จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย
เรื่อง

แอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* mutant UUNN – 1 และภาวะที่เหมาะสมของการผลิตของในถังหมักขนาด 5 ลิตรแบบไม่ต่อเนื่อง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย
นภา ศิวรังสรรค์

ตุลาคม ๒๕๔๓

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลวิจัย

แอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* mutant UUNN-1 และภาวะที่เหมาะสมของการผลิตของในถังหมักขนาด 5 ลิตรแบบไม่ต่อเนื่อง

โดย

ผศ. นภา ศิวรังสรรค์

ตุลาคม 2543

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ขอบพระคุณ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้กรุณาเอื้อเพื้อสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมี เพื่อการวิจัย รวมทั้งเจ้าหน้าที่ ภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกระหว่างการทำวิจัย

ขอบคุณนายอภิรักษ์ สุขพิทักษ์ ผู้ช่วยวิจัย

ขอขอบคุณนิสิตปริญญาโทชีวเคมีและเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่าน ที่ช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดการทำงานวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ที่สนับสนุนเงินทุนในการทำการวิจัยครั้งนี้จนเสร็จสมบูรณ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่ จฬ
วท15
เลขทะเบียน 010935
วัน.เดือน.ปี 27 กพ. 46

ชื่อโครงการ แอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* mutant UUNN-1 และภาวะที่เหมาะสมของการผลิตของในถังหมักขนาด 5 ลิตรแบบไม่ต่อเนื่อง

ชื่อผู้วิจัย นภา ศิวรังสรรค์

เดือนและปีที่ทำการวิจัยเสร็จ ตุลาคม 2543

บทคัดย่อ

Bacillus subtilis สายพันธุ์กลาย UUNN-1 สามารถผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสได้ในปริมาณสูงในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง โดยใช้สูตรอาหารที่ ปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.4%(w/v), KH_2PO_4 0.1%(w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05%(w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001%(w/v) ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0%(v/v) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}C อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm ในปริมาณทั้งสิ้น 3.5 ลิตร ทำการผลิตได้ 1,579 ยูนิตต่อกรัมเซลล์แห้งรวม ใช้ระยะเวลาในการหมัก 36 ชั่วโมง ทำการแยกให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 40-60 เปอร์เซ็นต์อิ่มตัว กำจัดเกลือโดยวิธี dialysis แล้วทำโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ด้วย ดีอีเอ อี-เซลลูโลส และ เซฟาเด็กซ จี-100 ตามลำดับ ได้แอลคาไลน์โปรติเอสมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 165 เท่า และค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 1,688 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งเอนไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 27,000 ดาลตัน จากวิธีเจลโครมาโตรกราฟี เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนที่ ช่วงอุณหภูมิ 30-65 องศาเซลเซียส และช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.5-10 และเหมาะสมที่ 45 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5 มีค่า K_m ต่อเคซีนเท่ากับ 0.101 mM และ V_{max} ต่อเคซีนเท่ากับ 0.0087 mM/min และถูกยับยั้งโดยสาร phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Project Title Alkaline protease from *Bacillus subtilis* mutant UUNN-1 and optimized condition production in 5 liter batch fermenter

Name of Investigators Napa Siwarungson

Year 2000

Abstract

Bacillus mutant UUNN-1 can produce high amount of alkaline protease in 5 liter batch fermenter. Culture medium contains KH_2PO_4 0.1%(w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05%(w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001%(w/v) and extraction of soy bean meal and sunflower seed meal with nitrogen content 0.4 % (w/v) in total volume of 3.5 liter. The optimal conditions for culturing were as follows : inoculum size at 1%(v/v) of the culture volume , aeration rate at 1 vvm , agitation speed of 250 rpm , temperature at 37°C and initial pH at 7.0 . This strain can produce the highest amount of alkaline protease 1,579 units / gram cell dry weight at 36 hours.The protease was partially purified by ammonium sulfate precipitation at 40-60 %(w/v), DEAE- cellulose and Sephadex G-100 column chromatography. The purification was 165 fold with specific activity of 1,688 units / mg protein. The molecular weight that was estimated with Sephadex G-100 chromatography is 27,000 Dalton. The enzyme has protease activity at temperature 30-65°C, pH 8.5-10.5 and optimum temperature at 45°C, pH 10.5. The partially purified enzyme showed K_m of 0.083 % by weight for casein and V_{max} of 0.0087 OD/min for casein and protease activity was inhibited by phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF).

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		ii
บทคัดย่อภาษาไทย		iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		iv
สารบัญ		v
รายการตารางประกอบ		vii
รายการรูปภาพประกอบ		viii
คำย่อ		xii
บทที่		
1	บทนำ	1
	ชนิดและสมบัติของเอนไซม์	3
	ความสำคัญและการสร้างเอนไซม์ในจุลชีพ	6
	ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์	7
	การกลายพันธุ์เพื่อเพิ่มการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอส	9
	มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย	11
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	13
2	ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์	
	ครุภัณฑ์	14
	เคมีภัณฑ์	15
	วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง	16
	แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง	16
3	วิธีการทดลอง	
	การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	17
	การเตรียมสารละลาย	19
	การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง	20
	การศึกษาการผลิตแอลคไลน์โปรติเอส	21
	การวัดการเจริญของเชื้อโดยวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้ง	23
	การวัดแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรติเอส	23
	การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl	24
	การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอรด์	25

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่		หน้า
	การเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	25
	การทดสอบสมบัติของเอนไซม์	27
4	ผลการทดลอง	28
	ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง	28
	ผลของปริมาณแหล่งคาร์บอน	28
	ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจน	31
	ผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง	34
	ผลของปริมาณเชื้อตั้งต้น	37
	ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก	40
	ผลของอัตราการเติมอากาศ	43
	ผลของอัตราการกวน	46
	ผลการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสในภาวะเหมาะสมที่ได้	49
	การเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	51
	การตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียม	51
	การทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์ ดีอีเออี-เซลลูโลส	53
	การทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์ เซฟาเด็กซ จี-100	55
	การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์	59
	ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์	59
	ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์	60
	ศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์	61
	ศึกษาผลของตัวยับยั้งปฏิกิริยาเอนไซม์	62
5	สรุปวิจารณ์ผลการทดลอง	63
รายการอ้างอิง		75
ภาคผนวก		81
	ภาคผนวกที่ 1	82
	ภาคผนวกที่ 2	87
	ภาคผนวกที่ 3	88

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1	อุตสาหกรรมกับการใช้โปรติเอส.....	2
2	แสดงผลการตกตะกอนแอลคาไลน์โปรติเอส ที่ช่วงเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นเกลือต่างๆ.....	52
3	สรุปผลการเตรียมเอนไซม์เอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ให้บริสุทธิ์บางส่วน.....	58
4	แสดงผลของสารยับยั้ง PMSF และ EDTA ต่อแอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1.....	62
5	เปรียบเทียบปัจจัยที่ศึกษาระหว่าง *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 กับ *Bacillus subtilis* TISTR25 สายพันธุ์ดั้งเดิม.....	67
6	เปรียบเทียบการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมของสายพันธุ์ดั้งเดิม กับภาวะเหมาะสมที่ได้จากการทดลอง.....	67
7	เปรียบเทียบสมบัติของแอลคาไลน์โปรติเอสจาก*Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ระหว่าง Crude enzyme กับเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์.....	72
8	เปรียบเทียบขั้นตอนการสกัดแยกแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 กับแอลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 สายพันธุ์ดั้งเดิม.....	72
9	เปรียบเทียบสมบัติของแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 กับแอลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 สายพันธุ์ดั้งเดิม.....	73

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการรูปภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1	การเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนโดยโปรติเอส	1
2	ความแตกต่างระหว่างเซลล์ จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนที่กำลังขยาย 10000 เท่า (ก)*Bacillus subtilis* TISTR25 และ (ข)สายพันธุ์กลาย UUNN-1	12
3	เปรียบเทียบการเจริญของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 0, 0.5 และ 1 %(w/v) ในอาหารเลี้ยงที่มีปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.3%(w/v) ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0%(v/v) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}C อัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm	29
4	เปรียบเทียบการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 0, 0.5 และ 1 %(w/v) ในอาหารเลี้ยงที่มีปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.3%(w/v) ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0%(v/v) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}C อัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm.	30
5	เปรียบเทียบการเจริญของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.2, 0.3, 0.4%(w/v) ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0%(v/v) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}C อัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm.....	32
6	เปรียบเทียบการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.2, 0.3, 0.4% (w/v) ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0%(v/v) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}C อัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm.....	33

รูปที่		หน้า
7	เปรียบเทียบการเจริญของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0, 7.0 และ 8.0 ปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวันเท่ากับ 0.4%(w/v) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0%(v/v) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}C อัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm.	35
8	เปรียบเทียบการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0, 7.0 และ 8.0 ในอาหารเลี้ยงที่มีปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.4%(w/v) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0%(v/v), ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}C อัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm.....	36
9	เปรียบเทียบการเจริญของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5, 1.0, 1.5% (v/v) ในอาหารเลี้ยงที่มีปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.4%(w/v) ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}C อัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm.....	38
10	เปรียบเทียบการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5, 1.0, 1.5%(v/v) ในอาหารเลี้ยงที่มีปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.4%(w/v) ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}C อัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm	39
11	เปรียบเทียบการเจริญของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันการควบคุมอุณหภูมิในการหมักที่ 30^{0}C, 37 ^{0}Cและ 40^{0}C ในอาหารเลี้ยงที่มีปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.4%(w/v) ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0%(v/v) อัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm.....	41

รูปที่ หน้า

12 เปรียบเทียบการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันการควบคุมอุณหภูมิในการหมักที่ 30°C, 37 °Cและ 40°C ในอาหารเลี้ยงที่มีปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.4%(w/v) ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0%(v/v) อัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm..... 42

13 เปรียบเทียบการเจริญของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันอัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm ในอาหารเลี้ยงที่มีปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.4%(w/v) ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0%(v/v) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C อัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm..... 44

14 เปรียบเทียบการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันอัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm ในอาหารเลี้ยงที่มีปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.4%(w/v) ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0%(v/v) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C อัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm..... 45

15. เปรียบเทียบการเจริญของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันอัตราการกวนเท่ากับ 200, 250 และ 300 rpm ในอาหารเลี้ยงที่มี ปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.4%(w/v) ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0%(v/v) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm..... 47

16 เปรียบเทียบการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันอัตราการกวนเท่ากับ 200, 250 และ 300 rpm ในอาหารเลี้ยงที่มีปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.4%(w/v) ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0%(v/v) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm 48

รูปที่		หน้า
17	การเจริญ, แอลคาไลน์โปรติเอสแอคติวิตี และน้ำตาลรีดิวซ์ ในการเลี้ยง *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1%(v/v) ปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.4%(w/v) ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0 ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}C อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 1.0 vvm อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 รอบต่อนาที.....	50
18	การแยกโปรตีนโดยการผ่านคอลัมน์ ดีอีเออี-เซลลูโลส ขนาด 1.3 x 30 เซนติเมตร เรซินสูง 25 เซนติเมตร ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายทริส-คลอไลด์บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 7.5 อัตราการไหล 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง.....	54
19	การสกัดแยกแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtils* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 โดยคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-100 ขนาด 1.5x60 ซม.....	56
20	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Kav และ น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน ในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 โดยคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-100 ขนาด 1.5x60 ซม.	57
21	เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.5 ถึง 11	59
22	เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในช่วงอุณหภูมิ เท่ากับ 35 ถึง 70 องศาเซลเซียส.....	60
23	Lineweaver-Burk plot ของแอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 เมื่อใช้ เคซีนเป็นสับเสรท ทำการวัดแอคติวิตีที่ 45 องศาเซลเซียส	61

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

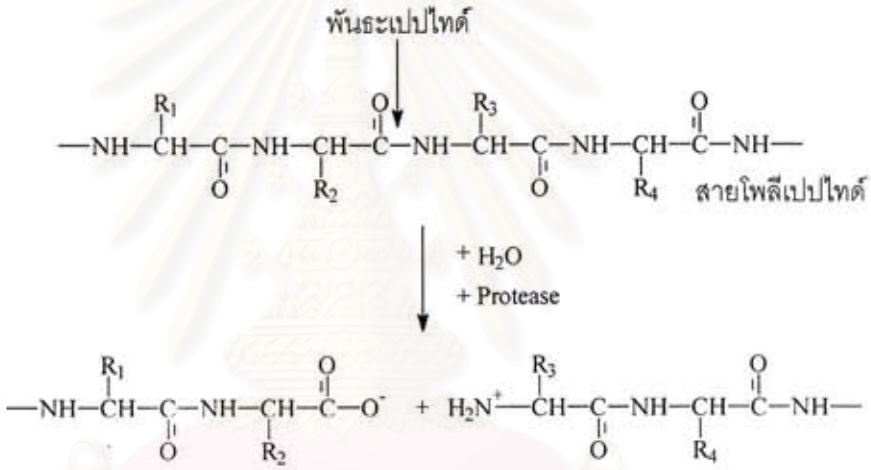
^{0}C	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์
μg	=	ไมโครกรัม
ml	=	มิลลิลิตร
vvm	=	ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที
rpm	=	รอบต่อนาที
N	=	นอร์มอล
v/v	=	ปริมาตรต่อปริมาตร
w/v	=	น้ำหนักต่อปริมาตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนและเปปไทด์สายสั้นๆ(Ward, 1983) [รูปที่ 1]และมีชื่อสามัญหลายชื่อ ได้แก่ เปปติเดส โปรตีเนส เปปไทด์ไฮโดรเลส และ เอนไซม์โปรติโอไลติค เป็นต้น ซึ่งโปรติเอสนั้นค้นพบมานานกว่าสองร้อยปี(Mihalyai, 1972 และ Adler-Nissen, 1986) เอนไซม์ชนิดนี้พบทั้งในพืช สัตว์ จุลชีพ โปรติเอสที่ผลิตได้จากพืชได้แก่ ปาเปน จากยางมะละกอ โบรมีเลน จากสับปะรด โปรติเอสที่ผลิตได้จากสัตว์ได้แก่ เรนนิน จากกระเพาะลูกวัว และโปรติเอสที่มีบทบาทมากที่สุดคือ โปรติเอสที่ผลิตได้จากจุลชีพซึ่งผลิตได้ทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย (Halpern, M.G., 1981)



รูปที่ 1. การเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนโดยโปรติเอส

เราสามารถนำโปรติเอสไปใช้เป็นประโยชน์ได้อย่างมากมาย[ตารางที่1] เช่น อุตสาหกรรมฟอกหนัง อาหาร เครื่องดื่ม เบียร์ ยา และอุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอก (Detergents) ซึ่งเป็นอุตสาหกรรมที่มีปริมาณการใช้ มูลค่าการส่งออก และส่วนแบ่งทางการตลาดสูงสุดเมื่อเทียบกับอุตสาหกรรมอื่นๆ

การนำโปรติเอสมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ มีลักษณะการใช้งานที่แตกต่างกันตามตารางที่ 1 และแหล่งของเอนไซม์ โปรติเอสเป็นเอนไซม์ ที่ถูกค้นพบเป็นชนิดที่สองของโลก หลังจากการพบ “Amylase” โดย ในปี ค.ศ. 1814 โปรติเอสที่พบชนิดแรกคือ ปาเปนในยางมะละกอ ซึ่งพบโดย Wurt และ ในปี ค.ศ. 1879 ต่อมาปีได้มีการนำโปรติเอสจากสัตว์คือ โปรติเอสจากตับอ่อน (Pancreatic protease) มาใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนังและกำจัดขนที่ติดอยู่กับหนังสัตว์ และในปี ค.ศ. 1913 ได้เริ่มนำโปรติเอสมาใช้เป็นสารซักล้าง (Detergent) ครั้งแรก

ตารางที่1 อุตสาหกรรมกับการใช้โปรติเอส(จันทิมา จิรนุชนาฎ 2539)

ผลิตภัณฑ์หรือประเภทของอุตสาหกรรมที่ใช้โปรติเอส	วัตถุประสงค์การใช้
ขนมอบ	เพิ่มความนุ่มในแป้งนวด เพิ่มคุณภาพของขนม
เครื่องดื่มผสมแอลกอฮอล์	ทำให้มีเนื้อ กลิ่นรส และคุณค่าทางอาหารในระหว่างการหมัก และช่วยประสิทธิภาพการกรอง การทำให้ใส และไม่ตกตะกอนระหว่างการแช่เย็น
ธัญพืช	ดัดแปลงโปรตีนในธัญพืช ซึ่งจะช่วยเพิ่มอัตราการทำแห้ง ตลอดทั้งจะช่วยปรับปรุงลักษณะผลิตภัณฑ์ ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตโชมิ และเต้าหู้
เนยแข็ง	ตกตะกอนโปรตีนในนม เกิดกลิ่นและรสระหว่างการบ่มเนยแข็ง
ไข่และผลิตภัณฑ์จากไข่	ปรับปรุงคุณสมบัติด้านการทำแห้ง
อาหารสัตว์	การย่อยสลายโปรตีนจาก waste ให้เป็นกรดอะมิโนหรือเปปไทด์สายสั้นสำหรับผสมในอาหารสัตว์
ไฮโดรไลเสทของโปรตีน	กระบวนการผลิตน้ำซอสปรุงรส น้ำปลา และน้ำซุป จากวัตถุดิบที่โปรตีน ทั้งจากพืชและสัตว์
ไวน์ และ เบียร์	ใช้ในกระบวนการแยกตะกอนโปรตีน ทำให้ผลิตภัณฑ์ใส และเพิ่มปริมาณโปรตีนที่ละลายในน้ำทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นและรสที่ดี และอาจช่วยเพิ่มฟองในเบียร์
เนื้อสัตว์	ใช้ในกระบวนการทำให้เนื้อนุ่ม
ผงซักฟอก	เป็นสารผสมในผงซักฟอกเพื่อย่อยสลายสิ่งสกปรกที่เป็นโปรตีน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แต่พบว่าความสามารถในการย่อยสลายและความเสถียรในสภาวะที่เป็นด่างไม่ดี ต่อมาในปี ค.ศ. 1954 ได้ค้นพบโปรติเอสจากจุลชีพชนิดแรกคือ *Bacillus subtilis* โดยตั้งชื่อว่า "Subtilisin" และในปี ค.ศ. 1959 บริษัทในประเทศสวิทเซอร์แลนด์ ได้ผลิตโปรติเอสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เป็นผลิตภัณฑ์ ภายใต้ชื่อการค้าว่า Bio-40 ซึ่งมีคุณภาพดีกว่าโปรติเอสจากตับอ่อน ต่อมาในปี ค.ศ.1960 บริษัท NOVO ได้ผลิตเอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* ซึ่งเรียกเอนไซม์นี้โดยทั่วไปว่า Subtilisin Carlsberg และชื่อทางการค้าว่า Biotex และเริ่มเข้าสู่ตลาดในสหรัฐอเมริกา โดยมีส่วนแบ่งทางการตลาดประมาณ 45-50 เปอร์เซ็นต์ ปี ค.ศ.1971 คณะกรรมการอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (FDA) ได้ให้คำรับรองว่าโปรติเอส สามารถนำมาใช้ร่วมกับการซักล้างได้โดยไม่มีอันตราย นอกจากอุตสาหกรรมการผลิตผงซักฟอกแล้ว ยังมีการพัฒนานำโปรติเอสจากจุลชีพไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆอีก เช่น อุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งโปรติเอสจะช่วยเพิ่มคุณภาพความเสถียร และช่วยในการละลายของอาหารให้ดีขึ้นอีกด้วยโปรติเอสมีหลายชนิด แตกต่างกันทางด้านความจำเพาะต่อสับสเตรท บริเวณเร่ง กลไกการเกิดปฏิกิริยา ช่วง pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน รวมทั้งความเสถียรของเอนไซม์

เนื่องจากเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่จะได้มาจากจุลชีพ เพราะเป็นแหล่งที่เหมาะสมในการผลิตปริมาณมากอีกทั้งเอนไซม์มีการสร้างและขับออกนอกเซลล์ (Extracellular enzyme) จึงง่ายต่อการสกัดแยกและผลิตได้ในปริมาณสูง (Ward, 1983)

โปรติเอสที่ผลิตได้จากจุลชีพ สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มใหญ่ๆ ตามกลไกพื้นฐานของสภาวะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (Hartley, 1960 ; Outtrup และ Boyce, 1990 ; Fox และคณะ, 1991)

1. **Acid Protease EC 3.4.23**

จุลชีพที่ผลิตส่วนใหญ่เป็นพวกเชื้อรา และยีสต์ ไม่ค่อยพบในแบคทีเรีย มีกรดอะมิโนแอสปาเทตอยู่บริเวณเร่ง เอนไซม์ทำงานเหมาะสมที่ pH 3-4 เอนไซม์ชนิดนี้ยังสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ตามลักษณะโครงสร้าง (Matsubara และ Feder, 1971) ได้ดังนี้

1.1 **Rennin-like Acid Protease** จุลชีพที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตโปรติเอสในเชิงการค้า ได้แก่ *Mucor pusillus, Mucor miehei* และ *Endothia parasitica* นิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมทำเนยแข็ง

1.2 **Pepsin-like Acid Protease** นิยมย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองในอุตสาหกรรมทำซีอิ๊ว (Soy Sauce) และปรับปรุงคุณภาพของแป้งที่ใช้ในการทำขนมปัง *Aspergillus oryzae*

เป็นจุลชีพที่สำคัญในการผลิตเอนไซม์ในอุตสาหกรรม เอนไซม์ชนิดนี้เป็นEndoprotease มีช่วงการทำงานที่เหมาะมีค่า pH 4-4.5

2. **Thiol Protease EC 3.4.22**

เป็นเอนไซม์ทำงานได้ดีในช่วง pH ที่เป็นกลาง น้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 30,000-50,000 ดาลตัน จุลชีพที่ผลิตเอนไซม์นี้ได้แก่ *Clostridium spp.* และ *Streptococcus spp.* และโปรติเอสที่ผลิตได้จากพืช ได้แก่ ปาเปน ไฟซิน และ โบรมีเลน (Ward, 1983)

3. **Metallo Protease EC. 3.4.24**

เอนไซม์ชนิดนี้เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Neutral Protease พบทั่วไปในแบคทีเรียและเชื้อรา โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัสหลายชนิด เช่น *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* และ *Bacillus thermoproteotyticus* ซึ่งจะผลิตเฉพาะนิวทรัลโปรติเอสเท่านั้น (Priest, 1977)แต่ใน *Bacillus subtilis* พบว่ามีการผลิตทั้งนิวทรัลโปรติเอสและแอลคาไลน์โปรติเอส นอกจากนี้ยังมี *Bacillus thuringensis*, *Bacillus pumilus* และ *Bacillus polymyxa* (Griffin และ Fogaty, 1973) เป็นต้น นิวทรัลโปรติเอสเป็น Metallo-endoprotease ที่มีอะตอมของโลหะเป็นส่วนประกอบของโมเลกุลและมีความสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ไอออนส่วนใหญ่ที่พบคือ Zn^{++} (Zinc) สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับกรดอะมิโนไลซีน และถูกยับยั้งปฏิกิริยาได้ด้วยสารเคมีประเภทคีเลตติ้ง (Chelating Agents) เช่น Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Dithizone (Ward, 1983; Millet และคณะ, 1969) 1,10-Phennanthroline (Pero และ Sloma, 1993) ซึ่งจะยับยั้งเอนไซม์โดยการดึงอะตอมของสังกะสีออก แต่ไม่ถูกยับยั้งโดย Di-isopropryl Fluorophosphate (DFP), Sulfhydryl reagent, Soybean trypsin inhibitor และ Potato protease inhibitor ความสามารถสูงสุดในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนที่สภาวะความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7-8 โดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรท มี ความเสถียรในช่วง pH 5-10 (Endo, 1962) นิวทรัลโปรติเอสที่สำคัญคือ thermolysin ซึ่งผลิตจาก *Bacillus thermoproteolyticus* เป็นเอนไซม์ที่มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูง ได้ดีพบว่าหลังบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เอนไซม์ยังคงมีแอคติวิตีเหลืออยู่50 เปอร์เซ็นต์ (Endo, 1962; Ohta, 1966) นิวทรัลโปรติเอสสามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมมากมาย เช่น อุตสาหกรรมฟอกหนัง เบียร์ ซีอิ๊ว น้ำปลา การผลิตสารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) อุตสาหกรรมผลิตเนยแข็งและขนมปังต่างๆ มีผู้ศึกษาถึงสมบัติของนิวทรัลโปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* พบว่าช่วยปรับปรุงคุณภาพของขนมปังประเภท Cracker และ Biscuit ทำให้แป้งเป็นแผ่นบางโดยไม่ฉีกขาด และช่วยลดฟองอากาศที่เกิดระหว่างการอบ

(Barrett, 1979; Aunstrup, 1980) และเมื่อใช้เอนไซม์นี้ร่วมกับไลเปส (Lipase) ในการทำเนย พบว่าช่วยเพิ่มรสชาติของเนยแข็งและไม่ทำให้เกิดรสขม (Godfrey และคณะ 1983)

4. Alkaline Protease EC. 3.4.21.14

เอนไซม์ชนิดนี้เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Serine Protease เนื่องจากมีหมู่กรดอะมิโนเซรีนอยู่บริเวณเร่งของเอนไซม์ (Active site) ถูกยับยั้งปฏิกิริยาด้วยสาร Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride (PMSF) และ Di-isopropryl Fluorophosphate (DFP) โดยการจับกับหมู่ไฮดรอกซิลของกรดอะมิโนเซรีนที่อยู่บริเวณเร่ง ส่วน EDTA ไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์นี้ได้ ช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ค่อนข้างอยู่ระหว่าง pH 5-12 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์อยู่ระหว่าง 60-70 องศาเซลเซียส (Outtrup และ Boyce, 1990) แคลเซียมไอออนจะช่วยให้เอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้น มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 25,000-30,000 ดาลตัน (Priest, 1977 และ Ward, 1983)

แอลคาไลน์โปรติเอสผลิตได้ทั้งในเชื้อราและแบคทีเรีย โดยเฉพาะพบในแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus spp.* เป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* และ Alkalophilic *Bacillus* ซึ่งเอนไซม์จะถูกสร้างและถูกปล่อยออกเป็นอิสระในน้ำเลี้ยงเชื้อ(Extracellular enzyme) และ อาจจะสร้างไปพร้อมๆกับนิวทรัลโปรติเอส หรืออาจจะมีการสร้างนิวทรัลโปรติเอสก่อนการสร้างแอลคาไลน์โปรติเอสก็ได้ (MG Halpern, 1981)

แอลคาไลน์โปรติเอสสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม โดยอาศัยความแตกต่างของกรดอะมิโนที่เป็นส่วนประกอบรวมทั้งสมบัติทางอิมมูนวิทยาและจลศาสตร์ (Keay, 1970 ; Outtrup และ Boyce, 1990) ได้ดังนี้

<u>กลุ่มที่ 1</u> **Subtilisin Carlsberg** พบครั้งแรกโดย Linderstrom Lang และ Ottesen ในปี ค.ศ. 1947 ที่ห้องปฏิบัติการเมือง Carlsberg (Aunstrup, 1979) ผลิตได้จาก *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus pumilus* เอนไซม์นี้มีลักษณะเป็นโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวประกอบด้วยกรดอะมิโน 274 ตัวเนื่องจากไม่มีกรดอะมิโนซิสเตอีนหรือซิสทีน ดังนั้นจึงไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ โครงสร้างตติยภูมิเป็นรูปทรงกลม (Spherical) มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 4.2 นาโนเมตร บริเวณเร่งประกอบด้วย เซรีนตำแหน่งที่ 221 ฮีสติดีนตำแหน่งที่ 54 และแอสปาร์เตทตำแหน่งที่ 32 มีความจำเพาะต่อซับสเตรทกว้าง (Broad specificity) จะไฮโดรไลส์โปรตีนพันธะเปปไทด์เป็นส่วนใหญ่และเอสเทอร์บางส่วน ในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลสิส โปรตีนไม่จำเป็นต้องมีตัวกระตุ้น (Activators) รวมทั้งไม่ต้องมีแคลเซียมไอออนในการช่วยให้เอนไซม์เสถียรเหมือนกับแอลคาไลน์โปรติเอสชนิดอื่นๆ เอนไซม์มีช่วง pH ที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลส์โปรตีน คือ pH 8-9 เอนไซม์มีความ

เสถียรในช่วง pH 5-11 ซึ่งเมื่อ pH ต่ำกว่า 5 หรือสูงกว่า 11 แอคติวิตีของเอนไซม์จะลดลง สันนิษฐานว่าเอนไซม์เกิดการย่อยตัวเอง(Autodigestion) โดยโมเลกุลจะคลายรูป (Unfold) (Ward, 1983) และเอนไซม์ยังมีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงประมาณ 55-60 องศาเซลเซียส

