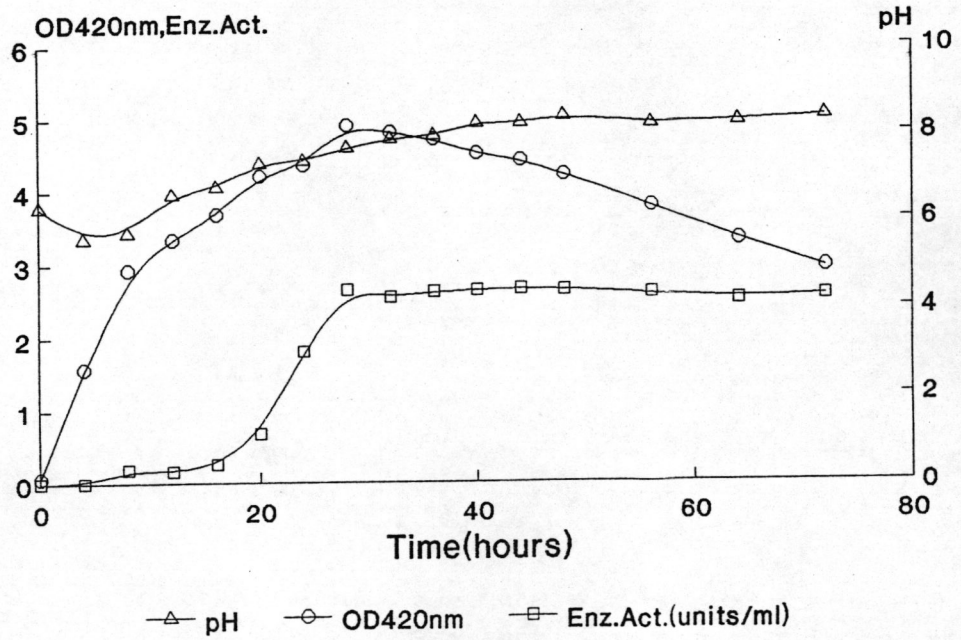
บทที่ 4

ผลการทดลอง

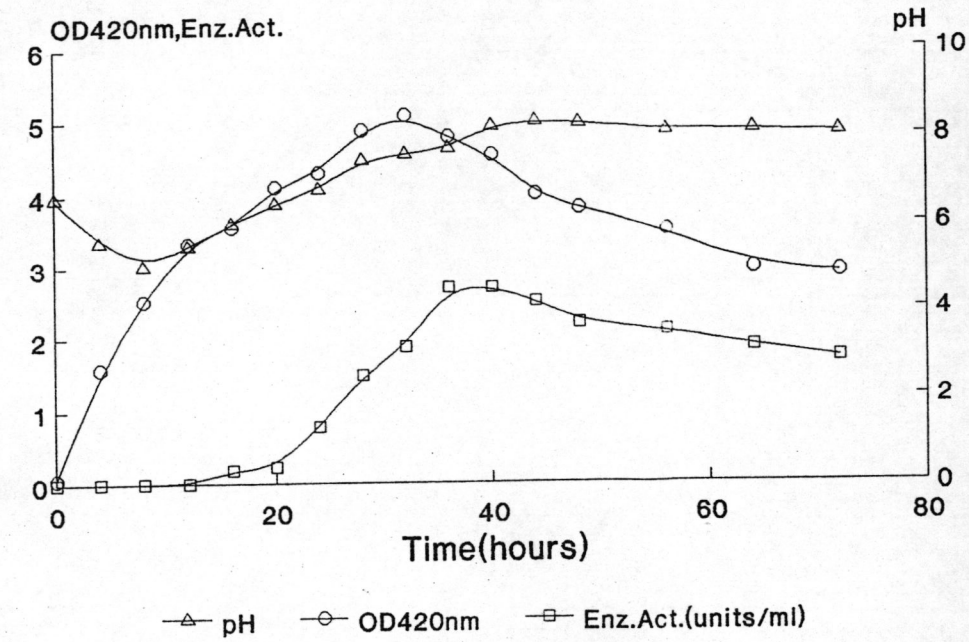
4.1 การหาสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25

การหาสูตรอาหารพื้นฐานเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสโดยเปรียบเทียบระหว่างสูตรอาหารสูตรที่ 1 และสูตรที่ 2 มีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) 2.0 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งไนโตรเจน รูปที่ 1 ก. และรูปที่ 1 ข. แสดงการเจริญของเชื้อ จะเห็นได้ว่าสูตรอาหารทั้งสูตรที่ 1 และสูตรที่ 2 เชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็วในระยะ 12 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ ต่อจากนั้นจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหรือค่อนข้างคงที่จนกระทั่งลดลงในที่สุด และสูตรอาหารทั้งสองทำให้เชื้อเจริญได้ดีพอๆกัน สำหรับการสร้างเอนไซม์ทั้งในอาหารสูตรที่ 1 และ 2 จะเห็นว่าในช่วง 8 ชั่วโมงแรกนั้นยังไม่มีการสร้างเอนไซม์และจะเริ่มสร้างเมื่ออัตราการเจริญของเชื้อคงที่ และมีการสร้างเอนไซม์สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 44 แอคติวิตีเอนไซม์ที่วัดได้จากอาหารสูตรที่ 1 และ 2 เท่ากับ 2.65 และ 2.70 ยูนิตต่อน้ำเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกัน เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลง pH ของอาหารทั้งสองสูตรแล้วก็มีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะเดียวกันคือ เมื่อเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อ pH ของระบบเท่ากับ 7.0 จากนั้นจะลดลงใน 8-12 ชั่วโมงแรกและค่อยๆเพิ่มขึ้นจนกระทั่งมี pH มากกว่า pH เริ่มต้นประมาณ 1 หน่วย pH ในวันที่สองของการเลี้ยงเชื้อ

จะเห็นได้ว่าสูตรอาหารทั้งสองสูตรให้ผลการเจริญของเชื้อ การสร้างเอนไซม์และรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH ไม่แตกต่างกัน แต่เนื่องจากสูตรอาหารสูตรที่ 1 ใช้ปริมาณแร่ธาตุใกล้เคียงกับสูตรที่ 2 แต่ใช้ชนิดของแร่ธาตุน้อยกว่า ดังนั้นจึงเลือกใช้สูตรอาหารสูตรที่ 1 เป็นสูตรอาหารพื้นฐานในการทดลองหาชนิดและปริมาณของวัตถุดิบที่เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนและไนโตรเจนต่อไป



รูปที่ 1ก. การเจริญ แอคติวิตีของเอนไซม์รีปรตีเอส และรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่ 1



รูปที่ 1ข. การเจริญ แอคติวิตีของเอนไซม์รีปรตีเอส และรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่ 2

4.2 การหา pH ที่เหมาะสมในการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์

การหา pH ที่เหมาะสมในการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 โดยเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหารพื้นฐานสูตรที่ 1 เสริมด้วยกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ สารสกัดจากยีสต์ 2.0 เปอร์เซนต์ จนครบ 48 ชั่วโมง นำเอาน้ำเลี้ยงเชื้อไปเหวี่ยงตกตะกอนแยกเซลล์ออกแล้วนำมาบ่มสารละลายบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ ที่เติมและไม่เติม EDTA 5 มิลลิโมลาร์ แล้วเติมเคซีน 0.5 เปอร์เซนต์ ที่ละลายในบัฟเฟอร์ pH ต่างๆ (pH 7.5-11.0 ตามวิธีในข้อ 3.6) และวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ ได้ผลดังตารางที่ 4 และรูปที่ 2 พบว่า ในกรณีที่เติม EDTA (ซึ่งเป็นสารยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอส) วัดแอคติวิตีได้สูงสุดที่ pH เท่ากับ 10.5 โดยที่แอคติวิตีจะเพิ่มขึ้นตั้งแต่ pH 7.5 จนสูงสุดที่ pH 10.5 และจะลดลงที่ pH 11.0 ส่วนในกรณีที่ไม่ได้เติม EDTA แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ pH 7.5 ถึง 8.5 จะสูงกว่าที่เติม EDTA แสดงให้เห็นว่านิวทรัลโปรตีเอสทำงานในช่วง pH นี้และถูกยับยั้งแอคติวิตีโดย EDTA จริง และที่ pH เท่ากับ 10.5 นั้นแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ทำการทดลองในทั้งสองสภาวะมีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้น pH ที่เหมาะสมในการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B.sutilis* TISTR 25 คือ pH 10.5 การทดลองขั้นต่อไปจึงตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ pH 10.5

4.3 การคัดเลือกวัตถุดิบที่เหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน

4.3.1 การหาชนิดของวัตถุดิบที่เหมาะสม

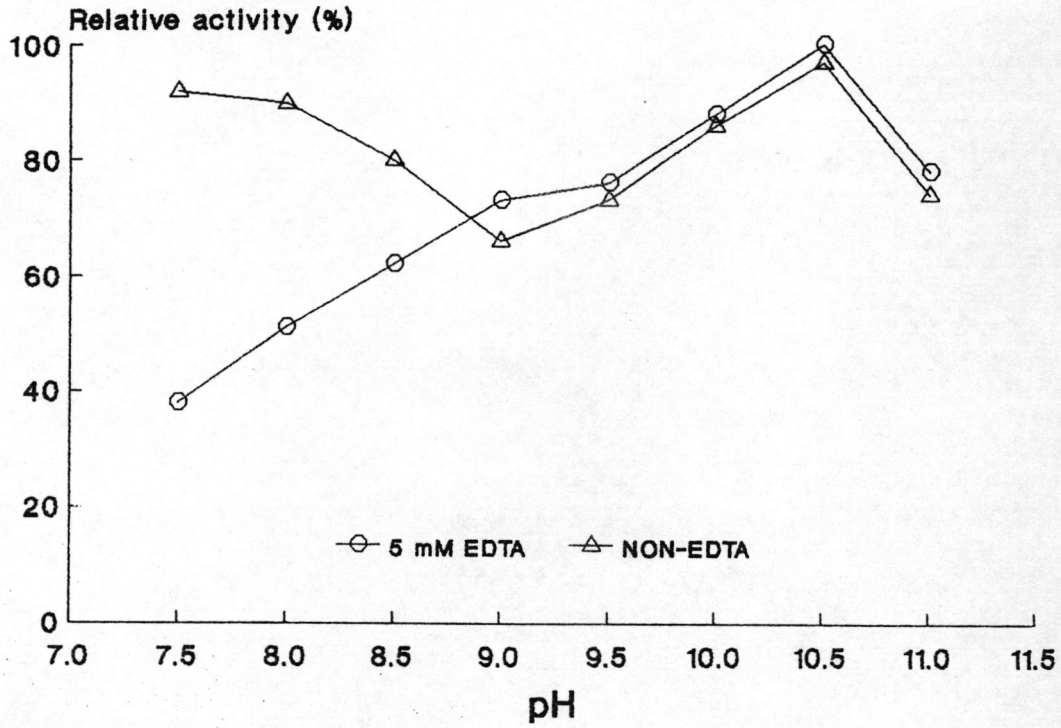
การหาชนิดของวัตถุดิบที่เหมาะสมทำโดยใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นตัวศึกษาหาปริมาณที่จะใช้ก่อนที่จะคัดเลือกชนิดของวัตถุดิบ แปรผันปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ดังนี้ คือ 0.1, 1.0, 2.0 และ 3.0 เปอร์เซนต์ เลี้ยงเชื้อติดตามการเจริญและการสร้างเอนไซม์ ได้ผลดังรูปที่ 3 ก.,3ข.และ3 ค. ซึ่งพบว่าการเติมสารสกัดจากยีสต์ 0.1-2.0 เปอร์เซนต์ เชื้อมีการเจริญใกล้เคียงกันและเป็นลักษณะเดียวกัน คือ มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 8-12 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ และเจริญสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 จากนั้นจะลดต่ำลงแต่

i17655354

ตารางที่ 4 ผลของ pH ในการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสจากเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 (บัฟเฟอร์ที่ใช้ : ฟอสเฟต pH 7.5-8.0, ทรีส-ไฮโดรคลอไรด์ pH 8.5-9.0, คาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนต pH 9.5-11.0)

pH	ไม่เติม EDTA		เติม EDTA 5 mM	
	activity (U/ml)	relative activity (%)	activity (U/ml)	relative activity (%)
7.5	2.54	92.0	1.05	38.0
8.0	2.48	90.0	1.40	51.0
8.5	2.21	80.0	1.70	62.0
9.0	1.84	66.9	2.00	73.0
9.5	2.01	73.0	2.09	76.0
10.0	2.37	86.0	2.42	88.0
10.5	2.68	97.0	2.75	100.0
11.0	2.03	74.0	2.14	78.0

