

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

กลุ่มวิจัย Microbial Fermentation Technology ที่ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มจร. ศึกษาการผลิต อัลคาไลน์ โปรติเอส จากรา *Aspergillus oryzae* U 1521 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงเพื่อการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส โดยวิธีพันธุ์วิศวกรรม และรายงานว่าการใช้ความเร็วรอบการกวนที่แตกต่างกัน และลักษณะหัวเชื้อ ที่แตกต่างกัน มีผลต่อสัณฐานวิทยาของ *Aspergillus oryzae* U1521 ในการหมักแบบอาหารเหลว (นกุล รัตนพันธุ์, 2547) โดยอัตราการกวนสูงจะให้ค่าการละลายของออกซิเจนได้ดีกว่าการกวนอัตราต่ำ เนื่องจากทำให้เกิดการกระจายของออกซิเจนเข้าสู่หมักอย่างรวดเร็ว ส่งผลต่อสัณฐานวิทยาที่ได้รับระหว่างการหมัก และมีผลต่อปริมาณการผลิตอัลคาไลน์โปรติเอส ปลดปล่อยสู่หมัก หรือกล่าวโดยสรุปคือ ปัจจัยที่ทำให้มีการผลิตอัลคาไลน์ โปรติเอสที่แตกต่างกัน ขึ้นกับสัณฐานวิทยาของราที่แตกต่างกันระหว่างการหมักนั่นเอง แต่โดยทั่วไป รูปแบบที่ราเจริญเป็นเพลเล็กระหว่างการหมัก ซึ่งเป็นรูปร่างที่ต้องการในระหว่างการหมัก ทำให้เกิดการจำกัดออกซิเจน ภายในเซลล์ได้ง่าย โดยเฉพาะ ถ้าเพลเล็ที่มีขนาดใหญ่ จะเกิดการจำกัดออกซิเจน ภายในเซลล์มาก การเพิ่มค่าการละลายของออกซิเจน (dissolved oxygen) ให้มากขึ้น เป็นหนทางหนึ่งของการเพิ่มผลผลิตอัลคาไลน์ โปรติเอสในราชชนิดนี้

การปรับสภาพบรรยากาศระหว่างการเลี้ยง รายงานว่ามีผลดี ในการทำให้กระบวนการเมตาบอลิซึมในพืชผักเปลี่ยนไป และทำให้เก็บผลิตภัณฑ์ได้นาน โดยคงความสดได้ ส่วนในจุลินทรีย์ยังมีการศึกษาน้อยมาก มีรายงานที่ศึกษาผลของออกซิเจน ต่อกระบวนการหมักในรา ในเรื่องการควบคุมหรือมีผลต่อรูปร่างระหว่างการผลิต เช่น พบการเจริญเป็นเพลเล็ทในสภาวะที่ขาดแคลนออกซิเจน ในขณะที่ออกซิเจนไม่จำกัด พบการเจริญเป็นเส้นใยปกติ (Hemmersdorfer และคณะ, 1987) และลักษณะ ดังกล่าวนี้อาจส่งผลต่อการผลิตโปรติเอสในปริมาณที่แตกต่างกัน (Ruohang และคณะ, 2004, Cui และคณะ, 1998)

เป็นที่ทราบกันดีว่า ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในราบางชนิด เช่น กลุ่ม dimorphic fungi โดยเฉพาะรา *Mucor rouxii* ที่พบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นยีสต์เซลล์ (yeast like cells) หรือจากงานวิจัยของ McIntyre และ McNeil (1997) ที่ว่าปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่างการหมักมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของรา *A. niger* A60 โดยปัจจัยดังกล่าวเป็นสภาวะกดดันที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของราเส้นใย

นอกเหนือจากนี้ มีรายงานของ Lopez และคณะ (2004) ศึกษาการเลี้ยงราในสภาพที่ใช้ก๊าซผสมระหว่างก๊าซออกซิเจนร้อยละ 80 และก๊าซไนโตรเจนร้อยละ 20 ต่อการผลิตสารปฏิชีวนะคือ lovastatin และรูปร่างของรา ใน *Aspergillus terreus* ATCC 20542 ซึ่งแสดงว่าการปรับสภาพบรรยากาศมีผลต่อรูปร่างลักษณะของราระหว่างการหมัก ซึ่งส่งผลต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ของ

