2. ผลของการละลายออกซิเจนต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการเพาะเลี้ยงในถังหมักส่วนใหญ่เป็นแบบต้องการอากาศหรือออกซิเจนในการเจริญ โดยใช้ออกซิเจนในการออกซิไดส์สารอาหารเพื่อการสร้างพลังงาน (ATP, adenosine triphosphate) และส่วนประกอบของเซลล์ เนื่องจากกลูโคสมีความสามารถในการละลายในอาหารเหลวที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายได้มากกว่าออกซิเจนถึง 6,000 เท่า (Stanbury *et al*., 1999) และเมื่อเซลล์มีการเจริญมากขึ้น ก็มีความต้องการออกซิเจนเพิ่มขึ้น จึงมีความจำเป็นต้องให้อากาศอย่างเพียงพอตลอดการทดลอง ดังนั้นออกซิเจนจึงเป็นปัจจัยจำกัด (limiting factor) ที่มีความสำคัญต่อจุลินทรีย์ประเภทนี้มาก การทดลองจะศึกษาความเข้มข้นของออกซิเจนละลายที่ 60, 70, 80 และ 90 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว ต่อไปนี้จะเรียกว่า 60, 70, 80 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์เช่นเดียวกับการศึกษาพีเอชที่เหมาะสม

ผลการทดลองการศึกษาความเข้มข้นออกซิเจนละลาย (ตารางที่ 9 และภาพที่ 15) พบว่าค่า μ จะเพิ่มขึ้นตามค่าการละลายที่เพิ่มขึ้นในช่วง DO ที่ 60 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ คือ มีค่า 0.374, 0.453 และ 0.472 h^{-1} ตามลำดับ จากนั้นค่า μ จะลดลงเมื่อค่า DO เพิ่มเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ คือ เท่ากับ 0.369 h^{-1} ซึ่งอาจจะเกิดจาก overoxygenation ซึ่งมีผู้กล่าวไว้ในการผลิตกรดอะมิโน (Hirose, 1986) กล่าวได้ว่าค่า μ และ DO มีความสัมพันธ์กันโดยตรง เมื่อพิจารณาที่ค่า q_p พบว่ามีแนวโน้มเดียวกับค่า μ ที่ค่า DO ตั้งแต่ 60 ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ มีค่า q_p 11,589, 13,138 และ 20,869 units/g cell.h ตามลำดับ จากนั้นจะต่ำลงที่ค่า DO 90 เปอร์เซ็นต์ คือ q_p มีค่า 10,590 units/g cell.h สอดคล้องกับ Calik *et al*. (2000a) ที่กล่าวว่าออกซิเจนมีผลต่อเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ รวมถึงการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสด้วย ดังนั้นค่า μ และ q_p อาจอธิบายได้ว่าปริมาณออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มขึ้นจะทำให้เซลล์มีการออกซิไดส์กลูโคสและ skimmed milk ที่เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับได้ดีขึ้น เซลล์จะใช้ออกซิเจนในกระบวนการเมแทบอลิซึมในการสร้างพลังงานจากกระบวนการหายใจ (respiration) โดยออกซิเจนจะทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในระบบลูกโซ่ขนส่งอิเลคตรอน (Electron transport system, ETS) (Moat and Foster, 1995) เมื่อพิจารณามาถึงจุดนี้ ทั้งค่า μ และ q_p จะสูงสุดเมื่อ DO เท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ จากภาพที่ 17, 18, 19 และ 20 แสดงรูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของ *Bacillus* sp. A39 เมื่อควบคุมค่า DO เป็น 60, 70, 80 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นว่าเอนไซม์จะเริ่มสร้างกลางระยะ exponential phase ใกล้เคียงกับผลการทดลองเกี่ยวกับอิทธิพลพีเอชที่กล่าวแล้วข้างต้น กลูโคสถูกนำไปใช้หมดในช่วงที่มวลเซลล์มีค่าสูงสุด หลังจากนั้นความเข้มข้นของเซลล์และกิจกรรมของเอนไซม์จะลดต่ำลงเพราะขาดคาร์บอน ซึ่งในการทดลองนี้เติมกลูโคสใน BMSM medium เพียง 1 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น จึงอาจ

เป็นไปได้ว่าถ้าเพิ่มปริมาณกลูโคสใน BMSM medium จะทำให้ μ และ q_p และค่าจลนพลศาสตร์อื่นๆเพิ่มขึ้น