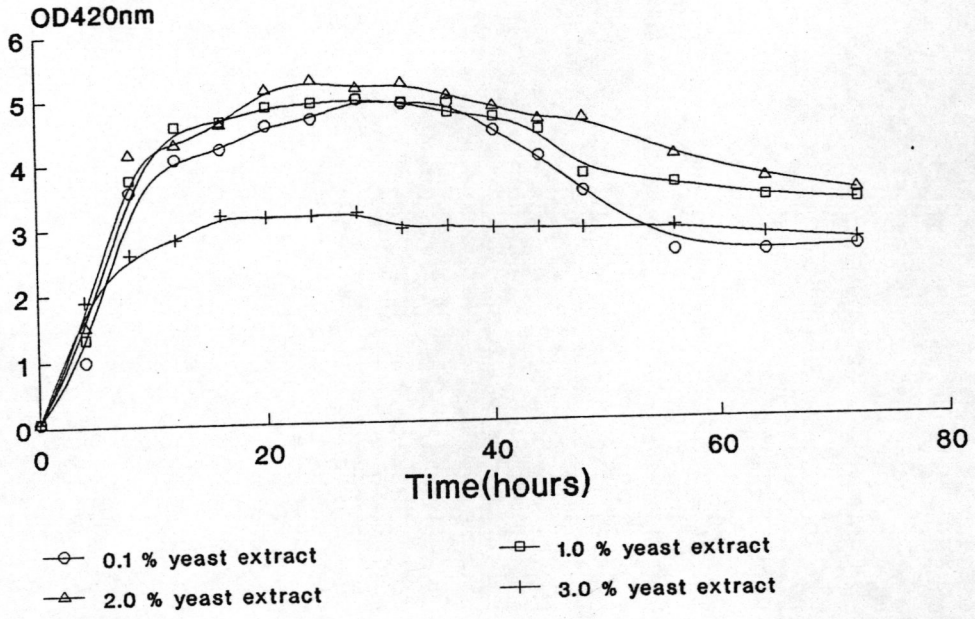
** Activity of Protease 2.75 U/ml = 100 %



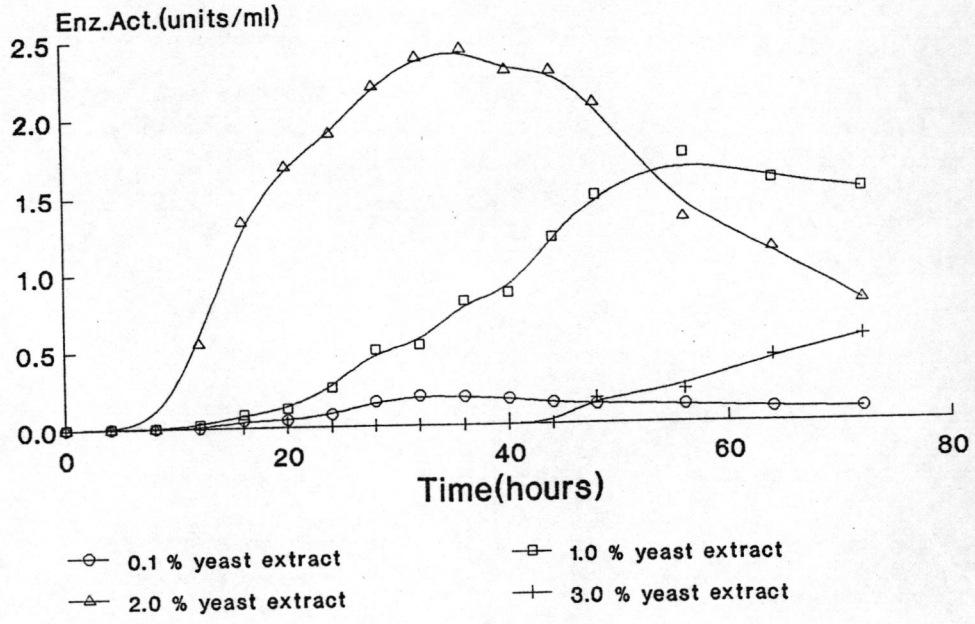
รูปที่ 2 ค่า pH ที่เหมาะสมในการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยเปรียบเทียบระหว่างการเติม EDTA 5 mM กับ ไม่เติม EDTA

ถ้าเติมสารสกัดจากยีสต์ 3.0 เปอร์เซนต์การเจริญของเชื้อถึงแม้จะมีรูปแบบเหมือนเดิมแต่เจริญได้น้อยกว่าอย่างเห็นได้ชัด เมื่อพิจารณาการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ พบว่าที่ปริมาณของสารสกัดจากยีสต์เท่ากับ 2.0 เปอร์เซนต์ จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสสูงที่สุด โดยที่แอคติวิตีของเอนไซม์ที่เชื้อสามารถผลิตได้เท่ากับ 2.42 ยูนิตต่อ 1 มิลลิลิตร ประมาณชั่วโมงที่ 32 การใส่สารสกัดจากยีสต์ต่ำหรือสูงเกินไปมีผลทำให้แอลคาไลน์โปรตีเอสแอคติวิตีต่ำมาก การเปลี่ยนแปลง pH มีลักษณะใกล้เคียงกัน

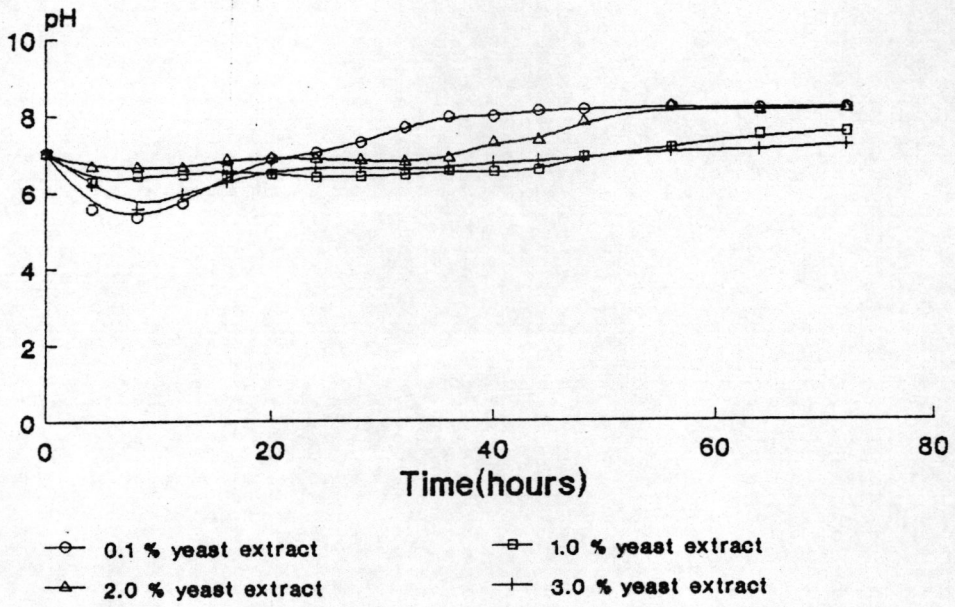
ในการคัดเลือกชนิดของวัตถุดิบที่เหมาะสมจะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ทดลองใช้ กากถั่วเหลือง, กากเมล็ดทานตะวัน, กากมะพร้าว, วีทกลูเตน, คอร์นกลูเตน และคอร์นสตีพลิเคอร์ แทนสารสกัดจากยีสต์ในปริมาณที่ใช้ คือ 2.0 เปอร์เซนต์ และเปรียบเทียบผลกับสารสกัดจากยีสต์ ดังแสดงในรูปที่ 4ก.,4ข.และ 4ค. กากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวันที่ย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริก (ตามวิธีทดลองในข้อ 3.1.3) จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวัตถุดิบชนิดอื่น โดยที่กากถั่วเหลืองจะให้ค่าแอคติวิตีเท่ากับ 2.66 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และกากเมล็ดทานตะวันให้ค่าแอคติวิตีเท่ากับ 2.27 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่กากมะพร้าวมีอัตราการเจริญต่ำมากและไม่สามารถสร้างเอนไซม์ได้เลย (ไม่ได้แสดงผลในรูป) วัตถุดิบชนิดอื่น ได้แก่ วีทกลูเตน คอร์นกลูเตน คอร์นสตีพลิเคอร์ และ สารสกัดจากยีสต์ เมื่อเปรียบเทียบการเจริญและการเปลี่ยนแปลง pH ของเชื้อแล้วมีความแตกต่างกันไม่มาก และจากการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนรวมในวัตถุดิบทุกชนิดดังตารางที่ 5 จะเห็นว่าวีทกลูเตนและคอร์นกลูเตนที่ผ่านการย่อยสลายด้วยกรดมีปริมาณไนโตรเจนสูงกว่ากากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวัน รวมทั้งปริมาณโปรตีนก็สูงกว่าด้วย แต่เอนไซม์ที่ได้น้อยกว่าการใช้กากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวัน แสดงว่าชนิดหรือส่วนประกอบของวัตถุดิบมีความสำคัญต่อการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ และถ้าเปรียบเทียบกับการใช้วัตถุดิบที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยกรด (เตรียมโดยวิธีที่ 1 ข้อ 3.1.3) จากรูปที่ 5 ก., 5 ข. และ 5ค. จะพบว่าการใช้กากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวันที่ย่อยด้วยกรดจะให้ผลดีกว่าทั้งในด้านการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ การเปลี่ยนแปลง pH มีลักษณะไม่ต่างกับการใช้กรดย่อยสลาย จึงเลือกกากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวันที่ผ่านการย่อยสลายด้วยกรดไปใช้ในการทดลองผสมวัตถุดิบต่อไป



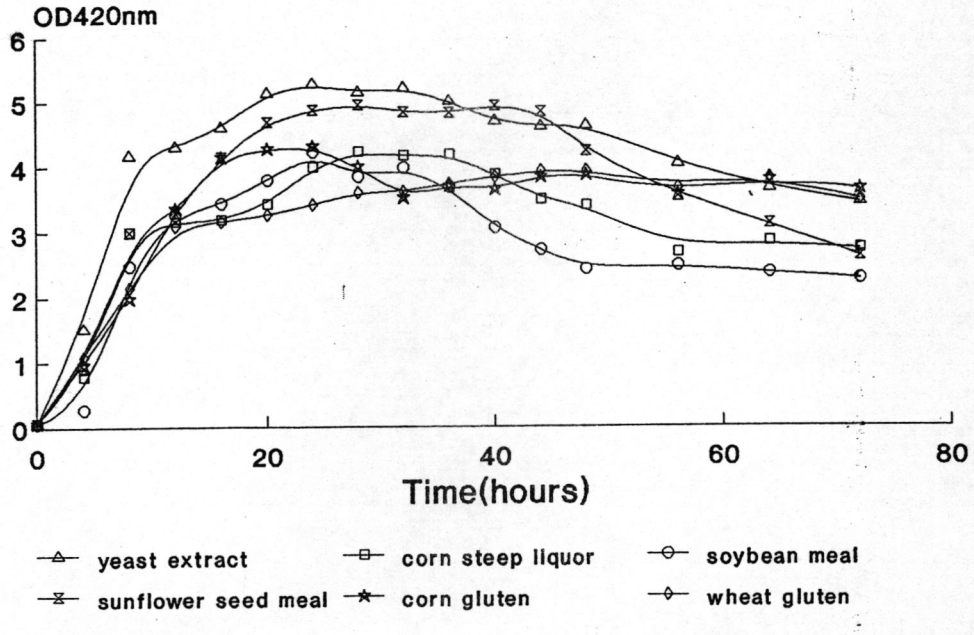
รูปที่ 3ก. เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนในปริมาณต่างๆ



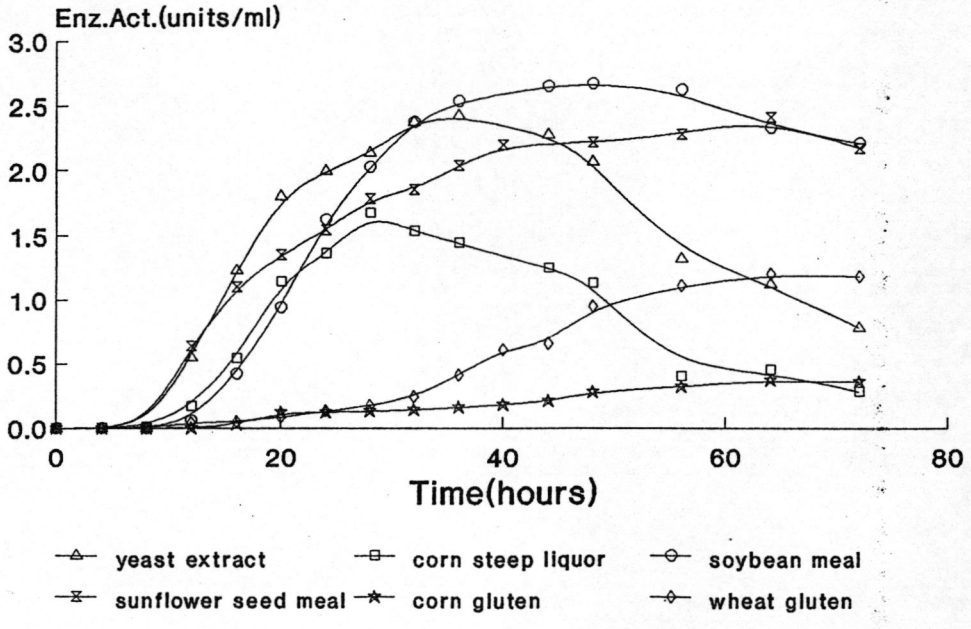
รูปที่ 3ข. เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนในปริมาณต่างๆ



