บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

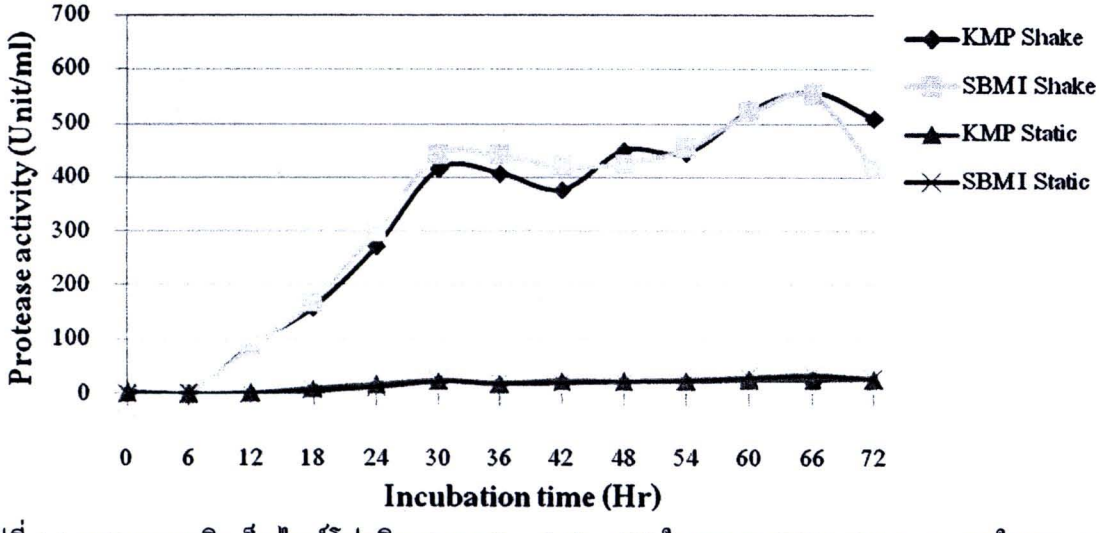
4.1 การผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส โดย *Bacillus subtilis* 405 บนอาหาร SBM สูตร 1 และ 2

4.1.1 อาหาร Soy Bean Meal สูตร 1 (SBM-F1)

เลี้ยง *B. subtilis* 405 ในอาหาร SBM-F1 และอาหาร KMP (เชิงพาณิชย์) โดยบ่ม 2 สภาวะ คือ สภาวะเขย่า (200 rpm) และไม่เขย่า ที่อุณหภูมิ 30 °C ศึกษาการผลิตเอ็นไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส การเจริญของเชื้อ และวัดปริมาณการใช้น้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) และ ค่า pH ระหว่างการเจริญ

4.1.1.1 อัลคาไลน์โปรติเอส

การผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสในอาหาร SBM-F1 และ KMP โดย *B. subtilis* 405 ที่สภาวะเขย่า มีรูปแบบที่คล้ายกันในอาหารทั้งสองชนิด คือ ไม่พบการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสใน 6 ชั่วโมงแรก แต่จะเริ่มผลิตหลังจากชั่วโมงที่ 6 และสูงสุดภายใน 66 ชั่วโมง โดยได้อัลคาไลน์โปรติเอส ประมาณ 550 U/ml จากนั้นเริ่มลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 66 ในขณะที่สภาวะไม่เขย่า พบการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสเพียง 30 U/ml (รูป 4.1)



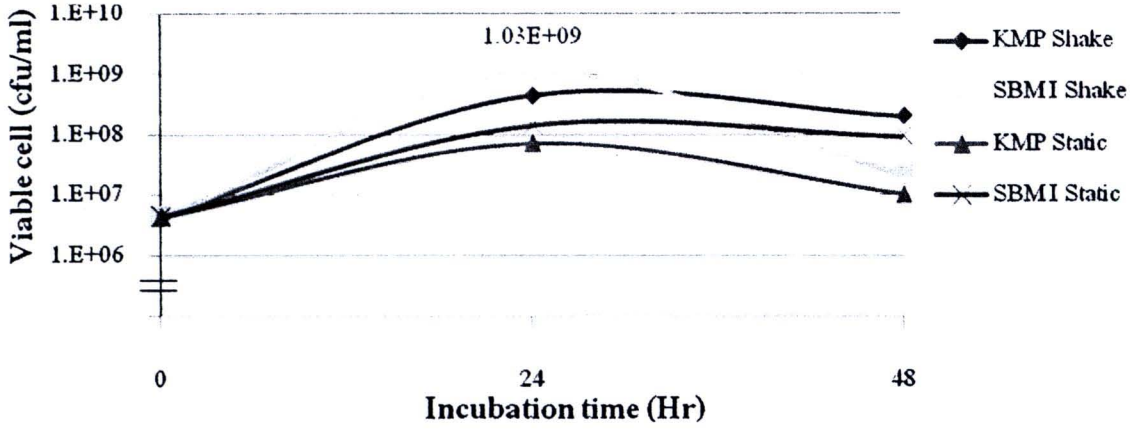
รูปที่ 4.1 แสดงการผลิตเอ็นไซม์โปรติเอสของ *B. subtilis* 405 ในอาหาร SBM-F1และ KMP ใน สภาวะเขย่า (200 rpm) และไม่เขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C

ปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อช่วยให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้เร็วขึ้น โดยเฉพาะกลุ่มแบซิลลัส ซึ่งสามารถนำออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าไปช่วยในเมทาบอลิซึมเพื่อการสร้างส่วนประกอบของเซลล์และสร้างพลังงานรวมทั้งช่วยในการขนส่งอาหารเข้าออกเซลล์ด้วย (สมใจ, 2537) ดังนั้นการเขย่าระหว่างการเลี้ยง จึงเป็นการช่วยให้ออกซิเจนจากอากาศแพร่เข้าสู่สารอาหาร

ได้เร็วขึ้นช่วยให้แบซิลลัสเจริญได้เร็วขึ้น แต่ไม่ทราบแน่ชัดว่าการให้อากาศแพร่เข้าสู่อาหารโดยการเขย่าสัมพันธ์กับการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสในแบซิลลัสที่ศึกษาอย่างไร

