3. <u>ผลของความเข้มข้นกลูโคสต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส</u>

จากการทดลองเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp**.** A39 แบบ batch culture ในถังหมักเพื่อศึกษาพีเอช และ DO ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส จะเติมกลูโคสซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานประมาณ 10 g/L หรือ 1 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลว BMSM medium ควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 1 VVM อัตราการกวนที่ 300 ถึง 550 rpm และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เหมือนกันทุกการทดลอง ผลการทดลองพบว่า *Bacillus* sp. A39 จะใช้กลูโคสหมดภายในเวลา 12 ถึง 20 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับพีเอชและค่า DO โดยถ้าเชื้อเจริญดีมีค่า μ และ q_p สูงก็จะใช้กลูโคสหมดเร็ว แต่ถ้าเจริญไม่ค่อยดีก็จะใช้เวลานานกว่า แต่อย่างไรก็ตามทันทีที่กลูโคสใน BMSM medium มีเหลือน้อยมาก *Bacillus* sp. A39 ก็จะเจริญและผลิตเอนไซม์ได้น้อยลงมาก ดังนั้นถ้าเติมกลูโคสเพิ่มขึ้น *Bacillus* sp. A39 อาจจะเจริญและผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้ดีขึ้น แต่ก็อาจเกิด catabolite repression ขึ้นได้เช่นเดียวกับ Beg *et al.* (2002) จึงทำการศึกษาผลของกลูโคสต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส ดังต่อไปนี้

ในการทดลองนี้ใช้อาหารเหลว BMSM medium ปริมาตร 3 L ในถังหมักและเพาะเลี้ยงโดยวิธี batch culture เติมกล้าเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์ ควบคุมพีเอชที่ 9.5 ค่า DO 80 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว การให้อากาศ 1 VVM อัตราการกวน 300-550 rpm และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยในแต่ละการทดลองจะเติมกลูโคสในปริมาณต่างๆกันคือประมาณ 1, 2, 3 และ 4.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ที่ 1 เปอร์เซ็นต์ใช้ของผลทดลอง DO, ภาพที่ 22) และผลการทดลองแสดงในตารางที่ 10 และภาพที่ 21

จากตารางที่ 10 และภาพที่ 21 พบว่าเมื่อเติมกลูโคสในอาหารเหลว BMSM medium เพิ่มขึ้นจาก 1 เป็น 2 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้เพิ่มค่า μ จาก 0.472 เป็น 0.511 h^{-1} และการเพิ่มขึ้นของค่าดังกล่าวก็ส่งผลให้ค่า q_p เพิ่มขึ้นด้วยจาก 20,869 เป็น 23,556 units/g cell.h กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในช่วงการคำนวณ q_p มีค่าเพิ่มขึ้นจาก 166 เป็น 317 units/ml ณ ชั่วโมงที่ 14 และ 14.5 ตามลำดับ จากภาพที่ 23 เป็นรูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของ *Bacillus* sp. A39 เมื่อมีกลูโคสเริ่มต้น 2 เปอร์เซ็นต์ เซลล์เริ่มมีการสร้างเอนไซม์ชั่วโมงที่ 8 ซึ่งเป็นกลางระยะ exponential phase ต่อมาอัตราการเจริญของเซลล์เริ่มลดลงเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 10 ทั้งที่จุดนี้ยังมีปริมาณกลูโคสมากถึง 12.8 g/L ซึ่งมากกว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของการทดลองที่มีกลูโคสใน BMSM medium เพียง 1 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 22) ระยะเวลาจากชั่วโมงที่ 10 ถึง 14.5 เป็นระยะ deceleration phase ซึ่งมีอัตราการผลิตเอนไซม์สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 14.5 นี้มีมวลเซลล์สูงสุดและยังคงมีกลูโคสเหลือถึง 5.52 g/L ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า ณ ช่วงเวลาที่ 10 ถึง 14.5 ชั่วโมง ยังมีกลูโคสเพียงพอต่อการเจริญของเซลล์ แต่กลับหยุดการเจริญ