กลุ่มที่ 2 Subtilisin BPN' (Bacterial Protease Nagarase) หรือ Subtilisin NOVO ซึ่งผลิตจาก *Bacillus amyloliquefaciens* ในปี ค.ศ. 1954 ได้ทำการเตรียมเอนไซม์นี้ในรูปผลึกครั้งแรก และในปี ค.ศ. 1960 ได้แยกเอนไซม์ชนิดนี้ออกจาก Bacterial Protease NOVO ซึ่งพบว่าการเรียงตัวของกรดอะมิโนเหมือนกับ Subtilisin BPN' จึงเรียก Subtilisin NOVO เอนไซม์ชนิดนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 275 ตัว การเรียงตัวของกรดอะมิโนคล้ายกับ Subtilisin Carlsberg ถึง 85 เปอร์เซ็นต์ (Pero และ Sloma, 1993) บริเวณเร่งเอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโนเซรีนตำแหน่งที่ 211 ฮีสติดีนตำแหน่งที่ 64 และแอสปาเตทตำแหน่งที่ 32 (Outtrup และ Boyce, 1990) ในโมเลกุลไม่มีกรดอะมิโนซิสเตอีนดังนั้นจึงไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ มีอะลานีนเรสซิดิวส์อยู่ที่ปลายด้านหมู่อะมีโนและกลูตามีนเรสซิดิวส์อยู่ที่ปลายด้านหมู่คาร์บอกซิล มีแคลเซียมไอออนช่วยทำให้เอนไซม์เสถียรมากขึ้นโดยเฉพาะที่อุณหภูมิสูง หรือ pH ต่ำหรือสูงมาก เอนไซม์นี้มีความจำเพาะต่อการไฮโดรไลส์พันธะเปปไทด์และเอสเทอร์ต่างจาก Subtilisin Carlsberg (Ward, 1983)

นอกจากเอนไซม์ 2 กลุ่มนี้แล้วยังได้มีการค้นคว้าหาเชื้อแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งคือ Alkalophilic *bacilli* ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสที่มีความเสถียรในสภาวะของการซักล้าง(Washing condition)เช่น ค่าความเป็นกรด-ด่างช่วง 9-10 อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส และอยู่ในสภาวะที่มีสารลดแรงตึงผิว(Surfactants) เอนไซม์ชนิดนี้พบในจุลชีพ *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus subtilis*

ความสำคัญและการสร้างเอนไซม์ในจุลชีพ

ในจุลชีพส่วนใหญ่ โปรติเอสจะถูกผลิตขึ้นเพื่อทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาย่อยสลายโปรตีนในอาหารให้มีโมเลกุลขนาดเล็กเพียงพอที่เซลล์จะสามารถนำอาหารโปรตีนนั้นไปใช้ประโยชน์ได้

โปรติเอสที่ผลิตได้จากแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus spp.* จะเกิดในช่วงปลายของการเจริญแบบทวีคูณ(Exponential phase or Logarithmic phase)หรือในช่วงระยะแรกของการเจริญแบบคงที่(Stationary phase) ใน Complex media (Millet และคณะ, 1969 ; Priest, 1977) ซึ่งอธิบายได้คือ ในขณะที่เซลล์มีการเจริญ เซลล์จะนำกรดนิวคลิอิกจำนวนมากไปใช้ในการสร้างไรโบโซม เมื่อเซลล์หยุดการเจริญ การสร้างไรโบโซมจะหยุดลงทำให้มีกรดนิวคลิอิกเหลือมากพอที่จะนำไปควบคุมการสร้างเอนไซม์ในช่วงการเจริญแบบคงที่ (Coleman, 1967) เอนไซม์จะถูกสังเคราะห์จากไรโบโซมด้านปลายอะมิโนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดไฮโดรโฟบิค ทำให้

เอนไซม์สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ จากนั้นปลายส่วนไฮโดรโฟบิคนี้จะถูกตัดออกโดยเปปไทด์เปปติเดส ซึ่งอยู่ด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ แล้วเอนไซม์ก็จะพับอยู่ในรูปเสถียร(Ward, 1983)

ได้มีผู้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างโปรติเอสกับการสร้างสปอร์ ใน *Bacillus spp.* พบว่า จาก *Bacillus subtilis* 168 ซึ่งสามารถสร้างได้ทั้งแอลคาไลน์โปรติเอสและนิวทรัลโปรติเอส เมื่อทำการกลายพันธุ์แล้วพบว่ากลายพันธุ์ที่ไม่สามารถสร้างแอลคาไลน์โปรติเอสจะไม่สามารถสร้างสปอร์ และเมื่อใช้สารPhenyl Methyl Sulfonyl Fluoride(PMSF) ยับยั้งการทำงานของแอลคาไลน์โปรติเอส สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ด้วย ซึ่งสรุปได้ว่าแอลคาไลน์โปรติเอสมีผลต่อสร้างสปอร์ในช่วงปลายของระยะการเจริญแบบทวีคูณ (Dancer และ Mandelstam,1975)

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์

ปัจจัยพื้นฐานที่สำคัญในอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลชีพซึ่งมีผลต่อการเจริญและการสร้างโปรติเอสของจุลชีพคือ

1. อิทธิพลของแหล่งคาร์บอน

กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนหลักในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลชีพสามารถนำไปใช้โดยง่าย ในช่วง stationary phase แหล่งอาหารและพลังงานลดน้อยลง เชื้อจะเริ่มสร้างสปอร์พร้อมๆกับการสร้างเอนไซม์ด้วย และถ้ากลูโคสในอาหารเลี้ยงมีปริมาณมากเกินไป กลูโคสจะกดการทำงานของการควบคุมยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์(Catabolite repression)(Doi, 1973; Bernlohr, 1964; Hubner และคณะ 1993)

สนธยา ศรีเมฆ(2533) ได้ทำการศึกษาผลการเติมกลูโคสลงไปในอาหารเลี้ยงในช่วง Stationary phase ของการเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR25 พบว่าหลังการเติมกลูโคส 2% ลงไป 1 ชั่วโมง แอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรติเอสจะลดลงเพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับการเติมกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ตอนช่วงการถ่ายเชื้อโดยตรงจะพบว่าแอคติวิตีลดลงอย่างมาก และการสร้างแอลคาไลน์โปรติเอสยังขึ้นกับปริมาณของกลูโคสในอาหารเลี้ยงด้วย

เกษม พงษ์มณี(2536) ได้ศึกษาการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 โดยใช้วัตถุดิบราคาถูกหลายชนิดผสมกันเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าในอาหารเลี้ยงที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนจะให้ปริมาณการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสที่มากกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรพื้นฐาน Basal medium สูตร1 และ 2 ที่ใช้กลูโคส 0.5 เปอร์เซ็นต์

Fujiwara และ Yamamoto (1987) ได้ศึกษาการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus spp.* B21-2 โดยใช้วัตถุดิบราคาถูกหลายชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การเพาะเลี้ยงโดยใช้แป้งและกลูโคส ให้การผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสสูงสุดเมื่อเทียบกับการใช้ แลคโตส ซูโครส และกลีเซอรีน เป็นแหล่งคาร์บอน

Giesecke และคณะ (1991) ได้ศึกษาการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* พบว่าสามารถใช้กลีเซอรอลความเข้มข้นที่เหมาะสม เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนกลูโคสได้

Janssen และคณะ (1994) ได้ศึกษาการผลิตโปรติเอสจาก *Thermus sp.* Rt41A พบว่าการใช้กลูตาเมต เป็นแหล่งคาร์บอน จะสามารถเพิ่มการผลิตโปรติเอสได้สูงและการใช้อะซิเตทและกลูตาเมตเป็นแหล่งคาร์บอนจะทำให้การเจริญของเชื้อดี แต่ไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์

2. อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน

การสร้างโปรตีนจะถูกกดดันโดยกรดอะมิโนหรือเปปไทด์ที่มีมากเกินไปในอาหารเลี้ยง ทั้งนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ และการที่มีกรดอะมิโนและเปปไทด์หลายชนิดอยู่รวมกันจะมีผลการกดดันการสร้างได้มากกว่ากรดอะมิโนชนิดเดียว(Votruba และคณะ, 1987)

สนธยา ศรีเมฆ(2533) ได้ศึกษาผลของกรดอะมิโนผสมระหว่าง แอสปาร์เตท และแอสปาราจีน เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่ามีผลต่อการเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* TISTR25 โดยทำให้มีการผลิตเอนไซม์ที่สูงกว่าการใช้กรดอะมิโนชนิดเดียวเสริมลงในสูตรอาหาร แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดอะมิโน การเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นแต่การผลิตโปรติเอสลดลง

เกษม พงษ์มณี(2536) ได้ศึกษาการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 โดยใช้วัตถุดิบที่เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูกหลายชนิดเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าการใช้อาหารเลี้ยงที่มีกากเมล็ดทานตะวันกับกากถั่วเหลืองในอัตราส่วน 1:1 ที่มีไนโตรเจน 0.3 เปอร์เซ็นต์ ทำให้การเจริญและการผลิตโปรติเอสของเชื้อสูงกว่าการเลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐาน basal medium สูตรที่ 1 และ 2 ซึ่งใช้สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) 2.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน

O'Reilly และ Day (1983) ได้ศึกษาการผลิตโปรติเอสจาก *Aeromonas hydrophila* โดยวัตถุดิบหลายชนิดเป็นแหล่งไนโตรเจน เช่น เคซีน, Casamino acid, Proteose Peptone, Neopeptone, Tryptose และไม่ใช้วัตถุดิบใดเลย พบว่าเมื่อไม่ใช้วัตถุดิบใดเลยเป็นแหล่งไนโตรเจน จะมีการเจริญของเชื้อต่ำแต่มีการผลิตโปรติเอสสูง เมื่อเทียบกับการใช้วัตถุดิบอื่นๆ

พบว่าการเจริญของเชื้อสูงมากแต่มีการผลิตโปรติเอสที่น้อยกว่า เนื่องจากความเข้มข้นของกรดอะมิโนที่ไม่เหมาะสมมีผลต่อการกดดันการสร้างโปรตีเอสได้

3. อิทธิพลของฟอสเฟต

ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบของสารพันธุกรรม และโปรตีน ฟอสเฟตจะเป็นตัวเพิ่มความเสถียรของ mRNA ในกระบวนการสร้างโปรติเอส โดยการยับยั้ง RNase และช่วยให้เอนไซม์ที่ปล่อยออกมานอกเซลล์ได้ดีขึ้น แต่ถ้าเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีปริมาณฟอสเฟตมากเกินไปจะมีผลยับยั้งต่อการสร้างโปรติเอส (Moon และ Parulekar, 1991)

4. อิทธิพลของไอออนโลหะ

ปริมาณแมกนีเซียมไอออนในอาหารเลี้ยงมีผลต่อการการเจริญ การแบ่งตัว ขนาด และรูปร่างของเชื้อ พบว่ามีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ แต่ในอาหารเลี้ยงที่มีปริมาณแมกนีเซียมมากเกินไปจะมีผลยับยั้งต่อการสร้างโปรติเอส (Webb, 1949)

ส่วนไอออนชนิดอื่นๆเช่น แมงกานีส และเหล็ก พบว่าเป็น cofactor ของเอนไซม์หลายชนิดที่มีความสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์(John และ David, 1991)

5. อิทธิพลของสภาวะแวดล้อมที่ใช้ในการหมัก

ได้แก่ pH อุณหภูมิและปริมาณออกซิเจน เป็นต้น Roger และBernard(1972) ทำการเลี้ยง *Bacillus subtilis* ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่างๆตั้งแต่ 5-12 พบว่า ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 7.5-9.5 เหมาะสมต่อการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสของเชื้อ

Giesecke และคณะ(1991) ทำการเลี้ยง *Bacillus licheniformis* แบบ fed batch โดยควบคุมปริมาณการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสได้สูงกว่าที่ไม่ควบคุมปริมาณการละลายออกซิเจนถึง 4.6 เท่า

การกลายพันธุ์เพื่อเพิ่มการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอส

ในปัจจุบันแอลคาไลน์โปรติเอสนำมาใช้ประโยชน์กันมาก ดังนั้นจึงมีความต้องการเอนไซม์ในปริมาณสูงโดยเฉพาะในระดับอุตสาหกรรม จึงมีแนวคิดในการปรับปรุงสายพันธุ์จากสายพันธุ์ดั้งเดิมเพื่อให้มีการผลิตเอนไซม์ที่สูงขึ้น

การกลายพันธุ์(mutation)คือการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ซึ่งเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ หรือถูกชักนำให้เกิดขึ้น ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 วิธีใหญ่ๆ คือ การใช้รังสี และการใช้สารเคมี

การใช้รังสีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามชนิดของรังสีที่ใช้คือ

1. Ionizing radiations

ได้แก่ รังสีแกรมมา(γ) รังสีเอ็กซ์(χ) นิวตรอน และอนุภาคต่างๆ ซึ่งชักนำให้โครโมโซมแตก(Breakage) มีผลให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ Translation, Deletion และ Inversions นอกจากนี้ยังมีผลให้เกิด Deamination, Dehydroxylation ของ Nitrogenous base เกิด Depurination และ peroxide formation มีผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์เฉพาะจุด (point mutation) (Fantini, 1975)

2. รังสี อัลตราไวโอเลต

เป็นคลื่นแสงในช่วงความยาวคลื่น 200-300 นาโนเมตร โดยความยาวคลื่นที่เหมาะสมในการก่อการกลายพันธุ์คือ 253.7 นาโนเมตร ซึ่งอัลตราไวโอเลตนี้มีผลเกิดการจับกันของเบสไพริมิดีน 2 ตัว(Pyrimidine dimer)ทั้งที่อยู่บนดีเอ็นเอสายเดียวกัน หรืออยู่ตรงข้ามกัน มาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโคเวเลนท์ เกิดเป็น Thymine-Thymine Dimer, Thymine-Cytosine Dimer, Cytosine-Cytosine Dimer ในอัตราส่วน 2:1:1 (Fantini, 1975) ในกรณีที่เกิดเป็นไดเมอร์บนสายดีเอ็นเอเดียวกันก็สามารถเป็นสาเหตุให้เกิดการบิดตัวของดีเอ็นเอจนเสียรูปไปซึ่งจะมีผลต่อการจำลองตัวของดีเอ็นเอ (DNA Replication) โดยในตำแหน่งที่เป็นไดเมอร์นี้อาจมีการเปลี่ยนแปลงรหัสจาก GC→AT ซึ่งเป็นการกลายพันธุ์แบบ Transition เป็นส่วนใหญ่ และอาจพบ Tranversion mutations ได้ไม่มาก นอกจากนี้ยังพบการกลายพันธุ์แบบ frameshift และ deletions ได้อีกด้วย เนื่องจากการกลายพันธุ์โดยวิธีนี้ทำได้ง่ายและให้ผลการกลายพันธุ์ได้ดีจึงเป็นวิธีที่นิยมใช้ (Fantini, 1975)

การใช้สารเคมีชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้

1. Base Analogue Mutagen

เป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับเบสซึ่งเป็นองค์ประกอบของดีเอ็นเอ เช่น 5-Bromouracil (BU) มีความคล้ายคลึงกับเบส Thymine เพราะหมู่ Br มีขนาดเท่ากับหมู่ CH_3 ดังนั้น โดยขณะเกิดการจำลองตัวของดีเอ็นเอ BU ที่อยู่ในรูป Ketone Form จะทำหน้าที่คล้ายกับเป็น Thymine จับคู่กับเบส Adenine และ BU ที่อยู่ในรูป Enol Form จะทำหน้าที่คล้ายกับเบส Cytosine จับคู่กับ Guanine การเปลี่ยนแปลงของ BU ที่อยู่ในรูป Ketone Form และ Enol Form นี้เรียกว่า "Tautomerization" ซึ่งมีผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ Transition คือ AT เป็น GC หรือ GC เป็น AT

2. Intercalating Substances

เป็นสารเคมีที่มีโครงสร้างโมเลกุลแบนราบและสามารถเข้าไปแทรกกลางอยู่ระหว่างเกลียวคู่ของโมเลกุลดีเอ็นเอ ต่อมาจะมีการเติมหรือเอาออกของเบส 1ตัว ดังนั้นเมื่อเกิดการจำลอง

ตัวของดีเอ็นเอจะทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ "Frameshift" สารเคมีในกลุ่มนี้ได้แก่ Acridine orange, Ethidium Bromide และProflavin เป็นต้น

3. Chemical Mutagens

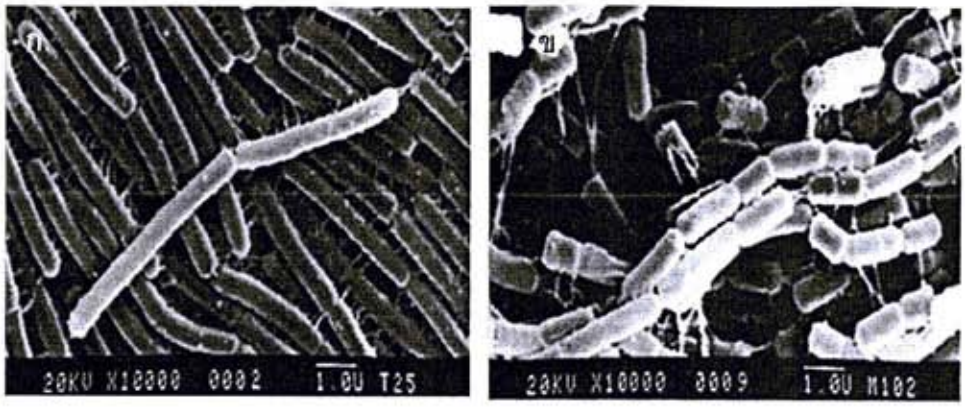
เป็นสารเคมีที่ทำปฏิกิริยากับเบสในดีเอ็นเอ ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ Transition หรือ Transversionซึ่งสารจำพวกนี้ได้แก่ Methyl Methane Sulfonate (MMS), Ethyl Methane Sulfonate(EMS), N-Methyl-N'-Nitrosoguanidine(NTG)

มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย

จากการที่ จันทิมา จิรนุชนาฎ (2539) ได้ทำการกลายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR25(รูปที่2 ก.) ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและสารเคมี NTG ได้สายพันธุ์ใหม่(UUNN-1)(รูปที่2 ข.) ที่สามารถให้การผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสที่สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมถึง 81.80 เปอร์เซ็นต์แต่การกลายพันธุ์ดังกล่าวมีผลทำให้ลักษณะรูปร่างของเชื้อมีขนาดสั้นลง และสมบัติบางประการของแอลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตได้นั้นเปลี่ยนไปด้วย ซึ่งในส่วนของสมบัติของแอลคาไลน์โปรติเอสที่เปลี่ยนไปนั้นมีการรายงานไว้เฉพาะส่วนของค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน แต่ยังไม่ได้มีการสกัดแยกให้บริสุทธิ์และศึกษาถึงสมบัติอื่นๆบางประการอีก และยังเป็นไปได้ว่าการกลายพันธุ์นั้นยังจะมีผลให้ปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสแตกต่างไปจากสายพันธุ์ดั้งเดิมอีกด้วย

เพื่อให้ได้ประโยชน์สูงสุดจากการทำงานวิจัยนี้ การศึกษาถึงภาวะที่เหมาะสมในผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสของเชื้อที่ถูกกลายพันธุ์นี้ในถังหมักขนาด 5 ลิตรแบบไม่ต่อเนื่อง ซึ่งจะทำให้ได้เอนไซม์ในปริมาณที่มากพอสำหรับการสกัดแยกและศึกษาสมบัติพื้นฐานของเอนไซม์ และข้อมูลภาวะที่ได้จากการศึกษานี้ยังสามารถใช้เป็นแนวทางสำหรับขยายส่วนการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อสายพันธุ์ใหม่นี้ต่อไปได้อีกด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2 ความแตกต่างระหว่างเซลล์จากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนที่กำลังขยาย 10000 เท่า (ก)*Bacillus subtilis* TISTR25 และ (ข) *Bacillus subtilis* กลายพันธุ์ UUNN-1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสมีดังนี้

Fujiwara และ Yamamoto (1987) ได้ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสจาก Alkalophilic *Bacillis sp.* ให้ได้ปริมาณสูงขึ้นโดยใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก เช่น กากถั่วเหลือง bonito extract มาเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตได้

ปกรณ์ จิโรจน์กุลกิจ(2532) ได้ศึกษาสมบัติและการทำให้บริสุทธิ์แอลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 พบว่ามีความจำเพาะในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์เหมือนกันกับ Subtilisin Carlsberg และ Subtilisin BPN' ซึ่งเป็นเอนไซม์มาตรฐาน

Moon และ Parulekar (1991) ได้ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Bacillus firmus* NRS783 ในถังหมักระบบปิดและแบบ fed-batch พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง และอัตราการละลายของออกซิเจน ค่าความเข้มข้นของไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและสารสกัดจากยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอส

เกษม พงษ์มณี (2536) ได้ศึกษาการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 ในระดับขวดเขย่าโดยใช้แหล่งวัตถุดิบทางการเกษตรเป็นแหล่งอาหาร พบว่าการใช้แป้งมันสำปะหลัง และกากถั่วเหลืองและกากเมล็ดดอกทานตะวันสามารถเพิ่มการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสได้

จันทิมา จิรนุชนาฏ (2539) ศึกษาการกลายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR25 เพื่อเพิ่มการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอส พบว่าได้สายพันธุ์ UUNN-1 ที่ให้การผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม

วรรณวิมล ทรัพย์ดี (2540) ได้ศึกษาการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรแบบไม่ต่อเนื่อง พบว่าสามารถหาภาวะที่เพิ่มการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสได้

วัตถุประสงค์การวิจัย

ศึกษาสมบัติและภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรแบบไม่ต่อเนื่อง เพื่อนำแอลคาไลน์โปรตีเอสที่กลายพันธุ์ไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม

บทที่ 2

อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

1. อุปกรณ์

อุปกรณ์	รุ่นที่ผลิต	บริษัท/ประเทศ
1. ถังหมักขนาด 5 ลิตร	BIO FLO II C	New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison ,N.J. , U.S.A.
2. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง	Jenway 6400	Labquip England
3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง	DU 650	Beckman, U.S.A.
4. เครื่องปั่นแยก		Kokusan Enshiki Co., Ltd., Japan
5. เครื่องปั่นแยกความเร็วสูง	J2-21	Beckman, U.S.A.
6. เครื่องอบนึ่งฆ่าเชื้อ	HA-30	Hirayama Manufacturing Cooperation, Japan
7. ตู้บ่มเชื้อ	Heraeus TypeB 5050E	Heraeus, Germany
8. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิด้วยน้ำ	G76D	New Brunswick
9. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง	HPM 83	Radiometer, Copenhagen, Denmark
10. เครื่องชั่งสาร	Mettler AE200	Mettler Instrument AG., Switzerland
11. เครื่องชั่งสาร	Satorius LC6205	
12. เครื่องหาปริมาณไนโตรเจน	Kjeldaltherm	Gerhardt, Germany
13. เครื่องระเหยน้ำอุณหภูมิต่ำ	Lyph-Lock 1L	LABCONCO, USA

2. เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัท/ประเทศ
Casein Hammarstan L-Tyrosine	BDH Laboratory chemical Division, England
Ammonium sulfate Glucose Imidazole Trichloroacetic acid Skim milk	Fulka AG. Buch, Switzerland
Ammonium molybdate Boric acid Calcium chloride Copper sulfate Di sodium hydrogen phosphate Magnesium sulfate Potassium dihydrogen phosphate Sodium carbonate Sodium bicarbonate Sodium hydroxide	Meck AG. Darmstadt, Germany
Antifoam A Bovine Serum Albumin(BSA) DEAE-Cellulose ethylenediamine tetracetic acid(EDTA) phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)	Sigma Chemical Co., Ltd., U.S.A.
Sephadex G-100	Pharmacia Biotech. Sweden

3. วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

กากถั่วเหลืองและกากเมล็ดดอกทานตะวัน ได้รับความอนุเคราะห์โดย บริษัท กรุงเทพอาหารสัตว์ จำกัด บางนา-ตราด กม.21 อ.บางพลี จ.สมุทรปราการ

แป้งมันสำปะหลัง ตราปลามังกร

4. แบคทีเรียใช้ในการทดลอง

Bacillus subtilis สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ซึ่งเก็บไว้โดยวิธี Lyophilization โดย จันทิมา จิรานุชนาฏ(2539) ซึ่งได้ทำการกลายพันธุ์จาก *Bacillus subtilis* TISTR25 ด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลต 2 ครั้งและ สาร NTG 2 ครั้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเก็บรักษา

Nutrient Agar Slant

Beef Extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Bacto agar	15	กรัม

ละลายส่วนผสมของอาหารในน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1 ลิตร บรรจุในหลอดแก้วทดลอง แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำหลอดทดลองมาวางเอียงประมาณ 15 องศา ก่อนที่อาหารจะแข็งตัว เมื่ออาหารแข็งตัวเก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

3.1.2 อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ(Inoculum medium)(Basal medium)

(เกษม พงษ์มณี, 2536)

ส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงปริมาตร 1 ลิตร

KH_2PO_4	1	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.01	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	20	กรัม
กลูโคส	5	กรัม

ละลายส่วนผสมของอาหารในน้ำกลั่น เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 0.8 ลิตร ปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ส่วนของสารละลายกลูโคสแยกอบฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียสภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 10 นาทีแล้วจึงเติมเข้าไปให้มีความเข้มข้นสุดท้ายตามสูตรข้างต้น

3.1.3 สารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน(เกษม พงษ์มณี, 2536)

ผสมกากถั่วเหลืองเข้ากับกากเมล็ดดอกทานตะวันในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก เติมสารละลายกรดซัลฟุริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปริมาตร 600 มิลลิลิตรต่อกากถั่วเหลืองผสม

กากเมล็ดดอกทานตะวันน้ำหนัก 1 กิโลกรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 45 นาที กรองเอาส่วนสารละลาย ปรับ pH ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มอล จนมีค่าเท่ากับ 7 กรองเอาส่วนสารละลายเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 2 ลิตร นำไปหาปริมาณไนโตรเจน แล้วเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสหรือ –20 องศาเซลเซียส

3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอส ในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร

อาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสจะเปลี่ยนแปลงตามปัจจัยที่ต้องการศึกษา นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ในอาหารปริมาตร 1 ลิตรประกอบด้วย

KH_2PO_4	1	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.01	กรัม

สารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน

แป้งมันสำปะหลัง

3.1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับศึกษาปริมาณของไนโตรเจนที่เหมาะสม

ในอาหารปริมาตร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับในข้อ 3.1.4 โดยมีปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมคงที่ แต่เปลี่ยนแปลงปริมาณของสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวันที่ได้จากข้อ 3.1.3 ให้มีปริมาณไนโตรเจนในสัดส่วน 0.1-0.4 เปอร์เซ็นต์ (w/v)

3.1.6 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับศึกษาปริมาณของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสม

ในอาหารปริมาตร 1 ลิตร มีส่วนประกอบเช่นเดียวกับในข้อ 3.1.4 โดยมีปริมาณไนโตรเจนของสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวันที่ได้จากข้อ 3.1.3 ที่เหมาะสมคงที่ แต่เปลี่ยนปริมาณแป้งมันสำปะหลังในสัดส่วน 0-1.0เปอร์เซ็นต์(w/v)

3.1.7 อาหารเลี้ยงที่ใช้ทดสอบขั้นปฐมภูมิ

-Skim milk solution

ละลายนมผงพร่องมันเนย(Skim milk)จำนวน 10 กรัมในน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 10 นาที

-Skim milk agar plate

Bacto agar 1.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำอบไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติม Skim milk solution 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้พออุ่นแล้วเทลงบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.2 การเตรียมสารละลาย

3.2.1 สารละลายสำหรับวัดแอลคาไลน์โปรติเอสแอคติวิตี

-สารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 9.5

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 21.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร และชั่งโซเดียมไบคาร์บอเนต 16.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ผสมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตปริมาตร 202.5 มิลลิลิตร กับสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตปริมาตร 47.5 มิลลิลิตร นำไปปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 9.5 แล้วเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1 ลิตร

-สารละลายเคซีน 0.5 เปอร์เซ็นต์ pH 9.5

ละลายเคซีนแฮมเมอร์สเตน 0.5 กรัม ในสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนต บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 9.5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

-สารละลายกรดไตรคลอโรอะเซติก 10 เปอร์เซ็นต์

ชั่งกรดไตรคลอโรอะเซติก 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุเก็บไว้ในขวดสีชา

3.2.2 สารละลายสำหรับหาปริมาณไนโตรเจนโดยวิธี Kjeldahl (Leonard และคณะ; 1987)

-สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซ็นต์

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

-สารละลายกรดบอริก 4 เปอร์เซ็นต์

ชั่งกรดบอริก 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

-สารละลายอินดิเคเตอร์

ชั่งเมธิลเรด 0.2 กรัม และเมธิลลีนบลู 0.1 กรัม นำไปละลายในเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร

3.2.3 การเตรียมสารละลายสำหรับหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Nelson และ Samogyl(Nelson; 1944)

-Nelson Reagent

ชั่งแอมโมเนียมโมลิบเดต($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) 53.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 21 มิลลิลิตร ผสมจนเข้ากัน แล้วเติมสารละลาย $Na_2HASO_4.7H_2O$ จำนวน 6 กรัม ซึ่งละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมงและกรองก่อนนำไปใช้

-Alkaline Copper Reagent

ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต($Na_2HPO_4.12H_2O$) 71 กรัม และโปแตสเซียมโซเดียมทาร์เทรท 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 700 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต($CuSO_4.5H_2O$) เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 80 มิลลิลิตร นำไปอุ่นบน hot plate แล้วใส่โซเดียมซัลเฟตจำนวน 180 กรัม คนจนละลาย ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร ตั้งทิ้งไว้ 24-28 ชั่วโมง เก็บไว้ในขวดสีชาและกรองก่อนนำมาใช้

3.2.4 การเตรียมสารละลายสำหรับวัดปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอร์ด(Bradford; 1976)

-สารละลายโปรตีนรีเอเจนต์

ชั่ง Comassie brilliant G-250 จำนวน 100 มิลลิกรัม ละลายในเอธิลแอลกอฮอล์เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมกรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1 ลิตร

-สารละลายโปรตีนมาตรฐาน(1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

ชั่ง Bovine serum albumin (BSA) จำนวน 10 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศา

3.3 <u>การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง</u>

3.3.1 การเก็บรักษาเชื้อระยะสั้น

เขี่ยเชื้อจาก stock แล้ว streak ลงบน Nutrient Agar(NA) Slant จากข้อ 3.1.1 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วพันจุกด้วยพาราฟิล์มเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งจะเก็บได้นานประมาณ 2-3 เดือน

3.3.2 การเก็บรักษาเชื้อระยะยาว

เลี้ยงเชื้อใน Nutrient Broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาผสมกับกลีเซอรอล 50 เปอร์เซ็นต์ เทปิดทับหน้า 2-3 เซนติเมตร พันจุกด้วยพาราฟิล์มเก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส เก็บได้นานประมาณ 1 ปี

3.4 การศึกษาการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอส

3.4.1 การเตรียมเชื้อตั้งต้น

เขี่ยเชื้อจาก NA slant มา steak ลงบน skim milk agar plate จากข้อ 3.1.7 นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เขี่ยโคโลนี 1-2 โคโลนีลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อจากข้อ 3.1.2 นำไปบ่มด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบการเขย่า 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้ววัดความขุ่นเซลล์ที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ให้ได้ประมาณ 0.6

3.4.2 หาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรแบบไม่ต่อเนื่อง ทุกการทดลองได้ทำ 3 ซ้ำและหาค่าเฉลี่ย

3.4.2.1 หาปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยง

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1 ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงตามข้อ 3.1.6 ปริมาตรเริ่มต้นที่ 3.5 ลิตร โดยแปรผันปริมาณแป้งในอาหารเลี้ยงเท่ากับ 0.0, 0.5, 1.0 เปอร์เซ็นต์(w/v)และมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.3 เปอร์เซ็นต์(w/v) ควบคุมปริมาณเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์(v/v) ใช้อัตราการกวนที่ 250 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 1 vvm ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 2 นอร์มอล ให้อยู่ในช่วง 7.0 และควบคุมฟองที่เกิดจากการหมักด้วย Antifoam A ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:3 เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 84 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง วัดการเจริญของเซลล์และแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรติเอส

3.4.2.2 หาปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยง

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1 ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงตามข้อ 3.1.5 ปริมาตรเริ่มต้นที่ 3.5 ลิตร โดยแปรผันมีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.2, 0.3, 0.4 เปอร์เซ็นต์(w/v) ควบคุมปริมาณแป้งในอาหารเลี้ยงเท่ากับปริมาณแป้งที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2.1 ควบคุมปริมาณเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์(v/v)ใช้อัตราการกวนที่ 250 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 1 vvm ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 2 นอร์มอล ให้อยู่ในช่วง 7.0 และควบคุมฟองที่เกิดจากการ

หมักด้วย Antifoam A ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:3 เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 84 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง วัดการเจริญของเซลล์และแอคติวิตีของเอลคาไลน์โปรติเอส

3.4.2.3 หาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1 ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงตามข้อ 3.1.5 ปริมาตรเริ่มต้นที่ 3.5 ลิตร โดยแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 2 นอร์มอล ให้มีค่าเท่ากับ 6.0, 7.0, 8.0 ควบคุมปริมาณไนโตรเจนปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2.2 ปริมาณแป้งในอาหารเลี้ยงเท่ากับปริมาณแป้งที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2.1 ควบคุมปริมาณเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์(v/v)ใช้อัตราการกวนที่ 250 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 1 vvm และควบคุมฟองที่เกิดจากการหมักด้วย Antifoam A ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:3 เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 84 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง วัดการเจริญของเซลล์และแอคติวิตีของเอลคาไลน์โปรติเอส

3.4.2.4 หาปริมาณเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสม

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1 ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงตามข้อ 3.1.4 ปริมาตรเริ่มต้นที่ 3.5 ลิตร โดยแปรผันปริมาณเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 0.5, 1, 1.5 เปอร์เซ็นต์(v/v) ควบคุมปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2.2 ปริมาณแป้งในอาหารเลี้ยงเท่ากับปริมาณแป้งที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2.1 ใช้อัตราการกวนที่ 250 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 1 vvm ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 2 นอร์มอล ให้อยู่ในช่วง 7.0 และควบคุมฟองที่เกิดจากการหมักด้วย Antifoam A ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:3 เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 84 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง วัดการเจริญของเซลล์และแอคติวิตีของเอลคาไลน์โปรติเอส

3.4.2.5 หาอุณหภูมิที่เหมาะสม

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1 ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงตามข้อ 3.1.5 ปริมาตรเริ่มต้นที่ 3.5 ลิตร โดยแปรผันค่าอุณหภูมิในการหมักเป็น 30, 37, 45 องศาเซลเซียส ควบคุมปริมาณไนโตรเจนปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2.2 ปริมาณแป้งในอาหารเลี้ยงเท่ากับปริมาณแป้งที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2.1 ควบคุมปริมาณเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์(v/v)ใช้อัตราการกวนที่ 250 รอบต่อนาที ความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 2 นอร์มอล ให้มีค่าเท่ากับค่าที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2.4 อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 1 vvm และควบคุมฟองที่เกิดจากการหมักด้วย Antifoam A ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:3 เลี้ยง

เชื้อเป็นเวลา 84 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง วัดการเจริญของเซลล์และแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรติเอส

3.4.2.6 หาอัตราการเติมอากาศที่เหมาะสม

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1 ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงตามข้อ 3.1.5 ปริมาตรเริ่มต้นที่ 3.5 ลิตร โดยแปรผันอัตราการเติมอากาศเท่ากับ 0.5, 1.0, 1.5 vvm ควบคุมปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2.2 ปริมาณแป้งในอาหารเลี้ยงเท่ากับปริมาณแป้งที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2.1 ควบคุมปริมาณเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์(v/v)ใช้อัตราการกวนที่ 250 รอบต่อนาที ความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 2 นอร์มอล ให้มีค่าเท่ากับค่าที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2.3 ค่าอุณหภูมิในการหมักเท่ากับค่าที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2.5 และควบคุมฟองที่เกิดจากการหมักด้วย Antifoam A ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:3 เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 84 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง วัดการเจริญของเซลล์และแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรติเอส

3.4.2.7 หาอัตราการกวนที่เหมาะสม

ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1 ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงตามข้อ 3.1.5 ปริมาตรเริ่มต้นที่ 3.5 ลิตร โดยแปรผันใช้อัตราการกวนที่ 150, 250, 300 รอบต่อนาที ควบคุมปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2.2 ปริมาณแป้งในอาหารเลี้ยงเท่ากับปริมาณแป้งที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2.1 ควบคุมปริมาณเชื้อตั้งต้นเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์(v/v) ความเป็นกรด-ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 2 นอร์มอล ให้มีค่าเท่ากับค่าที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2.4 ค่าอุณหภูมิในการหมักเท่ากับค่าที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2.5 อัตราการเติมอากาศเท่ากับค่าที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2.6 และควบคุมฟองที่เกิดจากการหมักด้วย Antifoam A ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:3 เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 84 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง วัดการเจริญของเซลล์และแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรติเอส

3.5 <u>การวัดการเจริญของเชื้อโดยวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้ง</u>

นำตัวอย่างน้ำหมักที่ได้ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ไปเหวี่ยงตะกอนด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีแยกเอาส่วนตะกอนเซลล์มาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง และนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาใส่เดสิคเคเตอร์รอให้เย็นแล้วนำมาชั่งหาน้ำหนัก

3.6 การวัดแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรติเอส(ดัดแปลงจากวิธีทดลองของ Richardson และคณะ 1978)

นำส่วนใสที่ได้จากข้อ 3.5 มา 0.1 มิลลิลิตร บ่มกับสารละลายเคซีน เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ในสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 9.5 ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เสร็จแล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นทันที แล้วเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงตะกอนที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาแอคติวิตีของเอนไซม์โดยเปรียบเทียบหาปริมาณไทโรซีนที่เกิดจากการย่อยสลายเคซีนโดยเอนไซม์เทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซีนที่มีความเข้มข้น 0-140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร(ภาคผนวกที่ 1)

การคำนวณค่าแอลคาไลน์โปรติเอสแอคติวิตี

$$\text{แอลคาไลน์โปรติเอสแอคติวิตี(ยูนิต)} = \frac{\text{OD280 x Total volumn(ml) x Dilution}}{\text{Slope x Sample vol.(ml) x Incubation time(min)}}$$

3.7 การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl (Leonard และคณะ; 1987)

นำตัวอย่างที่ได้ตามข้อ 3.1.3 ปริมาณ 1-2 มิลลิลิตร เติมเกลือผสมช่วยเร่งปฏิกิริยา 7 กรัม (โพแทสเซียมซัลเฟต 95 กรัม คอปเปอร์ซัลเฟต 5กรัม) และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร ให้ความร้อนบนเตาหลุมจนได้สารละลายใสสีเขียว เมื่อสารละลายที่ได้เย็นเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายที่ได้ลงในขวดรูปกรวยที่มีสารละลายกรดบอริก 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ซึ่งมีอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด เติมสารละลายที่กลั่นได้จนกระทั่งมีปริมาตร 200 มิลลิลิตร หรือจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเขียว แล้วนำสารละลายที่ได้ไตเตรทกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอน ไตเตรทจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วงใส คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนจากสูตรด้านล่างนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน} = \frac{(A-B)xCx1.4}{V}$$

A = ปริมาณกรดไฮโดรคลอลิกที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

B = ปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทแบลงค์

C = ความเข้มข้นของกรดไฮโลรคลอริก

V = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้

1.4 = ปริมาณไนโตรเจน(มิลลิกรัม)ที่สมมูลกับปริมาณกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3.8 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีแบรดฟอรด์(Bardford; 1976)

นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโปรตีนรีเอเจนต์ 1 มิลลิลิตร เขย่าและตั้งทิ้งไว้ 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เปรียบเทียบหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานที่มีปริมาณโปรตีน 0-100 ไมโครกรัม(ภาคผนวกที่ 2)

3.9 การเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

3.9.1 การตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียม

นำน้ำหมักมาแยกตะกอนออกโดยเครื่องเหวี่ยงตะกอนที่ความเร็ว 5,500 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่บดละเอียดตั้งแต่ 0-40%, 40-60%, 60-80% และมากกว่า80 เปอร์เซ็นต์อิ่มตัว ในที่เย็น แยกตะกอนออกโดยเครื่องเหวี่ยงตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนที่ได้มาละลายในสารละลายอิมิดาโซลบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.6 และทำการไดอะไลซิสเพื่อกำจัดเกลือในสารละลายเดียวกัน จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้มาทำให้เข้มข้นด้วยวิธี Lyophilization และเก็บเอนไซม์ผงที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.9.2 การทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์ ดีอีเออี-เซลลูโลส

-การเตรียมคอลัมน์ ดีอีเออี-เซลลูโลส

นำ ดีอีเออี-เซลลูโลส เรซิน 15 กรัม แช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร คนเบาๆแล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที เทส่วนใสและส่วนแขวนลอยออก ล้างด้วย

น้ำกลั่น 3-4 ครั้ง แช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร คนเบาๆแล้วตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งมี ค่าความเป็นกรด- ด่างประมาณ 7 แล้วนำเรซินที่ได้มาบรรจุในคอลัมน์ ขนาด 1.3 x 30 เซนติเมตร ให้เรซินสูง 25 เซนติเมตร ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 7.5 จนกระทั่งสารละลายที่ไหลผ่านคอลัมน์มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5

-การแยกโปรตีนด้วยคอลัมน์ ดีอีเออี-เซลลูโลส

นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.9.1 มาละลายในสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 7.5 และนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ใส่ลงในคอลัมน์ ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายเดียวกันและเก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 5 มิลลิลิตร นำตัวอย่างที่ได้วัดโปรตีนที่ไม่จับกับคอลัมน์ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร จนกระทั่งไม่มีโปรตีนออกมาอีกจึงชะคอลัมน์ด้วย linear salt gradient ความเข้มข้นเกลือ 0-1.0 โมลาร์ เก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 5 มิลลิลิตร นำตัวอย่างที่ได้วัดโปรตีนที่ถูกชะที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร วัดค่าการนำไฟฟ้าเพื่อคำนวณความเข้มข้นเกลือในแต่ละหลอดโดยเทียบกับค่าการนำไฟฟ้าของเกลือมาตรฐาน(ภาคผนวกที่ 3) และวัดแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรติเอส เสร็จแล้วรวมสารละลายเฉพาะหลอดที่มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรติเอสทำให้เข้มข้นด้วยวิธี Lyophilization และเก็บเอนไซม์ผงที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส

3.9.3 การทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์ เซฟาเด็กซ จี-100

-การเตรียมคอลัมน์เซฟาเด็กซ จี-100

แช่เซฟาเด็กซ จี-100 ปริมาณ 20 กรัมในสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 7.5 ปริมาตร 600 มิลลิลิตร คนเบาๆแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง นำมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 1.5 x 60 เซนติเมตร ให้ได้ระดับเจลสูง 56 เซนติเมตร ชะด้วยสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 7.5 ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ ด้วยอัตราการไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เติมสารละลายผสมของบลูเด็กซแทรน 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับโปแตสเซียมไดโครเมต 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บแยกส่วนสารละลายที่ผ่านคอลัมน์ตัวอย่างละ 2 มิลลิลิตร หาปริมาตรสารละลายที่ใช้ชะบลูเด็กซแทรน(viod volume, V_o) หาปริมาตรสารละลายที่ใช้ชะโปแตสเซียมไดโครเมต(total bed volume, V_t)

-การแยกโปรตีนด้วยคอลัมน์เซฟาเด็กซ จี-100

นำเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 3.9.2 มาละลายในสารละลายทริส-คลอไรด์บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 7.5 และนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้ใส่ลงในคอลัมน์ ชะด้วยคอลัมน์ด้วยสารละลายเดียวกันและเก็บแยกส่วนสารละลายที่ออกมาจากคอลัมน์หลอดละ 2 มิลลิลิตร นำตัวอย่างที่ได้วัดปริมาณโปรตีนทที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร และวัดแอคติวิตีของ

แอลคาไลน์โปรติเอส เสร็จแล้วรวมสารละลายเฉพาะหลอดที่มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรติเอส ทำให้เข้มข้นด้วยวิธี Lyophilization และเก็บเอนไซม์ผงที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส

และเปรียบเทียบค่า K_{av} ที่คำนวณได้กับค่า K_{av} ของโปรตีนมาตรฐาน เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุล โดย

$$K_{av} = (V_e-V_o)/V_t-V_o)$$

V_e คือ Elution volume ของโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์

V_o คือ Void volume ของคอลัมน์

V_t คือ Total volume ของคอลัมน์

3.10 <u>การทดสอบสมบัติของเอนไซม์</u>

3.10.1 ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

ทำตามวิธีข้อ 3.6 โดยทดสอบกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH ต่างๆดังนี้ สารละลายซิเตรท 0.1 โมลาร์ pH 6.0 และ6.5 สารละลายทริส- คลอไรด์ 0.1 โมลาร์ pH 7.0, 7.5, 8.0 ,8.5 และ 9.0 สารละลายคาร์บอเนท-ไบคาร์บอเนทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 10.5 และ 11

3.10.2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

ทำตามวิธีข้อ 3.6 โดยทดสอบอุณหภูมิใช้ในการบ่มเอนไซม์เป็น 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 องศาเซลเซียส

3.10.3 ศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์

บ่มสารละลายเอนไซม์กับสารละลายเคซีนที่ความเข้มข้น 0.5, 1.5, 3.0, 6.0 และ 12 มิลลิโมลาร์ วัดแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรติเอสหาค่า K_m และ V_{max} ต่อเคซีน โดยการทำกราฟแบบ Lineweaver Burk

3.10.4 ศึกษาผลของตัวยับยั้งปฏิกิริยาเอนไซม์

บ่มสารละลายจากเอนไซม์ปริมาตร 0.1 มล. กับสารละลายของสารต่อไปนี้ phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ และ ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ใน คาร์บอเนท-ไบคาร์บอเนทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 9.5 เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปวัดแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรติเอสที่เหลือ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

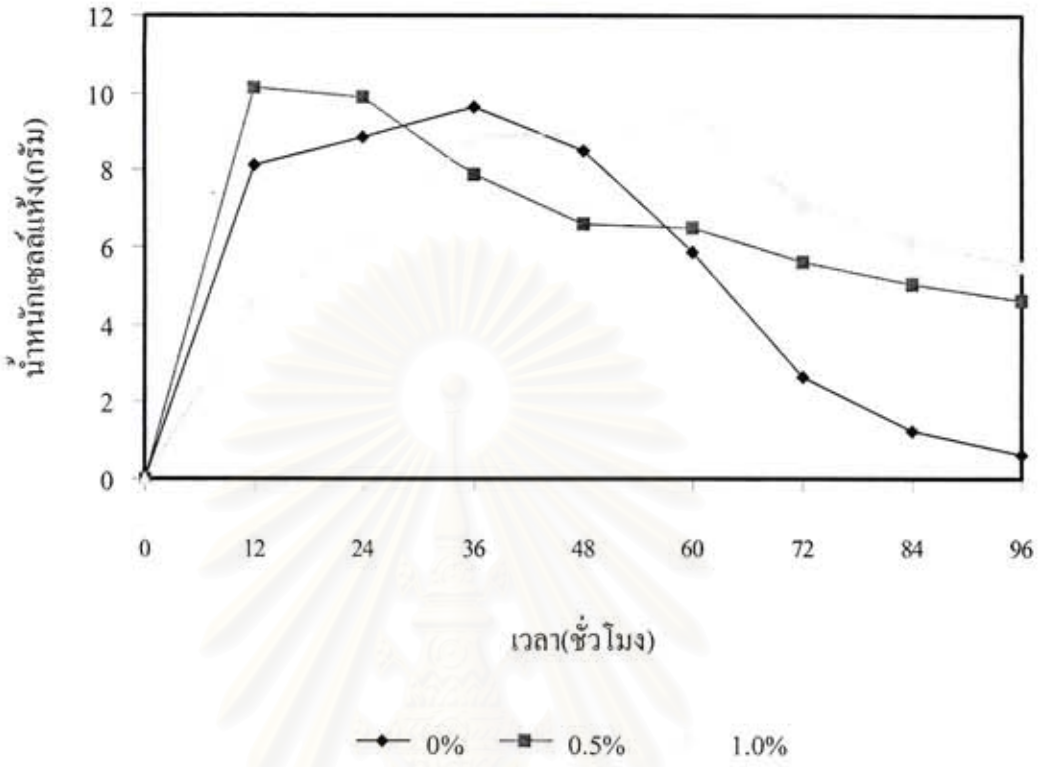
ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง

วรรณวิมล ทรัพย์ดี (2540) ได้ศึกษาการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรแบบไม่ต่อเนื่อง และพบว่าอาหารเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอส ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1%(w/v) $MgSO_4.7H_2O$ 0.05%(w/v) $CaCl_2.2H_2O$ 0.001%(w/v) สารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน 0.3%(w/v) และแป้งมันสำปะหลัง 0.1%(w/v) ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิในการหมัก 37 องศาเซลเซียส อัตราการเติมอากาศ 1 vvm อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะนำมาเป็นภาวะเริ่มแรกในการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง ซึ่งทำให้การผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสสูงกว่า *Bacillus subtilis* TISTR25 สายพันธุ์ดั้งเดิม 85.25%

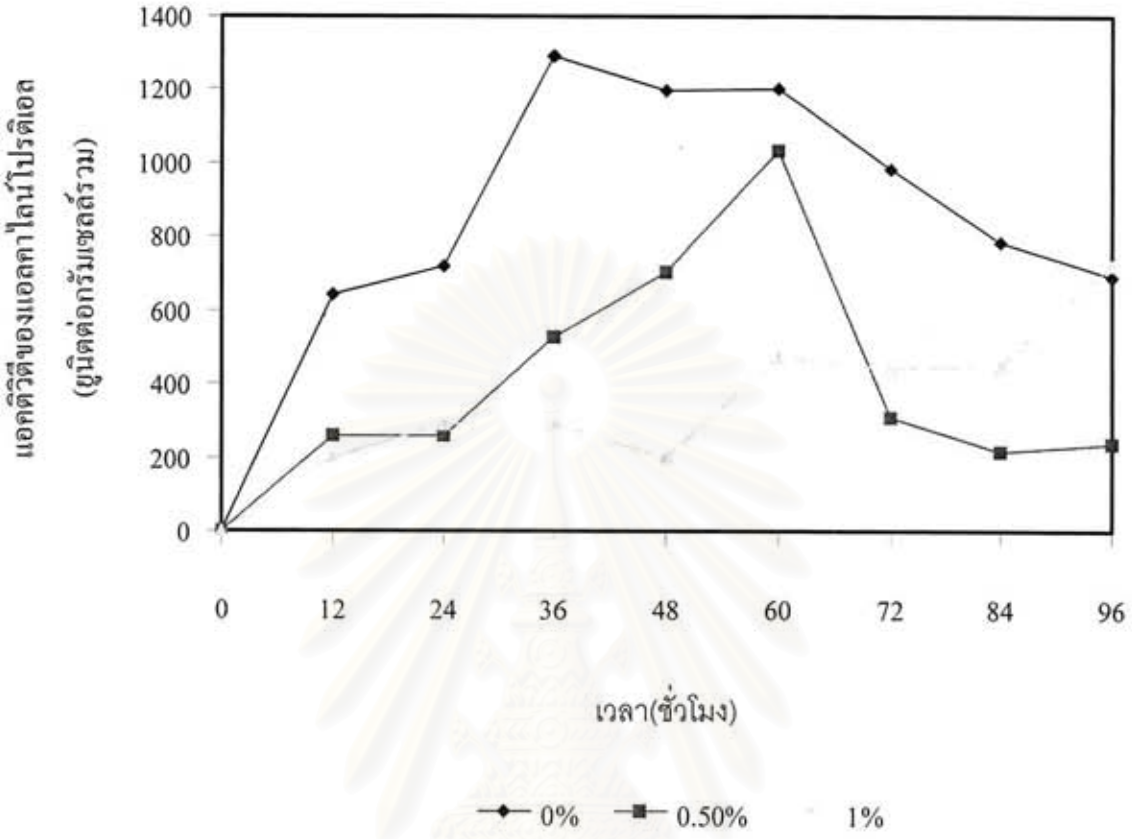
4.1.1 ผลของปริมาณแหล่งคาร์บอน

เนื่องจากแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเป็นปัจจัยพื้นฐานที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์และการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอส ในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง โดยแหล่งคาร์บอนที่ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงคือ แป้งมันสำปะหลัง และทำการทดลองตามข้อ 3.4.2.1 ผลการทดลองแสดงไว้ในกราฟรูปที่ 3 และ 4 ตามลำดับ พบว่าที่การหมักโดยใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 0, 0.5, 1 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณการเจริญของเชื้อสูงสุด ซึ่งวัดเป็นน้ำหนักเซลล์รวมคือ 9.65, 10.5, 9.45 กรัม ตามลำดับ โดยในการใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ เชื้อมีการเจริญแบบทวีคูณในเวลา 0-24 ชั่วโมง มีการเจริญสูงสุดที่ 36 ชั่วโมง และลดลงเรื่อยๆ มีการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสสูงสุด เท่ากับ 1,290 ยูนิตต่อน้ำหนักเซลล์แห้งรวม ในชั่วโมงที่ 36 ซึ่งมากกว่าการหมักในภาวะอื่น ในการทดลองต่อไปจึงไม่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยง และลดระยะเวลาที่ใช้ในการหมักเหลือเพียง 84 ชั่วโมง



รูปที่ 3 เปรียบเทียบการเจริญของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 0, 0.5 และ 1 %(w/v) ในอาหารเลี้ยงที่มีปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.3%(w/v), ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0%(v/v) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}C อัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



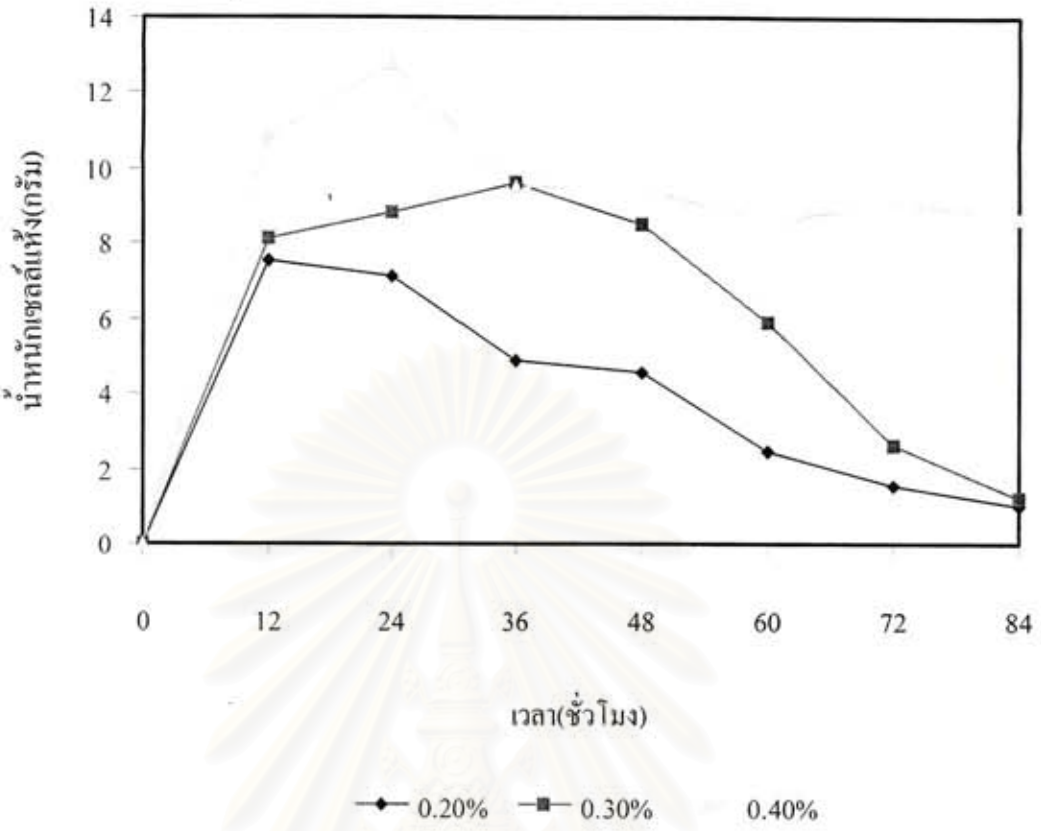
รูปที่ 4 เปรียบเทียบการผลิตเอลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 0, 0.5 และ 1 %(w/v) ในอาหารเลี้ยงที่มีปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.3%(w/v), ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0%(v/v) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}C อัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.2 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจน

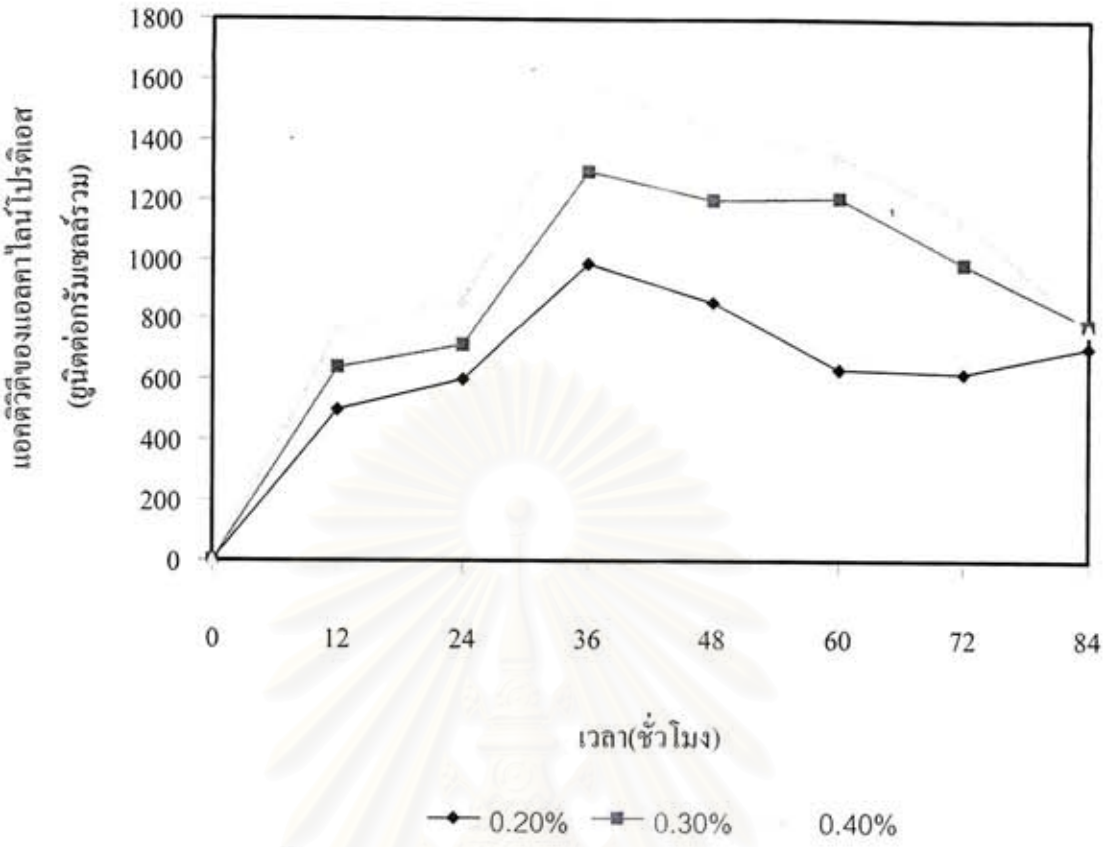
แหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเป็นปัจจัยพื้นฐานที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์และการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอส ในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง โดยแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงคือ สารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน และทำการทดลองตามข้อ 3.4.2.2 ผลการทดลองแสดงไว้ในกราฟรูปที่ 5 และ 6 ตามลำดับ พบว่าที่การหมักโดยใช้ปริมาณสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวันที่มีเปอร์เซ็นต์ของไนโตรเจนเท่ากับ 0.2, 0.3, 0.4 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณการเจริญของเชื้อสูงสุด ซึ่งวัดเป็นน้ำหนักเซลล์รวมคือ 7.52, 9.63, 12.8 กรัม ตามลำดับ โดยในการใช้ปริมาณสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวันที่มีเปอร์เซ็นต์ของไนโตรเจนเท่ากับ 0.4 เปอร์เซ็นต์ เชื้อมีการเจริญที่มากขึ้นจากภาวะเดิมที่ใช้ปริมาณสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวันที่มีเปอร์เซ็นต์ของไนโตรเจนเท่ากับ 0.3 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อมีการเจริญแบบทวีคูณในเวลา 0-24 ชั่วโมง มีการเจริญสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง และลดลงมีการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสสูงสุด เท่ากับ 1,574.27 ยูนิตต่อน้ำหนักเซลล์แห้งรวม ในชั่วโมงที่ 36 ซึ่งมากกว่าการหมักในภาวะอื่น ในการทดลองต่อไปจึงใช้ปริมาณสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวันที่มีเปอร์เซ็นต์ของไนโตรเจนเท่ากับ 0.4 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 เปรียบเทียบการเจริญของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.2, 0.3, 0.4%(w/v) ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0%(v/v), ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}C อัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



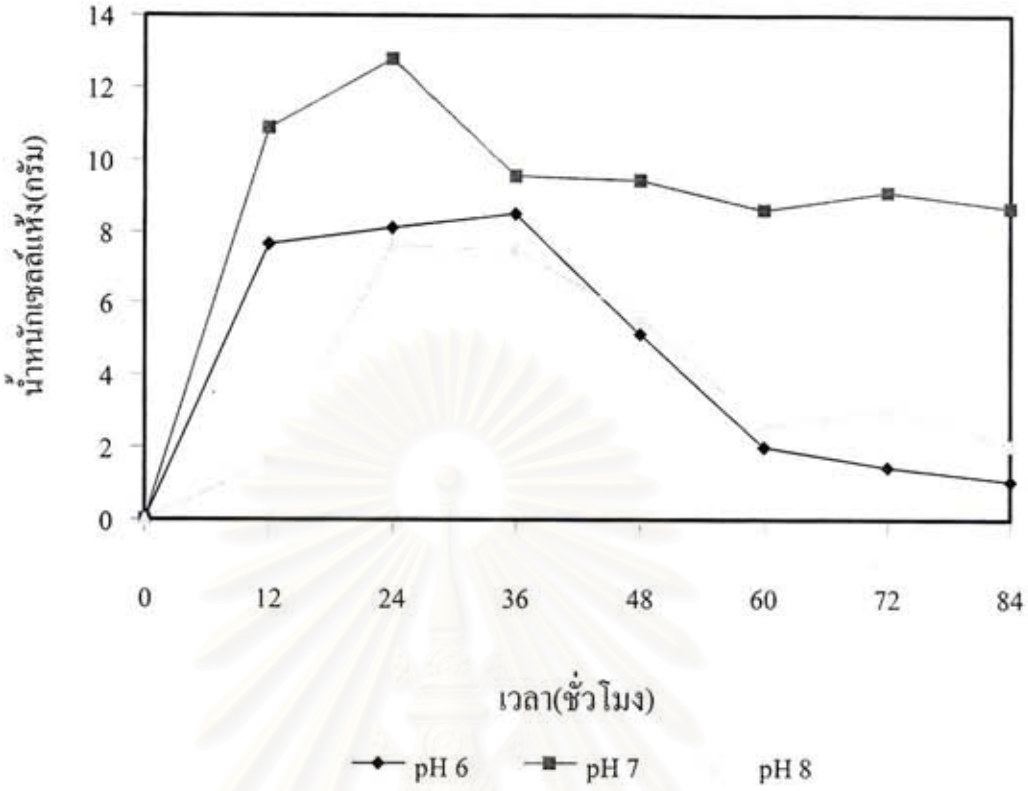
รูปที่ 6 เปรียบเทียบการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.2, 0.3, 0.4%(w/v) ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0%(v/v) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}C อัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.3 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง

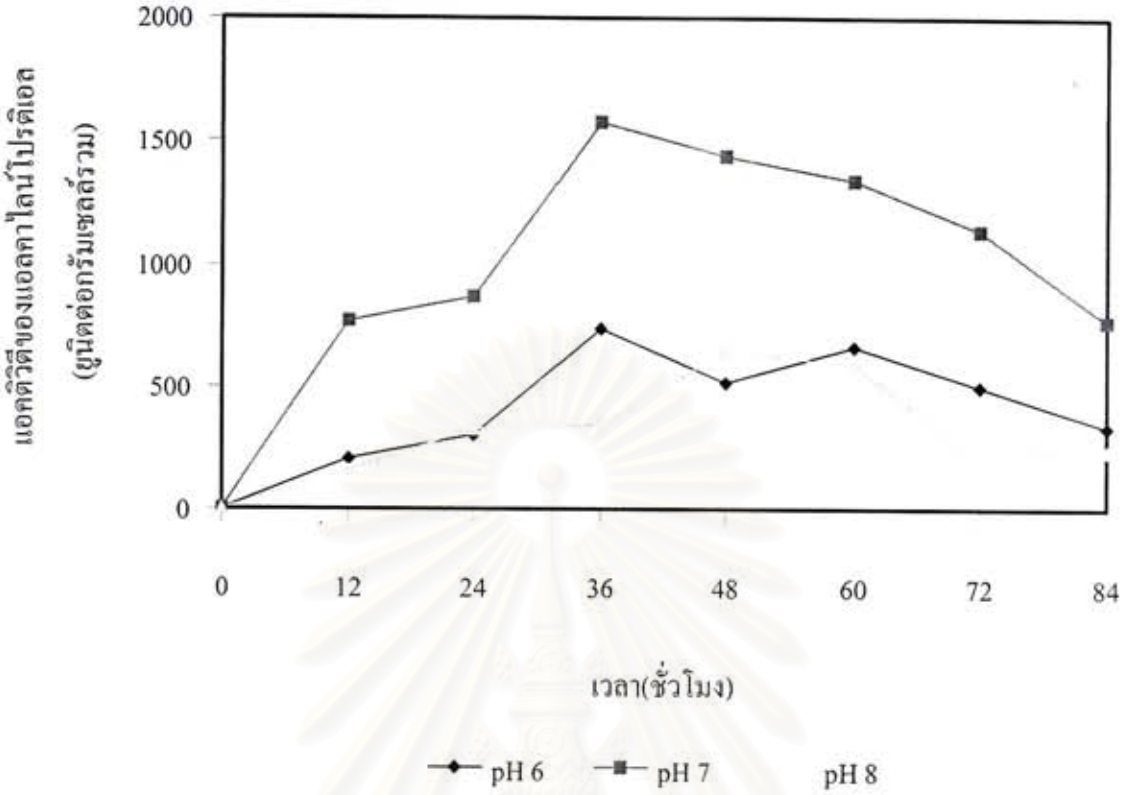
ค่าของความเป็นกรด-ด่างในอาหารเลี้ยงเป็นปัจจัยพื้นฐานที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ การส่งสารผ่านเข้าออกเยื่อหุ้มของเซลล์ ตลอดจนการผลิตเอนไซม์ ในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง โดยทำการทดลองตามข้อ 3.4.2.3 โดยควบคุมผ่านตัววัดค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวเครื่องควบคุมถังหมักแบบอัตโนมัติ ผลการทดลองแสดงไว้ในกราฟรูปที่ 7 และ 8 ตามลำดับ พบว่าที่การหมักค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0, 7.0, 8.0 มีปริมาณการเจริญของเชื้อสูงสุด ซึ่งวัดเป็นน้ำหนักเซลล์รวมคือ 8.46, 12.7, 7.56 กรัม ตามลำดับ โดยในการทดลองที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 เชื้อมีการเจริญแบบทวีคูณในเวลา 0-24 ชั่วโมง มีการเจริญสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง และลดลงเรื่อยๆ มีการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสสูงสุด เท่ากับ 1,574 ยูนิตต่อน้ำหนักเซลล์แห้งรวม ในชั่วโมงที่ 36 ซึ่งมากกว่าการหมักในภาวะอื่น ในการทดลองต่อไปจึงควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงไว้เท่ากับ 7.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 เปรียบเทียบการเจริญของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0, 7.0 และ 8.0 ในอาหารเลี้ยงที่ปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.4% (w/v) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0%(v/v) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}C อัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



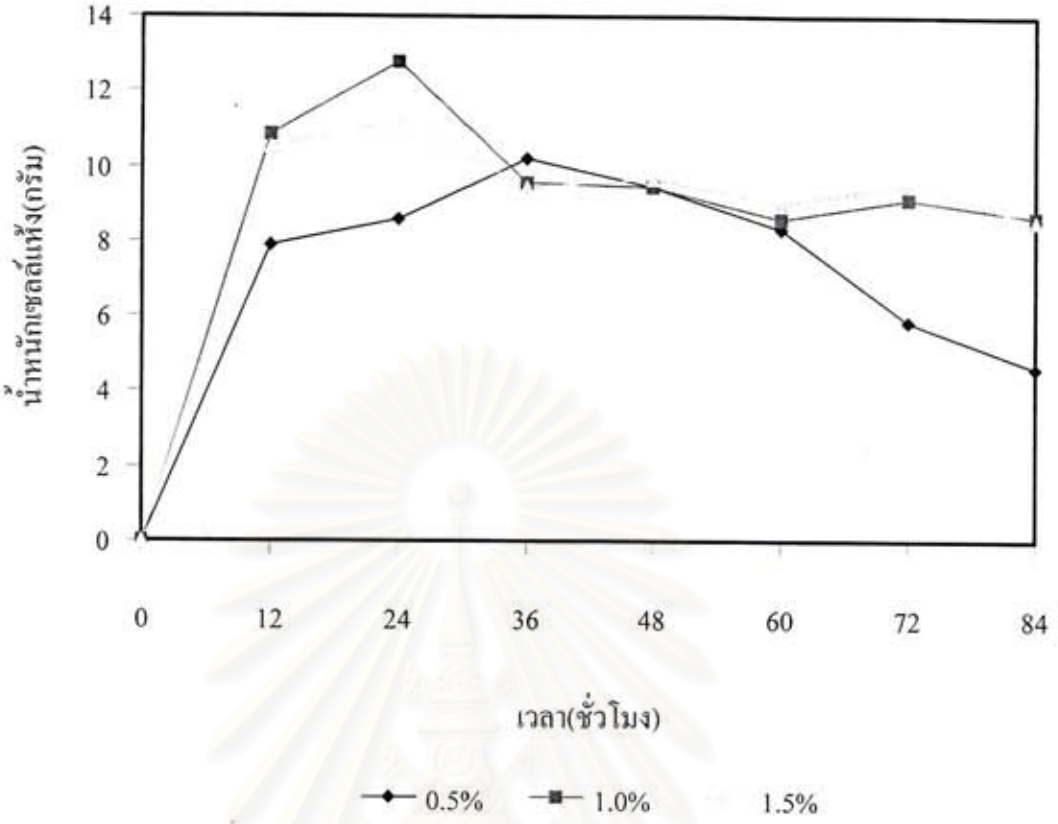
รูปที่ 8 เปรียบเทียบการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0, 7.0 และ 8.0 ในอาหารเลี้ยงที่มีปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.4%(w/v) ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0%(v/v) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}C อัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.4 ผลของปริมาณเชื้อตั้งต้น

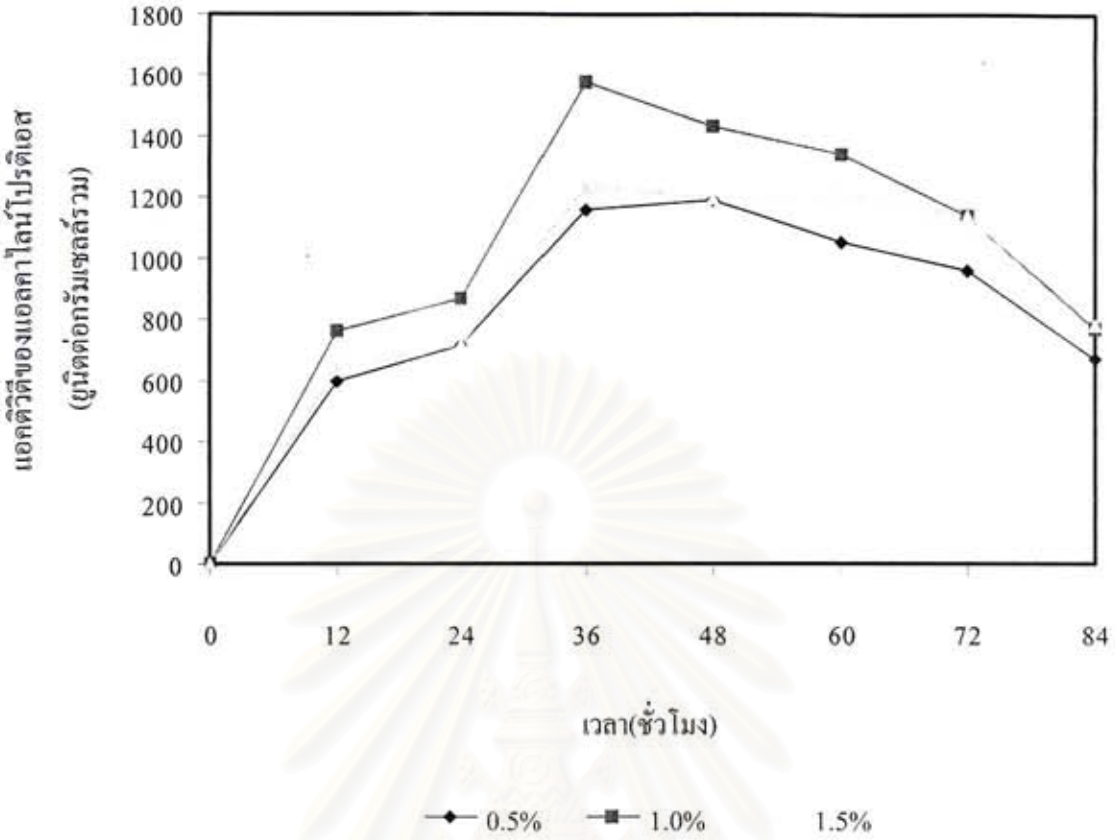
ปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ใช้ในการหมักอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์และการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอส ในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ใช้ในการหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง โดยทำการทดลองตามข้อ 3.4.2.4 ซึ่งคิดเปอร์เซ็นต์เชื้อตั้งต้นจากปริมาตรของเชื้อตั้งต้นที่มีความขุ่นโดยวัดที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตรเท่ากับ 0.6 ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงที่ใช้ในการหมัก ผลการทดลองมาจากการทำ 3 ซ้ำแสดงไว้ในกราฟรูปที่ 9 และ 10 ตามลำดับ พบว่าที่การหมักโดยใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ใช้ในการหมัก 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณการเจริญของเชื้อสูงสุด ซึ่งวัดเป็นน้ำหนักเซลล์รวมคือ 10.21, 12.78, 11.23 กรัม ตามลำดับซึ่งไม่แตกต่างกันมากนัก โดยในการใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ใช้ในการหมักเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ เชื้อมีการเจริญแบบทวีคูณในเวลา 0-24 ชั่วโมง มีการเจริญสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง และลดลงเรื่อยๆ มีการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสสูงสุด เท่ากับ 1,574 ยูนิตต่อน้ำหนักเซลล์แห้งรวม ในชั่วโมงที่ 36 ซึ่งมากกว่าการหมักในภาวะอื่น จึงใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้นในการหมักเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 เปรียบเทียบการเจริญของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5, 1.0, 1.5%(v/v) ในอาหารเลี้ยงที่มีปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.4%(w/v) ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}C อัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



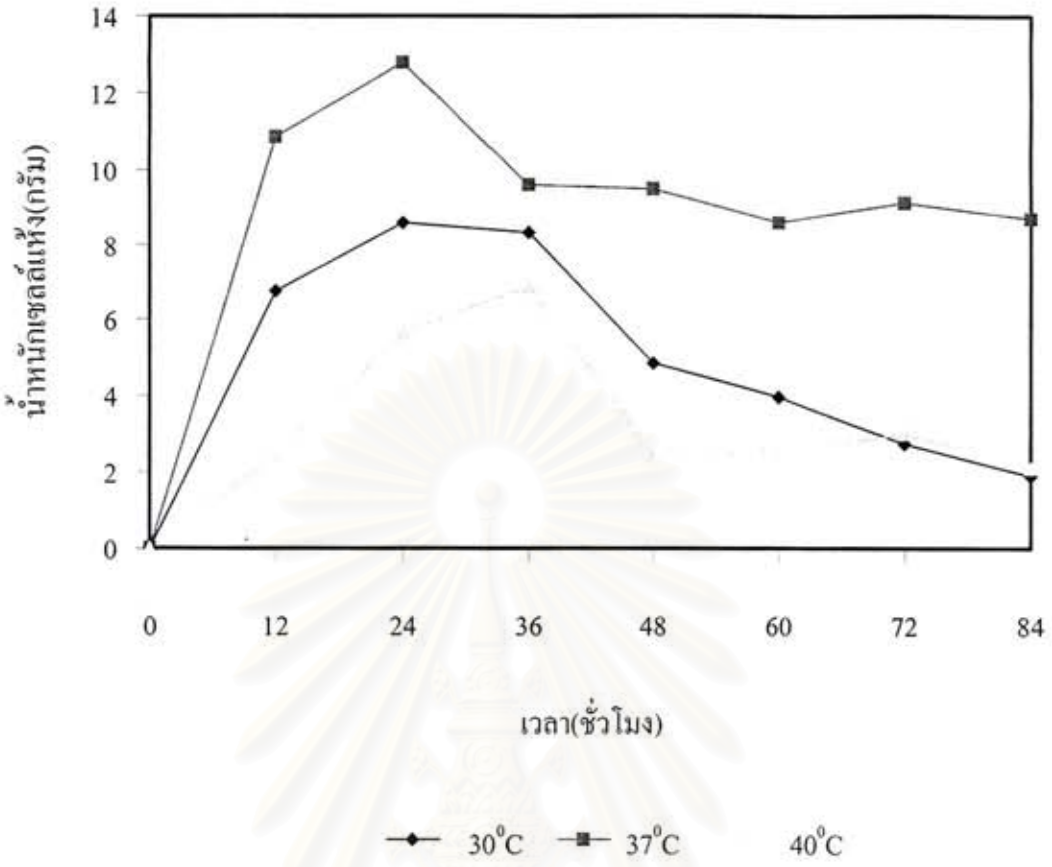
รูปที่ 10 เปรียบเทียบการผลิตเอลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5, 1.0, 1.5%(v/v) ในอาหารเลี้ยงที่มีปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.4%(w/v) ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}C อัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.5 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก

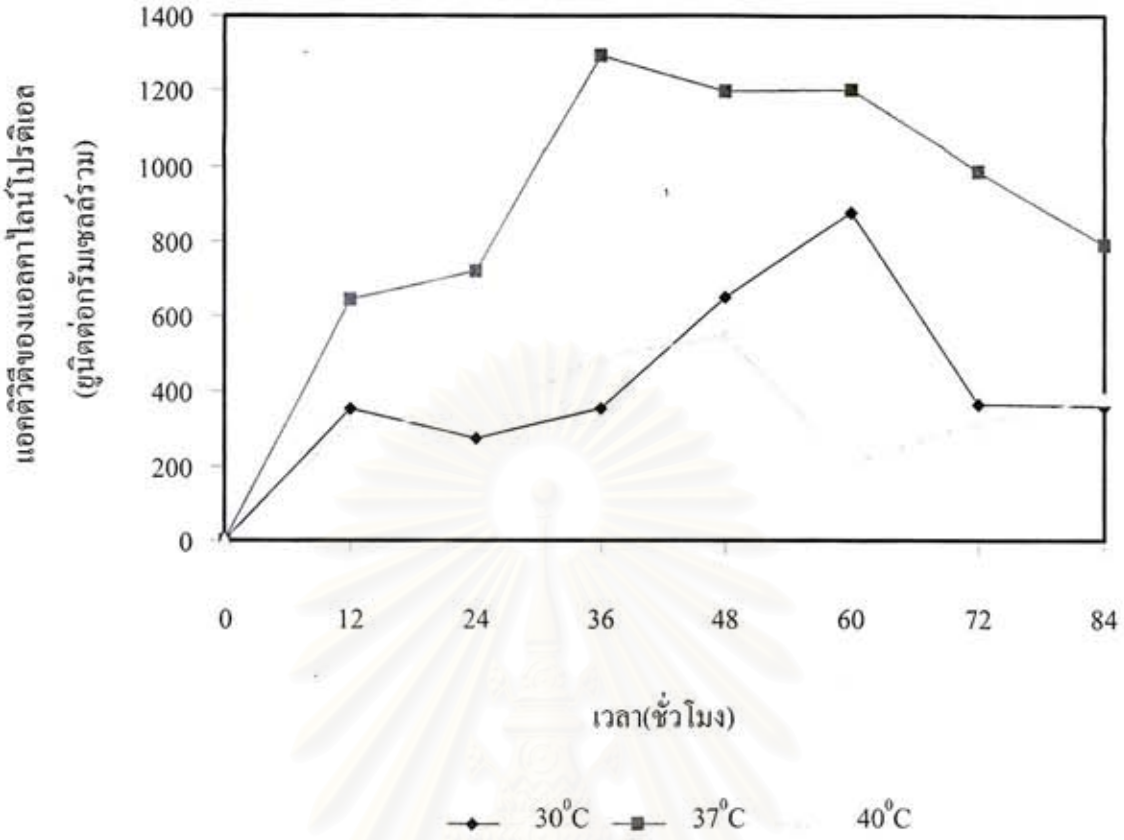
อุณหภูมิที่ใช้ในการหมักเป็นปัจจัยพื้นฐานที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์และการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอส ในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง โดยควบคุมผ่านตัววัดค่าอุณหภูมิของตัวเครื่องควบคุมถังหมักและระบบทำความเย็นที่ต่อกับตัวเครื่องแบบอัตโนมัติ ทำการทดลองตามข้อ 3.4.2.5 ผลการทดลองแสดงไว้ในกราฟรูปที่ 11 และ 12 ตามลำดับ พบว่าเมื่อควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักให้เท่ากับ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส มีการเจริญของเชื้อสูงสุด ซึ่งวัดเป็นน้ำหนักเซลล์รวมคือ 8.57, 12.7 และ 6.87 กรัม ตามลำดับ โดยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อมีการเจริญแบบทวีคูณในเวลา 0-24 ชั่วโมง มีการเจริญสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง และลดลงเรื่อยๆ มีการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสสูงสุด เท่ากับ 1,574 ยูนิตต่อน้ำหนักเซลล์แห้งรวม ในชั่วโมงที่ 36 ในขณะที่การหมักในภาวะที่ใช้อุณหภูมิในการหมักให้เท่ากับ 30 และ 45 องศาเซลเซียส มีการเจริญของเซลล์และการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสที่ต่ำกว่ามาก จึงเลือกควบคุมอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักไว้ที่ 37 องศาเซลเซียสในการทดลองต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 เปรียบเทียบการเจริญของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันการควบคุมอุณหภูมิในการหมักที่ 30°C, 37 °Cและ 40°C ในอาหารเลี้ยงที่มีปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวันเท่ากับ 0.4%(w/v) ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0%(v/v) อัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



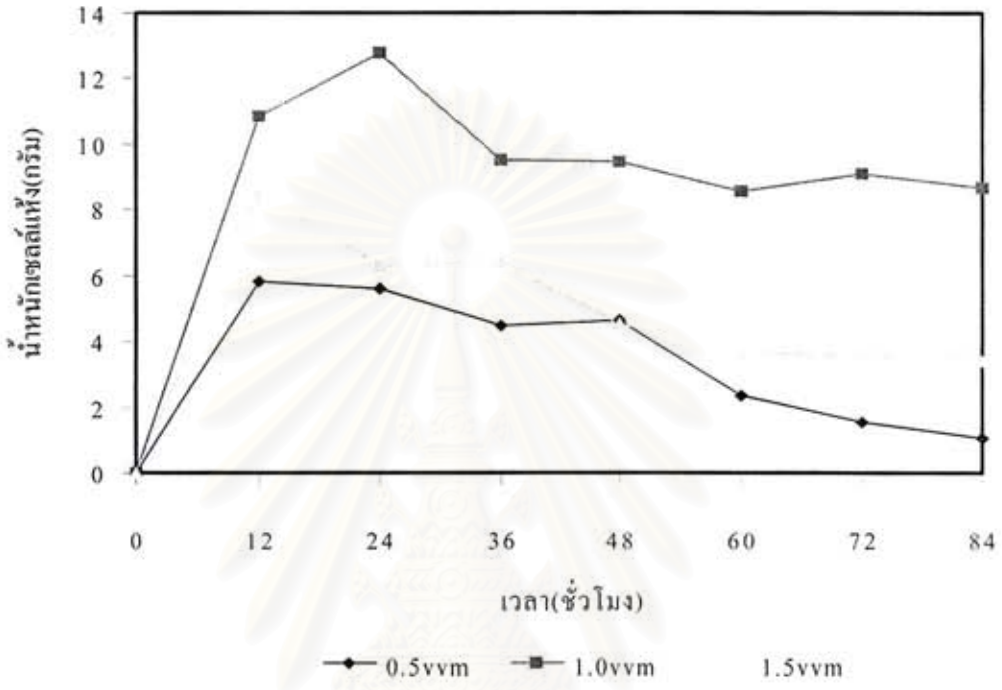
รูปที่ 12 เปรียบเทียบการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันการควบคุมอุณหภูมิในการหมักที่ 30°C, 37 °Cและ 40°C ในอาหารเลี้ยงที่มีปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.4%(w/v) ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0%(v/v) อัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