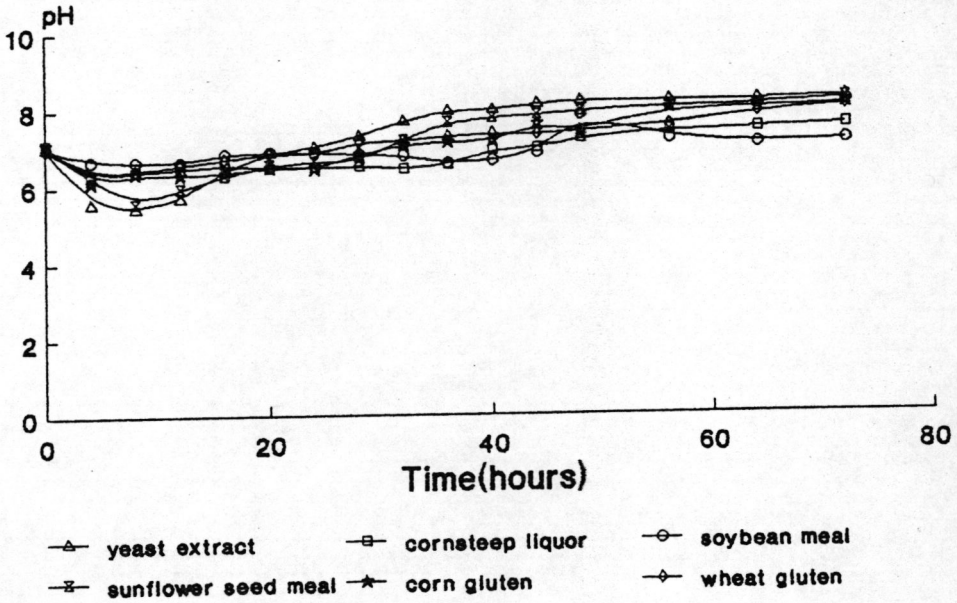
รูปที่ 3ค. เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลง pH เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนในปริมาณต่างๆ



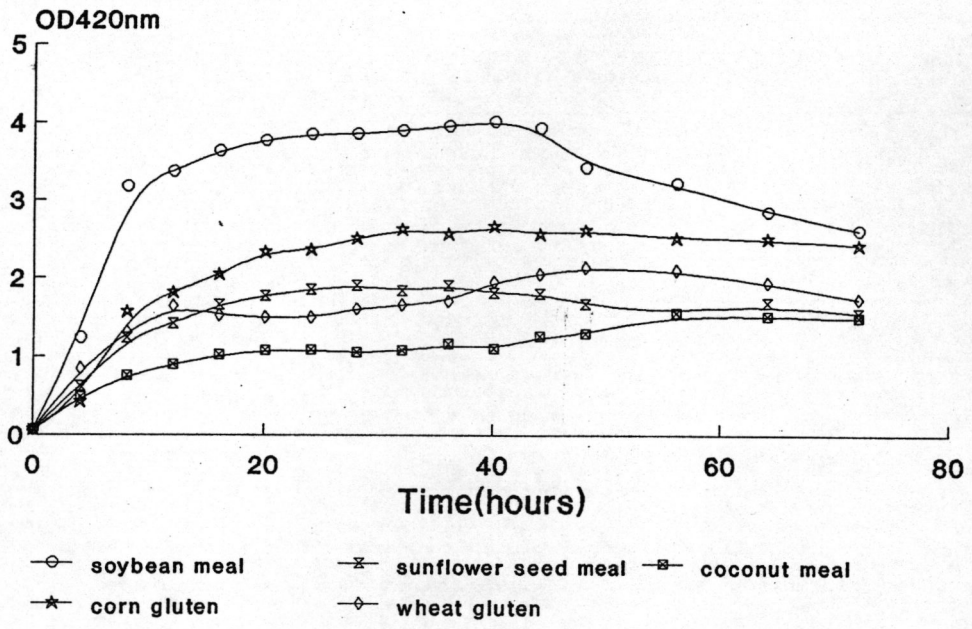
รูปที่ 4ก. เปรียบเทียบการเจริญของ *B.subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี 2 เปอร์เซนต์ สารสกัดจากยีสต์ หรือวัตถุดิบชนิดต่างๆซึ่งย่อยสลายด้วยกรดเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน



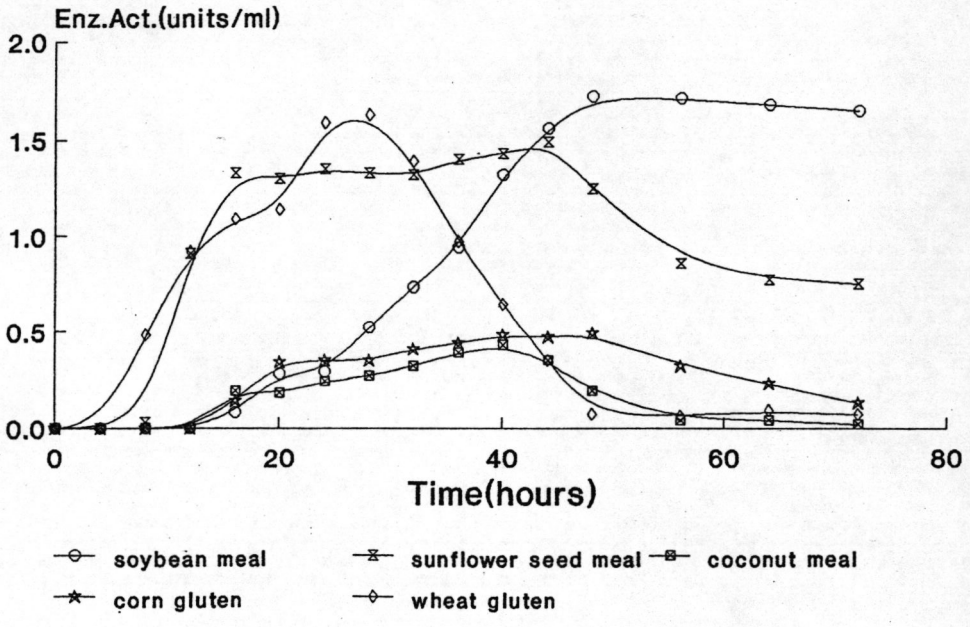
รูปที่ 4ข. เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *B.subtilis* TISTR 25 ในอาหารที่มี 2 เปอร์เซนต์ สารสกัดจากยีสต์ หรือวัตถุดิบชนิดต่างๆ ซึ่งย่อยสลายด้วยกรดเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน



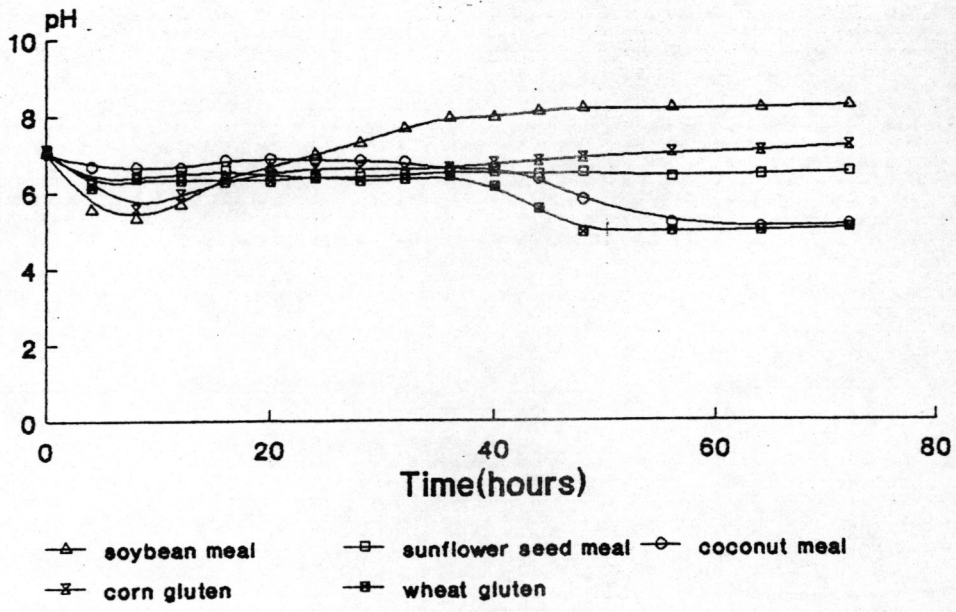
รูปที่ 4ค. เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลง pH ที่ได้จาก *B.subtilis* TISTR 25 ในอาหารที่มี 2 เปอร์เซนต์ สารสกัดจากยีสต์ หรือวัตถุดิบชนิดต่างๆ ซึ่งย่อยสลายด้วยกรดเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน



รูปที่ 5ก. เปรียบเทียบการเจริญของ *B.subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบชนิดต่างๆที่ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยกรดเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน



รูปที่ 5ข. เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *B.subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบชนิดต่างๆที่ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยกรดเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน



รูปที่ 5ค. เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลง pH ของเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบชนิดต่างๆที่ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยกรดเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนรวมและโปรตีนทั้งหมด ของวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน

วัตถุดิบ	ปริมาณไนโตรเจนรวม (%)		ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (%)
	วิธี A	วิธี B	
1. สารสกัดจากยีสต์	n	8.90	55.63
2. คอร์นสตีพลิเคอร์	n	3.70	23.13
3. กากถั่วเหลือง	6.04	4.33	46.40
4. กากเมล็ดทานตะวัน	4.59	1.01	29.70
5. กากมะพร้าว	2.20	0.34	20.40
6. วีทกลูเตน	7.76	1.08	78.40
7. คอร์นกลูเตน	6.75	0.75	63.50

A = นำวัตถุดิบที่ย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริก 1.0 นอร์มอล นำไปนึ่งด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 40 นาที

B = นำวัตถุดิบไปนึ่งด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

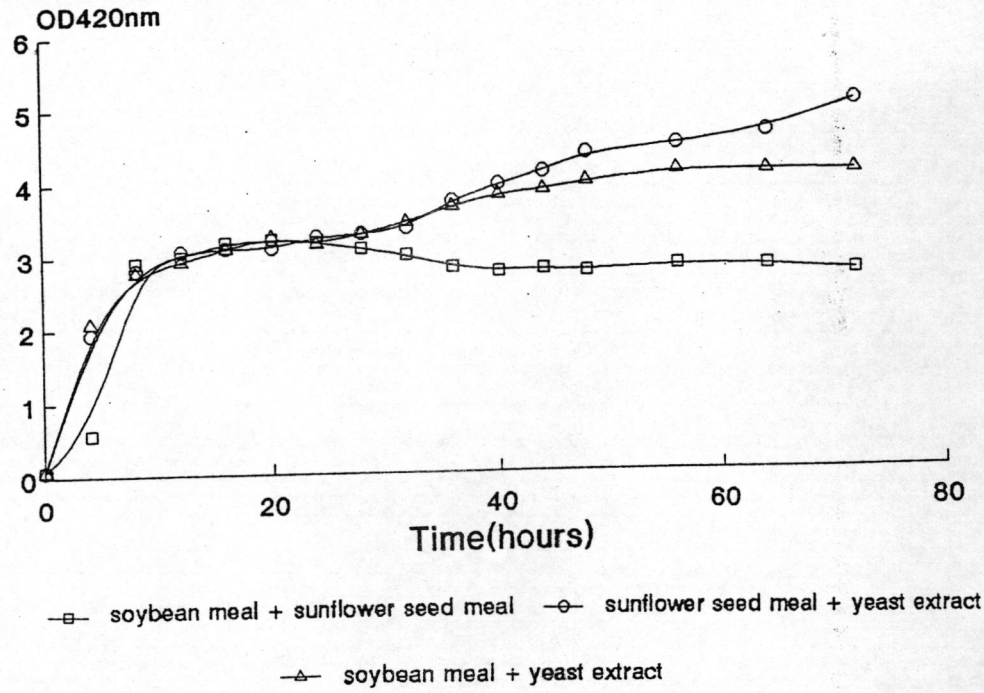
n = ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