จุลินทรีย์ ซึ่งจะเป็แนวทางที่ใช้ในการปรับปรุงการผลิตอัลคาไลน์โปรตีนในสายพันธุ์ปกติ คือ *Aspergillus oryzae* TISTR 3087 เพื่อให้เกิดการผลิตเอ็นไซม์อัลคาไลน์โปรตีนเพิ่มขึ้น

การเพิ่มผลผลิตทางชีวภาพจากจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่ดำเนินการโดยวิธีการปรับปรุงสายพันธุ์ คัดแปลงพันธุกรรมให้เกิดความผิดปกติ เพื่อให้มีการผลิตสารที่ต้องการเป็นจำนวนมาก โดยวิธีต่าง ๆ เช่น การกลายพันธุ์ (mutation) โดยใช้สาร mutagen ต่าง ๆ แต่วิธีที่นิยมใช้และให้ผลผลิตสูงคือวิธีทาง พันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) แต่ วิธีพันธุวิศวกรรม แม้จะเป็นวิธีที่ให้ผลแน่นอนและสูงใน ห้องปฏิบัติการ แต่ความยอมรับในตลาดผู้บริโภคเมื่อเป็นสินค้าผลิตจำหน่าย ยังน้อยมาก จนเป็น กระแสให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็น Non – GMO product ขึ้นในปัจจุบัน

โครงการวิจัยที่เสนอนี้ เป็นแนวทางการแก้ปัญหาการผลิตอัลคาไลน์โปรตีน จากรา *Aspergillus oryzae* สายพันธุ์ที่ได้รับการปรับปรุงวิธีการทางพันธุวิศวกรรม และได้รับการยอมรับว่า ผลิตอัลคาไลน์ โปรตีนได้สูง (วารินทร์ สมานธารณ์, 2544) โดยการเลือกใช้ *Aspergillus oryzae* TISTR 3087 สายพันธุ์ปกติ (wild type) แต่ใช้วิธีการปรุงกระบวนการเลี้ยงในสภาพบรรยากาศซึ่ง แตกต่างจากปกติ เพื่อให้เกิดเป็นสภาวะกดดัน ซึ่งจะทําให้ราชนิดนี้ เกิดการผลิตอัลคาไลน์ โปรตีน เพิ่มขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

ศึกษาปรับปรุงวิธีการผลิตอัลคาไลน์ โปรตีน โดยการปรับสภาพบรรยากาศระหว่างการหมัก จากสายพันธุ์ปกติคือ *Aspergillus oryzae* TISTR 3087 ในการหมักแบบอาหารเหลวในถังหมัก

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้วิธีการปรับปรุงการผลิตอัลคาไลน์โปรตีนจากจุลินทรีย์ โดยการปรับสภาพบรรยากาศ การเลี้ยงที่ควบคุมการแสดงออกทางสัณฐานวิทยา ซึ่งเป็นวิธีที่ช่วยทําให้เกิดการผลิตอัลคาไลน์โปรตีนได้สูงขึ้นในสายพันธุ์ปกติ โดยไม่ต้องใช้ราที่เป็นสายพันธุ์พันธุวิศวกรรม และสามารถใช้เป็นวิธี ในการพัฒนาการผลิตอัลคาไลน์ โปรตีนระดับอุตสาหกรรมต่อไป

2. ผลงานที่ได้สามารถเผยแพร่ได้ ทั้งในรูปแบบสิ่งตีพิมพ์ในวารสาร การประชุมวิชาการ ซึ่งเป็นองค์ความรู้ที่เป็นประโยชน์ต่อภาคอุตสาหกรรมและการวิจัย ซึ่งสามารถนำไปใช้ เพิ่มผลผลิตได้จริง