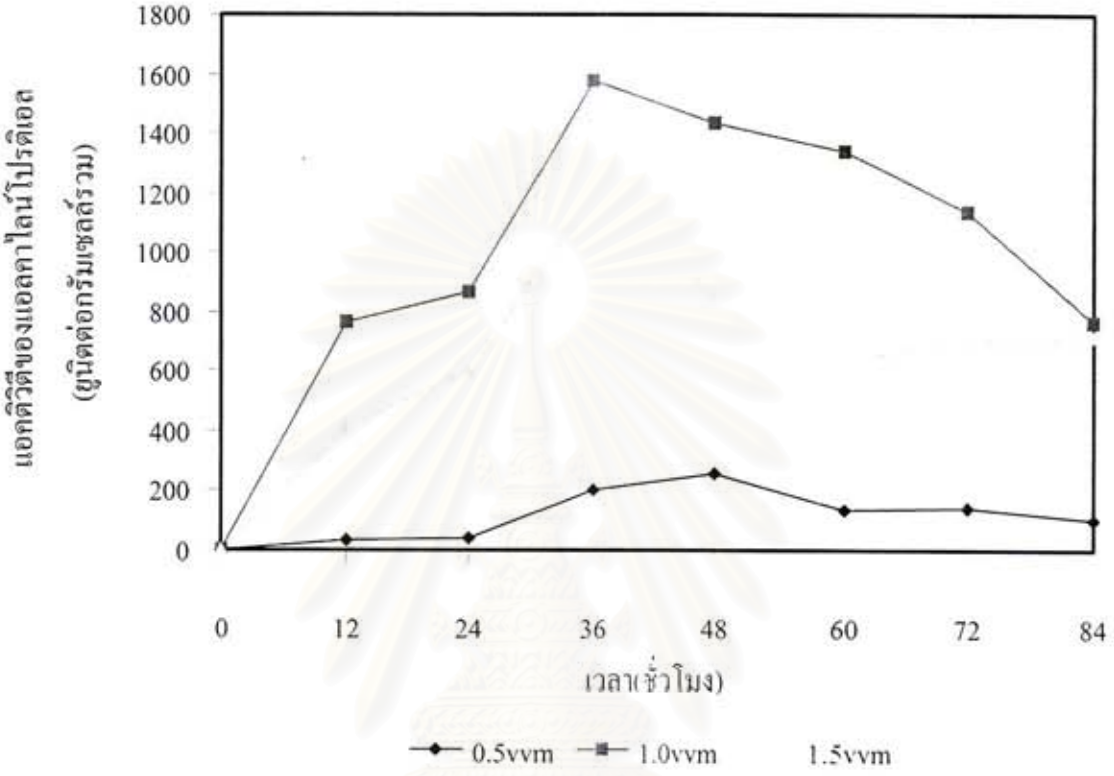
4.1.7 ผลของอัตราการเติมอากาศ

ออกซิเจนเป็นสิ่งสำคัญต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ ตลอดจนกิจกรรมต่างๆในการดำรงชีพ ปริมาณการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงจึงมีผลโดยตรงกับการเจริญของเซลล์ และการผลิตเอนไซม์ ดังนั้นอัตราการเติมอากาศจึงเป็นปัจจัยพื้นฐานที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์และการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอส ในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาอัตราการเติมอากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง โดยทำการทดลองตามข้อ 3.4.2.7 ผลการทดลองแสดงไว้ในกราฟรูปที่ 13 และ 14 ตามลำดับ พบว่าที่การหมักโดยใช้อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 0.5, 1.0, 1.5 vvm มีปริมาณการเจริญของเชื้อสูงสุด ซึ่งวัดเป็นน้ำหนักเซลล์รวมคือ 9.62, 12.7, 8.49 กรัม ตามลำดับ โดยอัตราการเติมอากาศเท่ากับ 1.0 vvm เชื้อมีการเจริญแบบทวีคูณในเวลา 0-24 ชั่วโมง มีการเจริญสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง และลดลงเรื่อยๆ มีการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสสูงสุด เท่ากับ 1,570 ยูนิตต่อน้ำหนักเซลล์แห้งรวม ในชั่วโมงที่ 36 ซึ่งมากกว่าการหมักในภาวะอื่น การเจริญที่ 1.5 vvm ไม่สามารถช่วยเพิ่มการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้เพราะอากาศที่สูงเกินไปส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ ในการทดลองต่อไปจึงทำการควบคุมอัตราการเติมอากาศไว้เท่ากับ 1.0 vvm

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 เปรียบเทียบการเจริญของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันอัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 0.5, 1.0, 1.5 vvm ในอาหารเลี้ยงที่มีปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.4% (w/v) ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0%(v/v)ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}C อัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm



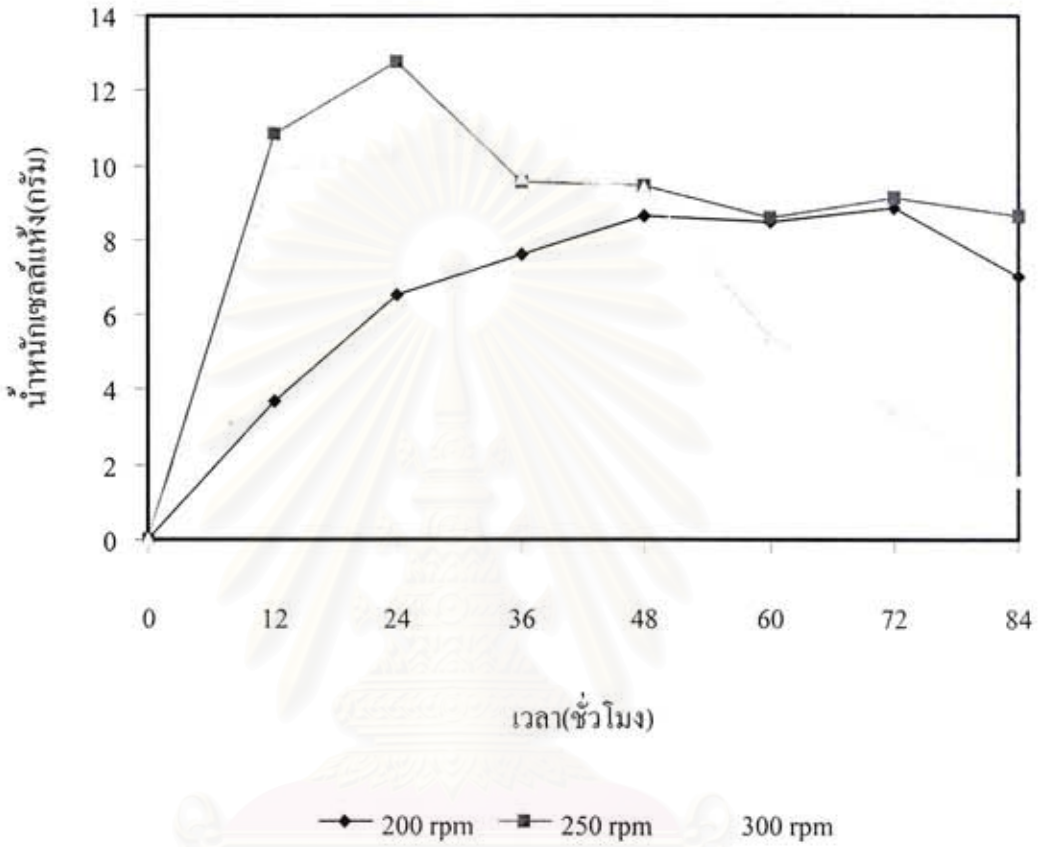
รูปที่ 14. เปรียบเทียบการผลิตเอลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันอัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 0.5,1.0, 1.5 vvm ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.4%(w/v) ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0% (v/v) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C อัตราการกวนเท่ากับ 250 rpm

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

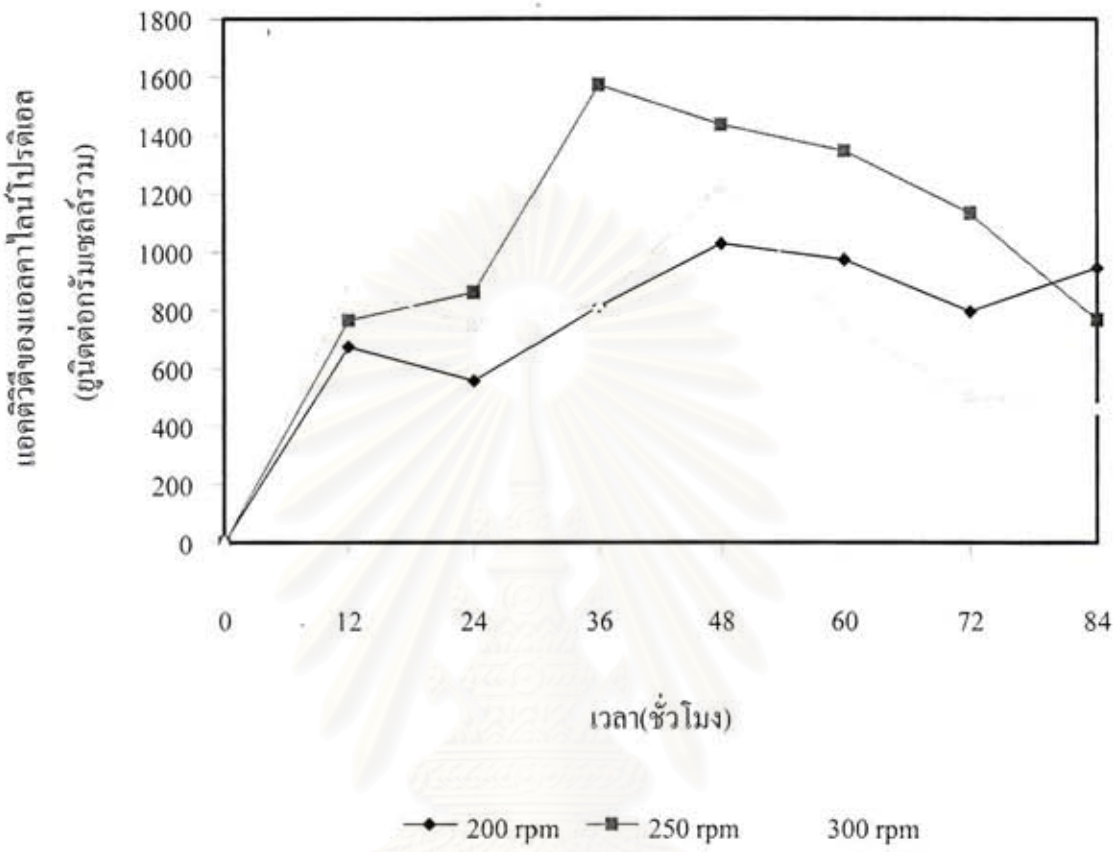
4.1.6 ผลของอัตราการกวน

อัตราการกวนที่ใช้ในการหมักมีผลต่อการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยง ซึ่งการหมุนของใบกวนของถังหมักจะทำหน้าที่ในการตีฟองอากาศที่ผ่านเข้าไปจากทางก้นถังหมักให้มีขนาดฟองเล็กลง และแตกกระจายผสมไปกับอาหารเลี้ยง อีกทั้งยังช่วยในการกระจายเซลล์ในอาหารเลี้ยง ให้ผสมกันและสัมผัสอย่างสม่ำเสมอ อัตราการกวนจึงเป็นปัจจัยพื้นฐานที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์และการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอส ในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาอัตราการกวนที่ใช้ในการหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง โดยทำการทดลองตามข้อ 3.4.2.6 ผลการทดลองแสดงไว้ในกราฟรูปที่ 15 และ 16 ตามลำดับ พบว่าที่การหมักโดยควบคุมอัตราการกวนไว้ที่ 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที มีปริมาณการเจริญของเชื้อสูงสุด ซึ่งวัดเป็นน้ำหนักเซลล์รวมคือ 8.37, 12.7 และ 10.3 กรัม ตามลำดับ ในการควบคุมอัตราการกวนที่ 250 รอบต่อนาที เชื้อมีการเจริญแบบทวีคูณในเวลา 0-24 ชั่วโมง มีการเจริญสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง และลดลงเรื่อยๆ มีการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสสูงสุด เท่ากับ 1,574 ยูนิตต่อน้ำหนักเซลล์แห้งรวม ในชั่วโมงที่ 36 ซึ่งมากกว่าการหมักในภาวะอื่น จึงควบคุมอัตราการกวนที่ 250 รอบต่อนาที เป็นภาวะที่เหมาะสมในการผลิตครั้งต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 15 เปรียบเทียบการเจริญของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันอัตราการกวนเท่ากับ 200, 250, 300 rpmในอาหารเลี้ยงที่มีปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.4% (w/v) ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0%(v/v) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}C อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm



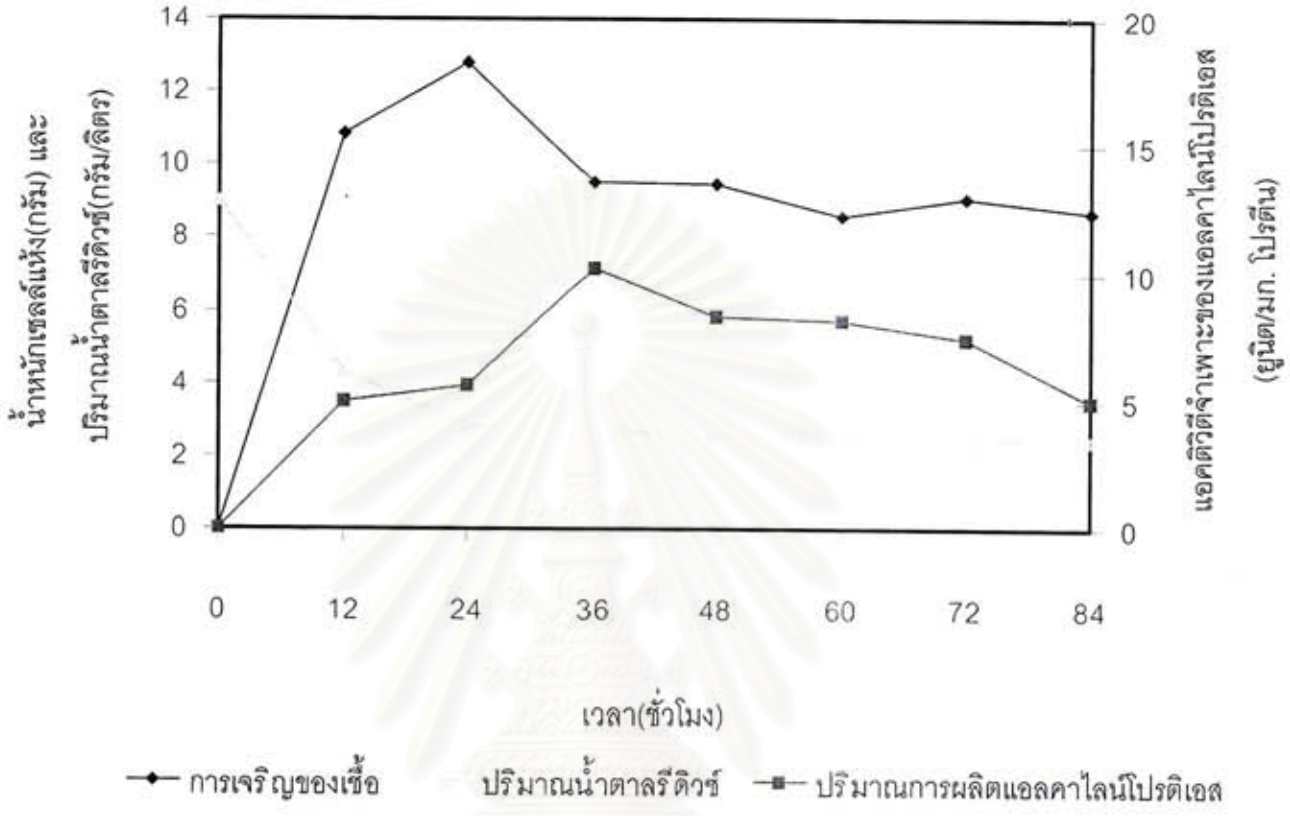
รูปที่ 16 เปรียบเทียบการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เมื่อแปรผันอัตราการกวนเท่ากับ 200, 250, 300 rpm ในอาหารเลี้ยงที่มีปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.4%(w/v) ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0%(v/v) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}C อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.1.7 ผลการผลิตแอลคาลน์โปรติเอสในภาวะเหมาะสมที่ได้

ทำการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสโดยภาวะที่เหมาะสมในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง คือใ ช้อาหารสูตร Basal medium โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1%(v/v) มีปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 0%(w/v), ปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.4%(w/v), KH_2PO_4 0.1%(w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05%(w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001%(w/v), ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}C อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 1.0 vvm. อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 รอบต่อนาที ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 17 พบว่าได้ปริมาณของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 10.23 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ปริมาณของเอนไซม์รวมเท่ากับ 1,579 ยูนิตต่อกรัมเซลล์แห้งรวม และใช้ระยะเวลาในการหมัก 36 ชั่วโมงและมีการลดลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญของเชื้อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 17 การเจริญ, แอลคาไลน์โปรติเอสแอคติวิตี และน้ำตาลรีดิวซ์ ในการเลี้ยง *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1%(v/v) ปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.4%(w/v) ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}C อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 1.0 vvm. อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 รอบต่อนาที

4.2 การเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

4.2.1 การตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

นำน้ำหมักที่ได้จากการหมักในภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.1 ซึ่งคือภาวะที่อาหารเลี้ยงปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.4%, KH_2PO_4 0.1%(w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05% (w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001%(w/v), ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0%(v/v) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}C อัตราการเติมอากาศ เท่ากับ 1.0 vvm อัตราการกวนเท่ากับ 250 รอบต่อนาที ในชั่วโมงที่ 36 ของการหมัก มาตกตะกอนเอนไซม์โดยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต วิธีการทดลองตามข้อ 3.9.1 ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2 ซึ่งช่วงปริมาณความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนเท่ากับ 40-60 เปอร์เซ็นต์ อิ่มตัว ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์เอนไซม์ที่ตกตะกอน(%yeild) และ Purification factor สูงสุดได้สารสกัดที่เรียกว่า crude enzyme ซึ่งมีโปรตีนรวม 257,000 มิลลิกรัม แอคติวิตีรวม 5,228,000 ยูนิต และมีแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 20.34 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงผลการตกตะกอนแอลคาไลน์โปรติเอส ที่ช่วงเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นเกลือต่างๆ

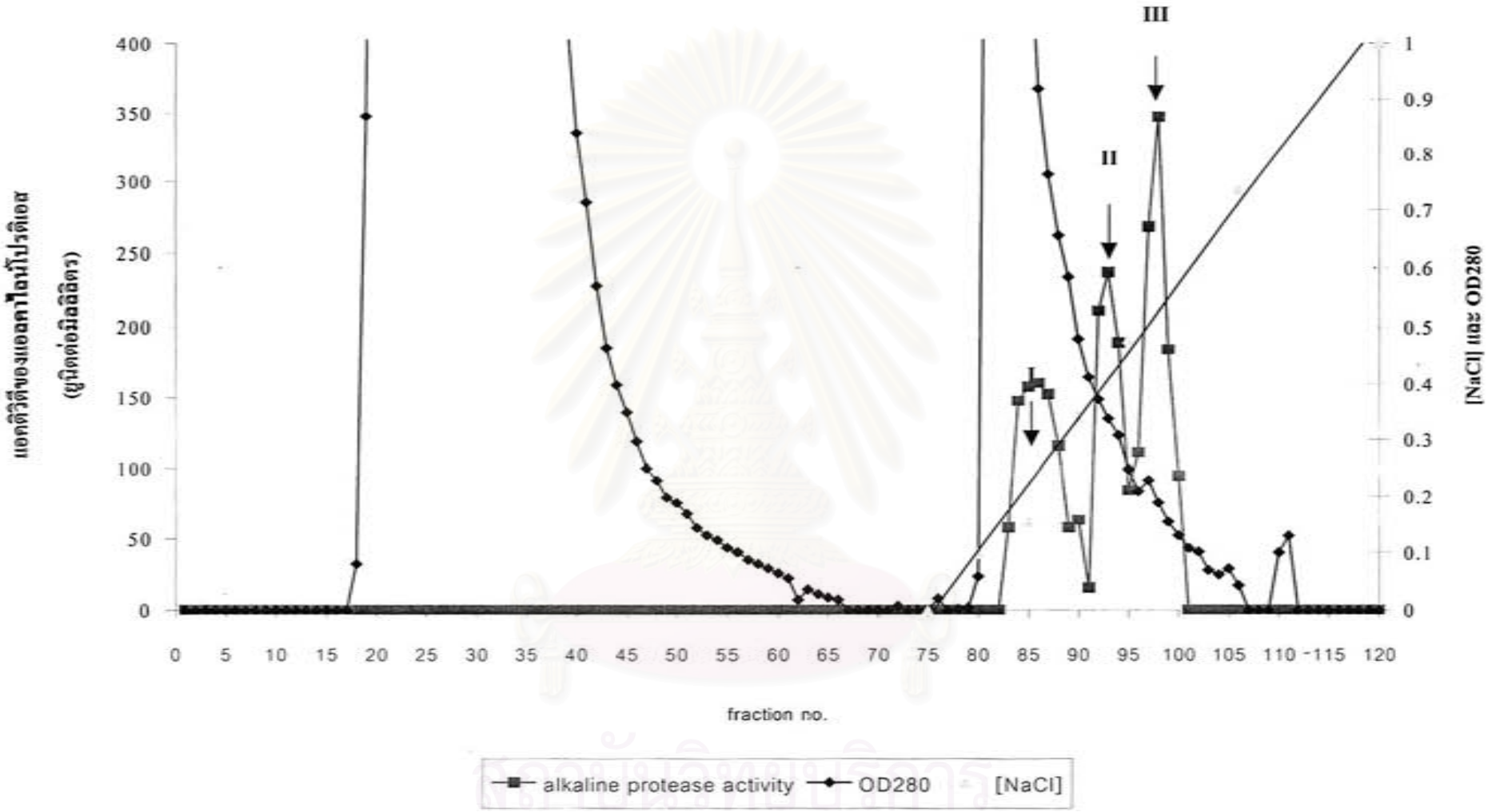
%ความเข้มข้นเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต	ปริมาณเอนไซม์รวม (ยูนิต)	ปริมาณโปรตีนรวม (มก.)	แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิตต่อมก.โปรตีน)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	% Yeild
น้ำหมัก	5,526,500	540,000	10.23	1.00	100
0-40%	0	1,071	-	-	0
40-60%	5,228,000	257,000	20.34	1.99	94.6
60-80%	187,901	160,500	1.170	0.11	3.4
มากกว่า 80%	60,791	121,400	0.500	0.005	1.1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2.2 <u>การทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์ ดีอีเออี-เซลลูโลส</u>

วิธีนี้เป็นการแยกโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างของประจุโปรตีนในสารละลาย เมื่อทำการทดลองตามข้อ 3.9.2 จากการทดลองได้ผลดังแสดงไว้ในกราฟรูปที่ 18 ซึ่งพบว่ามี peak ที่มีแอคติวิตีของโปรติเอส 3 peak คือ I , II , III แต่เมื่อรวมสารละลายตาม peak ที่ปรากฏแล้วทดสอบแอคติวิตีโดยเติมสาร ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ พบว่าโปรติเอสที่ได้จาก peak I ไม่ถูกยับยั้งปฏิกิริยา ซึ่งแสดงว่าเป็นแอลคาไลน์โปรติเอส ส่วน peak II, III นั้นถูกยับยั้งปฏิกิริยาได้โดย สาร EDTA เข้มข้น 0.5 โมลาร์ แสดงว่าเป็นนิวทรัลโปรติเอส โดยแอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จาก peak I มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 160 เท่า ดังตารางที่ 3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

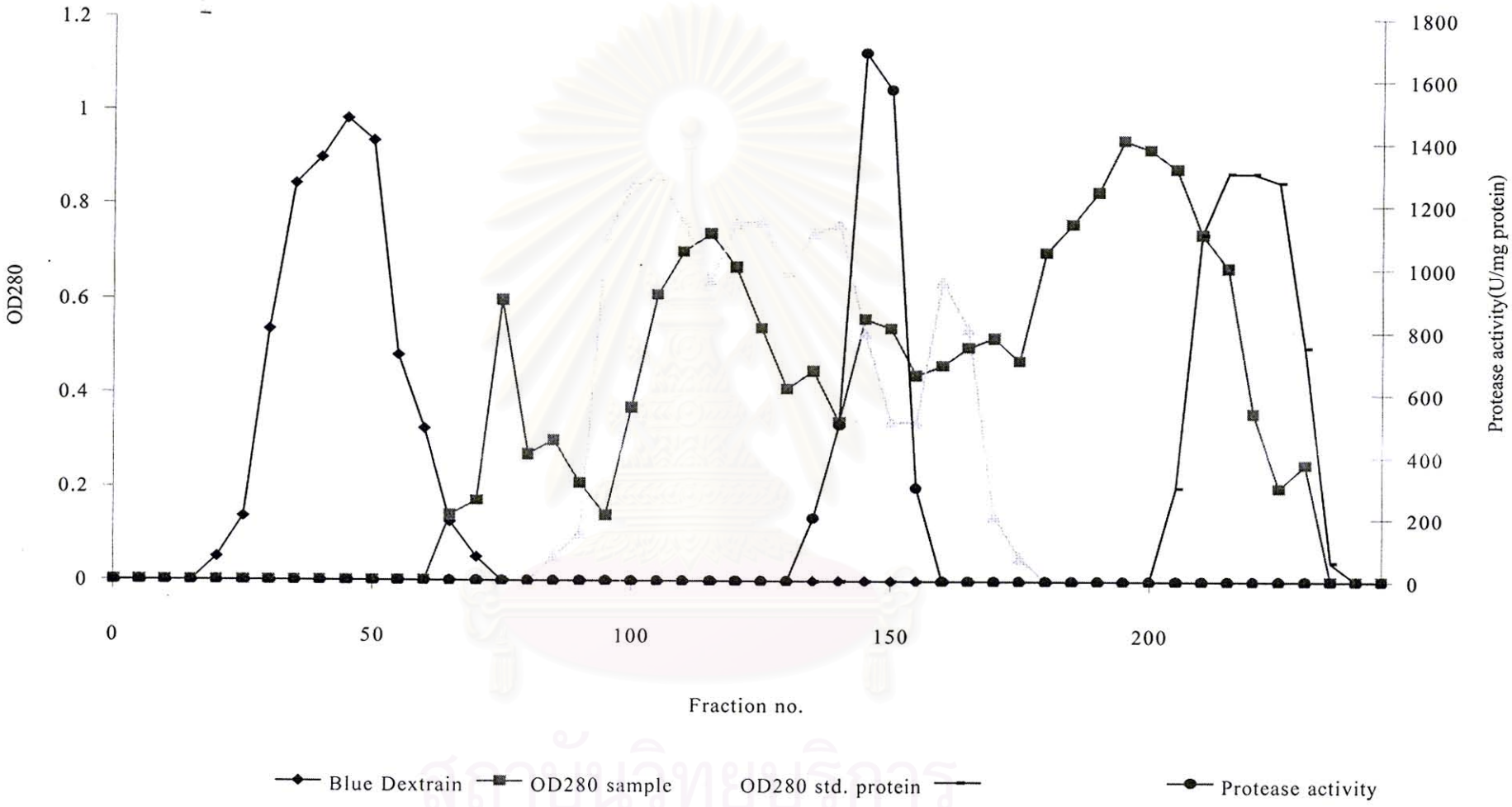


รูปที่ 18 การแยกโปรตีนโดยการผ่านคอลัมน์ ดีอีเออี-เซลลูโลส ขนาด1.3 x 30 เซนติเมตร เรซินสูง 25 เซนติเมตร ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายท
ริส-คลอไลด์บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ pH 7.5 อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที

4.2.3 <u>การทำให้บริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์ เซฟาเด็กซ จี-100</u>