4.3.2 การศึกษาผลของการใช้วัตถุดิบผสม

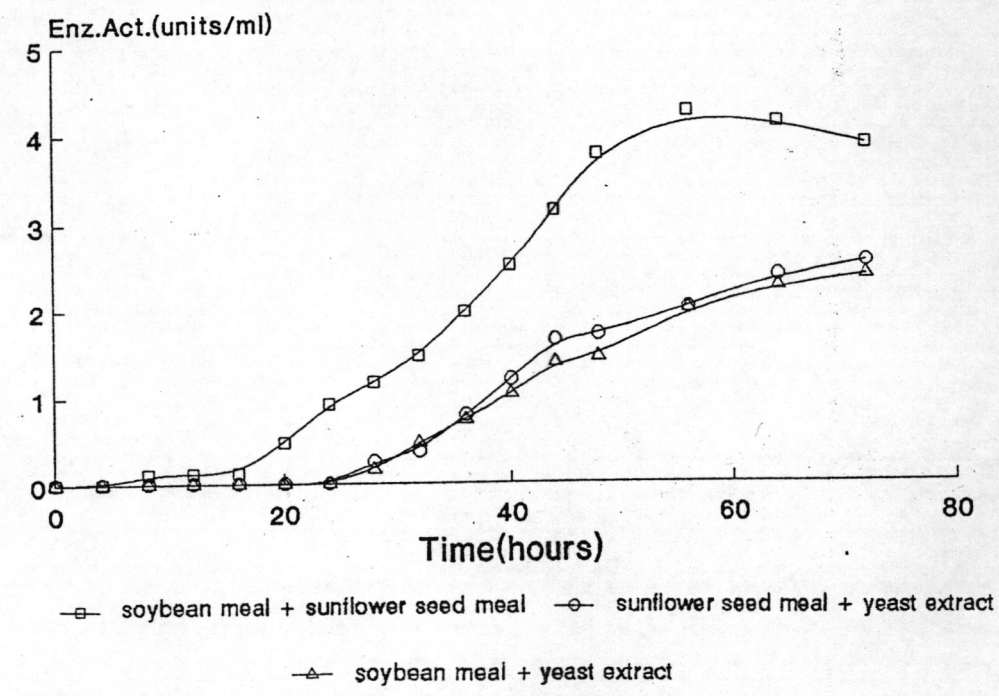
เลือกวัตถุดิบที่ใช้ได้ผลดีจากข้อ 3.1 มาผสมกัน วัตถุดิบผสมที่ทดลองได้แก่ กากถั่วเหลืองกับเมล็ดทานตะวัน กากถั่วเหลืองกับสารสกัดจากยีสต์ และกากเมล็ดทานตะวันกับสารสกัดจากยีสต์ โดยผสมกันในอัตราส่วน 1:1 และให้มีปริมาณสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 2 เปอร์เซนต์ ทำการเลี้ยงเชื้อติดตามการเจริญและการสร้างเอนไซม์ ผลการทดลองในรูปที่ 6 ก.และ6 ข. พบว่ากากถั่วเหลืองผสมกับสารสกัดจากยีสต์มีผลทำให้เชื้อเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรก และจะค่อยเพิ่มทีละน้อยคล้ายกับผลการทดลองในข้อที่ 3.1 แต่การสร้างเอนไซม์ของเชื้อจะช้าคือเริ่มสร้างเมื่อเลี้ยงเชื้อไปได้แล้วถึง 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในข้อที่ 3.1 (รูปที่ 4 ก.และ 4 ข.) ซึ่งพบว่าการใช้วัตถุดิบเพียงชนิดเดียว คือ กากถั่วเหลืองหรือสารสกัดจากยีสต์ เชื้อจะเริ่มสร้างเอนไซม์ที่ประมาณชั่วโมงที่ 12 เท่านั้น สำหรับวัตถุดิบผสมระหว่างกากเมล็ดทานตะวันและสารสกัดจากยีสต์ ก็ให้ผลเช่นเดียวกันทั้งในด้านการเจริญและการสร้างเอนไซม์

เมื่อพิจารณาถึงการใช้กากถั่วเหลืองผสมกับกากเมล็ดทานตะวัน พบว่าการสร้างเอนไซม์จะดีกว่าโดยจะเริ่มมีการสร้างเอนไซม์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8-12 และจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนมีแอคติวิตีสูงที่สุดเท่ากับ 3.85 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับผลของการใช้กากถั่วเหลืองผสมกับสารสกัดจากยีสต์ หรือกากเมล็ดทานตะวันผสมกับสารสกัดจากยีสต์ จะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าการใช้กากถั่วเหลืองผสมกับกากเมล็ดทานตะวันในอัตราส่วน 1:1 ปริมาณ 2.0 เปอร์เซนต์ จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงกว่าและการสร้างเอนไซม์จะเร็วกว่าในขณะที่การเปลี่ยนแปลงทางด้านการเจริญและ pH (รูปที่ 6 ก.และ 6 ค.) มีความใกล้เคียงกัน

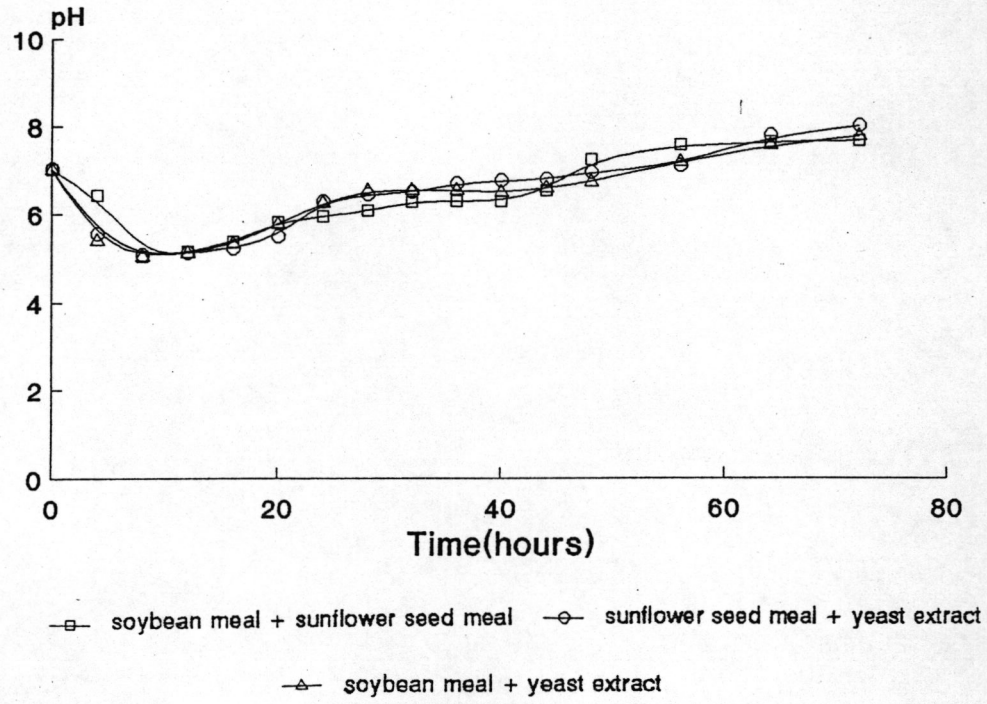
เมื่อเปรียบเทียบการใช้วัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองและกากเมล็ดทานตะวันกับการใช้วัตถุดิบเพียงชนิดเดียว คือ กากถั่วเหลือง หรือกากเมล็ดทานตะวัน ในปริมาณ 2.0 เปอร์เซนต์เท่ากัน ในด้านการเจริญและการสร้างเอนไซม์ (รูปที่ 6 ก., 6 ข., 4 ก.และ 4 ข.) จะพบว่าการใช้วัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันในอัตราส่วน 1:1 ปริมาณ 2.0 เปอร์เซนต์ การเจริญจะค่อนข้างคงที่กว่าในช่วงหลังจาก 12 ชั่วโมงไปแล้ว แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้สูงกว่าการใช้กากถั่วเหลืองหรือกากเมล็ดทานตะวันเพียงชนิดเดียวในปริมาณที่เท่ากัน



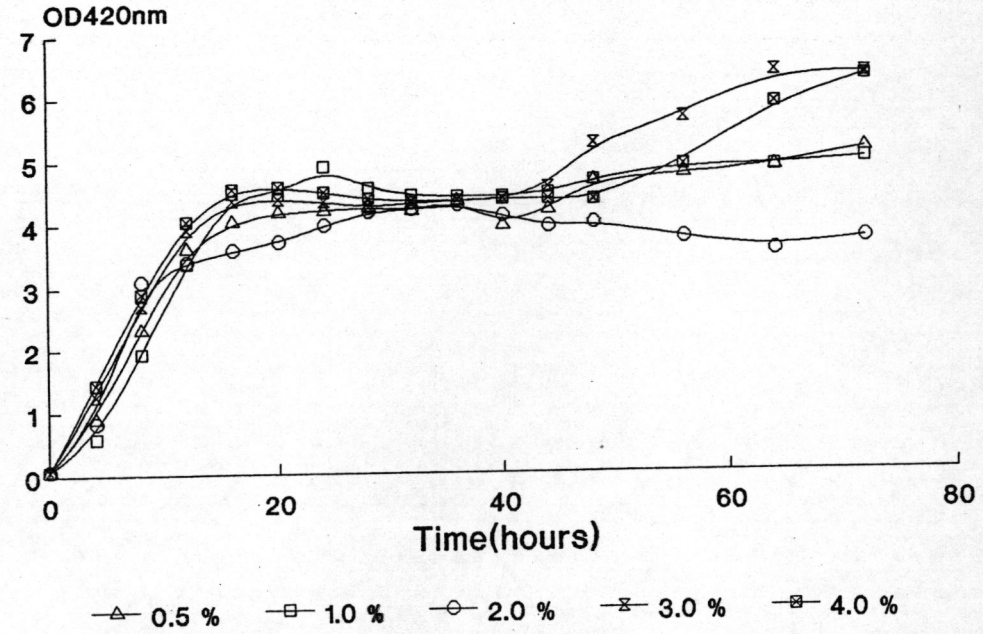
รูปที่ 6ก. เปรียบเทียบการเจริญของ *B.subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมชนิดต่างๆเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน



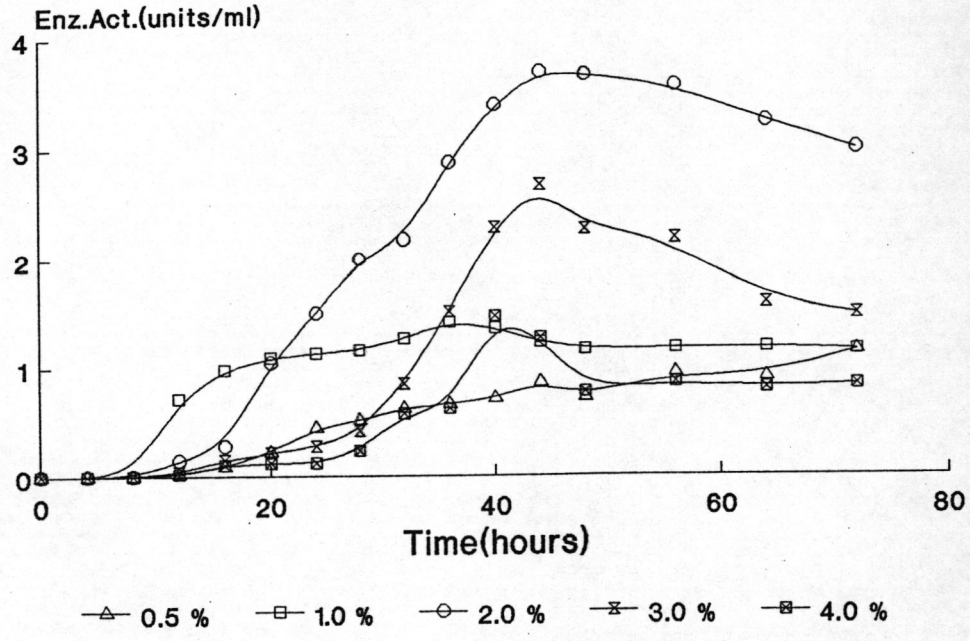
รูปที่ 6ข. เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *B.subtilis* TISTR 25 ในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมชนิดต่างๆเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน



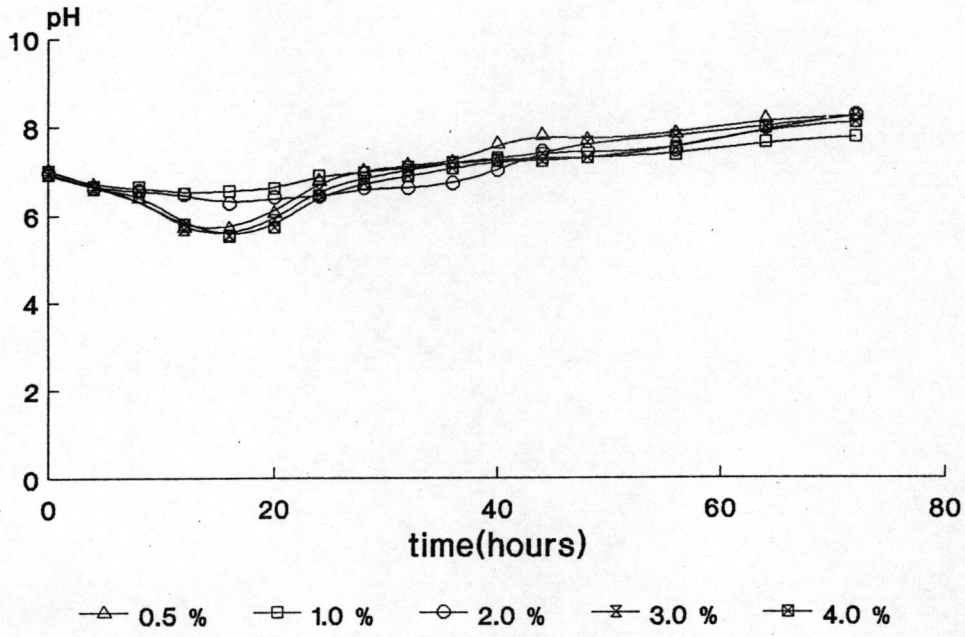
รูปที่ 6ค. เปรียบเทียบรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH ระหว่างการเลี้ยง *B.subtilis* TISTR 25 ในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมชนิดต่างๆเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน



รูปที่ 7ก. เปรียบเทียบการเจริญของ *B.subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนในปริมาณต่างๆ



รูปที่ 7ข. เปรียบเทียบแอคติวิตีเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *B.subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนในปริมาณต่างๆ



รูปที่ 7ค. เปรียบเทียบรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH ระหว่างการเลี้ยง *B.subtilis* TISTR 25 ในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนในปริมาณต่างๆ