สาเหตุอาจเกิดจากการขาดสารอาหารบางชนิด เช่น ยีสต์เอกซ์แทรคที่เป็นแหล่ง growth factor ซึ่งควรจะปรับสูตรอาหาร BMSM medium ให้มีปริมาณที่เหมาะสมต่อไป เนื่องจากสูตรดังกล่าวใช้สำหรับอาหารที่มีกลูโคสเพียง 1 เปอร์เซ็นต์

เมื่อเพิ่มปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 3 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10 และภาพที่ 21) มีผลทำให้ค่า μ สูงขึ้นเป็น 0.578 h^{-1} มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองที่เติมกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ แต่ค่า q_p กลับลดลงเหลือ 19,727 units/g cell.h แม้ว่ามวลเซลล์สูงสุดมีค่าใกล้เคียงกันมากคือ 3.342 g/L ณ ชั่วโมงที่ 18 ขณะที่กลูโคสยังเหลือมากถึง 21.5 g/L ซึ่งควรจะใช้ในการเจริญได้อีกมาก แต่การเจริญกลับลดลงหรือหยุดลง สาเหตุอาจเป็นเช่นเดียวกับที่กล่าวแล้วในการทดลองที่เติมกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ คือ สารอาหารอื่นเริ่มหมดลง จากภาพที่ 24 แสดงรูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ที่กลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ เซลล์เริ่มมีการสร้างเอนไซม์ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งเริ่มเข้าสู่กลางระยะ exponential phase ต่อมาเข้าสู่ชั่วโมงที่ 14 ขณะนั้นยังมีปริมาณกลูโคสมากถึง 29.3 g/L และอัตราการสร้างเอนไซม์คงที่ตลอดจนถึงชั่วโมงที่ 36 ระยะเวลาตั้งแต่ 14 ถึง 36 ชั่วโมง ที่เซลล์มีการสร้างเอนไซม์ในอัตราคงที่นี้จะคาบเกี่ยวการเจริญ 2 ระยะ คือ หนึ่งระยะ deceleration phase ที่ชั่วโมงที่ 14 ถึง 18 ซึ่งเป็นช่วงที่ค่า μ ลดต่ำลง และอีกระยะหนึ่งคือระยะ stationary phase ที่ชั่วโมงที่ 18 ถึง 36 ซึ่งจากรูปจะเห็นว่ามีค่า μ ต่ำสุด

เมื่อพิจารณาการทดลองที่มีกลูโคส 4.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 25) ในอาหารเหลว BMSM medium (ตารางที่ 10 และภาพที่ 21) จะพบว่าค่า μ และ q_p ต่างก็มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองที่มีกลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งก็อาจจะสาเหตุเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วในผลการทดลองที่มีกลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อพิจารณาชั่วโมงที่ 28 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้เพียง 805 units/ml เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลาเดียวกับกลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ได้ 1,000 units/ml ต่ำกว่าประมาณ 200 units/ml ทำให้คาดได้ว่าเกิดจาก overfeeding ที่ทำให้เกิดกลูโคส effect และ catabolite repressionขึ้น (Parulekar and Lim, 1972) และจากนั้นอัตราการสร้างเอนไซม์จะต่ำลงอย่างเห็นได้ชัด คาดว่าเกิดจาก skimmed milk ที่เป็นแหล่งไนโตรเจนหมดลง เมื่อกล่าวมาถึงจุดนี้เมื่อพิจารณาที่สภาวะกลูโคส 2, 3 และ 4.5 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นว่ารูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์จะถูกแยกจากกันค่อนข้างชัดเจน คือ ระยะแรกเป็นระยะของการเจริญ จะไม่มีการสร้างเอนไซม์หรือมีแต่ต่ำมาก เรียกว่าระยะ growth phase ค่า μ สูง ระยะที่สองเป็นระยะ enzyme production phase เซลล์เข้าสู่ระยะ deceleration phase การเจริญต่ำลงค่า μ ต่ำลง จะเริ่มมีการสร้างเอนไซม์ในอัตราที่สูง และมีการสร้างอย่างต่อเนื่องไปตลอด อัตราและระยะเวลาในการผลิตเอนไซม์ขึ้นกับปริมาณกลูโคส คือหากกลูโคสยังเหลืออย่างเพียงพอ ซึ่งก็ผลิตต่อเนื่องไปจนถึงระยะ stationary phase ด้วย ในระยะนี้กลูโคสที่เหลือคาดว่าจะถูก

