39 (*Bacillus* sp. A39) (สุคติดา, 2545)

### 2. อุปกรณ์

2.1 ถังหมัก (New Brunswick, Bioflo 3000) ขนาด working volume สูงสุด 5 L พร้อมอุปกรณ์ควบคุมและตรวจวัดค่าพารามิเตอร์ที่จำเป็น ได้แก่ ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายน้ำ (DO) ความเป็นกรดและด่าง (pH) และอุณหภูมิ (temperature) เป็นต้น

2.2 เครื่องวัดค่าความขุ่นของเซลล์จุลินทรีย์และการดูดกลืนคลื่นแสง (spectrophotometer, Jenway 6404)

2.3 เครื่องควบคุมอุณหภูมิน้ำ (water bath, JENO TECH, WBC-10W)

2.4 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter, consort model C830)

2.5 เครื่องเขย่าแบบหมุนวน (rotary shaker)

2.6 อุปกรณ์อื่นๆ เช่น เครื่องแก้วต่างๆ

### 3. วิธีการทดลอง

การศึกษานี้จะเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. A39 ในถังหมักขนาด working volume สูงสุด 5 L ทั้งหมด โดยศึกษาปัจจัยที่สำคัญและความเข้มข้นของสารอาหารที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ การศึกษาจะแบ่งวิธีการเพาะเลี้ยงเป็น 2 วิธี คือ การเพาะเลี้ยงแบบ batch และ fed-batch culture รายละเอียดดังต่อไปนี้

### 3.1 การเตรียมกล้าเชื้อ (starter)

3.1.1 นำหลอดเก็บเชื้อที่เก็บโดยวิธีแช่เยือกแข็ง (freezing) มาหลอมละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จี๊ดเชื้อ (streak) ลงบนอาหาร BMSM agar (ภาคผนวก ก) บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 24 ถึง 36 ชั่วโมง เมื่อเชื้อมีการเจริญ นำไปจี๊ดลงบน BMSM agar อีกครั้ง บ่มประมาณ 24 ถึง 36 ชั่วโมง

3.1.2 จี๊ดเชื้อจากข้อ 3.1.1 ลงในอาหาร BMSM broth (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 ml ในพลาสติกขนาด 250 ml ที่มีการขึ้นรูปผิวข้างคล้าย baffle ของถังหมัก เพื่อเพิ่มการส่งผ่านออกซิเจน ให้ดีขึ้นประมาณ 1 ลูกปัดเชื้อ นำไปเขย่าที่ความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 6 ถึง 8 ชั่วโมง

3.1.3 นำเชื้อในอาหารเหลวมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ค่าความขุ่นที่ 660 nm ( $OD_{660nm}$ ) ประมาณ 0.6 ถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 60 ml ลงในพลาสติกขนาด 250 ml เพื่อเป็นกล้าเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงในถังหมัก

### 3.2 การเพาะเลี้ยงแบบ batch culture

3.2.1 การเตรียมถังหมัก Bioflo 3000 ถังหมักที่ใช้ในการทดลองเป็นแบบ stirred tank มี working volume สูงสุด 5 L ปริมาตรทั้งหมด (total volume) 6.6 L ควบคุมการทำงานด้วยระบบ PID มีขั้นตอนดังนี้

3.2.1.1 ประกอบชิ้นส่วนของตัวถังหมักเข้าด้วยกัน ติดตั้งอุปกรณ์วิเคราะห์ความเป็นกรดและด่าง (pH probe) ที่ทำการ calibration แล้ว และอุปกรณ์วิเคราะห์ความเข้มข้นออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเหลว (dissolved oxygen probe) ลงบนช่องด้านบนของ headplate เดิม BMSM medium ลงไป 3 L ต่อชุดพลาสติกที่มี silicone mixture 10 เปอร์เซ็นต์เพื่อใช้กำจัดฟอง (antifoam) เข้ากับท่อเติมสารของถังหมัก ปิดท่อที่สัมผัสกับของเหลวทั้งหมดด้วย clamp นำไปนั่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

3.2.1.2 นำตัวถังหมักไปประกอบเข้ากับส่วนควบคุมของเครื่องควบคุม เชื่อมสายสัญญาณอุปกรณ์วิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆเข้ากับตัวถังหมัก รวมถึงของอุปกรณ์วัดค่าอุณหภูมิ