4.3.3 การหาปริมาณของวัตถุดิบที่เหมาะสม

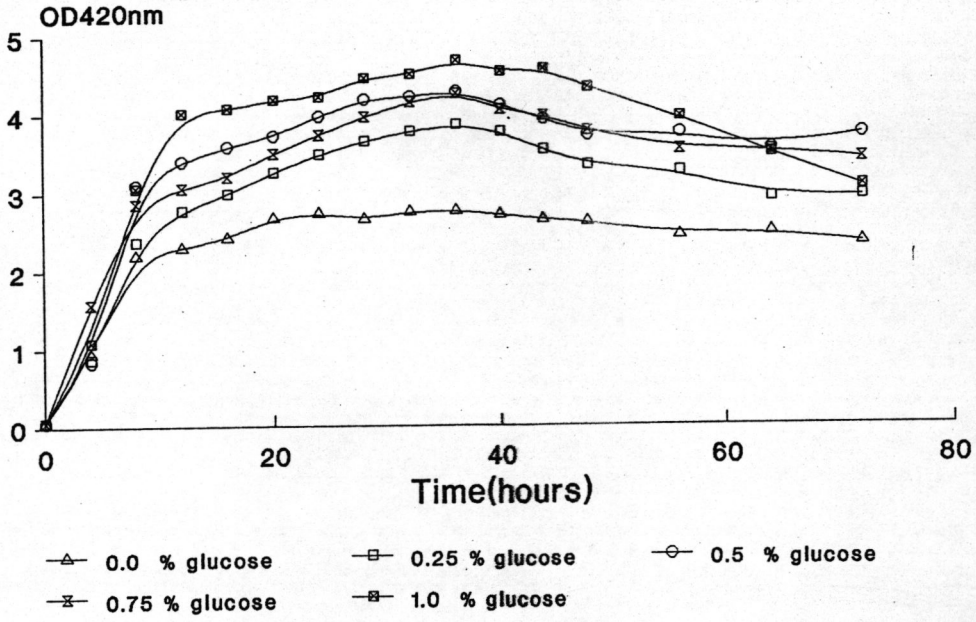
เมื่อหาชนิดของวัตถุดิบที่เหมาะสมได้แล้วก็จะหาปริมาณของวัตถุดิบผสมที่จะใช้เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนโดยทำการศึกษาแปรผันปริมาณของวัตถุดิบผสมดังนี้ คือ 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 เปอร์เซนต์ มีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน ทำการเลี้ยงเชื้อที่สภาวะเดียวกับการทดลองที่ผ่านมา ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 7 ก.และ7 ข. จะเห็นว่าปริมาณของวัตถุดิบผสมที่ใช้เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนตั้งแต่ 0.5-2.0 เปอร์เซนต์ เมื่อมีปริมาณมากขึ้น ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้มีค่าสูงขึ้นตามลำดับของปริมาณวัตถุดิบที่ใช้เพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณของวัตถุดิบเป็น 3.0 และ 4.0 เปอร์เซนต์ ปรากฏว่าแอคติวิตีที่ได้มีค่าต่ำลงทันที และต่ำลงมากที่ปริมาณของวัตถุดิบเท่ากับ 4.0 เปอร์เซนต์ ในขณะที่การเจริญของเชื้อที่ปริมาณวัตถุดิบต่างกันนั้นมีการเจริญไม่แตกต่างกันมากภายใน 40 ชั่วโมงแรก แต่หลังจาก 40 ชั่วโมงไปแล้วนั้น ที่ความเข้มข้นหรือปริมาณของวัตถุดิบผสม 3.0 และ 4.0 เปอร์เซนต์ มีการเจริญเพิ่มขึ้น แต่ที่ความเข้มข้นของวัตถุดิบเป็น 2.0 เปอร์เซนต์ การเจริญจะค่อนข้างคงที่หรือลดลงเล็กน้อย สำหรับการเปลี่ยนแปลง pH เมื่อใช้วัตถุดิบผสมในปริมาณต่างๆกันพบว่า ไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 7 ค.)

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การเพิ่มปริมาณของวัตถุดิบผสมไม่สามารถเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ได้เสมอไปและความเข้มข้นหรือปริมาณของวัตถุดิบที่เหมาะสมในการทดลองที่ได้ คือ 2.0 เปอร์เซนต์ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงใช้วัตถุดิบผสมระหว่าง กากถั่วเหลือง และกากเมล็ดทานตะวัน ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาณ 2.0 เปอร์เซนต์ทำการทดลองขั้นต่อไป

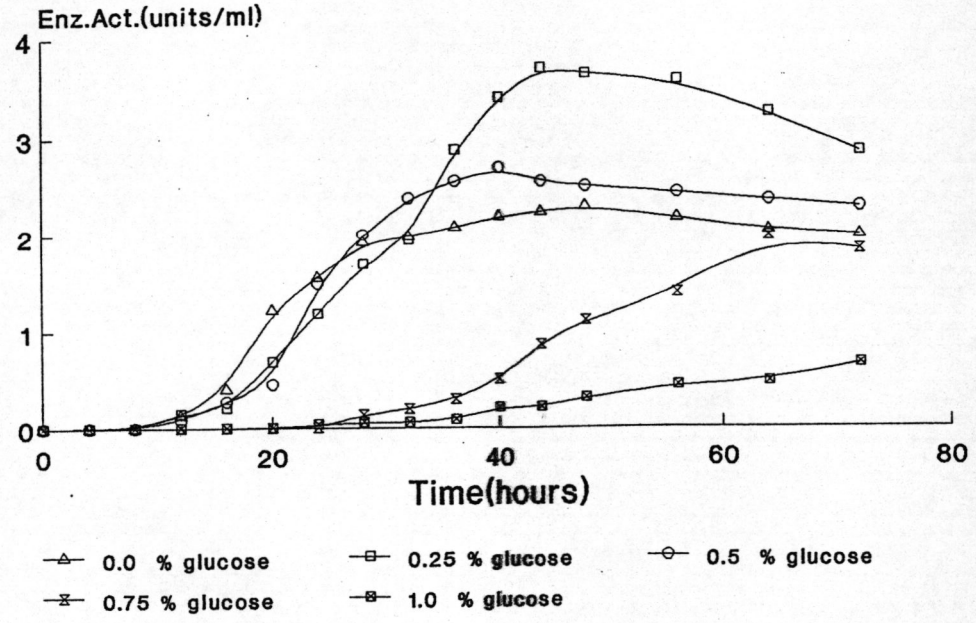
4.4 การคัดเลือกวัตถุดิบที่เหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

4.4.1 การหาชนิดของวัตถุดิบที่เหมาะสม

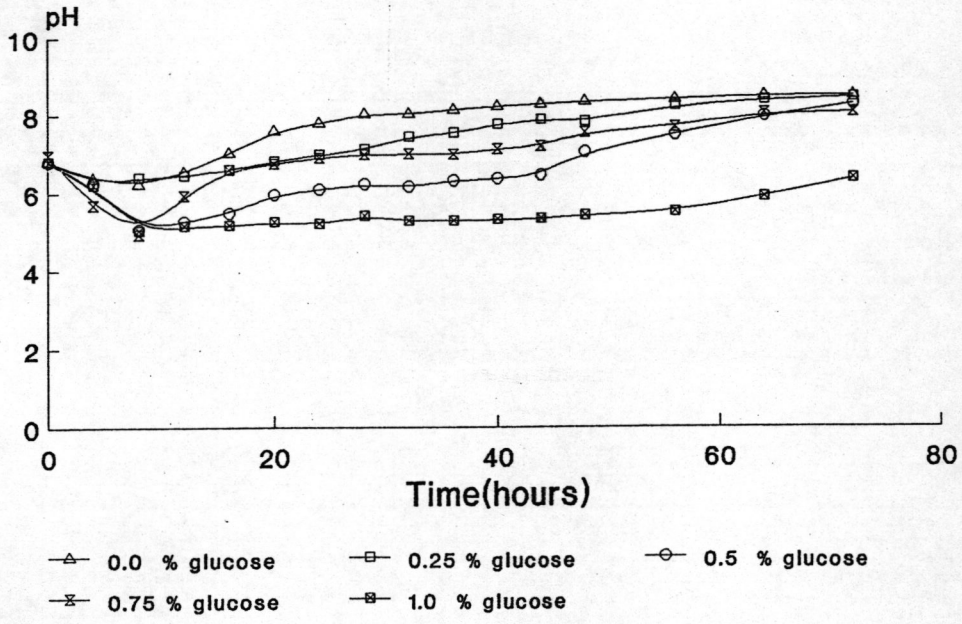
การหาชนิดของวัตถุดิบที่เหมาะสมทำโดยใช้กลูโคสเป็นตัวศึกษาหาปริมาณที่จะใช้ก่อนที่จะคัดเลือกชนิดของวัตถุดิบ ทำการแปรผันปริมาณกลูโคสดังนี้ 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 เปอร์เซนต์ เลี้ยงเชื้อติดตามการเจริญ หาแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้ และศึกษารูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH ซึ่งจากผลการทดลองรูปที่ 8 ก., 8 ข.และ 8 ค.พบว่า



รูปที่ 8ก. เปรียบเทียบการเจริญของ *B.subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในปริมาณต่างๆ



รูปที่ 8ข. เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *B.subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในปริมาณต่างๆ

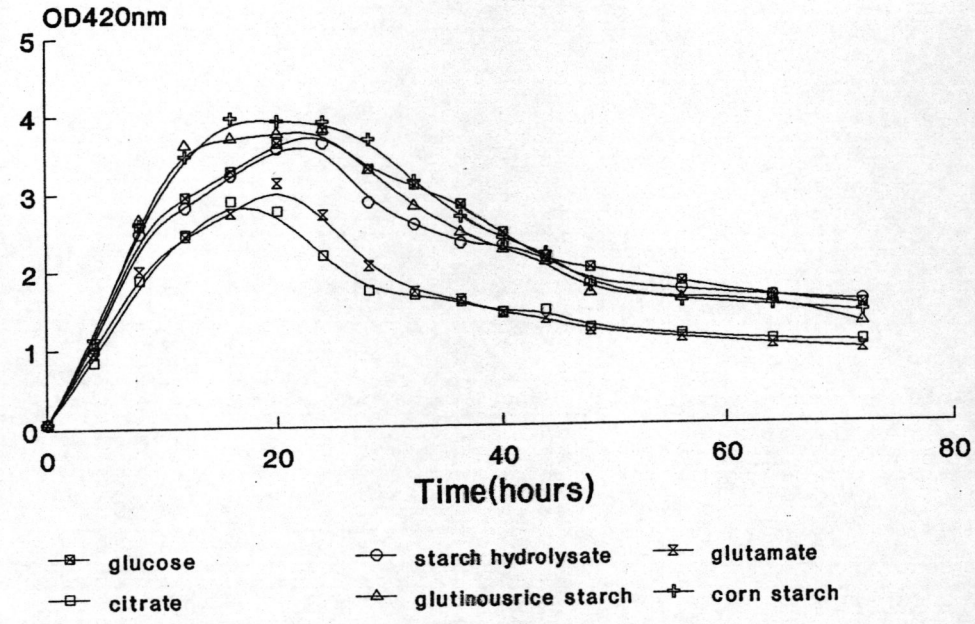


<u>รูปที่ 8ค.</u> เปรียบเทียบรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH ระหว่างการเลี้ยง *B.subtilis* TISTR 25 ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในปริมาณต่างๆ

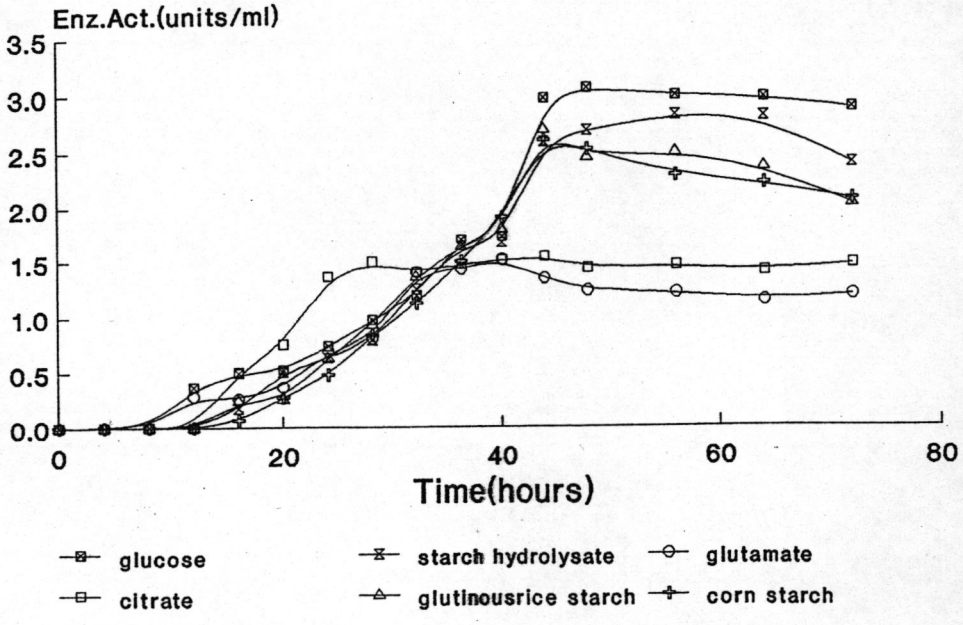
ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมกลูโคสเลย เชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 สามารถเจริญและสร้างเอนไซม์ได้ มีแอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 2.45 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมกลูโคสในปริมาณ 0.25 เปอร์เซนต์ พบว่าเชื้อสามารถเจริญและสร้างเอนไซม์ได้สูงกว่าโดยมีแอคติวิตีเท่ากับ 3.69 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อเพิ่มปริมาณของกลูโคสเป็น 0.5 0.75 และ 1.0 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ การเจริญของเชื้อจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยแต่การสร้างเอนไซม์ของเชื้อกลับลดลงตามปริมาณของกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 สามารถใช้กลูโคสในการเจริญและสร้างเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสได้ในปริมาณที่เหมาะสมคือ 0.25 เปอร์เซนต์กลูโคส และการสร้างเอนไซม์ของเชื้อจะสูงสุดประมาณชั่วโมงที่ 44-48 ส่วนการเปลี่ยนแปลง pH เมื่อใช้ 0.25 เปอร์เซนต์กลูโคส จะมีความใกล้เคียงกับไม่ใส่กลูโคส ในการทดลองต่อไปที่จะคัดเลือกชนิดของวัตถุดิบจึงใช้ปริมาณของวัตถุดิบที่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนปริมาณเท่ากับ 0.25 เปอร์เซนต์โดยวัตถุดิบที่ใช้ในการทดลองเปรียบเทียบกับกลูโคส ได้แก่ ไฮโดรไลเสทของแป้งมันสำปะหลัง, กลูตาเมท, ซิเตรท, แป้งข้าวเหนียว และแป้งข้าวโพด โดยใช้ในปริมาณ 0.25 เปอร์เซนต์ เท่ากันหมด