4.1.1.2 การเจริญเติบโตของเซลล์

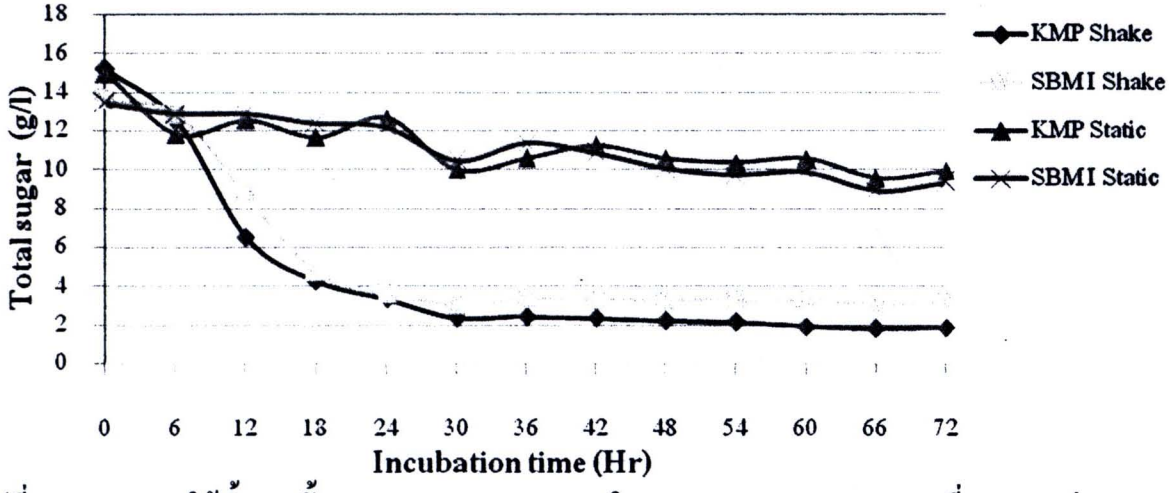
พบว่าการเจริญของ *B.subtilis* 405 สภาวะเขย่าดีกว่าไม่เขย่าในอาหารทั้งสองชนิด (SBM-F1และ KMP) โดยอาหารสูตร SBM-F1 ให้จำนวนเซลล์สูงกว่าในชั่วโมงที่ 24 คือ $1.03x10^9$ cfu/ml เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารสูตร KMP ที่มีจำนวนเซลล์ $4.50x10^8$ ตามลำดับ ซึ่งสนับสนุนว่าการเขย่าช่วยให้แบซิลลัสเจริญได้ดีกว่า เนื่องจากมีปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารสูงกว่าการตั้งไว้โดยไม่เขย่า (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.2 แสดงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell) ของ *B. subtilis* 405 ในอาหาร SBM-F1และ KMP ในสภาวะเขย่า (200 rpm) และไม่เขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C

4.1.1.3 การใช้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar)

พบว่าสภาวะเขย่าจะทำให้ *B. subtilis* 405 ใช้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดได้เร็วกว่าและดีกว่าการตั้งไว้โดยไม่เขย่า ในอาหารทั้งสองชนิด (SBM-F1และKMP) โดยปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเริ่มคงที่ ประมาณ 2-3 g/l หลังจากชั่วโมงที่ 30 ใน *B. subtilis* 405 (รูปที่ 4.3)



รูปที่ 4.3 แสดงการใช้น้ำตาลทั้งหมดของ *B. subtilis* 405 ในอาหาร SBM-F1และ KMP ที่สภาวะเขย่า (200 rpm) และไม่เขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C

4.1.1.4 ค่า pH

ไม่พบการเปลี่ยนแปลงค่า pH อย่างมีนัยสำคัญ โดย pH ในอาหาร SBM-F1 อยู่ในช่วง pH 6.4-7 และในอาหาร KMP อยู่ในช่วง pH 5.4-6 สันนิษฐานว่าการที่ค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เปลี่ยนแปลงมาก แม้จะมีการผลิตเอ็นไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส อาจเนื่องจากส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเฉพาะ K_2HPO_4และ Na_2HPO_4 นั้นมีความสามารถในการเป็น buffer ได้ดี จึงทำให้ค่า pH ในอาหาร ไม่เปลี่ยนแปลง มากนัก (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 แสดงค่า pH ของ *B. subtilis* 405 ในอาหาร SBM-F1และ KMP ในสภาวะเขย่า (200 rpm) และไม่เขย่า ที่อุณหภูมิ 30°C

Microorganism	Medium	Condition	pH	
			0 hr	72 hr
B. subtilis 405	KMP	Shaking	5.46	6.09
		Static	5.41	5.57
	SBM-F1	Shaking	7.00	7.11
		Static	7.04	6.33

จากค่า pH ซึ่งอยู่ระหว่าง 6-7 ในตาราง 4.1 และความสามารถของสารที่เป็นบัฟเฟอร์ได้ดีในสูตรอาหารดังกล่าว อาจเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมในการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสระหว่างการเลี้ยง เนื่องจากมีรายงานว่า อัลคาไลน์โปรติเอสสามารถผลิตได้ดีในสภาวะที่เป็นเบส ดังนั้นในงานทดลองต่อไป จึงได้ปรับปรุง สูตรอาหาร SBM-F1 โดยการไม่ใส่ K_2HPO_4และ Na_2HPO_4 และเปลี่ยนแหล่ง

ฟอสเฟสเป็น 0.05 % KH_2PO_4 แทน 0.1 % K_2HPO_4 และ 0.1 % Na_2HPO_4 และเพิ่มแหล่งไนโตรเจนคือ 0.4 % ปลาป่น ในอาหารสูตรเดิม และให้ชื่อว่า Soy Bean Meal สูตร 2 (SBM-F2) ซึ่งจะนำมาใช้ในหัวข้อถัดไป