ด้วย ติดตั้งมอเตอร์ควบคุมการหมุนของใบพัด ต่อท่อเข้าเย็นที่ใช้ควบคุมอุณหภูมิภายในถังหมัก ตั้งค่าการทำงานของเครื่องให้พร้อมใช้งานทุกระบบ ควบคุมระบบการวัดค่าความเป็นกรดและด่าง ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 N ควบคุมความเข้มข้นออกซิเจนที่ละลายในอาหารเพาะเลี้ยงด้วยระบบการกวนที่กำหนดค่าตั้งแต่ 300 ถึง 550 rpm โดยควบคุมสัมพันธ์กับการใช้ออกซิเจนบริสุทธิ์ในกรณีที่ไม่เพียงพอ

3.2.2 ถ่ายกล้าเชื้อที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 3.1.3 ลงในถังหมักที่เตรียมระบบพร้อมแล้ว และมีอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 L ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) กวนให้เข้ากันประมาณ 5 นาที เก็บตัวอย่างปริมาตร 10 ml แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปวัดการเจริญโดยวัดจากความขุ่น ( $OD_{660nm}$ ) ของเซลล์ อีกส่วนหนึ่งนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อแยกเซลล์ออก เก็บส่วนใสไว้ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ (จุฬาพร, 2543; ภาคผนวก ข) และน้ำตาลกลูโคส (Nelson, 1944; ภาคผนวก ข) เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมงภายใน 24 ชั่วโมงแรก อีก 24 ชั่วโมงถัดมาเก็บทุก 4 ชั่วโมง รวมเป็น 48 ชั่วโมง

### 3.3 การเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch culture

ในการทดลองนี้จะใช้การเพาะเลี้ยงแบบ constantly fed-batch culture ซึ่งวิธีการจะเริ่มจากการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture เพื่อเป็นการเตรียมเซลล์ในระยะแรก จากนั้นจึงทำการเติมอาหาร BSM medium ที่อยู่ใน reservoir ด้วยอัตราคงที่ โดยอัตราการเติมคำนวณจากสูตรอัตราการเจือจางที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบบ continuous culture ดังนี้

$$D = F/V \quad \text{เมื่อ}$$

D คืออัตราการเจือจาง ( $h^{-1}$ )

F คืออัตราการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ (L/h)

V คือปริมาตรของของเหลว (culture broth) ในถังหมักก่อนเติมอาหาร (L)

ขั้นตอนการเตรียมถังหมักและชุดควบคุมทำเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture ตามข้อ 3.2 แต่เพิ่มขั้นตอนการเติมอาหารจาก reservoir ลงไป

3.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus* sp. A39

#### 3.4.1 พีเอช (pH condition)

เพาะเลี้ยง A39 ในอาหารเหลว BMSM medium ปริมาตร 3 L โดยใช้ถังหมัก และการเพาะเลี้ยง โดยวิธี batch culture โดยการควบคุมการกวนที่ 300 ถึง 550 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส DO ไม่ต่ำกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัวตลอดการทดลอง โดยแปรค่าพีเอช ต่างๆ กัน คือ 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 และ 10.0 ตามลำดับ ดำเนินการเพาะเลี้ยงและวิเคราะห์ค่าต่างๆ เช่นเดียวกับข้อ 3.2.2

3.4.2 ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในอาหารเหลว (Dissolved oxygen concentration, DO)

เพาะเลี้ยง A39 ในอาหารเหลว BMSM medium ปริมาตร 3 L โดยใช้ถังหมัก และการเพาะเลี้ยง โดยวิธี batch culture โดยการควบคุมการกวนที่ 300 ถึง 550 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมตามข้อ 3.4.1 โดยแปรค่า DO ต่างๆกัน คือ 60, 70, 80 และ 90 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว ตามลำดับ ดำเนินการเพาะเลี้ยงและวิเคราะห์ค่าต่างๆ เช่นเดียวกับข้อ 3.2.2