จากผลการทดลองรูปที่ 9 ก. และ 9 ค. พบว่าการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชนิดของแหล่งคาร์บอนต่างกัน มีการเจริญและการเปลี่ยนแปลง pH ไม่แตกต่างกันนักแต่แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้จากการใช้สารต้นตอคาร์บอนต่างกัน (รูปที่ 9 ข.)โดยเมื่อพิจารณาในช่วง 40 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้จะไม่แตกต่างกัน แต่จะเริ่มแตกต่างกันที่ชั่วโมงที่ 44 เป็นต้นไป ซึ่งจะสังเกตเห็นว่า แอคติวิตีของเอนไซม์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกได้แก่ กลุ่มที่เสริมด้วยกลูตาเมท และซิเตรท กลุ่มที่สองได้แก่ กลุ่มที่เสริมด้วยกลูโคส, ไฮโดรไลเสทของแป้งมันสำปะหลัง, แป้งข้าวเหนียวและแป้งข้าวโพด โดยในกลุ่มที่สองจะมีแอคติวิตีของเอนไซม์สูงกว่าในกลุ่มแรกประมาณเท่าตัว และวัตถุดิบในกลุ่มที่สองนี้ส่วนใหญ่จะเป็นสารประเภทคาร์โบไฮเดรท ซึ่งให้ผลไม่ต่างกันนัก จึงเลือกใช้แป้งข้าวเหนียวเนื่องจากราคาถูกที่สุด

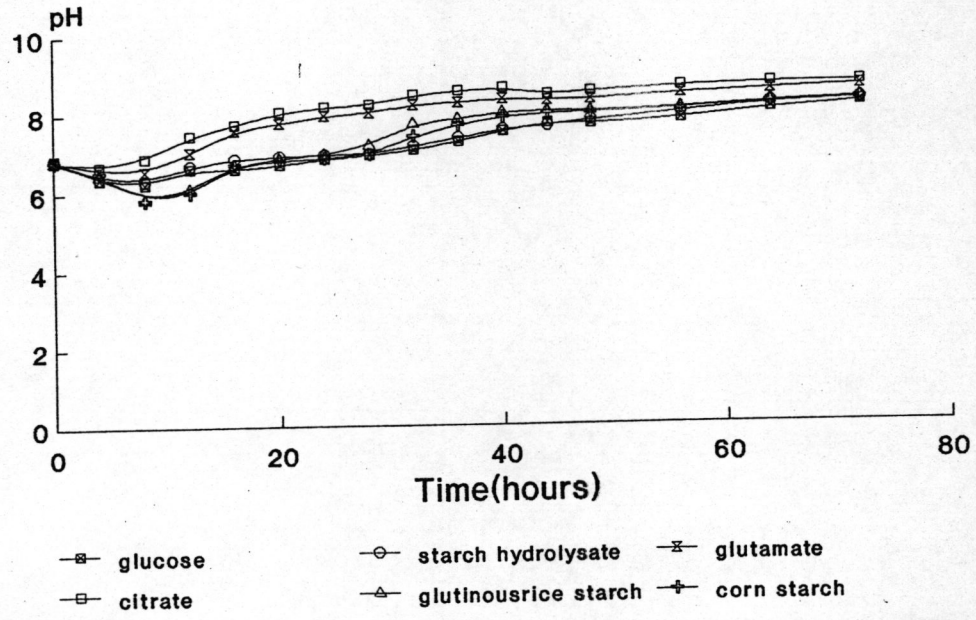
วัตถุดิบในกลุ่มแรก คือ กลูตาเมท และซิเตรทนั้น จากรายงานของ สนธยา (2533) พบว่า กลูตาเมท และซิเตรท เมื่อนำมาใช้เสริมกับวัตถุดิบต้นตอคาร์บอนชนิดอื่นจะสามารถเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้วัตถุดิบผสมระหว่างกลูโคส, แป้งข้าวเหนียว, กลูตาเมท และซิเตรท



รูปที่ 9ก. เปรียบเทียบการเจริญของ *B.subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบชนิดต่างๆเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน



รูปที่ 9ข. เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *B.subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบชนิดต่างๆเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

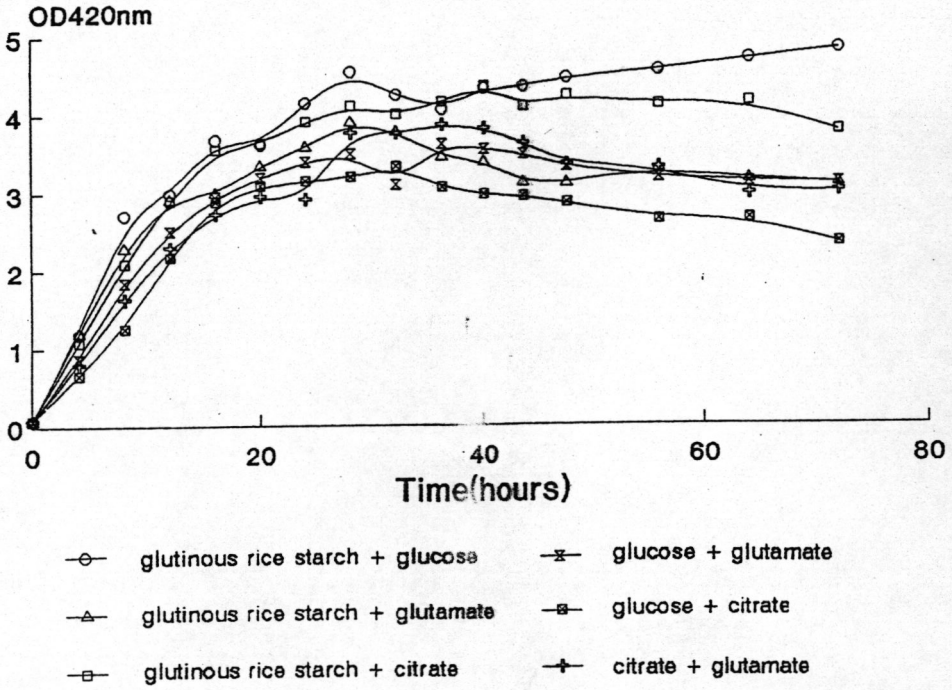


รูปที่ 9ค. เปรียบเทียบรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH ระหว่างการเลี้ยง *B.subtilis* TISTR 25 ในอาหารที่มีวัตถุดิบชนิดต่างๆเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

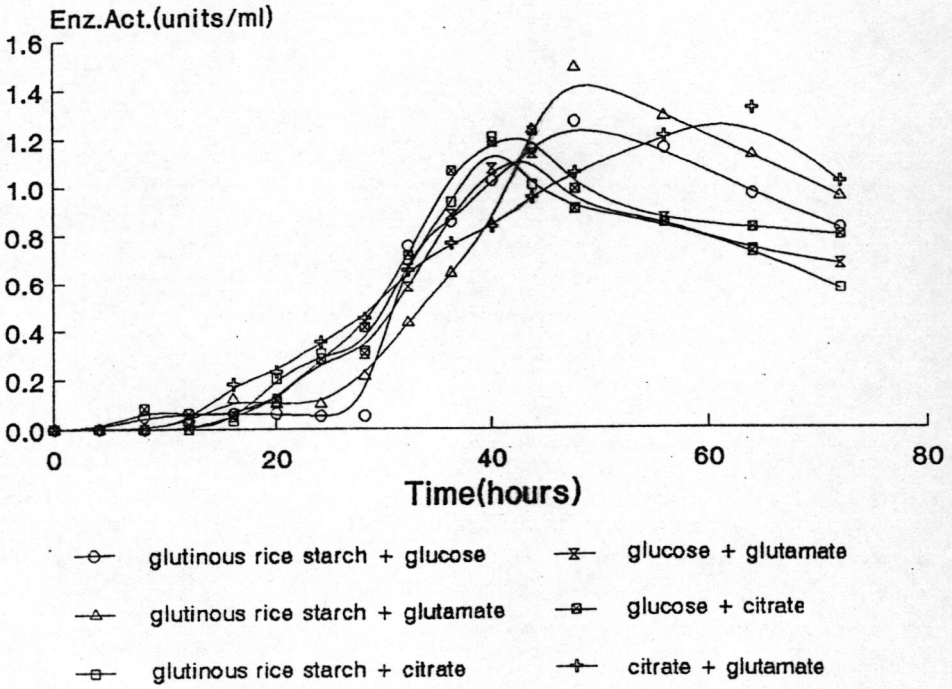
4.4.2 <u>การศึกษาผลของการใช้วัตถุดิบผสม</u>

การใช้วัตถุดิบผสมเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.1 คือ กลูโคส, แป้งข้าวเหนียว, ซิเตรท, กลูตาเมท ผสมกันดังนี้คือ กลูโคสกับแป้งข้าวเหนียว, กลูโคสกับซิเตรท, กลูโคสกับกลูตาเมท, แป้งข้าวเหนียวกับซิเตรท, แป้งข้าวเหนียวกับกลูตาเมท และ ซิเตรทกับกลูตาเมท ในอัตราส่วน 1:1 ให้มีปริมาตรสุดท้ายในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.25 เปอร์เซนต์ เลี้ยงเชื้อ ติดตามการเจริญ ศึกษารูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH และการสร้างเอนไซม์ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 10 ข.และ 10 ค. จะเห็นได้ว่าเมื่อเราใช้วัตถุดิบสองชนิดเสริมกันไม่ว่าจะเป็นวัตถุดิบชนิดใดในอัตราส่วน 1:1 ไม่สามารถช่วยเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ และแอคติวิตีที่ได้ยังต่ำกว่าการใช้วัตถุดิบคือ กลูโคส หรือ แป้งข้าวเหนียว เพียงอย่างเดียวด้วย แต่เมื่อพิจารณาดูการเจริญของเชื้อ(รูปที่ 10 ก.)ในช่วงเวลาหลังจากชั่วโมงที่ 24ไปแล้ว เปรียบเทียบกับการเจริญของเชื้อเมื่อใช้วัตถุดิบเพียงชนิดเดียว (รูปที่ 9)พบว่าการเจริญของเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในวัตถุดิบที่ผสมกันในอัตราส่วน 1:1 ปริมาณ 0.25 เปอร์เซนต์ เท่ากันกับการใช้วัตถุดิบเพียงชนิดเดียว มีการเจริญค่อนข้างที่จะคงที่กว่าเมื่อใช้วัตถุดิบเพียงชนิดเดียวซึ่งจะมีการเจริญหลังจากชั่วโมงที่ 24 ไปแล้วลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจนแสดงให้เห็นว่าการใช้วัตถุดิบผสมในอัตราส่วน 1:1 ปริมาณ 0.25 เปอร์เซนต์ นี้ไม่สามารถที่จะเพิ่มแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ แต่จะช่วยให้การเจริญในช่วง stationary phase มีระยะนานขึ้น การเปลี่ยนแปลง pH ระหว่างการเลี้ยงเชื้อในอาหารต่างชนิดกันแต่มีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะเดียวกัน คือ จะลดลงในช่วง 8-12 ชั่วโมง และจะเพิ่มขึ้นในที่สุด