นำไปใช้ในการสร้างเอนไซม์มากกว่าที่จะนำไปใช้ในการเจริญ สอดคล้องกับ Moon and Parulekar (1990) และ Calik *et al*. (2000b) ณ จุดนี้สามารถกล่าวได้ว่ากลูโคสมีความสำคัญต่อการสร้างเอนไซม์อย่างมากในระยะ enzyme production phase ซึ่งสอดคล้องกับ Singh *et al*. (2004) นอกจากนี้ skimmed milk ก็น่าจะมีส่วนสำคัญในการสร้างเอนไซม์ด้วย ซึ่งจะได้ทำการทดลองแปรผันความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลองถัดไป

เป็นที่น่าสังเกตว่าไม่ว่าในการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture จะเพิ่มปริมาณกลูโคสในอาหารเหลว BMSM medium ตั้งแต่ 1 ถึง 4.5 เปอร์เซ็นต์ ทุกการทดลองจะมีลักษณะเหมือนกันคือ stationary phase ของ growth curve เริ่มที่เวลาใกล้เคียงกันคือประมาณ 14 ถึง 18 ชั่วโมง แม้ว่าปริมาณกลูโคสเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อจะต่างกันมากที่สุดถึง 4 เท่า แต่เมื่อใดที่มีปริมาณกลูโคสเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำ จะทำให้ค่า μ และ q_p มีแนวโน้มที่สูงกว่า ซึ่งจะต้องพิสูจน์ต่อไปว่าสาเหตุใดที่ทำให้ชะงักการเจริญและการผลิตเอนไซม์ที่คาดว่าอาจเกิดจาก overfeeding หรือการขาดสารอาหารบางชนิด โดยเฉพาะแหล่งไนโตรเจนและ growth factor เนื่องจากโครงสร้างของเอนไซม์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบถึง 15 เปอร์เซ็นต์ (Kumar and Takagi, 1999) โดยจะดำเนินการทดลองด้วยการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch culture ซึ่งจะกล่าวในการทดลองถัดไป

เมื่อพิจารณาที่ผลได้ของเซลล์และเอนไซม์ จากตารางที่ 10 พบว่าผลได้ของเซลล์และผลได้ของเอนไซม์ต่างก็เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น คือ เมื่อมีกลูโคสเริ่มต้นเป็น 1, 2, 3 และ 4.5 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ผลได้ของเซลล์เท่ากับ 0.360, 0.310, 0.430 และ 0.440 g cell/g glucose และผลได้ของเอนไซม์เท่ากับ 30,672, 25,694, 53,026 และ 56,963 units/g glucose ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการทดลองที่เติมกลูโคสในอาหาร BMSM medium 3 ถึง 4.5 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ผลได้ของเซลล์สูงกว่าการทดลองที่เติมกลูโคสเพียง 1 ถึง 2 เปอร์เซ็นต์ อยู่ประมาณ 2 เท่า แต่กิจกรรมเอนไซม์สูงสุดของกลุ่มที่เติมกลูโคส 3 ถึง 4.5 เปอร์เซ็นต์ จะสูงกว่ากลุ่มที่เติมกลูโคส 1 ถึง 2 เปอร์เซ็นต์ อยู่ 6 ถึง 8 เท่าตามลำดับ ดังนั้นจึงทดลองการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch culture เพื่อพิสูจน์ว่าการเติมกลูโคสเพียง 2 เปอร์เซ็นต์ ใน BMSM medium ซึ่งให้ค่า μ และ q_p สูงสุดจะดีกว่าการเติมกลูโคส 3 ถึง 4.5 เปอร์เซ็นต์ ใน BMSM medium ที่ให้ผลได้ของเอนไซม์สูงสุดหรือไม่ ดังจะได้ทำการทดลองต่อไป