#### 3.4.3 ความเข้มข้นกลูโคส (glucose concentration)

เพาะเลี้ยง A39 ในอาหารเหลว BMSM medium ปริมาตร 3 L โดยใช้ถังหมัก และการเพาะเลี้ยง โดยวิธี batch culture โดยการควบคุมการกวนที่ 300 ถึง 550 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชและ DO ที่เหมาะสมตามข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 ตามลำดับ โดยแปรค่าความเข้มข้นกลูโคสเป็น 1, 2, 3 และ 4.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดำเนินการเพาะเลี้ยงและวิเคราะห์ค่าต่างๆ เช่นเดียวกับข้อ 3.2.2

#### 3.4.4 ความเข้มข้น skimmed milk (skimmed milk concentration)

เพาะเลี้ยง A39 ในอาหารเหลว BMSM medium ปริมาตร 3 L โดยใช้ถังหมัก และการเพาะเลี้ยงโดยวิธี batch culture โดยการควบคุมการกวนที่ 300 ถึง 550 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช DO และกลูโคส ที่เหมาะสมตามข้อ 3.4.1, 3.4.2 และ 3.4.3 ตามลำดับ โดยแปรค่าความเข้มข้น skimmed milk เป็น 0.25 และ 0.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดำเนินการเพาะเลี้ยงและวิเคราะห์ค่าต่างๆ เช่นเดียว กับข้อ 3.2.2

#### 3.4.5 ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเติมอาหาร (feeding time)

เพาะเลี้ยง A39 ในอาหารเหลว BMSM medium ปริมาตร 2 L โดยใช้ถังหมัก และการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch culture โดยการควบคุมการกวนที่ 300 ถึง 550 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช DO กลูโคส skimmed milk ตามข้อ 3.4.1, 3.4.2, 3.4.3 และ 3.4.4 ตามลำดับ โดยทดลองเติมอาหารใหม่ในช่วง deceleration phase และ stationary phase ดำเนินการเพาะเลี้ยง และวิเคราะห์ค่าต่างๆ เช่นเดียว กับข้อ 3.2.2 และ 3.3

#### 3.4.6 อัตราการเจือจาง (dilution rate)

เพาะเลี้ยง A39 ในอาหารเหลว BMSM medium ปริมาตร 2 L โดยใช้ถังหมัก และการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch culture โดยการควบคุมการกวนที่ 300 ถึง 550 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช DO กลูโคส และ skimmed milk และช่วงเวลาที่ใส่เติมอาหารที่เหมาะสมตามข้อ 3.4.1, 3.4.2, 3.4.3, 3.4.4 และ 3.4.5 ตามลำดับ โดยแปรค่าอัตราการเจือจางเป็น 0.05 และ 0.075  $h^{-1}$  ดำเนินการเพาะเลี้ยงและวิเคราะห์ค่าต่างๆ เช่นเดียว กับข้อ 3.2.2 และ 3.3

#### 3.4.7 ความเข้มข้นของ BMSM medium ใน reservoir

เพาะเลี้ยง A39 ในอาหารเหลว BMSM medium ปริมาตร 2 L โดยใช้ถังหมัก และการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch culture โดยการควบคุมการกวนที่ 300 ถึง 550 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช DO กลูโคส skimmed milk ช่วงเวลาในการเติม และอัตราการเจือจางที่เหมาะสมตามข้อ 3.4.1, 3.4.2, 3.4.3, 3.4.4, 3.4.5 และ 3.4.6 ตามลำดับ โดยแปรค่าความเข้มข้นอาหารใน

reservoir เป็น 1 และ 2 เท่า ตามลำดับ ดำเนินการเพาะเลี้ยงและวิเคราะห์ค่าต่างๆ เช่นเดียว กับข้อ 3.2.2 และ 3.3