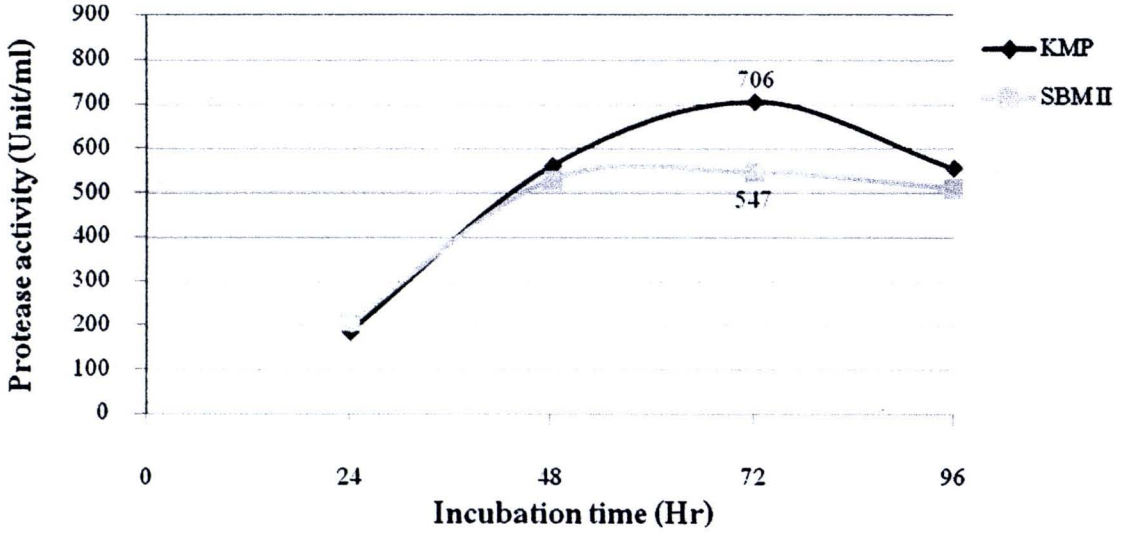
4.1.2 อาหาร Soy Bean Meal สูตร 2 (SBM-F2)

ในการทดลองนี้ ทำการทดลองเฉพาะสภาวะเขย่าเท่านั้น เนื่องจาก ผลการทดลองใน 4.1.1 แสดงให้เห็นว่า เอ็นไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสนั้นสามารถผลิตได้ดีในสภาวะที่มีการเขย่า

เลี้ยง *B. subtilis* 405 ในอาหาร SBM-F2 และ KMP โดยบ่มที่สภาวะเขย่า (200 rpm) ที่อุณหภูมิ 30 °C

4.1.2.1 อัลคาไลน์โปรติเอส

พบการผลิตเอ็นไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ *B. subtilis* 405 สูงสุดราวชั่วโมงที่ 72 ในอาหารทั้งสองชนิด (SBM-F2 และ KMP) คือ 547 U/ml และ 706 U/ml ตามลำดับ โดยปริมาณเอ็นไซม์ใน อาหาร SBM-F2 ไม่มีความแตกต่างมากนัก ระหว่างชั่วโมงที่ 48, 72 และ 96 ในขณะที่การผลิต อัลคาไลน์โปรติเอสในอาหาร KMP เริ่มลดลงหลังชั่วโมงที่ 72 (รูป 4.4)

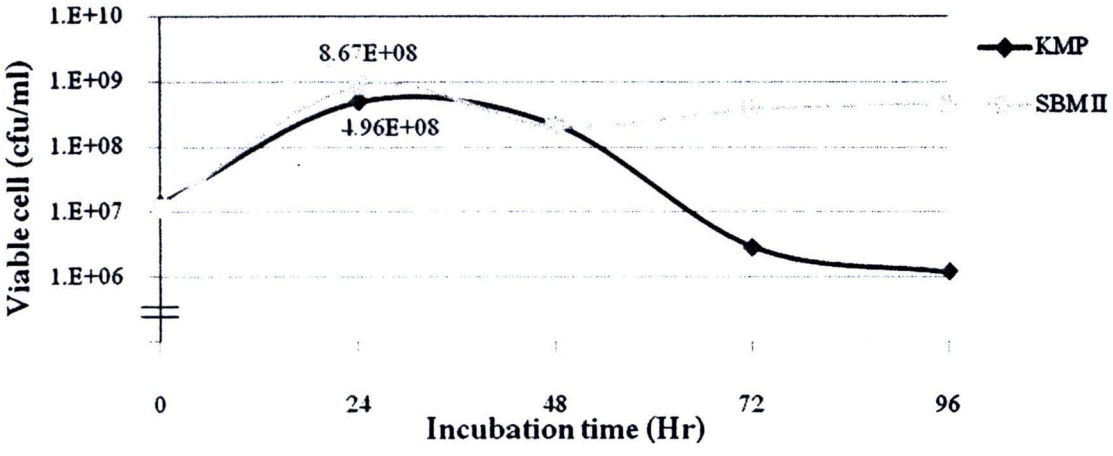


รูปที่ 4.4 แสดงการผลิตเอ็นไซม์โปรติเอสของ *B. subtilis* 405 ในอาหาร SBM-F2และ KMP ในสภาวะเขย่า (200 rpm) ที่อุณหภูมิ 30°C

4.1.2.2 การเจริญเติบโตของเซลล์

พบการเจริญของ *B. subtilis* 405 สูงสุดภายใน 24 ชั่วโมง คือ 8.67×10^8 cfu/ml ในอาหารKMP และ 4.97×10^8 cfu/ml ในอาหาร SBM-F2 โดยจำนวนเซลล์ในอาหาร SBM-F2 มีปริมาณไม่แตกต่างกันมากระหว่างชั่วโมงที่ 24 และ 96 ซึ่งต่างจากเซลล์ที่เลี้ยงในอาหาร KMP ซึ่งมีจำนวนลดลงมากระหว่าง

ชั่วโมงที่ 24 และ 96 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า อาหาร SBM-F2 มีความเหมาะสม ในการใช้เป็นแหล่งผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสใน *B. subtilis* 405 (รูปที่ 4.5)