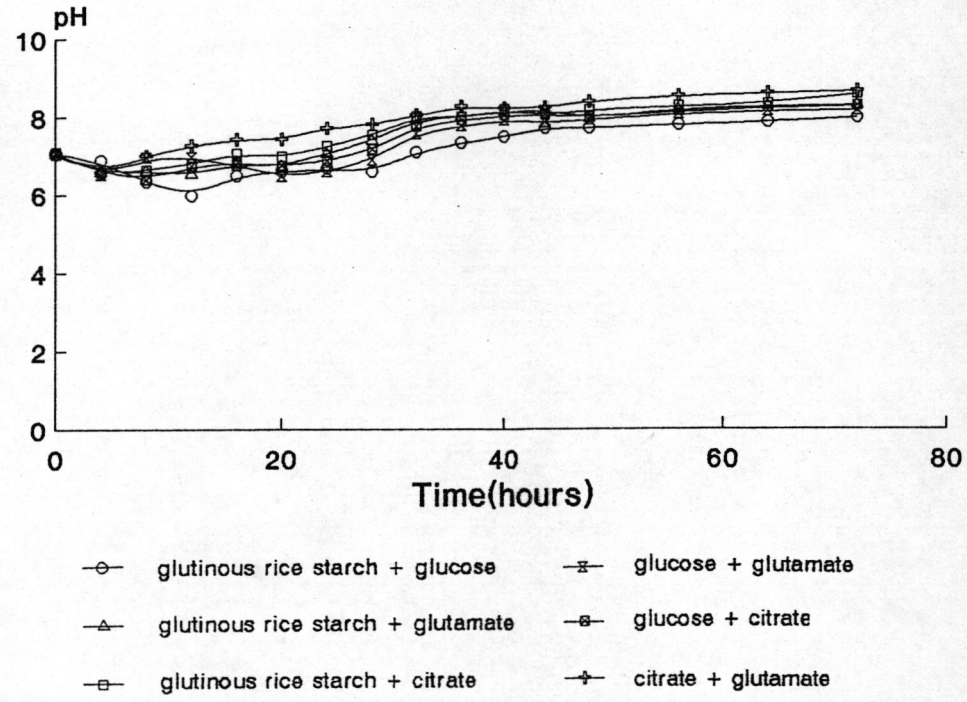
จากผลการทดลองข้อที่ 4.1 และ 4.2 นี้จะเห็นว่าการใช้วัตถุดิบเพียงชนิดเดียวเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนให้ผลในการสร้างเอนไซม์ได้ดีการกว่าใช้วัตถุดิบผสมสองชนิด และพบว่ากลูโคสในปริมาณ 0.25 เปอร์เซนต์ นี้ให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงที่สุด แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แป้งข้าวเหนียวในปริมาณ 0.25 เปอร์เซนต์แล้วแม้ว่ากลูโคสจะให้ปริมาณเอนไซม์สูงกว่าเล็กน้อยแต่ราคาของกลูโคสสูงกว่าแป้งข้าวเหนียวมาก แป้งข้าวเหนียวจึงมีความเหมาะสมมากกว่า ดังนั้นจึงเลือกใช้แป้งข้าวเหนียวเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในการทดลองขั้นต่อๆไป



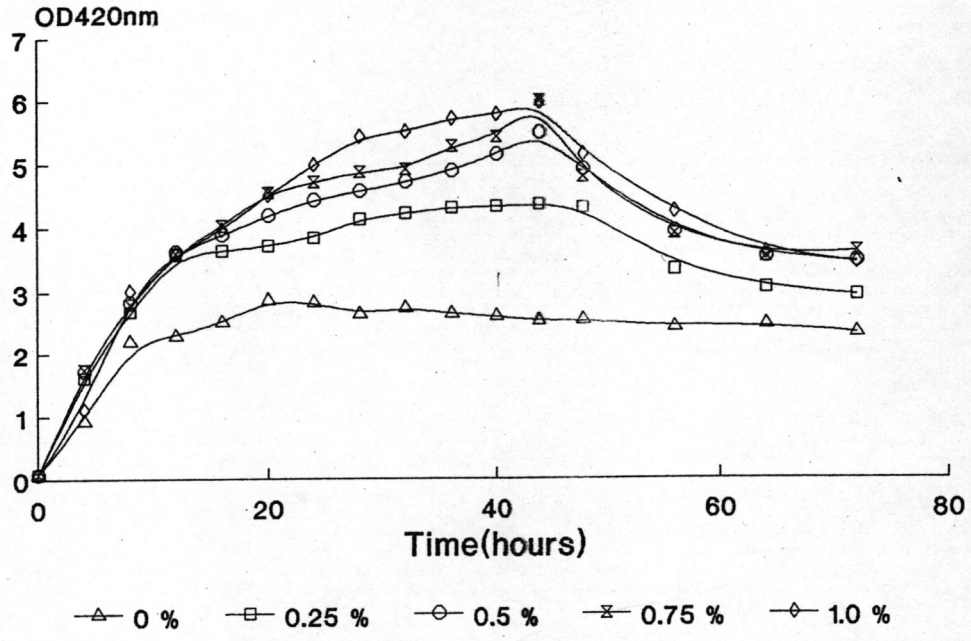
รูปที่ 10ก. เปรียบเทียบการเจริญของ *B.subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมชนิดต่างๆเป็นแหล่งต้นคาร์บอน



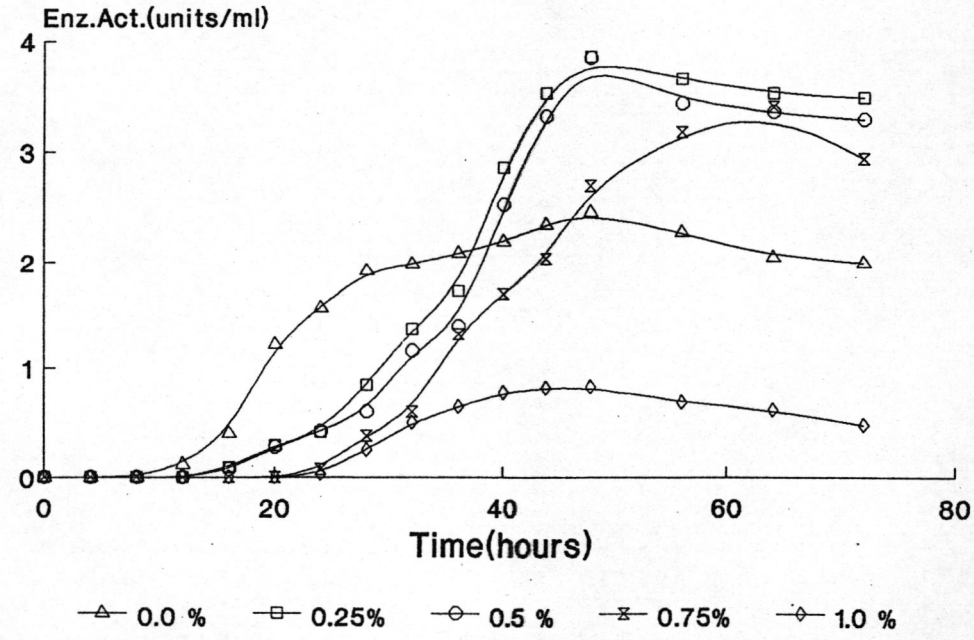
รูปที่ 10ข. เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *B.subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมชนิดต่างๆเป็นแหล่งต้นคาร์บอน



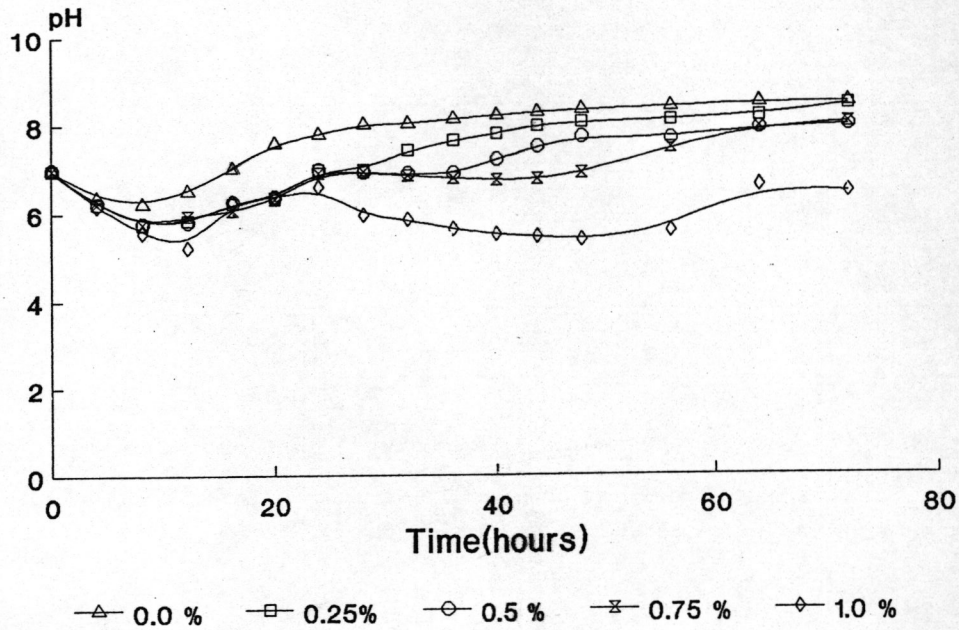
รูปที่ 10ค. เปรียบเทียบรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH ระหว่างการเลี้ยง *B.subtilis* TISTR 25 ในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมชนิดต่างๆเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน



รูปที่ 11ก. เปรียบเทียบการเจริญของ *B.subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบแป้งข้าวเหนียวเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในปริมาณต่างๆ



รูปที่ 11ข. เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *B.subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบแป้งข้าวเหนียวเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในปริมาณต่างๆ



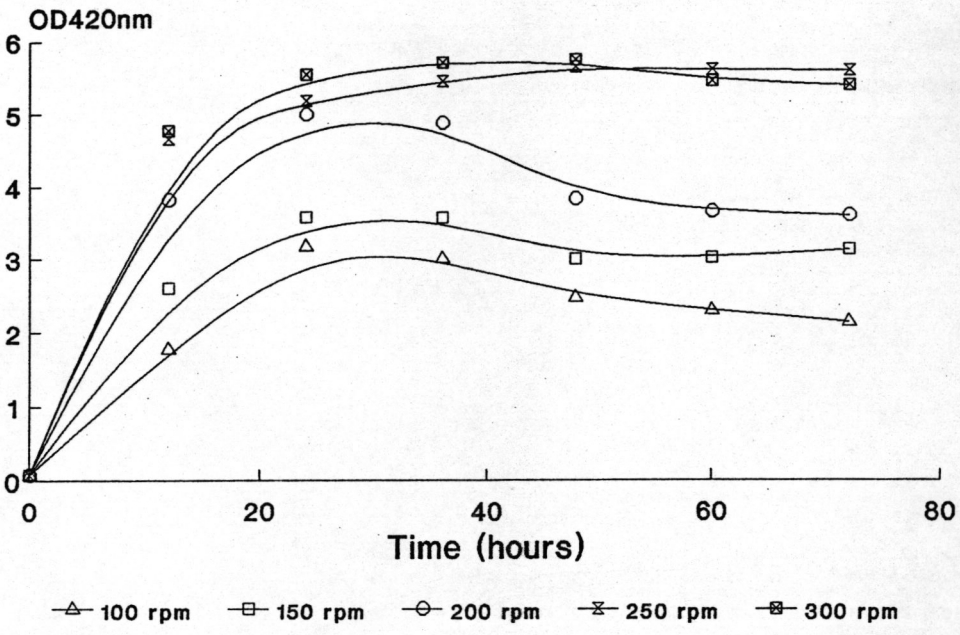
<u>รูปที่ 11ค.</u> เปรียบเทียบรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH ระหว่างการเลี้ยง *B.subtilis* TISTR 25 ในอาหารที่มีวัตถุดิบแป้งข้าวเหนียวเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในปริมาณต่างๆ

4.4.3 การหาปริมาณของวัตถุดิบที่เหมาะสม

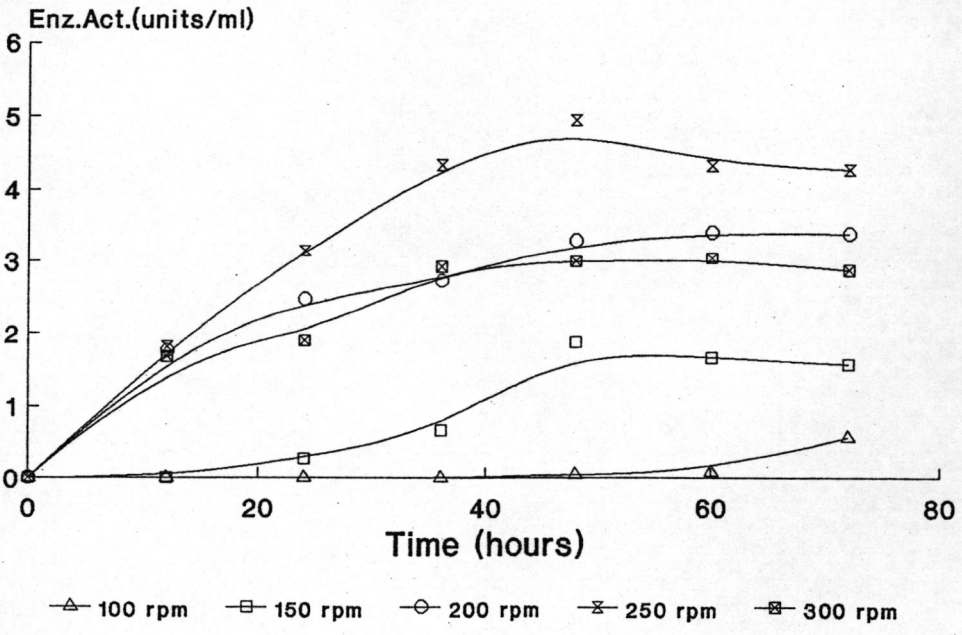
การหาปริมาณของแป้งข้าวเหนียวที่เหมาะสมจะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์โดยแปรผันปริมาณของแป้งข้าวเหนียว คือ 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 เปอร์เซนต์ ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 11 พบว่าปริมาณของแป้งข้าวเหนียวที่ 0.25 และ 0.5 เปอร์เซนต์ ให้ผลการสร้างเอนไซม์ใกล้เคียงกันโดยค่าแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 มีค่าเท่ากับ 3.85 และ 3.84 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 11 ข.)และเมื่อเพิ่มปริมาณของแป้งข้าวเหนียวขึ้นเป็น 0.75 และ 1.0 เปอร์เซนต์ ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้ก็จะลดลงโดยที่ปริมาณของแป้งข้าวเหนียวเท่ากับ 1.0 เปอร์เซนต์ จะให้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ต่ำที่สุด เมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อและการเปลี่ยนแปลง pH (รูปที่ 11 ก.และ 11 ค.)ในอาหารที่มีแป้งข้าวเหนียวตั้งแต่ 0.5-1.0 เปอร์เซนต์ มีลักษณะใกล้เคียงกันมากและจะดีกว่าการใช้แป้งข้าวเหนียวปริมาณ 0.25 เปอร์เซนต์ หรือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมแป้งข้าวเหนียวเลยดังนั้นปริมาณแป้งข้าวเหนียวที่เหมาะสมที่จะใช้เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์จึงเลือกใช้ที่ 0.25 เปอร์เซนต์