#### **4. สถานที่ทำการทดลอง**

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน  
จตุจักร กรุงเทพฯ

#### **5. ระยะเวลาในการทดลอง**

การทดลองครั้งนี้เริ่มตั้งแต่ ตุลาคม 2546 และสิ้นสุดมีนาคม 2549

## ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

### 1. ผลของพีเอชต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

พีเอชเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลอย่างมากต่อกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ของแบคทีเรียและการลำเลียงสารผ่านเข้าออกเซลล์ จึงศึกษาเป็นปัจจัยแรกของการทดลองในครั้งนี้ โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ BMSM medium ปริมาตร 3 L ในถังหมัก โดยทำการแปรผันค่าพีเอชที่ 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 และ 10.0 รวม 6 ค่าการทดลอง ควบคุมพีเอชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 ถึง 5 N แล้วแต่ความเหมาะสม (ที่ค่าพีเอชต่ำใช้ความเข้มข้นน้อยเพื่อควบคุมไม่ให้ค่าพีเอชผิดพลาดมากเกินไป) ควบคุมการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ (DO) ไม่ให้ต่ำกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัวตลอดการทดลอง โดยกำหนดระบบการกวนที่ 300 ถึง 550 rpm การให้อากาศ ตลอดจนถึงการให้ออกซิเจนบริสุทธิ์จากถังออกซิเจนเหลวจากภายนอกให้มีความสัมพันธ์กัน

การทดลองผลของพีเอชหรือความเป็นกรดและด่างต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อิทธิพลของพีเอชต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่แสดงในตารางที่ 8 และภาพที่ 13 พบว่าในช่วงพีเอช 7.5 ถึง 9.5 การเพิ่มค่าพีเอชจะทำให้การเจริญและการผลิตเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้น การทดลองนี้ได้ทดลองเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. A39 ในอาหารเหลว BMSM medium ซึ่งมีกลูโคสประมาณ 10 g/L หรือ 1 เปอร์เซ็นต์ แล้วเพาะเลี้ยงโดยวิธี batch culture ในถังหมัก ซึ่งมีอาหารเหลว 3 L ในแต่ละการทดลองจะควบคุมพีเอชให้คงที่และควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ค่า DO ไม่ต่ำกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว ที่การให้อากาศ 1 VVM อัตราการกวนอยู่ที่ 300 ถึง 550 rpm จากการเปรียบเทียบพีเอชในช่วง 7.5 ถึง 10.0 พบว่าพีเอชมีอิทธิพลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสอย่างชัดเจน ดังแสดงในตารางที่ 8 และภาพที่ 13 โดยระหว่างพีเอช 7.5 ถึง 9.5 ยิ่งเพิ่มค่าพีเอช ก็จะทำให้การเจริญและการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้น ดังจะเห็นได้จากค่า specific growth rate ( $\mu$ ) เพิ่มขึ้นจาก 0.260 เป็น 0.521  $h^{-1}$  และค่า specific alkaline protease production rate ( $q_p$  หรือ Rho) เพิ่มขึ้นจาก 7,762 เป็น 20,928 units/g cell.h แต่เมื่อเพิ่มค่าพีเอชเป็น 10.0 *Bacillus* sp. A39 เจริญและผลิตเอนไซม์ลดลง คือ มีค่า  $\mu$  เพียง 0.372  $h^{-1}$  และค่า  $q_p$  เพียง 17,060 units/g cell.h ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าสภาวะพีเอชที่สูงเช่นนี้ เมแทบอลิซึมภายในอาจกระทบกระเทือน โดยเฉพาะเอนไซม์ชนิดต่างๆ ซึ่งเป็นโปรตีนอาจเสียสภาพ (denaturation) ทำให้เมแทบอลิซึมเปลี่ยนแปลง การเจริญและกิจกรรมต่างๆภายในเซลล์จึงช้าลง ผลการทดลองที่ *Bacillus* sp. A39 เจริญได้ในช่วงพีเอชกว้างตั้งแต่ 7.5 ถึง 10.0 นี้ อาจกล่าวได้ว่าเป็นแบคทีเรียประเภท facultative alkalophile ตามนิยามของ Krulwich and Guffanti (1989) ที่กล่าวว่าจุลินทรีย์

ประเภทนี้มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ที่ประมาณ 10 แต่ก็สามารถเจริญได้ในสภาวะพีเอชเป็นกลางได้