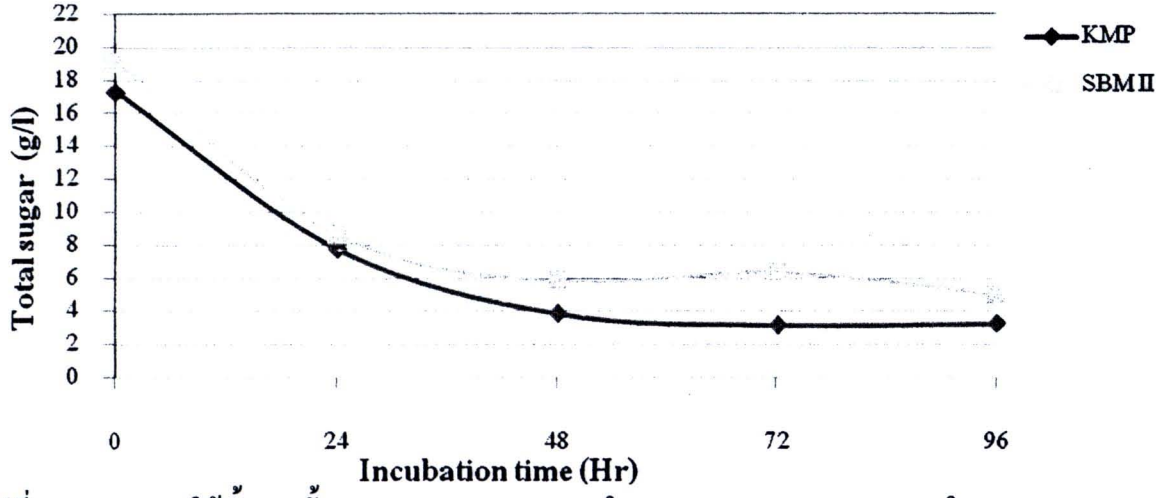


รูปที่ 4.5 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell) ของ *B. subtilis* 405 ในอาหาร SBM-F2 และ KMP ในสภาวะเขย่า (200 rpm) ที่อุณหภูมิ 30°C

ปริมาณเซลล์ที่ลดลงในอาหาร KMP (4.1.2.2) สอดคล้องกับกิจกรรมของเอ็นไซม์โปรติเอสที่ลดลง ในอาหาร KMP เมื่อเวลาผ่านไป (4.1.2.1) ซึ่งต่างจากปริมาณเซลล์ในอาหาร SBM-F2 ซึ่งมีจำนวนเซลล์ ค่อนข้างคงที่ ทำให้ปริมาณเอ็นไซม์ไม่แตกต่างกันมากเมื่อเวลาผ่านไป

4.1.2.3 การใช้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ทั้ง *B. subtilis* 405 มีการใช้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหารทั้งสองชนิด (SBM-F2 และ KMP) อย่างรวดเร็วภายใน 48 (รูป 4.6)



รูปที่ 4.6 แสดงการใช้น้ำตาลทั้งหมดของ *B. subtilis* 405 ในอาหาร SBM-F2 และ KMP ในสภาวะสภาวะเขย่า (200 rpm) ที่อุณหภูมิ 30°C

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ซึ่งผลการใช้น้ำตาลสอดคล้องกับการเจริญเติบโต (หัวข้อที่ 4.1.2.2) คือเซลล์มีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วภายในชั่วโมงที่ 0-24 เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ แต่หลังจากชั่วโมงที่ 24 พบจำนวนเซลล์ลดลงทำให้อัตราการใช้น้ำตาลลดลงด้วย และหลังจากชั่วโมงที่ 48 น้ำตาลในอาหารมีปริมาณคงที่ เนื่องจากเซลล์ไม่สามารถใช้น้ำตาลในอาหารส่วนนี้ได้ โดยเฉพาะในอาหาร KMP ไม่ทราบแน่ชัดว่า มีปัจจัยใดในอาหาร SBM-F2 ที่ทำให้เซลล์ไม่ลดจำนวนลง เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงในอาหาร KMP

4.1.2.4 ค่า pH

ในอาหาร SBM-F2 ซึ่งใช้ KH_2PO_4 แทน K_2HPO_4และ Na_2HPO_4 ค่า pH ระหว่างการเลี้ยง *B. subtilis* 405 มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเท่านั้น (ตาราง 4.2)

ตารางที่ 4.2 แสดงค่า pH ของ *B. subtilis* 405 ในอาหาร SBM-F2และKMP ในสภาวะเขย่า (200 rpm) ที่อุณหภูมิ 30°C

Microorganism	Medium	pH				
		0 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
***B. subtilis* 405**	KMP	5.67	5.75	6.13	5.94	5.69
	SBM-F2	6.37	6.81	7.60	7.52	6.37

จากตาราง 4.2 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงค่า pH ระหว่างการหมักมากนัก ซึ่งเป็นไปได้ว่า สภาวะ buffer โดย K_2HPO_4และ Na_2HPO_4อาจไม่ใช่สาเหตุสำคัญของการที่ค่า pH ในอาหาร SBM-F 1 ไม่เปลี่ยนแปลง หรือเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดสภาวะไม่เหมาะสมในการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส เคยมีรายงานว่า extracellular protease ที่ *B. subtilis* ผลิตนั้นส่วนใหญ่เป็น alkaline protease และ neutral protease (metalloprotease) ซึ่งแล้วแต่สายพันธุ์ว่าจะผลิตโปรติเอสชนิดไหนมากกว่ากัน เป็นไปได้ว่า *B. subtilis* 405 อาจจะผลิต neutral protease เป็นส่วนใหญ่ (Pero และ Sloma, 1993)

ในการทดลองต่อไป จึงเลือกสูตรอาหาร SBM –F2 ซึ่งให้ผลผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสมากกว่า มาศึกษาปัจจัยในอาหารที่มีผลต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส โดยใช้กระบวนการทางสถิติต่อไป

4.2 การผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส บนอาหาร SBM –F2 โดยใช้สถิติในการการคัดเลือกองค์ประกอบอาหาร

เลี้ยง *B. subtilis* 405 ในอาหารสูตร SBM-F2 ในตู้บ่มแบบเขย่า (Incubator shaker) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 °C ความเร็วรอบ 200 rpm

4.2.1 การผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสโดย *B. subtilis* 405

4.2.1.1 การทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสโดยใช้ Fractional Factorial Design

การคัดเลือกตัวแปรที่มีความสำคัญต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสโดยใช้วิธี Fractional Factorial Design แบบ 2^{6-2} การทดลองประกอบด้วย 3 Levels (+1, 0, -1) และ 20 การทดลอง (Run) ในอาหารสูตร SBM-F2 ประกอบด้วย กากถั่วเหลือง (soybean meal; SBM) ปลาป่น (fishmeal) นมผง (milk powder) น้ำตาลซูโครส (sucrose) แป้งสาลี (wheat flour) และ KH_2PO_4