เมื่อพิจารณาที่ค่าผลได้ของเซลล์และเอนไซม์ พบว่าที่ค่า DO 70 เปอร์เซ็นต์ ผลได้เซลล์และเอนไซม์สูงสุด คือ มีค่าเท่ากับ 0.455 g cell/g glucose และ 32,302 units/g glucose ตามลำดับ ในขณะที่ค่า DO 80 เปอร์เซ็นต์ มีค่าต่ำลงมาคือมีค่า 0.360 g cell/g glucose และ 30,672 units/g glucose และที่ค่า DO 90 เปอร์เซ็นต์ มีค่าทั้งสองต่ำสุด หากใช้ค่าทั้งสองนี้ในการพิจาณาจะเห็นว่าที่ 70 เปอร์เซ็นต์ มีความเหมาะสม ซึ่งค้านกับข้อมูลของค่า μ และ q_p อย่างไรก็ตามการหาค่าผลได้ Yx/s, Yp/s และ Yp/x ใช้การคำนวณจากการใช้ค่าผลต่างสูงสุดและค่าเริ่มต้น มิได้คำนวณโดยใช้ค่าความชันของทั้งการทดลอง จึงอาจทำให้มีการคลาดเคลื่อนได้ จึงใช้ค่า μ และ q_p ในการพิจารณาหาสภาวะที่เหมะสมต่างๆและ DO ที่เหมาะสมต่อการหมัก *Bacillus* sp. A39 เพื่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส คือ 80 เปอร์เซ็นต์

ในการทดลองการศึกษาหา K_La ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการส่งผ่านออกซิเจนไปยังเซลล์จุลินทรีย์ โดยจะใช้การคำนวณ 2 วิธี วิธีแรกเป็นการใช้ข้อมูลในช่วงหลังการเปิดให้อากาศในถังหมักจนกระทั่งค่าการละลายออกซิเจนคงที่ เป็นวิธี static method of gassing out และอีกวิธีใช้แบบ dynamic method of gassing out (ขั้นตอนและวิธีการคำนวณ ดังภาคผนวก ค) ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 9 และภาพที่ 16 จากตารางพบว่าค่า K_La นี้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับค่า DO ตั้งแต่ 60 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ค่าที่ได้จากการคำนวณทั้ง 2 วิธีใกล้เคียงกันมากดังนี้ คือ ที่ค่า DO 60, 70, 80 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ค่า K_La ที่คำนวณโดยวิธี static method of gassing out มีค่า 0.020, 0.026, 0.033 และ0.036 s^{-1} ตามลำดับ ในขณะที่คำนวณโดยวิธี dynamic method of gassing out มีค่า 0.020, 0.026, 0.031 และ 0.039 s^{-1} ตามลำดับ ผู้ทำการทดลองจึงใช้ค่าเฉลี่ยของทั้ง 2 วิธีในการอ้างอิงถึงข้อมูลและเปลี่ยนจากหน่วย s^{-1} เป็น h^{-1} โดยค่าเรียงตั้งแต่ 60 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ คือ 71.10, 93.60, 114.30 และ 134.10 h^{-1} ตามลำดับ ซึ่งจากภาพที่ 16 เมื่อนำไปเขียนกราฟระหว่างค่า K_La กับค่า q_p และ μ ก็จะได้ความสัมพันธ์เช่นเดียวกับเมื่อเขียนกราฟ DO สามารถอธิบายได้ว่าค่า K_La ที่เพิ่มขึ้นจะทำให้การส่งผ่านออกซิเจนไปยังเซลล์แบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น แบคทีเรียสามารถดูดซึมออกซิเจนได้สูงขึ้น โดยเฉพาะในช่วงระยะ exponential phase ที่เป็นช่วงที่เซลล์มีเมแทบอลิซึมสูง อัตราการหายใจสูง จึงต้องการออกซิเจนสูงตามไปด้วย สังเกตได้จากค่า μ สูงขึ้นตามค่า K_La ที่เพิ่มขึ้นและจะสูงสุดที่ค่าการละลายออกซิเจน 80 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มค่า DO เป็น 90 เปอร์เซ็นต์ ค่า K_La ก็ยังคงเพิ่มขึ้น แต่ค่า μ กลับลดลง ซึ่งปรากฏการณ์นี้ก็พบในการหมักกรดอะมิโน โดยค้นพบสาเหตุเกิดจาก overoxygen (Hirose, 1986) ในกรณีนี้ก็อาจเกิดจากสาเหตุเดียวกัน นอกจากนี้การ