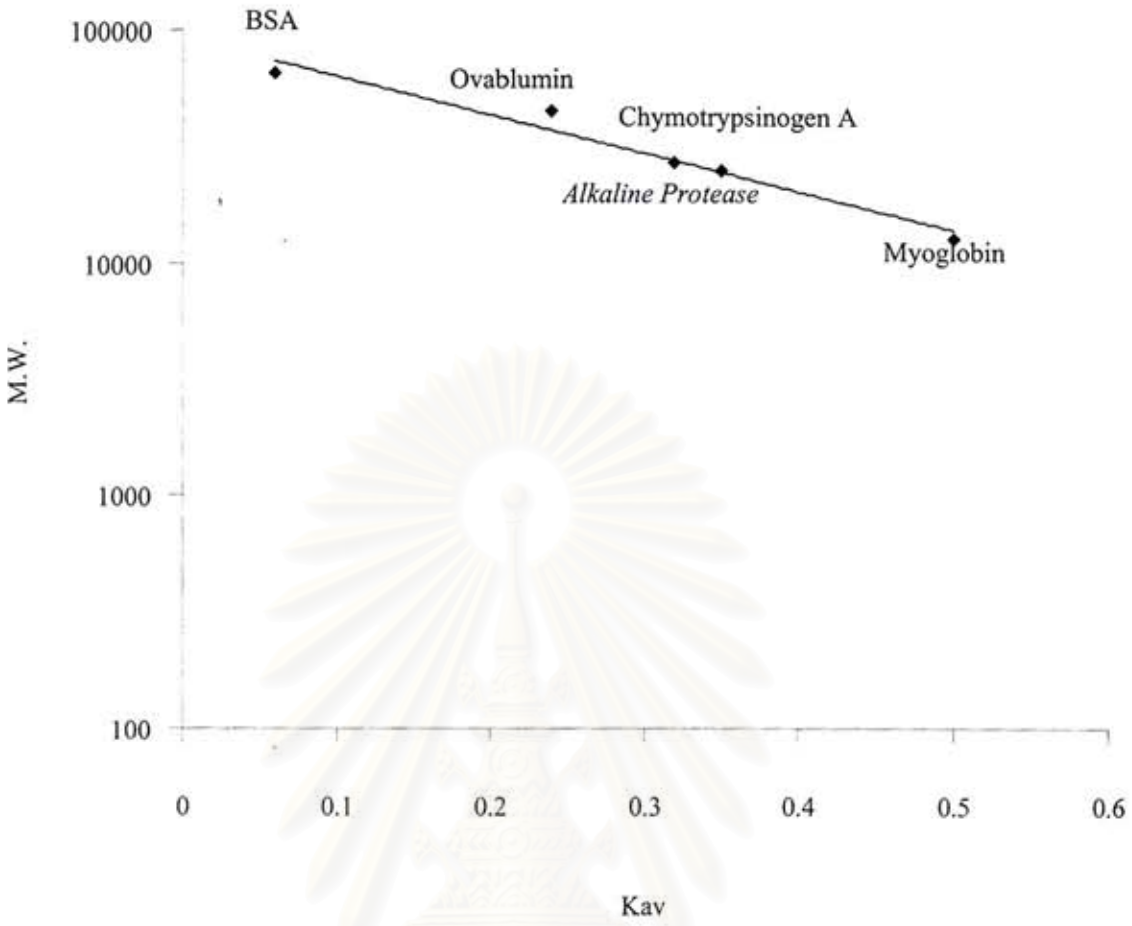
เป็นการแยกโปรตีนโดยอาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุลโปรตีนโดยคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-100 จะมีความสามารถในการแยกโปรตีนที่มีขนาด 4,000-150,000 ดาลตัน ทำการทดลองตามข้อ 3.9.3 ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 19 และทำการเปรียบเทียบระหว่างค่าน้ำหนักโมเลกุลกับค่า K_{av} ของโมเลกุลโปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ดังแสดงไว้ในรูปที่ 20 พบว่าได้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เท่ากับ 27,000 ดาลตัน และ ได้แอลคาไลน์โปรติเอสที่มีความบริสุทธิ์ขึ้น 27.4 เท่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 19 การสกัดแยกแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtils* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 โดยคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-100 ขนาด 1.5x60 ซม. ตามวิธีการทดลองข้อ 3.9.3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 20 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า K_{av} และ น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน ในการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtils* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 โดยคอลัมน์ เซฟาเด็กซ์ จี-100 ขนาด 1.5x60 ซม. ตามวิธีการทดลองข้อ 3.9.3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 สรุปผลการเตรียมเอนไซม์เอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1ให้บริสุทธิ์

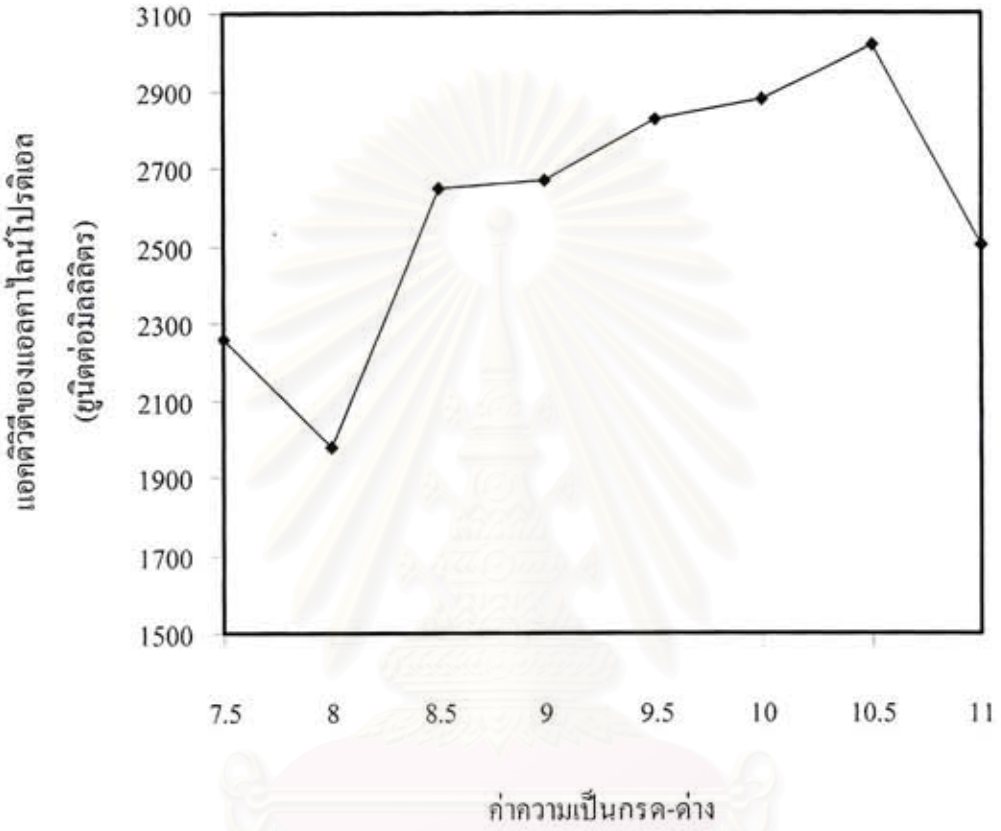
ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาณโปรตีนรวม(มก.)	แอคติวิตีรวม (ยูนิต)	แอคติวิตีจำเพาะ (ยูนิต ต่อ มก. โปรตีน)	Yield (%)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
Crude enzyme	540,000	5,526,500	10.23	100	1.00
ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 40-60%อิ่มตัว	257,000	5,228,000	20.34	94.6	1.99
DEAE-cellulose	1,277	2,091,900	1,638	37.9	160
Sephadex G-100	217.6	367,400	1,688	6.64	165

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การศึกษาสมบัติบางประการของเอนไซม์ที่บริสุทธิ์

4.3.1 ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

ทำการทดลองตามข้อ 3.10.1 ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 21 พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาเท่ากับ 10.5

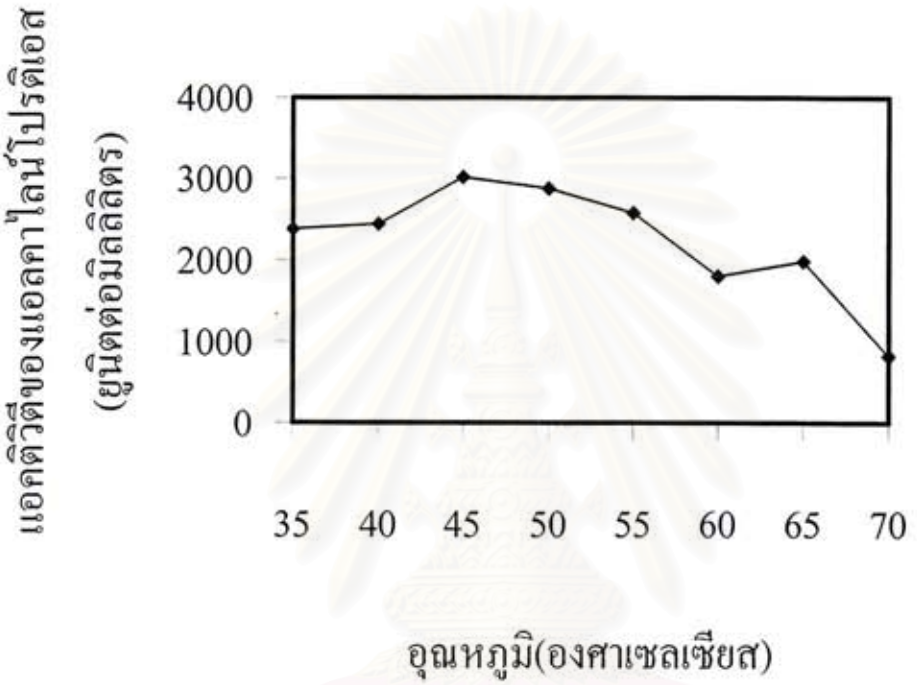


รูปที่ 21 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของแอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.5 ถึง 11

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์

ทำการทดลองตามข้อ 3.10.2 ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 22 พบว่าค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เท่ากับ 45 องศาเซลเซียส

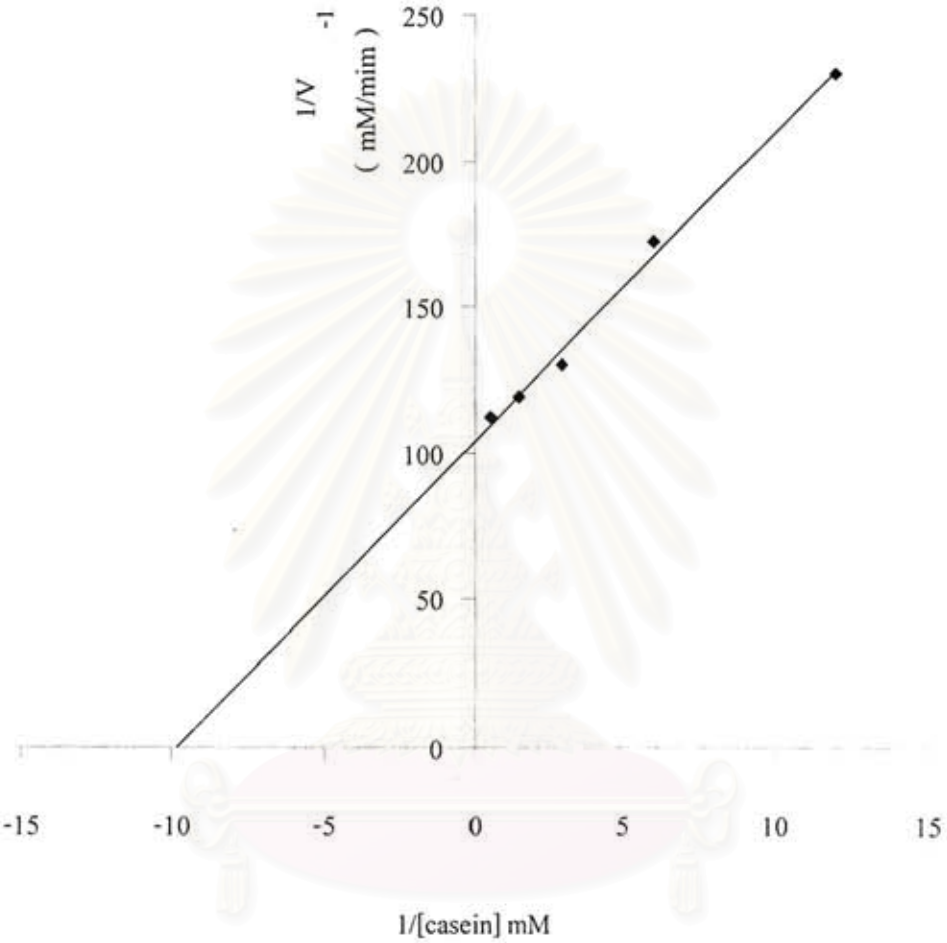


รูปที่ 22 เปรียบเทียบแอคติวิตีจำเพาะของเอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในช่วงอุณหภูมิ เท่ากับ 35 ถึง 70 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.3 ศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์

ทำการทดลองตามข้อ 3.10.3 ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 23 และได้ค่า K_m ต่อเคซีนเท่ากับ 0.101 mM, V_{max} เท่ากับ 0.0087 mM/min



รูปที่ 23 Lineweaver-Burk plot ของแอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 เมื่อใช้ เคซีนเป็นซับสเตรท ทำการวัดแอคติวิตีที่ 45 องศาเซลเซียส ตามวิธีข้อ 3.10.3

4.3.4 ศึกษาผลของตัวยับยั้งปฏิกิริยาเอนไซม์

ทำการทดลองตามข้อ 3.10.4 ได้ผลการทดลองดังแสดงตามตารางที่ 4 พบว่า สามารถถูกยับยั้ง ด้วยสาร phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วยสาร ethylenediamine tetracetic (EDTA) เข้มข้น 0.5 โมลาร์

ตารางที่ 4 แสดงผลของสารยับยั้ง PMSF และ EDTA ต่อแอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1

การทดลอง	Relative activity (%)	%การถูกยับยั้ง
ชุดควบคุม	100	0
เติม PMSF	10.33	89.64
เติม EDTA	99.71	5.76

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากงานวิจัยของ วรรณวิมล ทรัพย์ดี (2540) ซึ่งได้ทำการศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง เพื่อการผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่สูงขึ้นจึงทดลองใช้ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ซึ่งทำการกลายพันธุ์จาก *Bacillus subtilis* TISTR25 และคัดเลือกโดย จันทิมา จิรนุชนาฏ (2539) โดยใช้สูตรอาหารที่มีการปรับปรุงมาจาก basal medium ซึ่งประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1%(w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05%(w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001%(w/v) สารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน 0.3%(w/v) และแป้งมันสำปะหลัง 0.1%(w/v) และควบคุมภาวะต่างๆในการหมักคือ ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิในการหมัก 37 องศาเซลเซียส อัตราการเติมอากาศ 1 vvm อัตราการกวน 250 รอบต่อนาที โดยจะทำการศึกษาในแต่ละภาวะเพื่อเปรียบเทียบระหว่างเชื้อ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 กับ *Bacillus subtilis* TISTR25

โดยปัจจัยแรกที่ศึกษาได้แก่ ปริมาณของแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็นแหล่งอาหารและพลังงานที่สำคัญของจุลินทรีย์ ในการทดลองนี้แป้งมันสำปะหลังที่ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงโดยทำการแปรผันปริมาณแป้งในอาหารเลี้ยงเป็น 0%, 0.5%, 1% พบว่าที่ปริมาณแป้งเท่ากับ 0% เชื้อมีการเจริญ และทั้งยังผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสในปริมาณสูงสุด แสดงว่าในอาหารเลี้ยงย่อมมีสารอาหารซึ่งเป็นแหล่งพลังงานสำหรับเชื้ออยู่อย่างพอเพียง โดยไม่จำเป็นต้องใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งพลังงาน และการมีปริมาณของแหล่งคาร์โบไฮเดรตมากในอาหารเลี้ยงจะทำให้การผลิตเอนไซม์ลดลงอันเป็นผลมาจาก Catabolite repression ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Aunstrup ในปี 1979 ว่าในการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสในอาหารเลี้ยงต้องมีปริมาณโปรตีนสูงและมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตน้อย ซึ่งทำการแก้ไขได้โดยการเติมคาร์โบไฮเดรตลงไปเป็นช่วงๆ ตลอดระยะเวลาของการหมัก และ Catabolite repression มีผลมาจากการที่กลูโคสอันเกิดจากการย่อยสลายแป้งของเชื้อจะไปกดการทำงานของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ให้สร้างออกมาน้อยลง (Bernlohr, 1964; Doi, 1973) ซึ่งรูปแบบของการเจริญและภาวะที่ได้จากการทดลองนี้แสดงถึงความแตกต่างของสายพันธุ์กลายกับ *Bacillus subtilis* TISTR25 สายพันธุ์ดั้งเดิม

จุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนมากมักใช้ไนโตรเจนในรูปของสารประกอบอนินทรีย์หรืออินทรีย์ โดยจะเป็นแหล่งอาหารที่ใช้ในการสังเคราะห์สารประกอบที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบเช่น กรดอะมิโน, กรดนิวคลีอิก, โปรตีน และส่วนประกอบของผนังเซลล์ Aunstrup

และคณะ (1979) รายงานไว้ว่า แอลคาไลน์โปรติเอสมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบถึง 15.6% และถ้ามีปริมาณไนโตรเจนในอาหารมากหรือน้อยไปก็จะกดดันการสร้างเอนไซม์ได้(Kole และคณะ, 1988) จากรายงานของ Moon และ Parulekar (1991) พบว่าไนโตรเจนมีบทบาทสำคัญในการสร้างผนังเซลล์จึงรักษาสภาพเซลล์ไม่ให้เกิดการแตก (lysis) การเลือกแหล่งไนโตรเจนขึ้นอยู่กับความสามารถของเชื้อว่าสามารถใช้ไนโตรเจนจากแหล่งไหนได้ดี โดยเชื้อแต่ละชนิดจะใช้แหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน เชื้อจะใช้แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ได้ง่ายก่อน เมื่อสารนั้นหมดก็จะใช้จากแหล่งอื่น ซึ่งในการทดลองนี้เราใช้กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน ซึ่งเป็นวัตถุดิบทางการเกษตรที่มีราคาถูกผสมกันในอัตราส่วน 1:1 ย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริก โดยใช้ความร้อนและความดันสูง เพื่อให้เกิดเป็นเปปไทด์สายสั้นๆ และกรดอะมิโน ในกระบวนการหมักกากถั่วเหลืองจะเป็นที่นิยมใช้เป็นวัตถุดิบเนื่องจากมีสมดุลย์ของสารอาหารที่เหมาะสมซึ่งประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน เซลลูโลส แคลเซียม ฟอสฟอรัส (กำเนิด สุภัณวงษ์, 2534) ส่วนกากเมล็ดทานตะวันนั้นมีส่วนประกอบเป็นกรดอะมิโนไปเสริมกับกรดอะมิโนในกากถั่วเหลือง เมื่อทำการทดลองโดยการแปรผันค่าปริมาณไนโตรเจนของสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เป็น 0.2%, 0.3% และ0.4%(w/v) พบว่าเมื่อใช้ปริมาณไนโตรเจนของสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวันเป็น 0.4%(w/v) เชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นจากภาวะที่ใช้ปริมาณไนโตรเจนของสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวันเป็น 0.2% และ 0.3%(w/v) และผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสเพิ่มขึ้นมาก และเนื่องจากการเตรียมสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวันให้มีปริมาณไนโตรเจนสูงสุดเท่ากับ 0.4%(w/v) จึงไม่สามารถทำการทดลองเพิ่มเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนที่สูงกว่า 0.4%(w/v)ได้ และรูปแบบของการเจริญและภาวะที่ได้จากการทดลองนี้แสดงถึงความแตกต่างของเชื้อกลายพันธุ์กับเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR25 ดั้งเดิม

สภาพความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงมีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และการผลิตเอนไซม์ในระหว่างหารหมักนั้น ผลิตภัณฑ์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นจากการเมทาโบลิซึม อาจทำให้สภาพความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเปลี่ยนแปลงและมีผลกระทบให้จุลินทรีย์หยุดการเจริญและยับยั้งการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ได้ ในการศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์มักประสบปัญหาเกี่ยวกับการควบคุม pH ให้เป็นปัจจัยคงที่ไม่ได้ตลอดการทดลอง โดย pH ของอาหารเลี้ยงจะมีผลต่อกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์และกระบวนการขนส่งสารผ่านเข้าออกเยื่อหุ้มเซลล์ มีผลกระทบต่อสรีรวิทยาบางอย่างของจุลินทรีย์อีกด้วย (สุพจน์ ใช้เทียมวงศ์ 2530) ในการทดลองนี้ได้ศึกษาถึงผลของสภาพความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงที่ 6.0, 7.0 และ 8.0 พบว่า ที่ pH 7.0 เป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ และผลกระทบจากสภาพความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงนี้จะสังเกตเห็นได้ชัดเจนมากจากระยะเวลาที่เชื้อเข้าสู่ log phase จะนานขึ้น

และระดับการเจริญของเชื้อที่ลดลง แสดงว่าสภาพความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเริ่มต้นจะมีผลกระทบต่อการเจริญของเชื้อมาก ซึ่งในแง่ของการผลิตเอนไซม์ Janssen และคณะ (1994) พบว่าในการเลี้ยง *Thermus sp.* Rt41 A เพื่อผลิตโปรติเอส พบว่าที่ pH สูงกว่า 7.5 จะทำให้ธาตุที่เป็นส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อตกตะกอนเป็นสาเหตุให้โปรติเอสไม่มีความเสถียรและอาจทำให้ไม่มีการผลิตเอนไซม์นี้เลย Moon และ Parulekar (1991) พบว่าการเลี้ยง *Bacillus firmus* ที่สภาพความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงที่ 7.7 จะมีการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสสูงสุด และถ้าสภาพความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงสูงในตอนเริ่มต้นจะทำให้เชื้อไม่เจริญในช่วงแรก

อีกปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์คือ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น โดยปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมจะขึ้นกับปริมาตรของอาหารเลี้ยง หากปริมาณเชื้อเริ่มต้นน้อยไปเชื้อจะเข้าสู่ log phase ช้า และถ้ามีปริมาณเชื้อเริ่มต้นมากไป ก็จะมีผลให้ปริมาณของสารอาหารในอาหารเลี้ยงลดลงอย่างรวดเร็วก่อนจะถึงระยะเริ่ม stationary phase ที่เซลล์จะผลิตเอนไซม์ โดยการทดลองนี้ศึกษาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 0.5%, 1% และ1.5%(v/v) พบว่าในปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ไม่แตกต่างกันมากจะมีผลกระทบต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์น้อยเนื่องจากใช้ระยะเวลาในการหมักนาน โดยได้ปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ 1% เชื้อจะมีการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสสูงสุด

อุณหภูมิเป็นภาวะแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ดังนั้นอุณหภูมิในการหมักเป็นปัจจัยที่เกี่ยวเนื่องกับการเจริญของเชื้อ และการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอส โดยได้ทำการศึกษาการใช้อุณหภูมิในการหมักที่ 30, 37, 45 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้อุณหภูมิในการหมักที่ 37 องศาเซลเซียส เชื้อมีการเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสสูงสุด ภาวะนี้ไม่มีความแตกต่างจากเชื้อดั้งเดิมซึ่งแยกได้จากดินภายในประเทศไทย จากการศึกษาของ Jaroslav (1991) พบว่าอุณหภูมิยังมีผลต่อระดับของ mRNA ที่ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์โปรติเอสของ *Bacillus megaterium* อีกด้วย

เนื่องจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 เป็นเชื้อพวกที่ต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต(aerobic bacteria) ดังนั้นปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อชนิดนี้ ซึ่งการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงในกระบวนการหมักขึ้นอยู่กับ 2 ปัจจัย โดยปัจจัยแรกคือ อัตราการเติมอากาศลงไปในอาหารเลี้ยง ซึ่งได้ทำการศึกษาอัตราการเติมอากาศเท่ากับ 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm พบว่า อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 1.0 vvm เชื้อมีการเจริญและผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสสูงสุด แสดงว่าที่อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 0.5 vvm มีปริมาณการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงน้อยเพราะมีอัตราการเติมอากาศที่ต่ำกว่า ในขณะที่อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 1.5 vvm เชื้อมีการเจริญที่ต่ำและมีผลต่อการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสที่ต่ำกว่าเพราะมีอากาศมากเกินไป และปัจจัยต่อมาก็คือค่าอัตราการกวนของใบกวนที่ใช้ในการหมัก ซึ่งเป็นการทำให้อากาศที่เติมลงไปผสมเข้ากับอาหารเลี้ยง

และยังช่วยการกระจายเซลล์ ออกซิเจน และสารอาหารในอาหารเลี้ยงให้สม่ำเสมอและทั่วถึง ซึ่งค่านี้จะมีความสัมพันธ์กับสมบัติทางกายภาพของอาหารเลี้ยง ลักษณะและรูปร่างของถังหมัก และลักษณะของใบกวน ได้ทำการศึกษาอัตราการกวนที่ 200, 250 และ 300 รอบต่อนาที พบว่าการใช้อัตราการกวนเท่ากับ 250 รอบต่อนาที เชื้อมีอัตราการเจริญและผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสสูงสุด แสดงว่าที่อัตราการกวนเท่ากับ 200 รอบต่อนาที มีความเร็วรอบที่ช้าเกินไป จนทำให้การกระจายของเซลล์ สารอาหาร และการละลายของออกซิเจนไม่สม่ำเสมอ และที่อัตราการกวนเท่ากับ 300 รอบต่อนาทีมีความเร็วรอบที่สูงเกิน จนทำให้การกระจายของเซลล์ สารอาหาร และการละลายของออกซิเจนไม่สม่ำเสมอ อันเป็นผลเนื่องมาจากแรงเหวี่ยงอันเกิดจากการหมุน

เมื่อเปรียบเทียบภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง ที่ได้จากการทดลอง กับภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR25 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง ของ วรรณวิมล ทรัพย์ดี (2540) พบว่า *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 มีรูปแบบการเจริญ การผลิตเอนไซม์ และภาวะที่เหมาะสมบางประการแตกต่างไปจากสายพันธุ์ดั้งเดิมดังแสดงในตารางที่ 5 ทั้งยังให้การผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสที่สูงกว่า โดยในสายพันธุ์ดั้งเดิมให้การผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสรวมเท่ากับ 353,000 ยูนิต ในสายพันธุ์กลายให้การผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสรวมเท่ากับ 5,526,500 ยูนิต เพิ่มขึ้น 15.7 เท่า

ซึ่งจะเห็นได้ว่า *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 มีสมบัติที่แตกต่างจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 สายพันธุ์ดั้งเดิม จึงได้ทำการทดลองสกัดแยกแอลคาไลน์โปรติเอสให้บริสุทธิ์เพื่อทำการทดสอบเปรียบเทียบสมบัติบางประการของแอลคาไลน์โปรติเอสที่ทำให้บริสุทธิ์นี้กับแอลคาไลน์โปรติเอสที่ทำให้บริสุทธิ์ซึ่งผลิตจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 สายพันธุ์ดั้งเดิม(ปกรณ์ จิโรจน์กุลกิจ, 2532)

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมของสายพันธุ์ดั้งเดิม กับภาวะเหมาะสมที่ได้จากรทดลอง (จันทิมา จิรนุชนาฏ, 2539)ดังตารางที่ 6 พบว่าในภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 มีแอคติวิตีรวมสูงกว่า แต่มีค่าแอคติวิตีจำเพาะที่ต่ำกว่าอาจเป็นเพราะในภาวะที่เหมาะสมของสายพันธุ์กลาย UUNN-1 ใช้ปริมาณไนโตรเจนที่ได้จากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมเมล็ดดอกทานตะวันสูงกว่าจึงทำให้มีปริมาณโปรตีนอื่นที่ไม่ใช่เอนไซม์มีมากกว่า

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสในถังหมักขนาด 5 ลิตร ระหว่าง *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 กับ *Bacillus subtilis* TISTR25 สายพันธุ์ดั้งเดิม

ปัจจัยที่ทำการศึกษา	*Bacillus subtilis TISTR25	Bacillus subtilis สายพันธุ์กลาย UUNN-1
ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง	0.1%(w/v)	0%(w/v)
ปริมาณไนโตรเจน (จากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองและเมล็ดดอกทานตะวัน)	0.3%(w/v)	0.4%(w/v)
ค่าความเป็นกรด-ด่าง	7.0	7.0
ปริมาณเชื้อเริ่มต้น	0.5%(v/v)	1%(v/v)
อุณหภูมิในการเลี้ยง	37°C	37°C
อัตราการเติมอากาศ	1.0 vvm.	1.0 vvm.
อัตราการกวน	250 รอบต่อนาที	250 รอบต่อนาที
ปริมาณแอลคาไลน์โปรติเอสรวม	**353,000 ยูนิต	***5,526,500 ยูนิต
แอคติวิตีจำเพาะ	**198.32ยูนิตต่อ มก. โปรตีน	***10.23 ยูนิตต่อ มก. โปรตีน
ระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์	84 ชั่วโมง	36 ชั่วโมง

*วรรณวิมล ทรัพย์ดี, 2540, **แอคติวิตีที่ pH 10.5, ***แอคติวิตีที่ pH 9.5

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมของสายพันธุ์ดั้งเดิม กับภาวะเหมาะสมที่ได้จากการทดลอง

ปัจจัยที่ทำการศึกษา	การผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1	
	*ภาวะที่เหมาะสมของสายพันธุ์ดั้งเดิม	ภาวะเหมาะสมที่ได้จากการทดลอง
ปริมาณแอลคาไลน์โปรติเอสรวม	**651,477 ยูนิต	***5,526,500 ยูนิต
แอคติวิตีจำเพาะ	**383.2 ยูนิตต่อ มก. โปรตีน	***10.23 ยูนิตต่อ มก. โปรตีน
ระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์	48 ชั่วโมง	36 ชั่วโมง