ตารางที่ 4.3 แสดงการออกแบบการทดลองและผลการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสโดยใช้วิธี Fractional Factorial Design แบบ 2^{6-2} พบว่า *B. subtilis* 405 ผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสได้สูงในวันที่ 2 (121-586 U/mL) และมีการผลิตเพิ่มขึ้นในวันที่ 5 โดยมีความเข้มข้นสูงที่สุด 1,965 U/ml (การทดลองที่ 15 - run number 15)

ตารางที่ 4.3 การออกแบบการทดลองและการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสในวันที่ 2 และ 5 โดยใช้Fractional Factorial Design แบบ 2^{6-2}

Runs	Composition concentration (g/L)						Protease activity (U/mL)	
	SBM	Milk powder	Fishmeal	Wheat flour	Sucrose	KH_2PO_4	Day 2	Day 5
1	10	1	1	5	1	0	194±1	150±3
2	100	1	1	5	30	0	298±1	596±3
3	10	10	1	5	30	1	250±1	46±1
4	100	10	1	5	1	1	586±3	751±1
5	10	1	40	5	30	1	415±2	862±3
6	100	1	40	5	1	1	484±2	429±1
7	10	10	40	5	1	0	146±1	612±2
8	100	10	40	5	30	0	198±1	525±1
9	10	1	1	50	1	1	121±1	305±1
10	100	1	1	50	30	1	518±1	684±1
11	10	10	1	50	30	0	241±1	610±1
12	100	10	1	50	1	0	505±1	750±4
13	10	1	40	50	30	0	253±2	1058±3
14	100	1	40	50	1	0	277±2	563±4
15	10	10	40	50	1	1	496±3	1965±1
16	100	10	40	50	30	1	260±2	1453±1
17	50	5	20	27.5	15	0.5	317±1	1308±1
18	50	5	20	27.5	15	0.5	318±4	1303±1
19	50	5	20	27.5	15	0.5	320±1	1315±1
20	50	5	20	27.5	15	0.5	315±2	1300±1

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติของการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส ในวันที่ 2 และวันที่ 5 แสดงดังตารางที่ 4.4 และ 4.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส ในวันที่ 2 และวันที่ 5 เมื่อพิจารณาองค์ประกอบทั้ง 6 ชนิด ที่มีความสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ($p<0.01$) จากตารางที่ 4.4 พบว่าทั้ง SBM และ KH_2PO_4 มีผลต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wittayaanumas (2001) พบว่า กากถั่วเหลือง 10 g/L มีผลให้ *Aspergillus oryzae* U1521 เจริญเติบโตได้มากที่สุด นอกจากนี้การเติม KH_2PO_4 0.5-2 g/L ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นประโยชน์ต่อการผลิตเอ็นไซม์ (Guangrong *et al.*, 2008) Moon และ Paruleker (1991) รายงานว่า ฟอสเฟต 23 mM เพียงพอต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสของ *B. firmus*

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์การถดถอย (regression) สำหรับการผลิตโปรติเอสในวันที่ 2 โดยใช้ Fractional Factorial Design แบบ 2^{6-2}

Composition	Effect	SE	*t*-value	*p*-value
Constant	-	-	589.57	0.000
SBM (X_1)	126.08	0.5565	113.27	0.000*
Milk powder (X_2)	15.09	0.5565	13.55	0.000*
Fishmeal (X_3)	-23.06	0.5565	-20.72	0.000*
Wheat flour (X_4)	12.5	0.5565	11.23	0.000*
Sucrose (X_5)	-46.98	0.5565	-42.21	0.000*
KH_2PO_4 (X_6)	127.37	0.5565	114.43	0.000*
X_1*X_2	-22.41	0.5565	-20.14	0.000*
X_1*X_3	-148.92	0.5565	-133.79	0.000*
X_1*X_4	-13.79	0.5565	-12.39	0.001*
X_1*X_5	-97.41	0.5565	-87.52	0.000*
X_1*X_6	15.30	0.5565	13.75	0.001*
X_2*X_4	67.89	0.5565	60.99	0.000*
X_2*X_6	-1.72	0.5565	-1.55	0.219
$X_1*X_2*X_4$	-76.08	0.5565	-68.35	0.000*
$X_1*X_2*X_6$	-69.40	0.5565	-62.35	0.000*

* ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ที่ค่าความน่าจะเป็น < 0.01

สำหรับ ปลาป่นและแป้งสาลีเป็นสารอาหารที่มีความสำคัญและมีผลต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส สูงที่สุดในวันที่ 5 (ตารางที่ 4.5) เนื่องจากปลาป่นเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยกรดอะมิโนและเปปไทด์ จึงนำไปใช้ในการผลิตชีวมวลและเอ็นไซม์กันอย่างกว้างขวาง (Singh *et al.*, 1995) Ellouz และคณะ (2001) พบว่าอาหารสำหรับการเจริญเติบโตที่ประกอบด้วยหัวปลาและอวัยวะภายในของปลา 10 g/L สามารถเพิ่มการผลิตโปรติเอสได้ 100 % Gupta และคณะ (2002) รายงานว่า โดยทั่วไป แป้งสาลี โพลีแซคคาไลน์ เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสในระยะยาว

ตารางที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์การถดถอย (regression) สำหรับการผลิตโปรติเอสในวันที่ 5 โดยใช้ Fractional Factorial Design แบบ 2^{6-2}

Composition	Effect	SE	*t-value*	*p-value*
Constant	-	-	420.81	0
SBM (X_1)	18.1	1.688	5.36	0.013
Milk powder (X_2)	258.2	1.688	76.48	0.000*
Fishmeal (X_3)	447.2	1.688	132.4	0.000*
Wheat flour (X_4)	427.2	1.688	126.52	0.000*
Sucrose (X_5)	38.8	1.688	11.49	0.000*
KH_2PO_4 (X_6)	203.9	1.688	60.39	0.000*
X_1*X_2	43.5	1.688	12.90	0.001*
X_1*X_3	-399.6	1.688	-118.35	0.000*
X_1*X_4	-140.1	1.688	-41.49	0.000*
X_1*X_5	152.6	1.688	45.20	0.000*
X_1*X_6	16.8	1.688	4.98	0.016
X_2*X_4	283.6	1.688	84.01	0.000*
X_2*X_6	255.9	1.688	66.90	0.000*
$X_1*X_2*X_4$	-107.8	1.688	-31.92	0.000*
$X_1*X_2*X_6$	18.1	1.688	5.36	0.013

* ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ที่ $p\text{-value} < 0.01$