ควบคุมปริมาณออกซิเจนหรือ DO ให้คงที่จะทำโดยเพิ่มอัตราการกวนและอาจต้องเพิ่มอัตราการให้อากาศมากขึ้น ทำให้คาดว่าอีกสาเหตุหนึ่งอาจเกิดจากที่สภาวะ DO 90 เปอร์เซ็นต์ จะมีการเพิ่มอัตราการกวนและการให้อากาศสูงมาก ทำให้เซลล์ปรับสภาพได้ยากและมีแรงฉีก (shear) และการเสียดสีสูง ทำให้เซลล์ไม่สมบูรณ์ บางส่วนถูกทำลายหรือชะงักการเจริญได้ นอกจากนี้อัตราการกวนที่เพิ่มขึ้น จะทำให้เกิดฟองปริมาณมาก ฟองที่เกิดขึ้นส่วนหนึ่งเนื่องมาจากจากการ denature ของโปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อเอง ได้แก่ skimmed milk และยีสต์เอกซ์แทรค ซึ่งจะเกิดขึ้นที่บริเวณผิวหน้าของของเหลว และฟองจะเกาะตัวกันอยู่ที่ผิวหน้าและมีความคงตัวสูง นอกจากนี้ฟองยังจะจับเซลล์จุลินทรีย์ไว้ ทำให้ขาดอาหารและเกิด autolysis ในที่สุด ซึ่งโปรตีนที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์จุลินทรีย์อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ฟองมีความคงตัวมากขึ้น (Stanbury *et al*., 1999) ทำให้อัตราการเจริญและการผลิตเอนไซม์ลดลง ถ้ากำจัดไม่ดีหรือไม่เหมาะสมก็จะทำให้ค่าอัตราการเจริญของเซลล์ลดลง

รูปแบบการเจริญ การผลิตเอนไซม์และการใช้กลูโคสของ *Bacillus* sp. A39 ในหัวข้อนี้มีรูปแบบที่คล้ายคลึงหรือแทบจะไม่แตกต่างจากหัวข้อการศึกษาค่าพีเอชก่อนหน้านี้ จากตัวอย่างที่ยกมาเป็นการทดลองการเพาะเลี้ยงโดยควบคุมค่าการละลายออกซิเจนที่ 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสมที่สุด และจะนำค่านี้ไปใช้ในการทดลองถัดไป จากภาพที่ 19 การทดลองยังคงใช้ปริมาณกลูโคสประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ เท่าเดิม เซลล์ *Bacillus* sp. A39 ใช้เวลา 4 ชั่วโมงในระยะ lag phase จากนั้นจะเข้าสู่ระยะ exponential phase ชั่วโมงที่ 8 กลูโคสเริ่มถูกใช้มากขึ้นและจะคงที่ด้วยอัตราค่าหนึ่ง สังเกตได้จากเส้นกราฟการลดลงของกลูโคสเป็นเส้นตรง เซลล์เริ่มมีการสร้างเอนไซม์ ณ ชั่วโมงที่ 8 ซึ่งเป็นระยะ exponential phase จากนั้นจะเข้าสู่ปลาย exponential phase ชั่วโมงที่ 11 ต่อเนื่องไปจนถึงชั่วโมงที่ 12 และ 14 เซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะ deceleration phase ซึ่งค่า μ เริ่มต่ำลง ระยะเวลาจากชั่วโมงที่ 11 ถึง 14 นี้ เซลล์จะมีการสร้างเอนไซม์ในอัตราสูงสุด มวลเซลล์สูงสุด กลูโคสเหลือต่ำมาก คือ 1.28 g/L จากนั้นเซลล์จะเข้าสู่ระยะ stationary phase ในระยะนี้เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 14 ถึง 48 ความเข้มข้นของเซลล์ค่อนข้างคงที่และอัตราการสร้างเอนไซม์ต่ำมาก จากรูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์นี้ อาจกล่าวได้ว่ากลูโคสมีความจำเป็นต่อการผลิตเอนไซม์สอดคล้องกับ Singh *et al*. (2004) ซึ่งจะได้ศึกษาผลของกลูโคสในการทดลองต่อๆไป