เนื่องจากการทดลองมุ่งเน้นที่จะผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสและเกี่ยวข้องกับค่า  $q_p$  ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงอัตราการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับมวลเซลล์และเวลา ดังนั้นการทดลองจะใช้ค่าดังกล่าวเป็นหลักในการพิจารณาพีเอชที่เหมาะสม เพื่อนำไปสู่การทดลองขั้นต่อไป จากตารางที่ 8 ค่า  $q_p$  สูงสุดจะอยู่ที่พีเอช 9.5 มีค่าเท่ากับ 20,928 units/g cell.h นอกจากนี้ยังพบว่าค่า  $q_p$  มีความสัมพันธ์โดยตรงกับค่า  $\mu$  เช่นกัน สามารถอธิบายได้ว่า  $\mu$  เป็นค่าที่บ่งบอกการเจริญ เมื่อการเจริญสูงมวลเซลล์สูง เอนไซม์ที่เป็นเมแทบอลิท์ของเซลล์ก็จะถูกผลิตในอัตราที่สูงตามไปด้วย เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างมวลเซลล์และน้ำตาลกลูโคส พบว่าช่วงระยะเวลาที่มวลเซลล์สูงสุดหรือใกล้เคียง ปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อจะหมดลงหรือเหลือน้อยมาก ซึ่งจากข้อมูลนี้สามารถบอกได้ว่าเมื่อน้ำตาลกลูโคสใกล้จะหมดหรือเหลือน้อย มวลเซลล์จะถูกสร้างน้อยลงเป็นลำดับ และส่งผลให้หยุดการสร้างเอนไซม์ ไม่ว่าจะ *Bacillus* sp. A39 จะเจริญที่พีเอช 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 และ 10.0 ก็ตาม แสดงให้เห็นว่ากลูโคสมีความสำคัญต่อการสร้างเอนไซม์อย่างมาก

สำหรับการทดลองควบคุมพีเอชเท่ากับ 8.0 มีลักษณะผิดปกติไปจากการทดลองในช่วง 7.5 ถึง 10.0 กล่าวคือค่า  $\mu$  0.427 h<sup>-1</sup> ซึ่งมีค่าสูงกว่าที่พีเอช 7.5 (0.296 h<sup>-1</sup>) แต่ค่า  $q_p$  กลับมีค่า 5,889 units/g cell.h ซึ่งต่ำกว่าที่พีเอช 7.5 (7,762 units/g cell.h) ที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจากขณะทำการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 8.0 มีการเติมสารกำจัดฟองมากเกินไป ซึ่งอาจเป็นผลให้ปริมาณของออกซิเจนละลายมีค่าต่ำเกินไปสำหรับการสังเคราะห์เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส แต่ไม่กระทบกระเทือน *Bacillus* sp. A39 มากนัก ดังนั้นความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในอาหารเพาะเลี้ยงจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งที่จะต้องศึกษาหาค่าที่เหมาะสม ซึ่งจะกล่าวถึงในลำดับต่อไป

เมื่อพิจารณาผลได้ของเซลล์และของเอนไซม์ (yield) โดยเฉพาะผลได้ของเซลล์ต่อกรัม สับสเตรท (Y<sub>x/s</sub>) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้บ่งบอกประสิทธิภาพในการเปลี่ยนสับสเตรทเพื่อใช้ในการเจริญ ซึ่งก็ขึ้นกับสภาวะแวดล้อมด้วย เช่น พีเอช อุณหภูมิ และสับสเตรทที่ใช้ โดยเฉพาะ limiting substrate ในการทดลองนี้ใช้กลูโคส และเนื่องจากการทดลองมีการควบคุมพีเอชด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ทำให้มีการเติมสารละลายชนิดนี้ลงไปจำนวนมาก (ที่พีเอชสูง) มีผลทำให้ปริมาตรเพิ่มขึ้น ดังนั้นในการคำนวณของผลได้ของเซลล์จะทำการคำนวณปริมาตรที่เพิ่มขึ้นนี้เข้าไปด้วย จากตารางที่ 8 พบว่าค่าผลได้ของเซลล์ *Bacillus* sp. A39 ต่อกรัมกลูโคส มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามค่าพีเอชที่เพิ่มขึ้น และสูงสุดที่พีเอช 9.0 คือ มีค่า 0.360 g cell/g glucose และลดลงเป็น 0.310 และ

0.260 g cell/g glucose ที่พีเอช 9.5 และ 10.0 ตามลำดับ และเมื่อศึกษาค่าผลได้ของเอนไซม์ (Yp/s) พบว่าค่านี้มีแนวโน้มลักษณะเดียวกับผลได้ของเซลล์ แต่ผลการทดลองที่พีเอช 9.5 กลับเป็นค่าที่สูงสุดเท่ากับ 26,591 units/g glucose และยังมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดคือ 229 units/ml และจะลดลงที่พีเอช 10.0