ดังนั้น จึงใช้วิธี Response surface methodology ในการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของชุดการทดลอง 2 ชุด คือ (1) SBM และ KH_2PO_4 และ (2) ปลาป่นและแป้งสาลี ซึ่งความเข้มข้นของพารามิเตอร์ที่เลือกนั้นแตกต่างกัน ขณะที่พารามิเตอร์อื่นๆ ยังคงใช้ระดับความเข้มข้นไว้เท่าเดิม ของค่าจุดศูนย์กลาง

4.2.1.2 การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสโดยใช้ Response Surface Methodology

Response Surface Methodology (RSM) เป็นการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกากถั่วเหลือง (SBM), KH_2PO_4 , ปลาป่น และแป้งสาลี ต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส

Central Composite Design (CCD) ที่จุดศูนย์กลาง ถูกเลือกใช้จาก star point 4 จุด ($\alpha = \pm 1.414$) และการทำซ้ำ 5 ครั้ง นอกเหนือจาก SBM และ KH_2PO_4 แล้ว ระหว่างการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมยังคงความเข้มข้นของนมผง ปลาป่น แป้งสาลีและซูโครสไว้ เท่ากับ 5, 20, 27.5 และ 15 g/L ตามลำดับ

ตารางที่ 4.6 แสดงการออกแบบการทดลองและการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสในการทดลองที่ 13 (run no. 13) หลังจากการเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 7 วัน อยู่ในช่วง 512 ถึง 948 U/mL การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Minitab 14 รวมทั้งผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.6 การผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสโดย *B. subtilis* 405 ในอาหารสูตร SBM-F2 ภายใต้ความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ SBM และ KH_2PO_4

Runs	Composition concentration (g/L)		Protease activity (U/mL)
	SBM	KH_2PO_4	Day 7
1	30(-1)	0.3(-1)	610±1
2	90(+1)	0.3(-1)	522±2
3	30(-1)	0.7(+1)	650±2
4	90(+1)	0.7(+1)	600±1
5	17.6(-1.414)	0.5(0)	541±1
6	100.24(+1.414)	0.5(0)	512±2
7	60(0)	0.2(-1.414)	524±1
8	60(0)	0.8(+1.414)	806±1
9	60(0)	0.5(0)	946±2
10	60(0)	0.5(0)	932±1
11	60(0)	0.5(0)	941±2
12	60(0)	0.5(0)	943±3
13	60(0)	0.5(0)	948±1

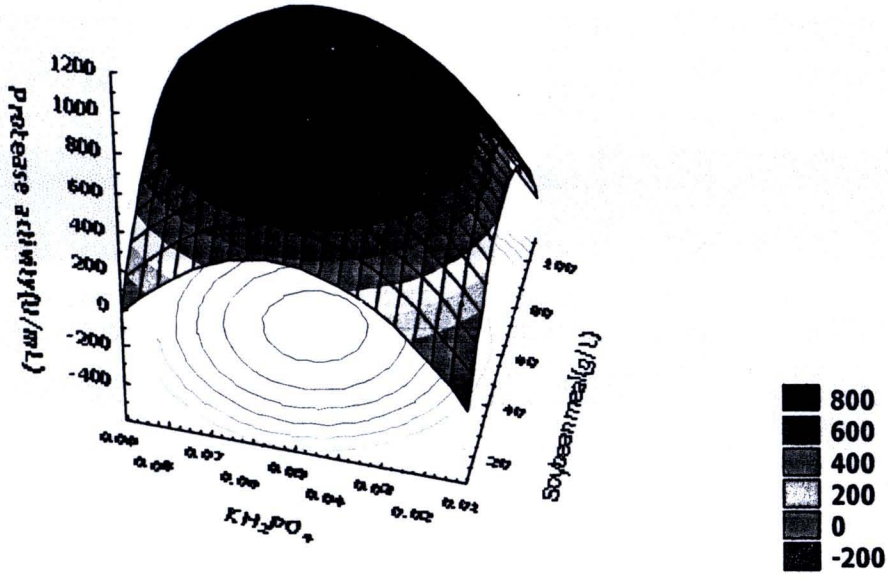
ตารางที่ 4.7 การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) โดยใช้ CCD แบบ 2^2 สำหรับการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสในวันที่ 7

Composition	Coefficience	SE coefficience	*t-value*	*p-value*
Constant	-766.85	134.60	-5.683	0.001
SBM (X_1)	27.66	2.45	11.249	0.000*
KH_2PO_4 (X_2)	3321.91	367.159	9.048	0.000*
X_1*X_1	-0.25	0.01	-15.409	0.000*
X_2*X_2	-3097.79	313.139	-9.893	0.000*
X_1*X_2	1.58	3.02	0.524	0.617

* ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ที่ *p-value* < 0.01, R^2=97.9%

จากตารางที่ 4.7 พบว่าทั้ง SBM และ KH_2PO_4 มีความสำคัญต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส (p=0.00) นอกจากนี้ second order interactions มี 2 พารามิเตอร์ที่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ได้แก่ SBM*SBM และ KH_2PO_4* KH_2PO_4 ขณะที่ความสัมพันธ์ระหว่าง SBM และ KH_2PO_4 ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

ข้อมูลในตารางที่ 4.6 นำไปวิเคราะห์รูปร่างและพื้นผิวของกราฟ โดยใช้โปรแกรม Statistica 7.0 (รูปที่ 4.7) จากรูปที่ 4.7 เห็นได้ชัดเจนว่าเมื่อความเข้มข้นของ SBM และ KH_2PO_4 เพิ่มขึ้น ค่ากิจกรรมการผลิตโปรติเอส (protease activities) เพิ่มขึ้นเช่นกัน อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ SBM และ KH_2PO_4 มากขึ้น ค่ากิจกรรมของอัลคาไลน์โปรติเอสเริ่มลดลง



รูปที่ 4.7 แสดงรูปร่างและพื้นผิวของกราฟ 3 มิติ ที่เกี่ยวกับความเข้มข้นของ SBM และ KH_2PO_4 ต่อ การผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส ที่อัตราการกวน 200 rpm, 30 ℃ ในวันที่ 7

ตามรูปที่ 4.7 พื้นผิวของกราฟสามารถอธิบายได้ตามสมการที่ (1) ดังนี้

$$PA= -765.898+27.6382X+33210.5566Y-0.2454X^2+15.8046XY-3.0974x10^5Y^2 \quad (1)$$