4.5 การขยายส่วนในการผลิตและการศึกษาหาสภาวะการเขย่าให้อากาศที่เหมาะสม

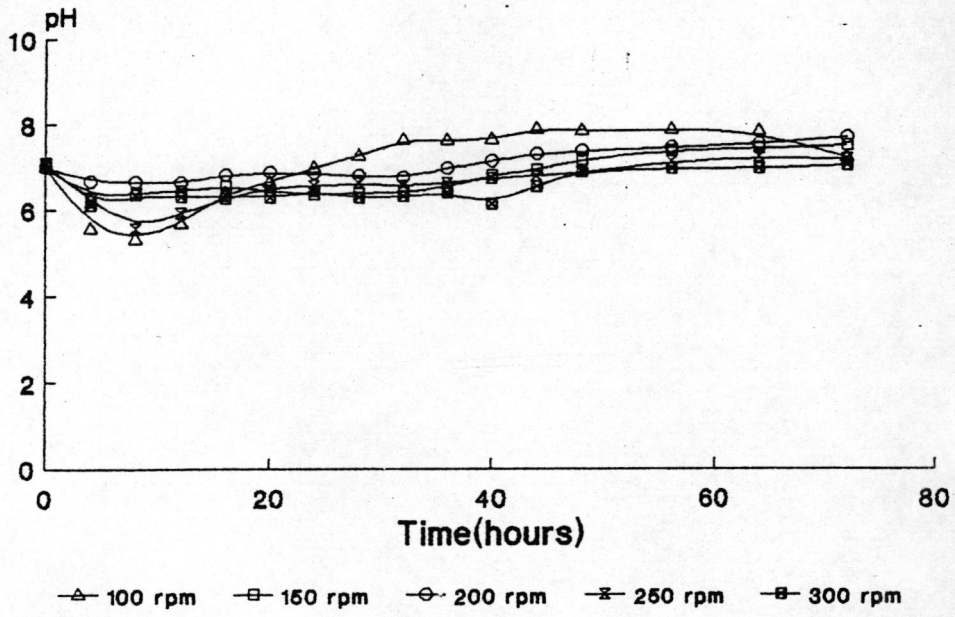
การศึกษาผลของการเขย่าให้อากาศที่ความเร็วรอบต่างๆต่อการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสของเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารพื้นฐานสูตรที่ 1 มีส่วนประกอบตามวิธีการทดลองข้อที่ 3.1.2 มีแป้งข้าวเหนียว 0.25 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน และวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันอัตราส่วน 1:1 เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน ขยายขนาดของขวดเขย่าขึ้นจากขนาด 500 มิลลิลิตร เป็น 1 ลิตร เพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์ในปริมาณมากขึ้น และทำการแปรผันจำนวนรอบของการเขย่าให้อากาศเป็น 100, 150, 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที (ดังรายละเอียดการทดลองข้อ 3.11)ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 12 จะเห็นว่าที่ความเร็วรอบของการเขย่าเท่ากับ 100 รอบต่อนาที แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้จะมีค่าต่ำที่สุดเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 12 ข.) การสร้างเอนไซม์เป็นไปแบบช้าๆดังผลการทดลองที่ได้คือจะตรวจพบแอคติวิตี



รูปที่ 12ก. เปรียบเทียบการเจริญของ *B.subtilis* TISTR 25 เมื่อให้ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศต่างๆกัน



รูปที่ 12ข. เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้จาก *B.subtilis* TISTR 25 เมื่อให้ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศต่างๆกัน



รูปที่ 12ค. เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลง pH เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 ที่ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศต่างๆกัน

ของเอนไซม์ที่ชั่วโมงที่ 48 ในขณะที่การเขย่าที่ความเร็วรอบอื่นๆสามารถตรวจพบเอนไซม์ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 หรือก่อนชั่วโมงที่ 12 และที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที จะมีแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 4.94 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกันจะเห็นว่าการเพิ่มความเร็วรอบจาก 100 เป็น 150, 200 และ 250 ตามลำดับจะได้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเร็วรอบของการเขย่าเป็น 300 รอบต่อนาที จะทำให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงในขณะที่การเจริญของเชื้อจะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ความเร็วรอบของการเขย่าให้อากาศมากขึ้น (รูปที่ 12 ก.) แสดงว่าอัตราการเขย่าให้อากาศมีผลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *B.subtilis* TISTR 25 ส่วนการเปลี่ยนแปลง pH ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อที่ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศ(รูปที่ 12 ค.)ให้ผลไม่ต่างกัน

การเพิ่มปริมาตรของภาชนะที่ใช้เลี้ยงเชื้อจากการใช้ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เป็นขนาด 1 ลิตร และเพิ่มปริมาตรของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก 150 มิลลิลิตร เป็น 300 มิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในข้อที่ 4.4.3 ที่ความเร็วรอบของการเขย่าให้อากาศ 200 รอบต่อนาที เท่ากัน พบว่า เมื่อใช้ขนาดของขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร จะได้ค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 3.85 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อใช้ขวดขนาด 1 ลิตร จะได้ค่าแอคติวิตีเท่ากับ 3.41 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลที่ได้ถือว่าใกล้เคียงกัน เนื่องจากขนาดภาชนะเพิ่มขึ้นเพียง 2 เท่าและยังใช้สัดส่วนของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรภาชนะเท่ากัน

4.6 การเตรียมเอนไซม์โปรตีเอสในรูปผงและการเก็บรักษาเอนไซม์ที่สภาวะอุณหภูมิต่างๆ

4.6.1 การเตรียมเอนไซม์ผง

การเตรียมเอนไซม์ผงโดยวิธีตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซนต์,โซเดียมซัลเฟต 30 เปอร์เซนต์,เอธานอล 70 เปอร์เซนต์ และการทำให้เข้มข้นก่อนโดยการกรองด้วย อัลตรา-ฟิวเตรชั่น แล้วจึงทำให้แห้งเป็นผงโดยวิธีไลโอฟิไลซ์เซชั่น (วิธีทำข้อ 3.12.1) จากตารางที่ 6 น้ำเลี้ยงเชื้อที่มีเอนไซม์เท่ากับ 4513 ยูนิตต่อลิตร และค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 2.56 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อนำมาตกตะกอนด้วยเกลือ

แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 70 เปอร์เซนต์ ได้ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 4.61 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และได้ activity yield สูงถึง 97 เปอร์เซนต์ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่ตกตะกอนด้วยเกลือโซเดียมซัลเฟต 30 เปอร์เซนต์ หรือ เอธานอล 70 เปอร์เซนต์ โดยพิจารณาจากปริมาณยูนิตทั้งหมดและแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ที่เตรียมได้แล้ว จะเห็นได้ว่า การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตจะได้ผลดีกว่า สำหรับการกรองด้วย อัลตราฟิวเตรชั่น และทำแห้งด้วยการไลโอฟิไลซ์เซชั่น แม้ว่าจะได้จำนวนยูนิตทั้งหมดของการเตรียมเอนไซม์ผงด้วยวิธีนี้สูงที่สุดก็ตาม แต่เมื่อพิจารณาค่าแอคติวิตีจำเพาะจะเห็นว่าวิธีนี้จะให้ค่าแอคติวิตีจำเพาะต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น คือ ได้ค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 3.27 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซนต์ และอบแห้งที่อุณหภูมิไม่สูงนัก

ในการเตรียมเอนไซม์ผงได้เปรียบเทียบการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตระหว่างการเติมผงเซลลูโลส 0.5 เปอร์เซนต์ และไม่เติมเซลลูโลส ซึ่งจากตารางที่ 7 จะเห็นว่า การเติมหรือไม่เติมผงเซลลูโลสนั้นให้ผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน แต่การเติมผงเซลลูโลสจะทำให้ตะกอนของเอนไซม์ที่ได้เมื่อนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง และนำไปอบแห้งแล้วไม่ติดกับกระดาษกรองใช้เวลาในการอบแห้งที่ 45 องศาเซลเซียส น้อยกว่าการไม่เติมผงเซลลูโลส

4.6.2 <u>การเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่สภาวะอุณหภูมิต่างๆ</u>

การเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่เตรียมได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และนำไปอบแห้ง โดยนำมาตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ผงก่อนที่จะแบ่งออกนำไปเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ คือ -20, 4, 18-22, 30, 45 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 วัน และเก็บตัวอย่างมาตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ผงเป็นระยะๆ เปรียบเทียบกับแอคติวิตีของเอนไซม์เริ่มต้น ผลการทดลองได้แสดงไว้ในตารางที่ 8 จะเห็นว่าที่อุณหภูมิ -20, 4, 18-22 และ 30 องศาเซลเซียส เมื่อเก็บเอนไซม์ไว้ครบ 120 วัน แล้วยังไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์เลย แต่ที่อุณหภูมิ 45 และ 60 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลง โดยที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แอคติวิตีของเอนไซม์ผงจะเริ่มลดลง

ตารางที่ 6 การเตรียมเอนไซม์โปรตีเอสในรูปผงโดยวิธีต่างๆ

วิธีการ	ยูนิตทั้งหมด (ยูนิต/1ลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มก./1ลิตร)	แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มก.โปรตีน)
1.Crude enzyme culture	4513	1764	2.56
2.ตกตะกอนด้วย 70 %$(NH_4)_2SO_4$	4373	947	4.61
3.ตกตะกอนด้วย 30 % Na_2SO_4	3494	894	3.91
4.ตกตะกอนด้วย 70 % Ethanol	3622	871	4.16
5.กรองโดย Ultra-Filtration ทำแห้งโดย Lyophilization	4494	1375	3.27

ตารางที่ 7 แอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสผงที่เตรียมโดยวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซนต์ เปรียบเทียบระหว่างการเติมผงเซลลูโลส 0.5 เปอร์เซนต์ และไม่เติมเซลลูโลส

ชนิดของเอนไซม์ผง	ยูนิตทั้งหมด (ยูนิต/1ลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มก./1ลิตร)	แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิต/มก.โปรตีน)
1. เอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซนต์	4494.8	959	4.69
2. เอนไซม์ที่ตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซนต์ และเติมผงเซลลูโลส 0.5 เปอร์เซนต์	4410.0	948	4.65

ประมาณวันที่ 60 ของการเก็บ และเมื่อเก็บไว้ครบ 120 วันแล้ว แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงเหลือประมาณ 85 เปอร์เซนต์ แต่เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 วัน เอนไซม์จะเสียแอคติวิตีเร็วกว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และแอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลงถึงประมาณ 50 เปอร์เซนต์ หลังการเก็บ 120 วัน จะเห็นว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นระยะเวลาที่จะเก็บเอนไซม์โดยให้แอคติวิตีของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงน้อยนั้นมีระยะเวลาสั้นลง ซึ่งจากผลการทดลองนี้แสดงว่าเอนไซม์ผงที่เตรียมได้สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำจนถึงอุณหภูมิห้องปกติได้เป็นเวลานานพอควรโดยที่ไม่สูญเสียแอคติวิตี

ตารางที่ 8 ผลการเก็บรักษาเอนไซม์โปรตีเอสผงซึ่งเตรียมโดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซนต์

จำนวนวันที่เก็บ	Relative Activity (%)					
	-20°C	4°C	18-22°C	30°C	45°C	60°C
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
7	112.1	110.0	110.0	111.3	102.1	101.3
14	106.4	105.5	105.4	105.6	104.2	102.5
18	102.4	111.4	108.9	106.8	100.5	91.8
25	111.5	103.3	99.3	101.5	99.8	92.3
35	99.9	101.3	99.0	101.5	102.3	83.1
43	101.9	100.8	103.5	100.1	100.3	79.8
50	104.8	109.2	106.4	99.9	104.7	69.9
60	99.5	100.1	101.8	103.6	90.7	63.6
65	102.4	99.9	100.2	104.2	89.0	55.4
98	100.5	103.3	101.9	110.2	86.6	54.0
120	108.0	104.1	102.9	104.6	85.2	52.5

** Crude enzyme powder 1017.22 U/g = 100 %