จากที่กล่าวมาจึงได้เลือกที่จะควบคุมพีเอช 9.5 ระหว่างการเพาะเลี้ยงในทุกการทดลองต่อจากนี้ไป ซึ่งใกล้เคียงและสอดคล้องกับ Johnvesly and Naik (2001) รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ในแต่ละค่าพีเอชมีความคล้ายคลึงกันมาก จึงขอยกตัวอย่างอธิบายความสัมพันธ์นี้จากการทดลองสภาพที่ได้ค่าพีเอชที่เหมาะสมแล้ว คือ พีเอช 9.5 เพื่อจะนำไปใช้ศึกษาปัจจัยอื่นๆในขั้นต่อไป ดังภาพที่ 14 โดย *Bacillus* sp. A39 ใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมงในระยะ lag phase จากนั้นจะเริ่มเข้าสู่ระยะ exponential phase ในชั่วโมงที่ 6 ต่อมามวลเซลล์มีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆพร้อมกับปริมาณกลูโคสเริ่มถูกใช้ไป ระยะเวลาที่ยังไม่พบการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส ต่อมาเซลล์เริ่มเข้าสู่ปลายระยะ exponential phase ณ ชั่วโมงที่ 10 เซลล์เริ่มมีการสังเคราะห์เอนไซม์ และเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 12 พบว่ามีการสร้างเอนไซม์และสร้างในอัตราสูงสุด ( $q_p$ ) อยู่ที่ 20,928 units/g cell.h เป็นที่น่าสังเกตว่าจากชั่วโมงที่ 10 ถึง 12 ค่าอัตราการเจริญหรือ  $\mu$  เริ่มลดลง เซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะ deceleration phase ซึ่งสอดคล้องกับ Moon and Parulekar (1991) ที่รวบรวมแนวคิดกลไกในการผลิตเอนไซม์ โปรติเอสในช่วงเวลาดังกล่าวที่เกี่ยวข้องกับกลไกการสังเคราะห์ mRNA ที่มีความจำเพาะต่อการสังเคราะห์เอนไซม์เมื่อ  $\mu$  ลดต่ำลง เมื่อมาถึงชั่วโมงที่ 14 มวลเซลล์มีปริมาณสูงสุด กลูโคสถูกใช้จนหมด ส่งผลต่ออัตราการสร้างเอนไซม์มีค่าต่ำลงและต่ำที่สุดเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะ stationary phase แม้ว่ากิจกรรมเอนไซม์จะสูงสุดในระยะนี้ก็ตาม

การเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. A39 ค่า  $\ln OD_{660}$  และมวลเซลล์ (cell mass) จะไม่สัมพันธ์กันในช่วง 0 ถึง 4 ชั่วโมงแรก อาจสั้นหรือยาวนานกว่านี้ขึ้นกับการเจริญของเซลล์ เนื่องจากไม่สามารถคำนวณมวลเซลล์ในช่วงนี้ได้เพราะความขุ่นใน culture broth ส่วนหนึ่งเกิดจาก skimmed milk ในอาหารเหลวซึ่งมีมากในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง ค่า  $\ln OD_{660}$  ที่ลดลงในช่วงแรกแสดงว่าความขุ่นลดลง ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจาก skimmed milk ถูกใช้ไป ทำให้เส้นกราฟลดลง ดังนั้นการที่ความขุ่นลดลงแสดงว่าเชื้อเจริญและมีการใช้ skimmed milk

จากการทดลองการเปรียบเทียบพีเอชที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ พบว่าค่า  $\mu$  มีส่วนสำคัญในการกำหนดค่า  $q_p$  ดังนั้นหากมีการควบคุมค่านี้ได้โดยเร่งกระบวนการเมแทบอลิซึมหรือเร่งอัตราการเจริญได้ ก็อาจจะได้สภาพที่จะทำให้มีเซลล์มีการผลิตเอนไซม์ได้อย่างมี

ประสิทธิภาพมากขึ้น และเนื่องจาก *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียกลุ่ม aerobe จึงต้องการออกซิเจนในกระบวนการเมแทบอลิซึม ดังนั้นจึงจำเป็นต้องวิเคราะห์หาปริมาณออกซิเจนละลายที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์ชนิดนี้