เมื่อ X, Y และ PA แทน SBM, KH_2PO_4 และ protease activity ตามลำดับ ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ SBM และ KH_2PO_4 นำไปสู่การผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสสูงสุด สามารถประมาณค่าได้ใกล้เคียงกันกับการวิเคราะห์และการใช้กราฟ

การวิเคราะห์เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ SBM และ KH_2PO_4 ในสมการที่ 1 เป็นการเรียงลำดับความแตกต่างของ X และ Y เมื่อ X และ Y เท่ากับ 0 การเท่ากันของตัวแปรทั้งสองสามารถอธิบายผลความเข้มข้นของ SBM และ KH_2PO_4 เท่ากับ 58.08 และ 0.55 g/L ตามลำดับ ส่วนนมผง ปลาป่น แป้งสาลี และน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มเข้ามามีความเข้มข้นเท่ากับ 5, 20, 27.5 และ 15 g/L ตามลำดับ นอกจากนั้นความเข้มข้นของอัลคาไลน์โปรติเอสที่ทำนายได้ตามสมการที่ (1) คือ 951 U/mL ขณะที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมให้ผลการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสเท่ากับ 1,152±11 U/mL ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Joo *et al.* (2002) ที่พบว่าการเลี้ยง *B. horikoshii* ในอาหารที่ประกอบด้วย กากถั่วเหลือง KH_2PO_4 และ casein ความเข้มข้น15, 5 และ10 g/L ตามลำดับ ให้ค่ากิจกรรมโปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 208 U/mL

Mabrouk *et al* (1999) ศึกษาการผลิตโปรติเอสโดย *B. licheniformis* ATCC21415 พบว่า ในอาหารสำหรับการเจริญเติบโต ที่มีถั่วเหลืองและฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 60 และ 12 g/L ตามลำดับ พร้อมทั้ง น้ำตาลกลูโคส 15 g/L น้ำตาลแลคโตส 40 g/L และ $CaCl_2$ 0.7 g/L ให้ค่ากิจกรรมโปรติเอส 20,379 U/mL ซึ่งฟอสเฟตมีความสำคัญต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส เนื่องจากฟอสเฟตมีบทบาทสำคัญต่อปฏิกิริยาของเอ็นไซม์จำนวนมาก ได้แก่ การเผาผลาญอาหารในขั้นแรก (primary metabolism) ประกอบด้วย การสังเคราะห์ deoxyribonucleic acid (DNA) และ ribonucleic acid (RNA) โปรตีน การเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต การหายใจระดับเซลล์ และการควบคุมระดับ adenosine triphosphate (ATP) (Yoon *et al.*, 1989 และ Mehta *et al.*, 2006) มีรายงานว่าสารอนินทรีย์ฟอสเฟตที่มากเกินไปจะกระตุ้นการใช้กลูโคส การเจริญของเซลล์และการผลิตเอ็นไซม์ในสิ่งมีชีวิตบางชนิด (Martin, 1977)

สำหรับสภาวะที่ 2 เป็นการออกแบบการตอบสนองของปลาป่น และแป้งสาลี เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส การออกแบบการตอบสนอง (response) ของปลาป่นและแป้งสาลีที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.8 โดยมีส่วนประกอบอื่นๆ คือ นมผง น้ำตาลซูโครส SBM KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 5, 15, 50 และ 0.5 g/L ตามลำดับ หลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน การผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสอยู่ในช่วง 336-1,115 U/mL จากทั้ง 13 การทดลอง (ตารางที่ 4.8) นำค่าความเข้มข้นของอัลคาไลน์โปรติเอสที่ได้มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Minitab 14 ซึ่งได้ผลการวิเคราะห์ทางสถิติซึ่งแสดงเงื่อนไขดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.8 การผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสโดย *B. subtilis* 405 ในอาหารสูตร SBM-F2 ภายใต้ความเข้มข้นของปลาป่นและแป้งสาลีที่แตกต่างกัน

Runs	Concentrations (g/L)		Protease activity (U/mL) Day 6
	Fishmeal	Wheat flour	
1	10(-1)	20(-1)	643±12
2	50(+1)	20(-1)	351±10
3	10(-1)	60(+1)	589±10
4	50(+1)	60(+1)	315±7
5	1.7(-1.414)	40(0)	855±10
6	58.3(+1.414)	40(0)	336±7
7	30(0)	11.7(-1.414)	543±2
8	30(0)	68.28(+1.414)	1115±12
9	30(0)	40(0)	1046±7
10	30(0)	40(0)	1024±5
11	30(0)	40(0)	1022±17
12	30(0)	40(0)	1044±5
13	30(0)	40(0)	1040±2

ตารางที่ 4.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยใช้ 2^2 CCD สำหรับการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสในวันที่ 6

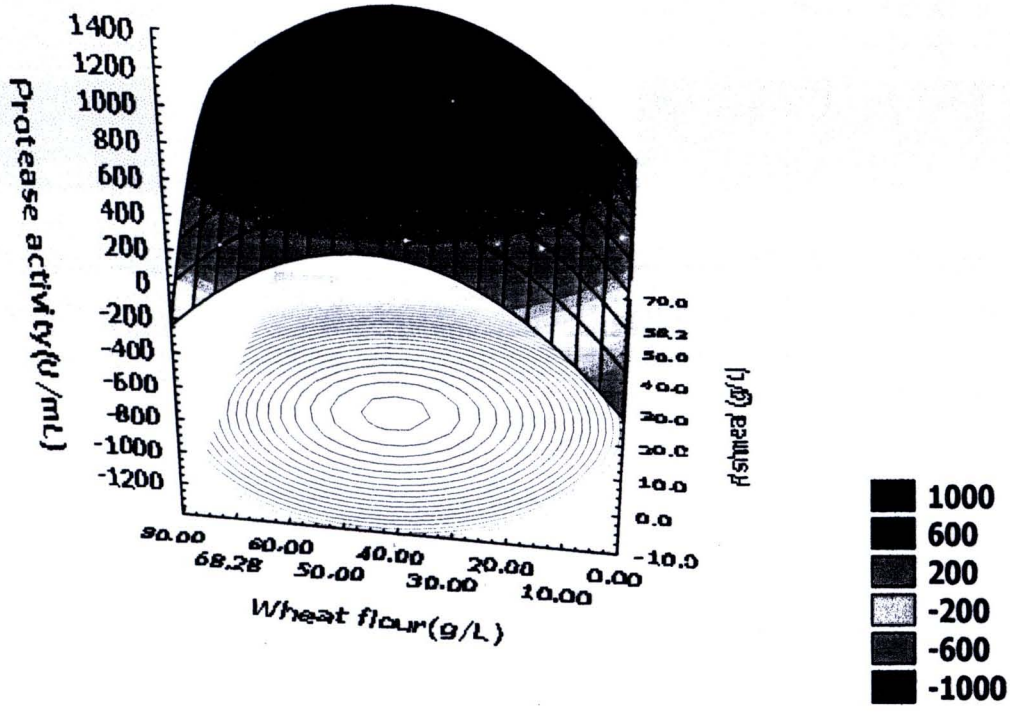
Composition	Coefficience	SE coefficience	*t-value*	*p-value*
Constant	-165.612	408.071	-0.406	0.697
Fish meal (X_1)	33.301	13.721	2.427	0.046*
Wheat flour (X_2)	36.675	15.251	2.405	0.047*
X_1*X_1	-0.698	0.167	-4.172	0.004*
X_2*X_2	-0.406	0.167	-2.429	0.046*
X_1*X_2	0.011	0.221	0.049	0.962