*จันทิมา จิรานุชนาฏ, 2539, **แอคติวิตีที่ pH 10.5, ***แอคติวิตีที่ pH 9.5

จากตารางที่ 6 เมื่อใช้ภาวะที่เหมาะสมนี้ เวลาในการหมักเพื่อให้ได้ปริมาณเอนไซม์สูงสุดลดลงเหลือ 36 ชั่วโมง ซึ่งเป็นประโยชน์มากต่อการใช้ในอุตสาหกรรมเพราะจะทำให้ได้เอนไซม์ปริมาณมากในระยะเวลาสั้น

ขั้นตอนแรกของการสกัดแยกแอลคาไลน์โปรติเอสคือ การตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมอิ่มตัว พบว่าการตกตะกอนที่ 40-60 เปอร์เซ็นต์อิ่มตัว มีปริมาณเอนไซม์สูงสุด และมีปริมาณโปรตีนคิดเป็น 24 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมด คิดเป็นค่า Purification factor เท่ากับ 3.1 (ดังตารางที่ 2)แสดงว่าการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยเกลือแอมโมเนียมที่ความเข้มข้น40-60 เปอร์เซ็นต์อิ่มตัว ได้ตะกอนเอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์เหมาะสม และกำจัดโปรตีนอื่นที่ไม่มีแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรติเอสได้บางส่วน (ดังตารางที่ 3) นำตะกอนเอนไซม์ที่ได้มาละลายและกำจัดเกลือแอมโมเนียมโดยวิธีไดอะไลซิส โดยโมเลกุลของเกลือซึ่งมีขนาดเล็กกว่าโมเลกุลของเอนไซม์จะแพร่ออกมาจากถุงยังสารละลายซึ่งมีความเข้มข้นเกลือน้อยกว่า นำสารละลายที่ได้ทำให้แห้งที่อุณหภูมิต่ำ -50 องศาเซลเซียส และเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เนื่องจากแอลคาไลน์โปรติเอสนี้มีสมบัติในการย่อยสลายโปรตีนซึ่งรวมถึงตัวเอนไซม์เองด้วย(autolysis) ดังนั้นจึงไม่เหมาะสมที่จะเก็บไว้ในรูปของสารละลาย ซึ่งจากการทดลองของ Clark DJ. และคณะ(2000)พบว่าแอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จาก *Micrococcus luteus* มีเสถียรภาพในสารละลายเพียง 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบความเสถียรของเอนไซม์ที่ได้จากสายพันธุ์กลายกับเอนไซม์จากสายพันธุ์ดั้งเดิม พบว่าทั้งสองชนิดไม่มีความเสถียรในสารละลาย โดยจะเก็บรักษาไว้ในรูปเอนไซม์ผง ซึ่งจะเก็บรักษาไว้ได้นานกว่า 3 เดือน(จันทิมา จิรนุชนาฏ, 2539 ; วรรณ วิมล ทรัพย์ดี, 2540)

ขั้นตอนต่อมาจึงทำการสกัดแยกด้วยวิธีแลกเปลี่ยนไอออนประจุลบ โดยใช้คอลัมน์ดีอีเออี-เซลลูโลส ซึ่งการทดลองนี้ต่างจากการทดลองของ ปกรณ์ จิโรจน์กุลกิจ (2532) ที่ใช้วิธีแลกเปลี่ยนไอออนประจุบวก โดยใช้คอลัมน์ ซีเอ็ม-เซลลูโลส เนื่องจากได้ทำการทดลองโดยใช้คอลัมน์ ซีเอ็ม-เซลลูโลส แต่เอนไซม์ไม่สามารถจับกับคอลัมน์ได้(ไม่ได้แสดงผลการทดลองไว้) แสดงว่าแอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จากการหมักนี้มีค่าประจุสุทธิเปลี่ยนแปลงไปจากแอลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 สายพันธุ์ดั้งเดิม(ปกรณ์ จิโรจน์กุลกิจ, 2532) การเปลี่ยนแปลงของค่าประจุสุทธิยังแสดงถึงการเปลี่ยนไปของกรดอะมิโนองค์ประกอบของเอนไซม์นี้จากเดิม จากการทดลองของ Yang และคณะ ในปี 2000 ได้ทำ site-directed mutagenesis ของเอนไซม์ Subtilisin เปลี่ยน Glutamic ตำแหน่งที่ 156 เป็น Lysine ซึ่งมีผลทำให้ค่าประจุเปลี่ยนไปได้ถึง 1 หน่วย pH ซึ่งเป็นผลมาจาก addtive effect จากการขยายตัวของ side chain ของ lysine ที่มีหมู่ ε-NH3+ มีผลต่อประจุบวกของ histidine ตำแหน่ง 64 ทำให้เกิด electrosatic effect ซึ่งจะเห็นได้ว่าแม้เกิดการเปลี่ยนแปลงกับกรดอะมิโนที่พื้นผิวเพียงตัวเดียวก็ยัง

สามารถทำให้ค่าประจุของเอนไซม์เปลี่ยนไปได้ จึงมีความเป็นไปได้สูงที่จากแอลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อสายพันธุ์กลายจะมีประจุที่เปลี่ยนไปเป็นตรงกันข้ามกับเอนไซม์จากสายพันธุ์ดั้งเดิมเนื่องจากเป็นการกลายพันธุ์แบบสุ่มและทำซ้ำกันหลายครั้ง จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนหลายแห่งและส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของประจุสุทธิของเอนไซม์ และในการทดลองใช้คอลัมน์ ดีอีเออี-เซลลูโลส ในการแยกเอนไซม์นี้ ได้ peak ที่มีแอคติวิตีคือ I, II, III จึงทำการทดสอบด้วยสารยับยั้ง และ ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) ซึ่งสามารถยับยั้งเฉพาะนิวทรัลโปรติเอส ปรากฏว่าสารละลายที่ได้จาก peak ที่ II และ III ถูกยับยั้งด้วย EDTA แต่ไม่สามารถยับยั้งสารละลายที่ได้จาก peak ที่ I ดังนั้นเฉพาะสารละลายที่ได้จาก peak I เป็นแอลคาไลน์โปรติเอส เนื่องจากขั้นตอนการทำนี้ใช้เวลาทำการทดลองที่นานกว่า 24 ชั่วโมง แอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จึงมีปริมาณที่ลดลงเป็นอย่างมาก(ดังตารางที่ 3) และจากการทดลองในการแยกแอลคาไลน์โปรติเอสจากให้บริสุทธิ์จากสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยใช้ ซีเอ็ม-เซลลูโลส คอลัมน์ พบ peak ที่มีแอลคาไลน์โปรติเอสเพียง 2 peak โดยเป็น peak ของแอลคาไลน์โปรติเอส และนิวทรัลโปรติเอส ตามลำดับ(ปกรณ์ จิโรจ์กุลกิจ, 2532) ที่ได้ผลแตกต่างจากการทดลองนี้เนื่องจาก การทดลองนี้ใช้เชื้อสายพันธุ์กลาย, สูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงซึ่งในสายพันธุ์ดั้งเดิมใช้ minimum medium ส่วนในสายพันธุ์กลายใช้ complex medium และภาวะที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ในสายพันธุ์ดั้งเดิมเป็นภาวะในระดับขวดเขย่า แต่ในสายพันธุ์กลายใช้ภาวะจากการหมักในถังหมักขนาดแบบ 5 ลิตรแบบไม่ต่อเนื่อง

ขั้นตอนต่อมาเป็นการคัดแยกโมเลกุลตามความแตกต่างของขนาดโดยใช้คอลัมน์เซฟาเด็กซ จี-100 ซึ่งโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่กว่าขนาดรูพรุนของเม็ดเจลจะผ่านคอลัมน์ลงมาก่อนทาง gel matrix ในขณะที่โมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่าจะผ่านคอลัมน์ทางรูพรุนของเม็ดเจล ผลการทดลองแสดงไว้ตามรูปที่ 16 พบว่ามีขนาดโมเลกุลโดยประมาณเท่ากับ 27,000 ดาลตัล และเนื่องจากขั้นตอนการทำนี้ใช้เวลาทำการทดลองที่นานกว่า 24 ชั่วโมง แอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จากขั้นตอนนี้จึงมีปริมาณที่ลดลงเป็นอย่างมาก(ดังตารางที่ 3) ซึ่งหากใช้ปริมาตรของน้ำหมักในการสกัดแยกน้อยลงก็จะได้ปริมาณเอนไซม์ที่ลดน้อยลงไปอีก

การทดสอบสมบัติของแอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้เนื่องจากเอนไซม์ที่ผ่านคอลัมน์เซฟาเด็กซ จี-100 มีปริมาณลดน้อยลงมากจึงใช้แอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-เซลลูโลสในการทดสอบสมบัติดังต่อไปนี้

จากผลการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา พบว่าแอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้มีความสามารถในเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนในช่วง pH เท่ากับ 8.5-10.5 โดยมีแอคติวิตีสูงสุดที่ 10.5 ซึ่งเปลี่ยนไปจากเอนไซม์ที่ยังไม่ทำการสกัดแยกให้บริสุทธิ์ ดังการทดลองของ จันทิมา จิรนุชนาฏ (2539) เมื่อเปรียบเทียบกับค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมใน

การเร่งปฏิกิริยาของแอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus subtilis* TISTR25 สายพันธุ์ดั้งเดิม (ปกรณ์ จิโรจน์กุลกิจ, 2532) ซึ่งก็เท่ากับ 10.5 เช่นกัน

จากผลของการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา พบว่าแอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้มีความสามารถในเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 35-65 องศาเซลเซียส แอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และแอคติวิตีลดลงเป็นอย่างมากที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ซึ่งเอนไซม์อาจเสียสภาพในการเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมินี้ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาของแอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus subtilis* TISTR25 สายพันธุ์ดั้งเดิม(ปกรณ์ จิโรจน์กุลกิจ, 2532) ซึ่งก็เท่ากับ 45 องศาเซลเซียส เช่นกัน

ผลการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์ พบว่าได้ค่า K_m ต่อโปรตีนเคซีน เท่ากับ 0.101 mM, V_{max} เท่ากับ 0.0087 mM/min เมื่อเปรียบเทียบกับค่า K_m และ V_{max} ของแอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus subtilis* TISTR25 สายพันธุ์ดั้งเดิม(ปกรณ์ จิโรจน์กุลกิจ, 2532) ซึ่งก็เท่ากับ 0.024 mM และ 0.142 mM/min ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันโดยค่า K_m จะบอกถึงความเข้มข้นของซับสเตรทครึ่งหนึ่งที่ทำให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาด้วยความเร็วสูงสุด ซึ่งจะบ่งบอกถึงความจำเพาะต่อซับสเตรทคือ หากมีค่า K_m น้อย แสดงว่ามีความจำเพาะต่อซับสเตรทสูง และ V_{max} จะบอกถึงความเร็วในการเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นจะเห็นได้ว่าแอลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 มีความจำเพาะต่อเคซีน และมีความเร็วในการเร่งปฏิกิริยาเคซีนที่น้อยกว่าแอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus subtilis* TISTR25 สายพันธุ์ดั้งเดิม แสดงว่าแอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้มีความสามารถในการย่อยสลายเคซีนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับแอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus subtilis* TISTR25 สายพันธุ์ดั้งเดิม โดยค่า *Km* ที่น้อยกว่านี้น่าจะมีผลให้ค่าแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรติเอสรวมมีค่าลดลงหรือน้อยกว่าเมื่อเทียบกับแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรติเอสรวม *Bacillus subtilis* TISTR25 สายพันธุ์ดั้งเดิม

เมื่อเปรียบเทียบค่าแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรติเอสรวมของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1ในถังหมักขนาด 5 ลิตรแบบไม่ต่อเนื่อง ที่ได้จากการทดลองนี้ กับค่าแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรติเอสรวมจากการทดลองของ วรรณวิมล ทรัพย์ดี (2540) ใน *Bacillus subtilis* TISTR25 สายพันธุ์ดั้งเดิม พบว่ามีค่าแอคติวิตีรวมที่สูงกว่า เนื่องจากความแตกต่างของการทดลองทดลองทั้งสอง โดยค่าแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรติเอสรวมที่ได้มากกว่าน่าจะมีผลมาจาก 1)เป็นผลมาจากการกลายพันธุ์มีผลให้ลักษณะ รูปร่างของเชื้อ สั้นกว่าเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิม อาจมีผลทำให้มีการเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสของเชื้อที่มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม 2) จากการที่ไม่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงอาหาร อาจทำให้ไม่มีผลกระทบจาก Catabolite repression และค่าอัตราส่วน C/N ของอาหารเลี้ยงน้อยกว่าในอาหารเลี้ยงที่เหมาะสมของสายพันธุ์ดั้งเดิม จึงเป็นไปได้ที่จะทำให้ค่าแอคติวิตีของแอลคาไลน์โปรติเอสรวม

สูงกว่าในสายพันธุ์ดั้งเดิม 3)เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลายสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ทำให้เหนี่ยวนำการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสเพื่อใช้ย่อยสลายโปรตีนในอาหารเลี้ยงมากขึ้นกว่าในสายพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งในการผลิตเพื่อใช้ในระดับเอนไซม์เพื่อใช้ในระดับอุตสาหกรรมที่ใช้เอนไซม์ปริมาณมากจึงมักคำนึงถึงปริมาณเอนไซม์รวม มากกว่าค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ เพราะนิยมใช้เอนไซม์ในรูปของ crude enzyme

ผลการยับยั้งของสาร phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF) และ ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA) โดยกลไกการยับยั้งของ PMSF คือการจับกับหมู่ไฮดรอกซิล(-OH)ของกรดอะมิโนเซรีน เป็นหมู่สำคัญในบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอลคาไลน์เซรีนโปรติเอส ขณะที่ EDTA ซึ่งเป็นสารคีเลตติ้ง กับไอออนของธาตุโลหะ ซึ่งจะแสดงการยับยั้งโปรติเอสที่มีหมู่ของไอออนโลหะ เป็นหมู่สำคัญบริเวณเร่งปฏิกิริยาหรือ metalloprotease จากการทดลองพบว่าเอนไซม์ที่ได้หลังจากการทำให้บริสุทธิ์ ถูกยับยั้งโดยสาร PMSF ซึ่งแสดงว่าเอนไซม์ที่ได้มีสมบัติเป็นแอลคาไลน์เซรีนโปรติเอส

เมื่อเปรียบเทียบเปรียบเทียบสมบัติของเอลคาไลน์โปรติเอส จากน้ำหมัก(crude enzyme) ของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 กับเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ดังตารางที่ 7 พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมของ crude enzyme มีค่าต่ำกว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมของเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์ เนื่องจากการทำให้บริสุทธิ์ได้กำจัดโปรตีนที่ปนเปื้อน ซึ่งโปรตีนเหล่านี้มีผลต่อค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โดยตรง ดังนั้นค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของแอลคาไลน์โปรติเอสที่ทำให้บริสุทธิ์จึงมีความน่าเชื่อถือมากกว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของ crude enzyme ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้(ปกรณ์ จิโรจน์กุลกิจ, 2532) ส่วนค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของ crude enzyme มีค่าเท่ากับอุณหภูมิที่เหมาะสมเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์

เมื่อเปรียบเทียบขั้นตอนการสกัดแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์และสมบัติบางประการของแอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จาก*Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1กับแอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จาก *Bacillus subtilis* TISTR25 สายพันธุ์ดั้งเดิม(ปกรณ์ จิโรจน์กุลกิจ, 2532) ดังตารางที่ 8 และ 9 ตามลำดับ พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีสมบัติเพียงบางประการที่เปลี่ยนไปจากแอลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 สายพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งเป็นผลมาจากการกลายพันธุ์

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบสมบัติของแอลคาไลน์โปรติเอสจาก*Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ระหว่าง Crude enzyme กับเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์

สมบัติบางประการ	แอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1	
	* Crude enzyme	เอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน
ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา	9.5	10.5
อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา	45 องศาเซลเซียส	45 องศาเซลเซียส

*Crude enzyme (จันทิมา จิรานุชนาฏ, 2539)

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบขั้นตอนการสกัดแยกแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 กับแอลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 สายพันธุ์ดั้งเดิม

ขั้นตอนการสกัดแยกเอนไซม์	แอลคาไลน์โปรติเอสจาก	
	*_Bacillus subtilis_ TISTR25 สายพันธุ์ดั้งเดิม	_Bacillus subtilis_ สายพันธุ์กลาย UUNN-1
การตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟต	**0-70%อิ่มตัว	40-60%อิ่มตัว
ชนิดของคอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนอิออน	CM-Cellulose	DEAE-Cellulose
ชนิดของคอลัมน์แบบเจลโครมาโทกราฟี	Sephadex G-100	Sephadex G-100

*เอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่า(ปกรณ์ จิโรจน์กุลกิจ, 2532)

**ใช้วิธีการตกตะกอนทั้งหมด ไม่ได้ทำการหาช่วงการตกตะกอน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบสมบัติของแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 กับแอลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 สายพันธุ์ดั้งเดิม

สมบัติบางประการ	แอลคาไลน์โปรติเอสจาก	
	**Bacillus subtilis* TISTR25 สายพันธุ์ดั้งเดิม	*Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1
ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา	10.5	10.5
อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา	45 องศาเซลเซียส	45 องศาเซลเซียส
ค่า K_m ต่อเคซีน	0.024 mM	0.101 mM
ค่า V_{max} ในการเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายเคซีน	0.142 mM/min	0.0087 mM/min
ค่ามวลโมเลกุลโดยประมาณจากวิธีเจลโครมาโตกราฟี	27,000 ดาลตัน	27,000 ดาลตัน
สารยับยั้ง	PMSF	PMSF

*เอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในระดับขวดเขย่า(ปกรณ์ จิโรจน์กุลกิจ, 2532)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการทดลอง

1. ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์กลาย UUNN-1 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง ในอาหารสูตร Basal medium โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1%(v/v) มีปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 0% (w/v), ปริมาณไนโตรเจนจากสารสกัดจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดดอกทานตะวัน เท่ากับ 0.4%(w/v), KH_2PO_4 0.1%(w/v), $MgSO_4.7H_2O$ 0.05%(w/v), $CaCl_2.2H_2O$ 0.001%(w/v), ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 ^{0}C อัตราการเติมอากาศเท่ากับ 1.0 vvm อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 รอบต่อนาที ได้ปริมาณของเอนไซม์เท่ากับ 1,579 ยูนิตต่อกรัมเซลล์แห้งรวม ใช้ระยะเวลาในการหมัก 36 ชั่วโมง
2. สามารถทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 165 เท่า และค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 1,688 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน
3. โปรติเอสที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 27,000 ดาลตัน จากวิธีเจลโครมาโตรกราฟี
4. แอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนที่ช่วงอุณหภูมิ 30-65 องศาเซลเซียส และเหมาะสมที่ 45 องศาเซลเซียส
5. แอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนที่ช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.5-10.5 และเหมาะสมที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 10.5
6. มีค่า K_m ต่อเคซีนเท่ากับ 0.101 mM และ V_{max} ต่อเคซีนเท่ากับ 0.0087 mM/min
7. ถูกยับยั้งโดยสาร phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

เกษม พงษ์มณี, 2536. การผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรติเอสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR25. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สหสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

กำเนิด สุภัณวงษ์, 2534. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิยาลัยเชียงใหม่.

จันทิมา จิรนุชนาฏ, 2539. การกลายพันธุ์ *Bacillus subtilis* TISTR25 เพื่อเพิ่มการผลิตแอลคาไลน์โปรติเอส. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สหสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รอ. ปกรณ์ จิโรจน์กุลกิจ, 2532. การแยกให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติแอลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR25. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุพจน์ ใช้เทียมวงศ์, 2530. โภชนาการที่จำเป็นต่อการหมัก. เทคโนโลยีการหมัก ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

สนธยา ศรีเมฆ, 2533. ผลของสารต้นตอคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการผลิตโปรติเอสและเอนไซม์ในไนโตรเจนเมตาบอลิซึมของ *Bacillus subtilis* TISTR25. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วรรณวิมล ทรัพย์ดี, 2540. การผลิตแอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 ในถังหมักขนาด 5 ลิตรแบบไม่ต่อเนื่อง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สหสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อุดมลักษณ์ ธิติรักษ์พานิชย์, 2534. การทำให้บริสุทธิ์และการศึกษาสมบัติของเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมี บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาษาอังกฤษ

Aiyappa, P.S., Traficante, L.T., and Lampen, O.J. 1977. Pennicillinase-Releasing Protease of *Bacillus licheniformis.* : Purification and General Properties *J. Bacteriol*, 129 : 191-197.

Alder, J., Nissen, 1986. Proteotytic Enzyme and Food Proteins. In Alder, J. and Nissen. (eds), *Enzyme Hydrolysis of Food Protein*, pp. 25-28. NewYork : Elsevier Applied Sicence Publisher.

Aunstrup, K. 1979. Proteolytic Enzymes. *Appl. Biochem. And Bioeng.* 2 : 49-53.

Aunstrup, K. 1980. Proteinase. In Rose A.H.(eds.), *Economic Microbiology* , 114 : 49-77.

Baltz, R. 1986. Strain improvement. In Demain. A.L., and Solomon. N.A. (eds.), *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, pp.157-169. New York : The United States of America Press.

Barrett, F.F. 1979. Enzyme Use in Milling and Baking Industries. In Reed, G. (eds), *Enzyme in Food Processing*, pp. 301-330.

Bernlohr, W.R. 1964. Postlogarithmic Phase Metabolism of Sporulating Microorganism I. Protease of *Bacillus licheniformis. J. Biol. Chem.* Vol. 239. No. 2 : 538-543.

Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method of Quantitation of Microgram quantities of Protein Utilizing The Principle Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.

Chaloupka, J., and Kreckova, P. 1968. Protease Repression in *Bacillus megaterium* KM. *Biochem. Biophys.* Res. Comm. 8 : 120-124.

Clark, D.J., Hawrylik, S.J., Kavanagh, E., Opheim, D.J. 2000. Purification and characterization of a unique alkaline elastase from *Micrococcus luteus. Protein Expr. Purif.* 18(1) : 46-55

Coleman, G. 1967. Studies on The Regulation of Extracellular Enzyme Formation by *Bacillus subtilis. J. Gen. Microbiol.* 49 : 421-431.

Dancer, B.N., and J. Mandelstam, 1975. Production and Possible Function of Serine Protease During Sporulation of *Bacillus subtilis*, *Journal of Bacteriology*, 121 : 406-410.

Drake, J.W. 1970. Radiation Mutagenasis. *The Molecular Basis of Mutation* : 160-176. New York : The United State of America.

Doi, R.H. 1973. Rôle of Protease in Sporulation. *Current Topics in cellular regulation.* 7 : 1-20.

Endo, S. 1962. Studies on Protease Produced by Thermophili Bacteria. *J. Ferment. Technol*, 40 : 346-353.

Fantini, A.A. 1975. Strain Development. *Methods in Enzymology.* Vol. 43 pp. 24-41. New York : Academic Press.

Fox, J.W., Shanon, J.D., and Bjarnason, J.B. 1991. Protease and Their Innibitors in Biotechnology. In Leatbam, G.F. & Himmel, M.E., *Enzyme in Biomass Conversion.* pp. 62-79. Washington D.C. : American Chemical society.

Fujiwara, N., and Yamamoto, K. 1987 Production of Alkaline Protease in Low-Cost Medium by Alkalophillic *Bacillus sp.* and Properties of the Enzyme. *J. Ferment Technol*, 65 : 345-348.

Giesecke, U.E. , Bierbaum, G. , Rudde, H. , Spohn, U. , and Wanderey, C. 1991. Production of Alkaline Protease with *Bacillus licheniformis* in a controlled Fed-batch Process. *Appl. Microbiol. Biotechnol*,

Griffin, P.L., and Fogaty, W.M. 1973 Production and Purification of The Metalloprotease of *Bacillus polymyxa. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26. : 185-190.

Godfrey, T. and Reichft, J., 1983. Flavoring and Coloring. *Industrial Enzymology*. London: Macmillan, pp. 305-314.

Hartley, B.S. 1960. Proteolytic Enzyme. *Annu. Rev. Biochem.* 29 : 45-72.

Heineken, F.B., and O' Connor, R.J. 1972. Continuous Coluture Studies on the Biosynthesis of Alkaline Protease, Neutral Protease and α-Amylase by *Bacillus subtilis* NRRL-B3411. *J. of Gen. Microbiol*, 73 : 35-44.

Hepner, I. And Male, C. 1986. Report : *Industrial enzyme by 1990.* L. Hepner and Assoc. London.

Hidato, T. Teruhiko, A. , and Koki, H. 1990 Characterization of an Alkaline Protease from *Bacillus sp.* No. AH-101. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 33 : 519-523.

Horikoshi, K. 1971. Production of Alkaline Enzymes by Alkalophillic Microcrganism. Part I Alkaline Protease Produced by *Bacillus* No. 221 *Agri. Biol. Chem*, 35 : 1783-1791.

Hopwood, D.A. 1970. The Isolation of Mutants. In Norris, J.R., and Ribbons, D.W. (eds.), *Method in Microbiology*, Vol. 3A. pp. 36-430. New York : Academic Press.

Hübner, U., Bock, U., and Schügerl, K. 1993. Production of alkaline Serine Protease Subtilisin Carlsberg by *Bacillus licheniformis* on Complex Medium in Stirred Tank Reactor. *App. Microbiol Biotechnol*, 40 : 182-188.

Janssen, P.H., Peek, K.K., and Morgan, H.W. 1994 Effect of culture Conditions on The Production of an Extracellular Protease by *Thermus sp.* Rt 41A. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 41 : 400-406.

Jaroslav, V. 1991. External Factor Involved in the Regulation of synthesis of an Extracellular Proteinase in *Bacillus megaterium* : Effect of Glucose and Amino acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 26 : 373-377.

Jaroslav, V. 1991. External Factor Involved in the Regulation of synthesis of an Extracellular Proteinase in *Bacillus megaterium* : Effect of Temperature. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 35 : 352-357.

John, D.H.. and David, G.C. 1991. The Response of *Bacillus subtilis* ATCC21332 Manganese During Continous-Phase Growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 35 : 72-76.

Keay, L., and Wildi, B.S. 1970a. Protease of the Genus *Bacillus. Biotech. Bioeng.* XII : 179-212.

Keay, L., and Wildi, B.S. 1970b. Protease of the Genus *Bacillus. Biotech. Bioeng.* XII : 213-219.

Kitada, M.. and Horikoshi, K. 1976. Alkaline Proteinase Production from Methyl Acetate By Alkalophilic *Bacillus sp. J. Ferment. Techonol.* Vol.54 , No.6 : 383-392.

Kole, M.M.. Daper, I., and Gerson, F.G. 1988. Production of Protease by *Bacillus subtilis* Using Simultaneous Control of Glucose and Ammonium Concentrations. *J. Chem Tech. Biotechnol*, 41 : 197-206.

Leonard, W.A., Woods, A.E., and Well, M.R. 1987. Protein Analysis. *Food Composition and Analysis.* An AVI Book. 275-276. New York : Van Nortrand Reinhold.

Louise Prestidge, Vivan Gage and John Spizizen, 1971. Protease Activities During the Course of Sporulation in *Bacillus subtilis. Journal of Bacteriology*, 107 : 815-823.

Mandelstam. J. 1968. Sporulation in *Bacillus subtilis. Biochem. J.*, 109 : 793-801.

Matsubara, H. , and Feder, J. Other Bacterial, Mold and Yeast Protease. 1971. In Boyce, P.D. (eds.), *The Enzymes.* Vol. 3. New York : Academic Press.

MG Halpern. 1981. Production from *Bacillus subtilis* ATCC21415 Through 1418. Industrial Enzyme from Microbial Source (Recent Advance) : 53-58. *Chemical Technology* Review 186. New Jersey : NOYES DATA Corperation

Mihalyai, E. 1972. Proteolytic Enzyme. *Application of Proteolytic enzyme to Protein sturcture Studies*. pp. 39-41. Chemical Robber Co.

Miller, B.M., and Listky, W. 1976. Microbial Enzymes. *Industrial Microbiology*, Mc.Graw-Hill, Inc.

Millet, J., Archer, R. and Aubert, J.P. 1969. Biochemical and Physiological properties of an Extercellular Protease Produced by *Bacillus megaterium. Biotech. Bioeng.* 11 : 1233.

Mizybe , F., Takahashi, K., and Ando, T. 1973. The Structure and Function of Acid Protease I. Specific Inactivation of an Acid Protease from *Rhizopus chinersis* by Diazoacetyl - DL - Norleucine Methyl Ester. *J. Biochem.* 73:61.

Moon , S.H., and Parulekar, S.J. 1991. A Parametric Study of Protease Production in Batch and Fed - Batch Cultures of *Bacillus firmus. Biotechnology and Bioengineering*. 37:467-483.