* ระดับนัยสำคัญทางสถิติ ที่ *p-value* < 0.05, R^2= 0.8100 (81.0%)

จากการวิเคราะห์พบว่า ทั้งปลาป่นและแป้งสาลีมีผลต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ความสัมพันธ์ขั้นที่สอง (Second order interactions) ของทั้งสองพารามิเตอร์ คือ FS*FS และ WF*WF ที่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ขณะที่ความสัมพันธ์ระหว่าง FS และ WF ไม่มีนัยสำคัญทางสถิต ($p>0.05$)

ข้อมูลในตารางที่ 4.8 นำมาวิเคราะห์รูปร่างและพื้นผิวของกราฟ โดยใช้โปรแกรม Statistica 7.0 ซึ่งได้ผลแสดงดังรูปที่ 4.8

จากรูปที่ 4.8 เมื่อของความเข้มข้นของปลาป่นและแป้งสาลีเพิ่มขึ้น ทำให้ค่ากิจกรรมโปรติเอสมีค่าเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามหากความเข้มข้นของปลาป่นและแป้งสาลีมีปริมาณเพิ่มขึ้นมากกว่านี้จะทำให้การผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสลดลง



รูปที่ 4.8 แสดงรูปร่างและพื้นผิวของกราฟ 3 มิติ ที่เกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของปลาป่น และแป้งสาลีต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส ที่อัตราการกวน 200 rpm, 30 °C ในวันที่ 6

พื้นผิวของกราฟ ในรูปที่ 4.8 สามารถอธิบายได้ตามสมการที่ (2) ดังนี้

$$PA = -165.6061+33.3004X+36.6745Y-0.6975X^2+0.0108XY-0.4063Y^2 \quad (2)$$

เมื่อ X, Y และ PA แทน ปลาป่น แป้งสาลี และกิจกรรมโปรติเอส ตามลำดับ ความเข้มข้นที่เหมาะสมของปลาป่นและแป้งสาลีที่อธิบายไว้ก่อนหน้านี้ คือ 24.22 และ 45.46 g/L ตามลำดับ รวมถึงความเข้มข้นของ นมผง น้ำตาลซูโครส กากถั่วเหลือง (SBM) และ KH_2PO_4 เท่ากับ 5, 15, 50 และ 0.5 g/L ตามลำดับ การผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสที่ทำนายได้ตามสมการที่ 2 คือ 1,071 U/mL ขณะที่ จากการทดลองได้ปริมาณอัลคาไลน์โปรติเอสเท่ากับ 1,528±1 U/mL ซึ่งมากกว่าปริมาณที่ทำนายไว้

เช่นเดียวกับผลของแป้งสาลีต่อการผลิตโปรติเอสโดย *B. pantotheneticus*, *B. licheniformis* N-2 และ *Bacillus* sp. I-312 ที่รายงานโดย Shikha *et al.* (2007) พบว่าจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารที่ประกอบด้วย แป้งสาลี yeast extract และ เปปโตนความเข้มข้นอย่างละ 10 g/L มีค่ากิจกรรมโปรติเอสเท่ากับ 71 U/mL นอกจากนี้ Joo และ Chang (2005) เลี้ยง *Bacillus* sp. I-312 ในอาหารที่ประกอบด้วย แป้งสาลี 10 g/L ร่วมกับส่วนประกอบอื่นๆ คือ กากถั่วเหลือง น้ำตาลฟรุกโตส K_2HPO_4, Na_2HPO_4, $CaCl_2$ และ Na_2CO_3 ความเข้มข้น 15, 5, 4, 1, 0.05 และ 8 g/L ตามลำดับ Ellouz *et al.* (2001) พบว่า ปลาป่น 10 g/L ช่วยเพิ่มการผลิตโปรติเอสได้ประมาณ 700 U/mL

หลังจาก ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการทดลองที่ 1 ได้อัลคาไลน์โปรติเอสความเข้มข้นเท่ากับ 1,152 U/mL ซึ่งต่ำกว่าปริมาณที่ได้รับจากสภาวะการทดลองที่ 2 ประมาณ 30 % โดยได้ความเข้มข้นของอัลคาไลน์โปรติเอสเท่ากับ 1,528 U/mL ดังนั้น ระหว่างการทดสอบสภาวะที่เหมาะสม ควรคัดเลือกสภาวะที่มีผลตอบสนองต่อความเข้มข้นที่สูงที่สุด โดยไม่คำนึงถึงระยะเวลาการบ่ม และการตอบสนองที่ได้รับจากการทดลองอื่นๆ ซึ่งอาจจะทำให้การผลิตเอ็นไซม์ช้าลง ดังนั้น สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอสโดย *B. subtilis* 405 คือ กากถั่วเหลือง นมผง ปลาป่น แป้งสาลี น้ำตาลซูโครส และ KH_2PO_4 ที่มีความเข้มข้น 50, 5, 24.22, 45.46, 15 และ 0.5 g/L ตามลำดับ