Nehete, P.N., Shah, V.D., and Kothari, RM. 1985. Profiles of Alkaline Protease Production as a Function of Composition of the Slant, Age, Transfer and Isolate Number and Physiological State of Culture. *Biotechnology Letters*. 7. 6:413-4t8.

Nelson, N. 1944. A Photometric Adaptation of the Somogyl Method for the determination of glucose. *J. Bio. Chem.*, 153:375-380.

Ohta, T. 1966. Thermostabte Protease from Thermophilic Bacteria III Studies on The Stability of The Protease. *J. Biochem.* 242 : 509.

O' Reilly, T. and Day, D.F. 1983. Effect of Culture Conditions on Protease Production by *Aeromonas hydrophila. Appl. And Environ. Microbiol.*45. 3 1132 - 1135.

Outtrup, H., and Boyce, C.O. 1990. Microbial Protease and Biotechnology. In Fogarty. W.M. & Kelly, C.T., *Microbial Enzymes and Biotechnology*, 2nd ed. pp. 227 - 254. New York : Elseveir Applied Science.

Pero, J., and Sloma, A. 1993. Protease. In Sonenshien, A.L. (eds.), *Bacillus subtilis* and Other Gram Positive Bacteria, pp. 939 - 952. New York : The United State of America.

Priest, F.G. 1977. Extracellular Enzyme Synthesis in The Genus *Bacillus. Bacteriol. Rev.* 41 : 711 - 753.

Putten, AB. 1996. Improvement of the production of Subtilisin Carlsberg alkaline protease by *Bacillus licheniformis* by on-line process monitoring and control in a stirred tank reactor. *J. of Biotechnol.* 49:83-93.

Richardson, B.C., and Te Whaiti, I.E. 1978. Partial Characterization of Heat Stable Extracellular Protease of some Psychrotropic Bacteria from Raw Milk. N.Z.JI. *Daily Sci. Technol.* 13. 173 - 176.

Roger, RB., and Bernard , O. 1972. Process for The Preparation of Protease Active in Alkaline Medium. *US. Patent 3. 661. 715.* May 9.

Sadannobu, T., Yoshihiro, N., and Koji, M. 1975. Microbial Protease and Preparation Thereof. *U.S. Patent 3.87t.963.* Mar. 18.

Takami, H., Akiba, T., and Horokoshi, K. 1989. Production of Extremely Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus sp.* No. AH- 10. *Appl. Miccobiol. Biotechnol,* 30 : 120 - 124.

Takii, Y., Kuriyama, N., and Suzuki, Y. 1990. Alkaline Serine Protease Produced from Citric Acid by *Bacillus alcalophilus subsp. halodurans* KP 1239. *Appl. Microbiol. Biotechnol,* 34:57-62.

Tange, T., Tanguchi , S. , Kojima , S. , Miura , K. , and Momose , H. 1994. Improvement of A Useful Enzyme (Subtilisin BPN') by M Experimental Evolution System. *Appl. Microbiol. Biotechnol,* 41 : 239 - 244.

Votruba, J. 1987. External Factors Involved in The Regulation of an Extracellular Proteinase Synthesis in *Bacillus rnegaterium.* The Effect of Glucose and Amino Acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26 : 373 - 377.

Votruba, J. 1991. External Factors Involved in The Regulation of an Extracellular Proteinase in *Bacillus megaterium* : Effect of Temperature. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35 : 352-357

Ward, O.P., 1983. Proteinase. In Foragrty W.M.(eds.), *Microbial Enzymes and Biotechnology.* London and New York: Applied Science Publishers, pp.251-317.

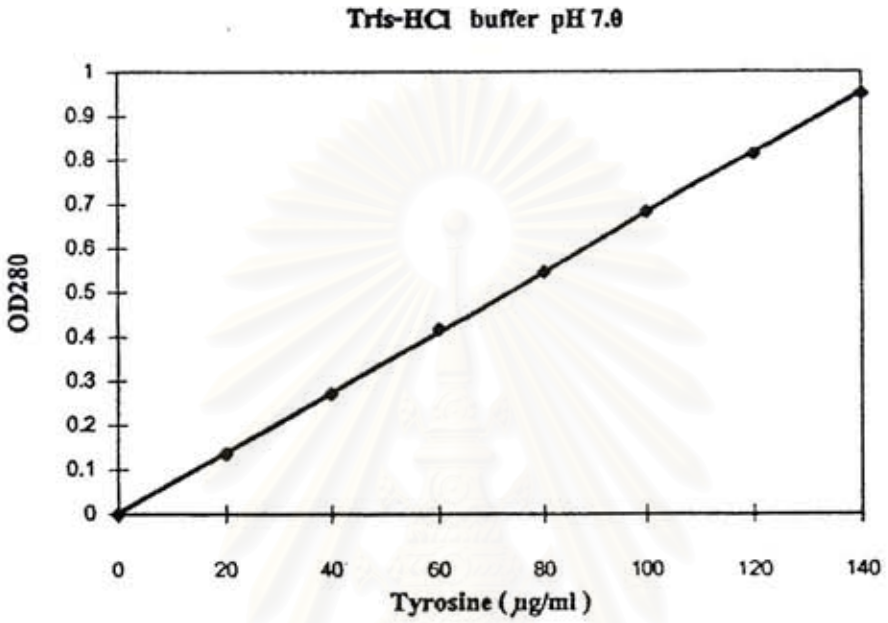
Webb, M. 1949. The Influence of Magnesium on Cell Division of Various Bacterial Species in Complex Media. *J. Gen. Microbiol.* 3 : 410-417.

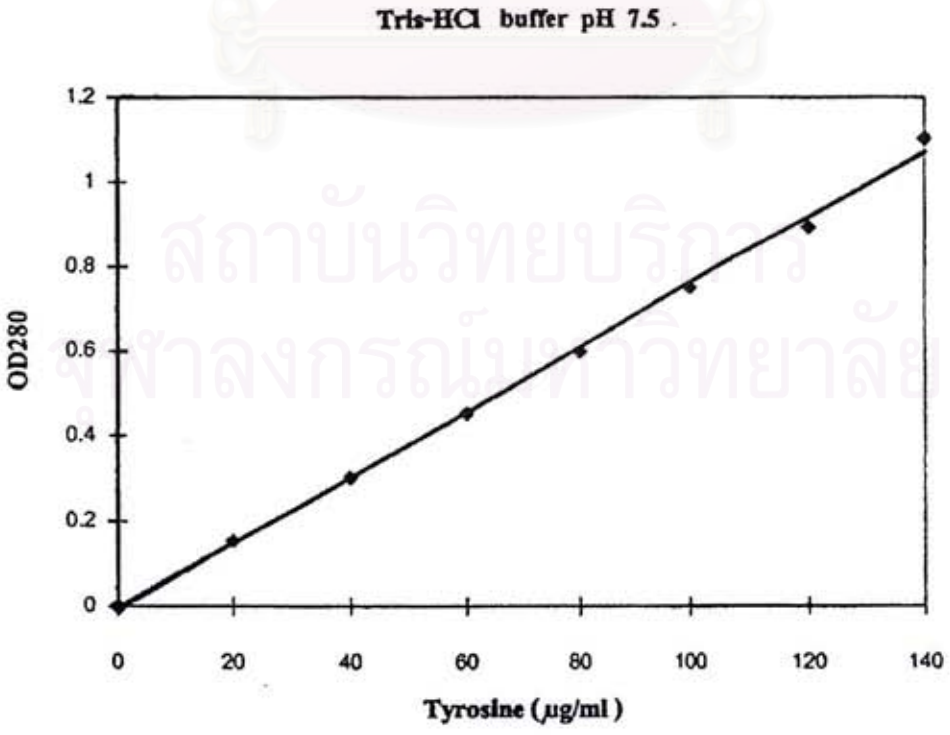
Yang, Y.H., Wu, Y.J., Jiang, L., Zhu, L.Q. and Yang, S.L. 2000. Mutants of subtilisin E. *Sheng Wu Kung Cheng Hsueh Pao.* 16(2):147-9

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

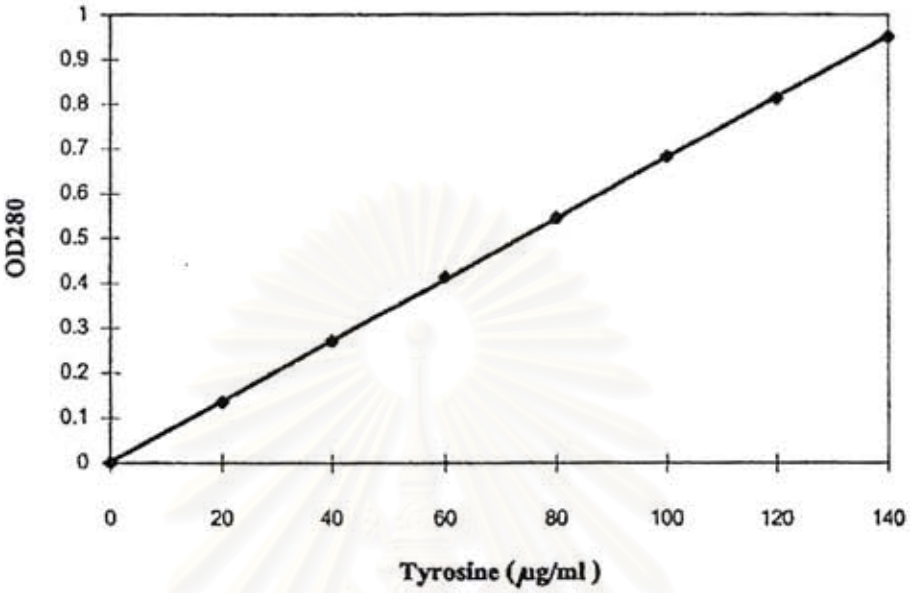
ภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร ของสารละลายไทโรซีน ที่มีความเข้มข้น 0-140 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ



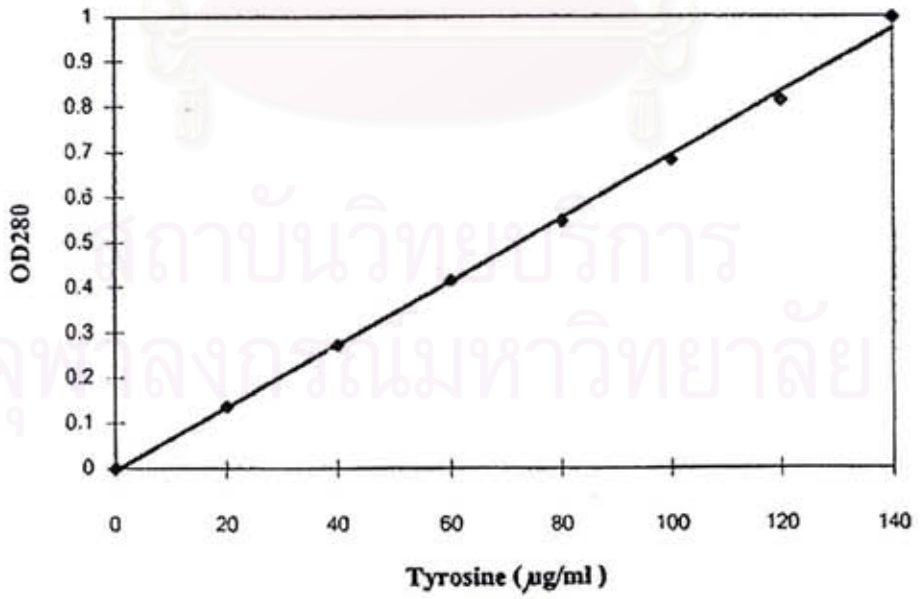


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

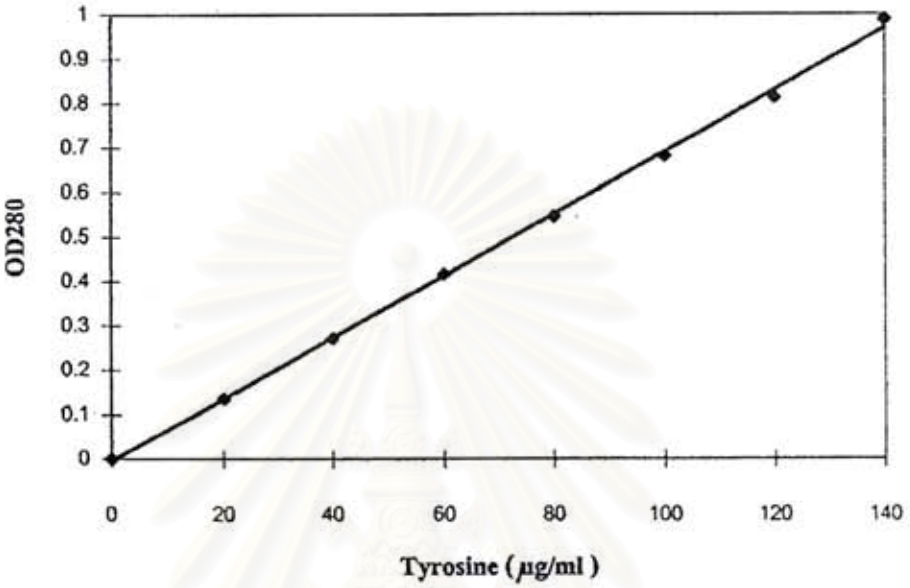
Tris - HCl buffer pH 8.0



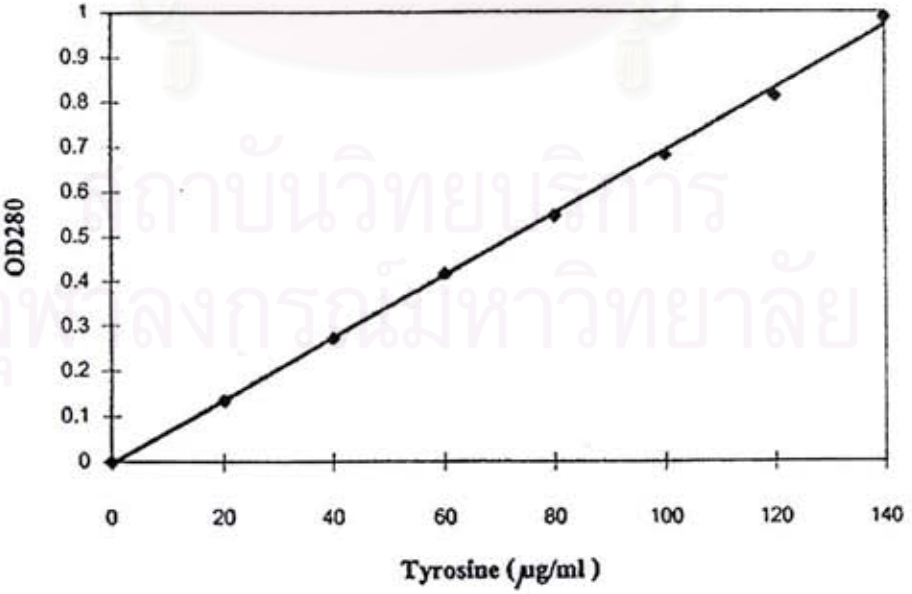
Tris - HCl buffer pH 8.5



Tris - HCl buffer pH 9.0

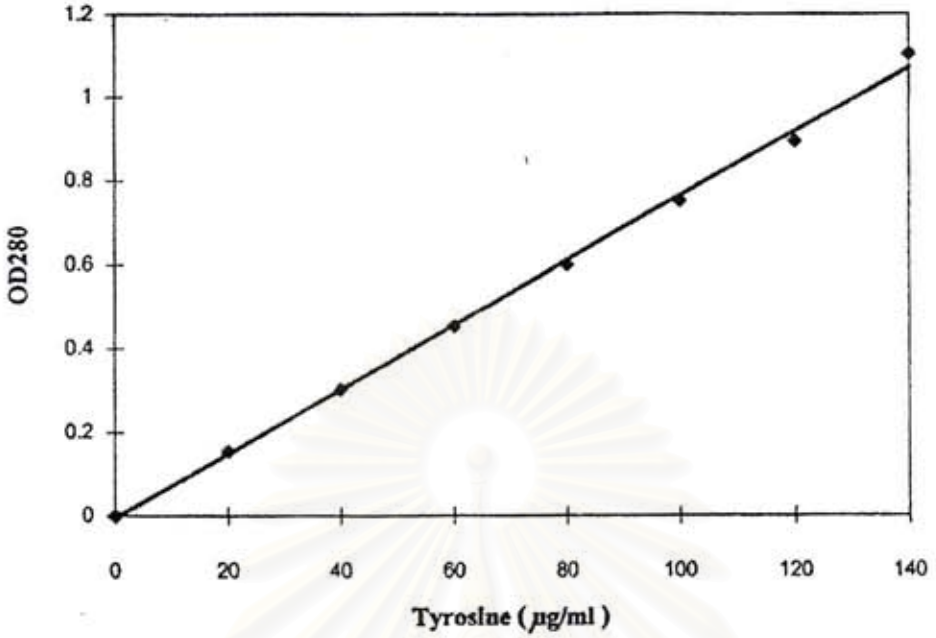


Tris - HCl buffer pH 9.5

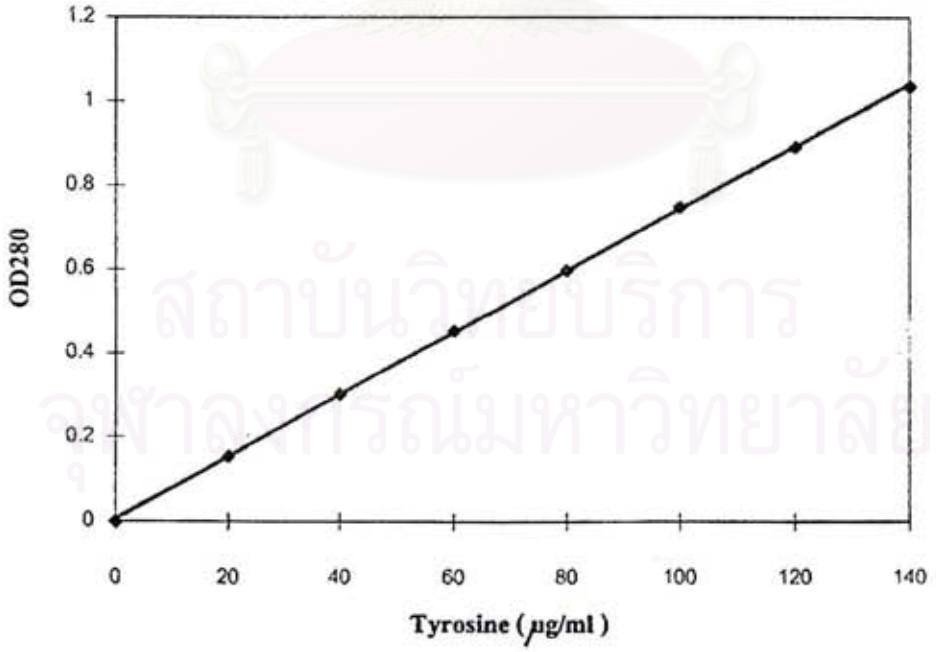


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Carbonate-bicarbonate buffer pH 9. 5

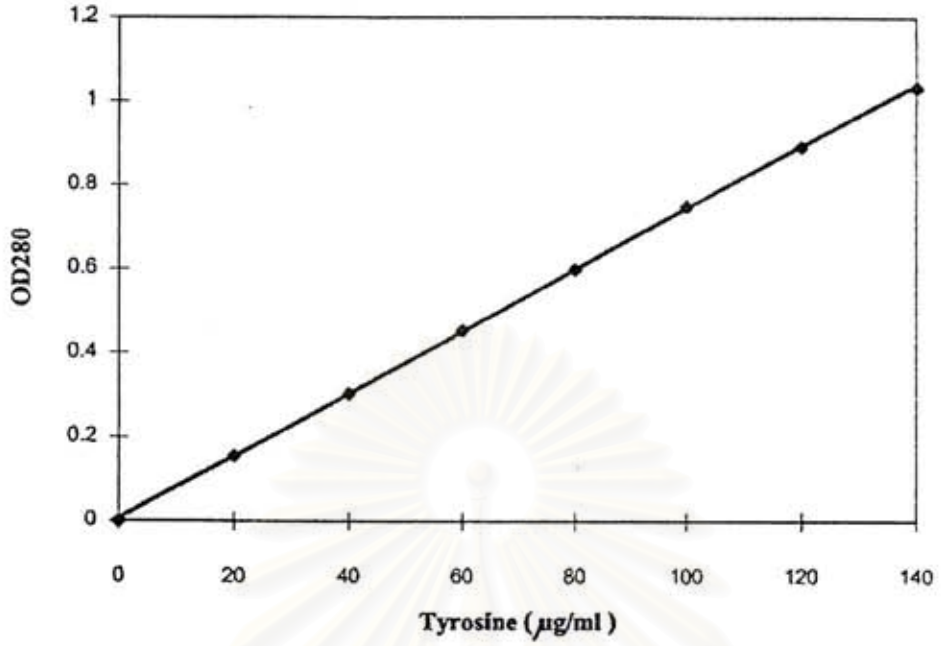


Carbonate-bicarbonate buffer pH 10.0

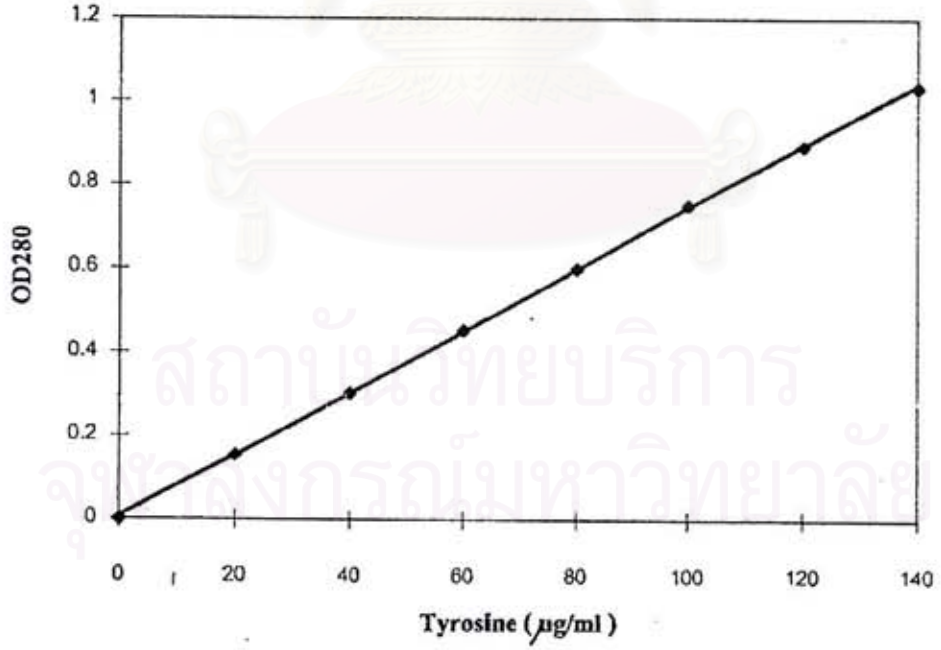


สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Carbonate-bicarbonate buffer pH 10.5

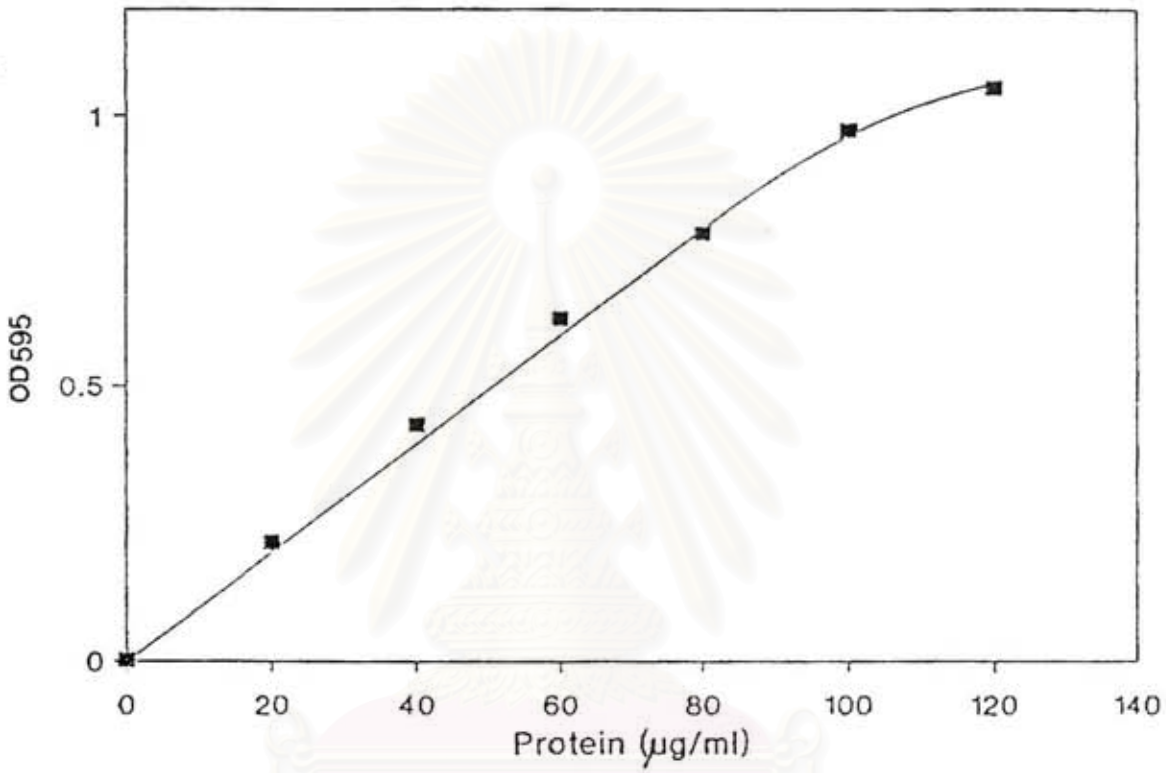


Carbonate buffer pH 11.0



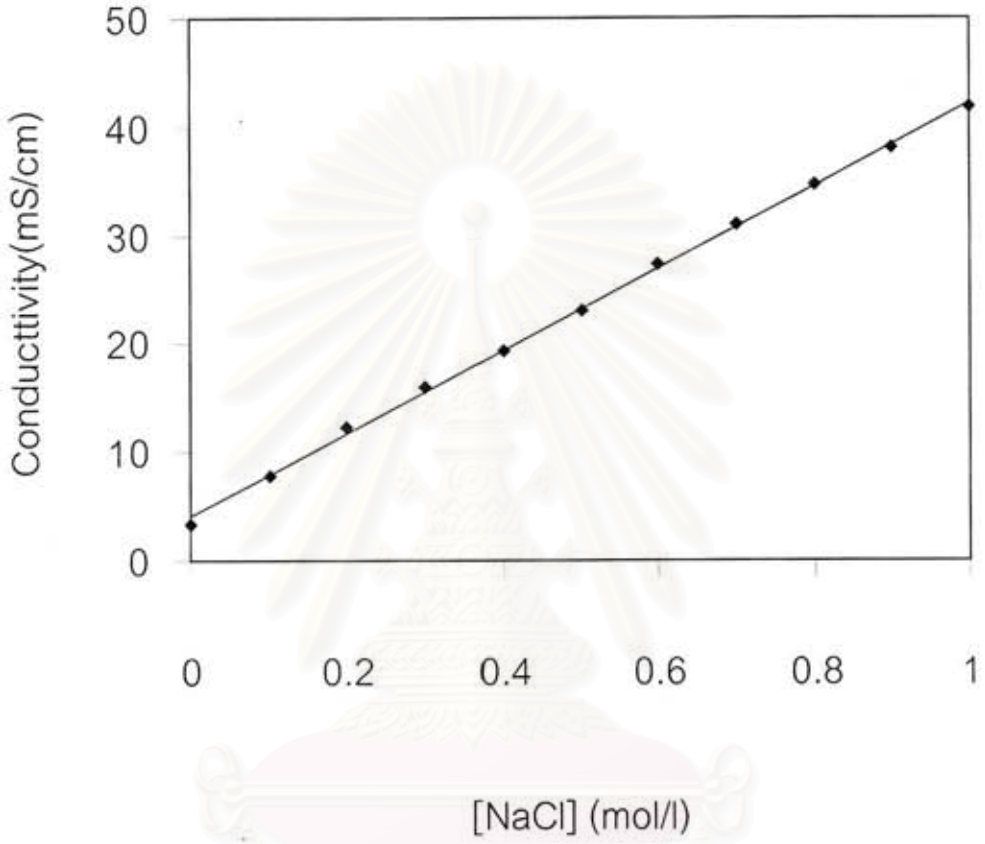
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 2 กราฟมาตราฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยแบรดฟอร์ด แปรผันความเข้มข้นของ Bovine Serum Albumin (BSA) 0-120 ไมโครกรัม วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานแสดงการนำไฟฟ้าของสารละลายที่มีเกลือเข้มข้น 0- 1.0 โมล่าร์



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย