บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ และการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 ในขวดเขย่า

3.1.1 ผลกระทบของแหล่งต้นตอคาร์บอน(Carbon source) ต่อการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri*

3.1.1.1 กลูโคส(Glucose)

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Proteus rettgeri* SPS-6 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 0.2 - 0.8 % เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน เขย่าที่ความเร็ว 150-200 รอบ ต่อ นาที ในอ่างควบคุมอุณหมิที่ 28° ซ. ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.1 พบว่า *Proteus rettgeri* SPS-6 จะให้ค่าการเจริญสูงสุดที่ใกล้เคียงกัน เมื่อใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.4 % ขึ้นไป และมีค่าสูงเป็น 2 เท่าของที่เลี้ยงที่ความเข้มข้น 0.2 % ในขณะที่ การเสริมด้วยกลูโคสที่ความเข้มข้นสูงกว่า 0.4 % เซลล์โปรเตียสจะให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ต่อปริมาณโปรตีนรวมทั้งหมดของเซลล์ต่ำลง (โดยใช้กรดฟีนิล-อะซิทิล-4-อะมิโนเบนโซอิก เป็นซับสเตรท ตามวิธีในข้อ 2.7)

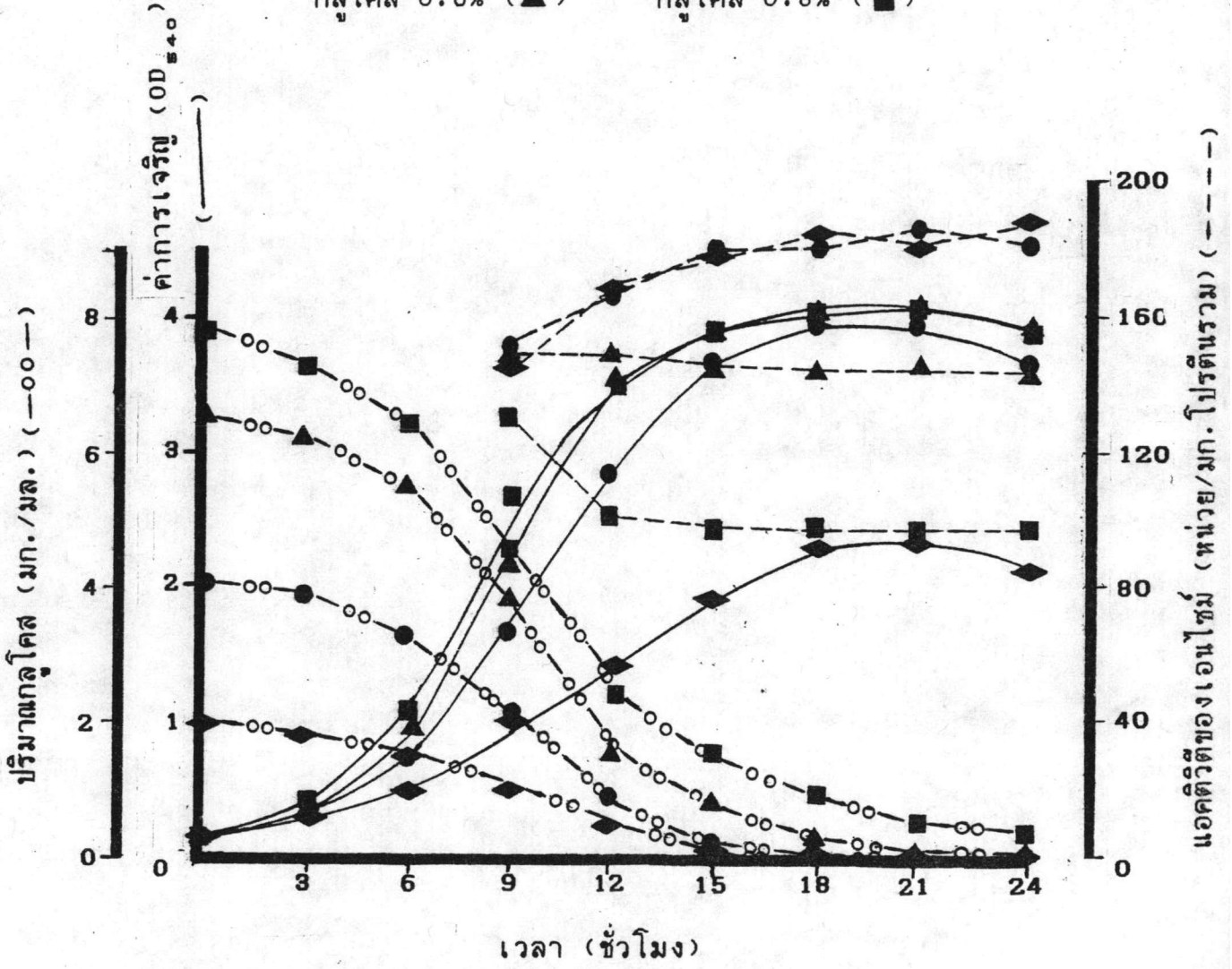
3.1.1.2 สารละลายแป้งไฮโดรไลซ์(Hydrolysate of starch)

เจริญเชื้อ *Proteus rettgeri* SPS-6 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่ใช้สารละลายแป้งไฮโดรไลซ์ เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนเดี่ยวแทนกลูโคสในสภาวะเดียวกันกับที่ใช้ในข้อ 3.1.1.1 และผันแปรปริมาณสารละลายแป้งไฮโดรไลซ์ที่ใช้ ความเข้มข้นระหว่าง 0.5 - 2.0 % ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.2 พบว่าเมื่อใช้สารละลายแป้งไฮโดรไลซ์ที่ความเข้มข้น 0.5 % โปรเตียสจะให้ค่าการเจริญ (OD_{540}) ต่ำที่สุด ประมาณครึ่งหนึ่งของการเจริญที่ความเข้มข้น 1.0 - 2.0 % แต่เมื่อมาพิจารณาถึงแอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส จะเห็นว่าเซลล์โปรเตียสจะให้ค่าแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์ค่อย ๆ ต่ำลง จาก 180, 160, 120 และ 100 หน่วย ต่อ มิลลิกรัมโปรตีนรวมของเซลล์เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายแป้งไฮโดรไลซ์ขึ้น ตั้งแต่ 0.5 ถึง 2.0 % ตามลำดับ

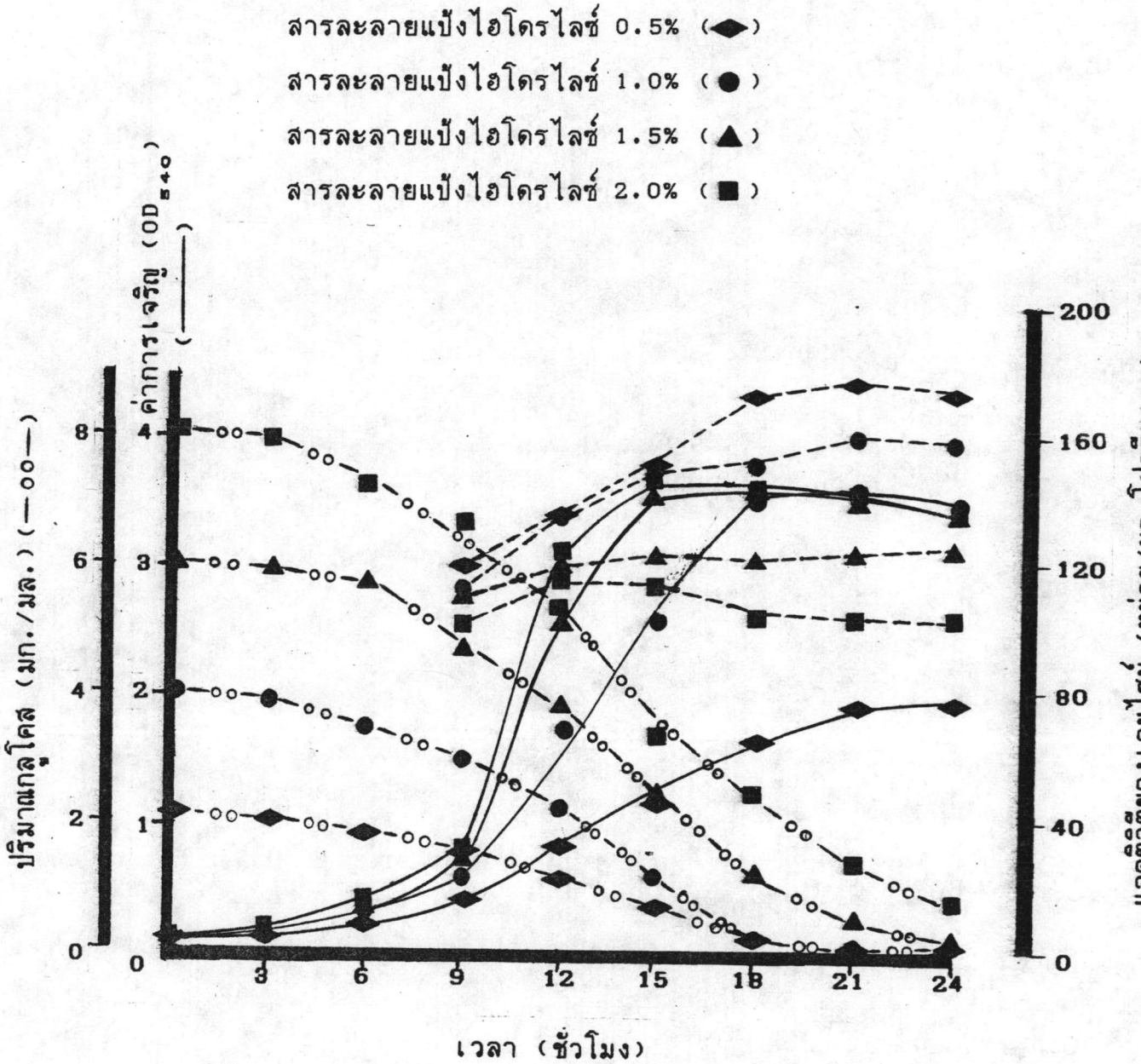
รูปที่ 3.1 แสดงรูปแบบการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 และปริมาณกลูโคสในอาหาร เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคสความเข้มข้นตั้งแต่ 0.2% ถึง 0.8% ที่อุณหภูมิ 28° ซ. เขย่าที่ความเร็ว 150-200 รอบ ต่อ นาที

กลูโคส 0.2% (◆) กลูโคส 0.4% (●)

กลูโคส 0.6% (▲) กลูโคส 0.8% (■)



รูปที่ 3.2 แสดงรูปแบบการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 และปริมาณกลูโคสในอาหาร เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยสารละลายแป้งไฮโดรไลซ์ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5% ถึง 2.0% ที่อุณหภูมิ 28° ซ. เขย่าที่ความเร็ว 150-200 รอบ ต่อ นาที



3.1.1.3 แบะแซ(Glucodextrin)

เมื่อใช้แบะแซในอาหารสูตรปรับต่ำเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนเดี่ยว สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Proteus rettgeri* SPS-6 ในสภาวะเดียวกับที่ใช้ในข้อ 3.1.1.1 และแปรผันความเข้มข้นของแบะแซในช่วงตั้งแต่ 6.5 - 26 % ติดตามการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.3 พบว่า เมื่อใช้แบะแซที่ความเข้มข้น 6.5 % และ 13 % โปรเตียสจะให้แอคติวิตีของเอนไซม์ ต่อ ปริมาณโปรตีนรวมของเซลล์สูงที่สุดและมีค่าใกล้เคียงกันมาก เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแบะแซให้สูงขึ้น ความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของ *Proteus rettgeri* SPS-6 จะต่ำลง แต่จะให้ค่าการเจริญ(OD_{540}) สูงสุดสูงขึ้น

3.1.1.4 กากน้ำตาล(Molasses)

เมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนเดี่ยว โดยใช้กากน้ำตาลความเข้มข้น 10 % ในอาหารสูตรปรับต่ำ เปรียบเทียบกับอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.4 % เลี้ยงในสภาวะเดียวกับที่ใช้ในข้อ 3.1.1.1 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.4 พบว่า *Proteus rettgeri* ไม่สามารถจะเจริญ และผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสได้ ในสูตรอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนเดี่ยวได้ ในขณะที่ สามารถเจริญ และผลิตเอนไซม์ได้อย่างปกติในสูตรอาหารที่ใช้กลูโคส 0.4 % เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน

3.1.2 ผลกระทบของแหล่งต้นตอไนโตรเจน(Nitrogen source) ต่อการเจริญและการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri*

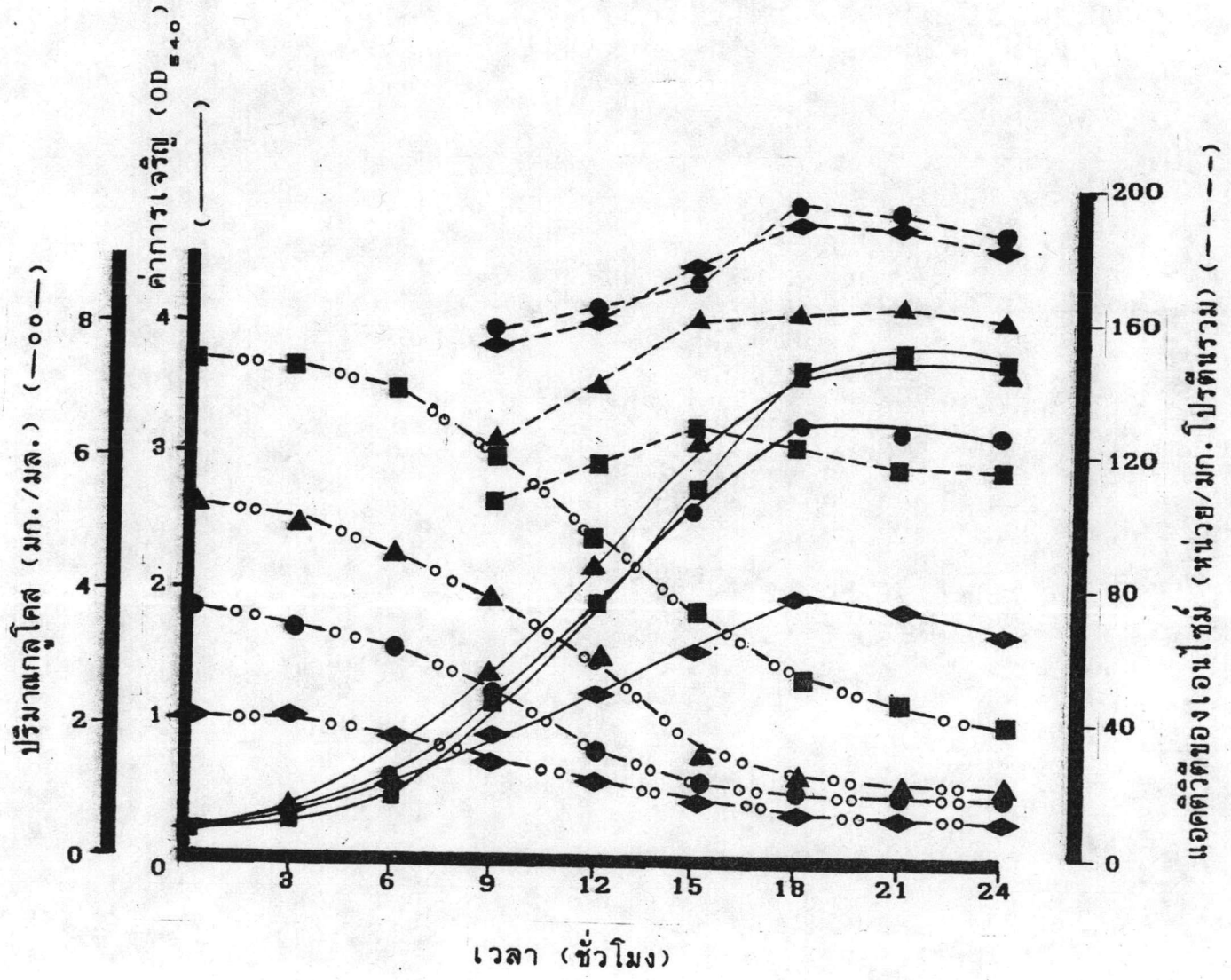
3.1.2.1 แอมโมเนียมซัลเฟต(Ammoniumsulfate)

เมื่อเจริญ *Proteus rettgeri* SPS-6 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.4 % เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28° ซ. โดยแปรผันความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ใช้ตั้งแต่ 0.05 - 0.15 % ติดตามการเจริญและการผลิตเอนไซม์ได้ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.5 พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตให้สูงขึ้นค่าการเจริญ(OD_{540}) สูงสุดก็จะสูงขึ้น และช่วง

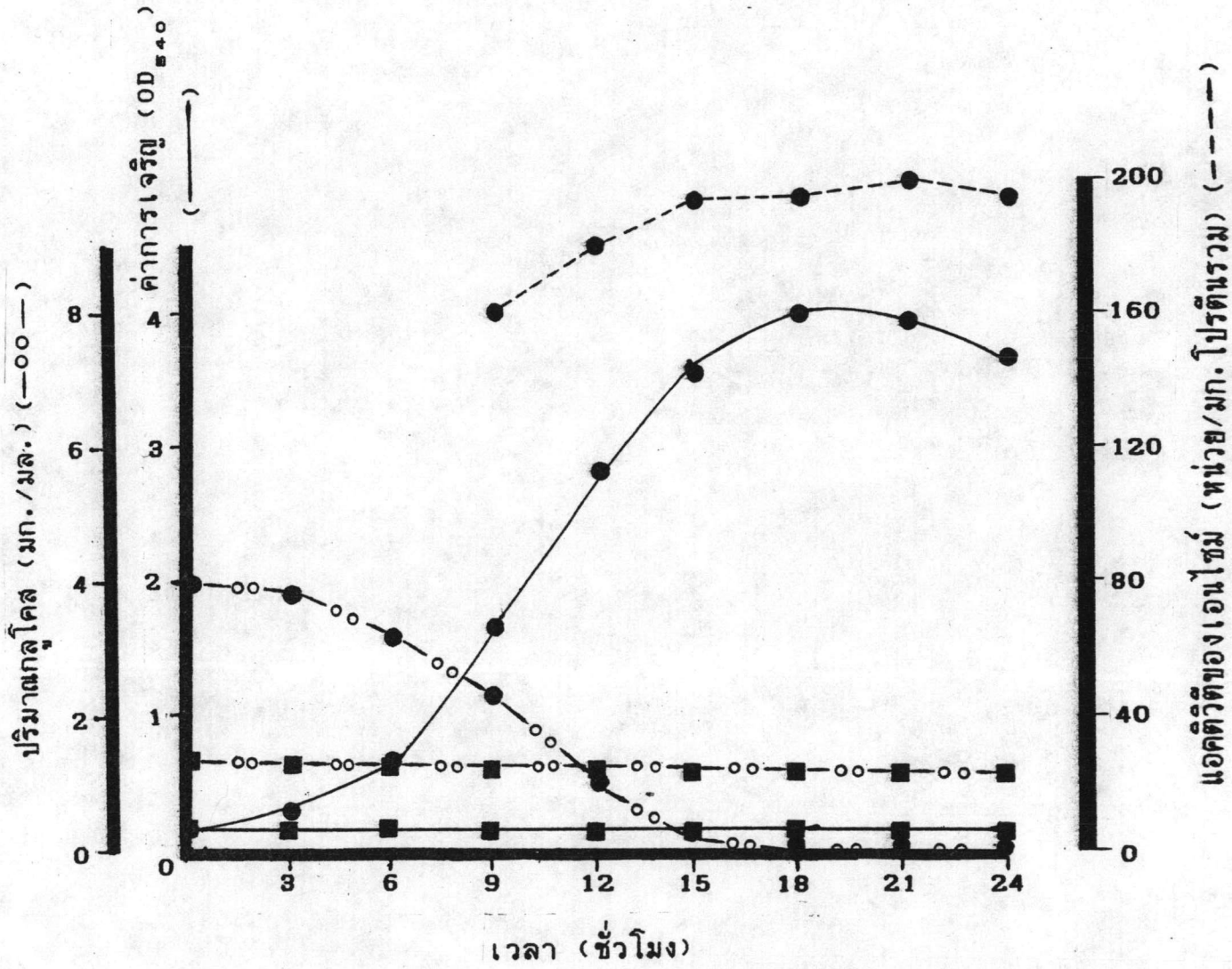
รูปที่ 3.3 แสดงรูปแบบการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 และปริมาณกลูโคสในอาหาร เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยแบะแซ(กลูโคเดกตริน)ความเข้มข้นตั้งแต่ 6.5% ถึง 26% ที่อุณหภูมิ 28° ซ. เขย่าที่ความเร็ว 150-200 รอบต่อ นาที

แบะแซ 6.5% (◆) แบะแซ 13.0% (●)

แบะแซ 19.5% (▲) แบะแซ 26.0% (■)



รูปที่ 3.4 แสดงรูปแบบการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกากน้ำตาล 10% (■), กลูโคส 0.4% (●) เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 28° ซ. เขย่าที่ความเร็ว 150-200 รอบต่อนาที



I19381517

เวลาที่ใช้เพื่อการเจริญสูงสุดก็จะยาวขึ้นด้วย ในขณะที่ ความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสของโปรเตียสจะอยู่ในระดับสูงใกล้เคียงกัน เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น ตั้งแต่ 0.075 % ขึ้นไป

3.1.2.2 ยูเรีย(Urea)

เมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนแทนแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วแปรผันความเข้มข้นของยูเรีย ตั้งแต่ 0.0225 % ถึง 0.067 % ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.6 พบว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของยูเรียสูงขึ้นก็จะให้ค่าการเจริญสูงสุด ของ *Proteus rettgeri* สูงขึ้นไปด้วย โดยจะเริ่มให้ค่าการเจริญสูงสุดเมื่อใช้ยูเรียความเข้มข้น ประมาณ 0.045 % ขึ้นไป แต่ช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญสูงสุดจะนานขึ้นเล็กน้อย และเซลล์โปรเตียสจะสามารถสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสได้สูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของยูเรียสูงขึ้นด้วย โดยที่โปรเตียสจะให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสได้สูงใกล้เคียงกัน เมื่อใช้ความเข้มข้นยูเรียมากกว่า 0.0338 % เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน

3.1.2.3 สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง (Hydrolysate of soybean meal)

เมื่อนำสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง มาใช้เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต และใช้เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนเดี่ยว ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.7 พบว่า *Proteus rettgeri* ที่เจริญในอาหารที่มีสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง เป็นองค์ประกอบจะใช้ระยะเวลาในการเจริญเข้าสู่ช่วงการเจริญสูงสุดได้ เร็วกว่าแบคทีเรียที่เจริญในอาหารที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตอย่างเดียว ประมาณ 6 ชั่วโมง และค่าการเจริญสูงสุดจะเพิ่มขึ้นตาม ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง) ที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่ ความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส กลับลดลงอย่างมาก โดยเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง จาก 5.8 % เป็น 11.6 % แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ที่ตรวจวัดได้จะมีค่าลดลงถึง 80 % และ *Proteus rettgeri* ที่เจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่ใช้ สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง

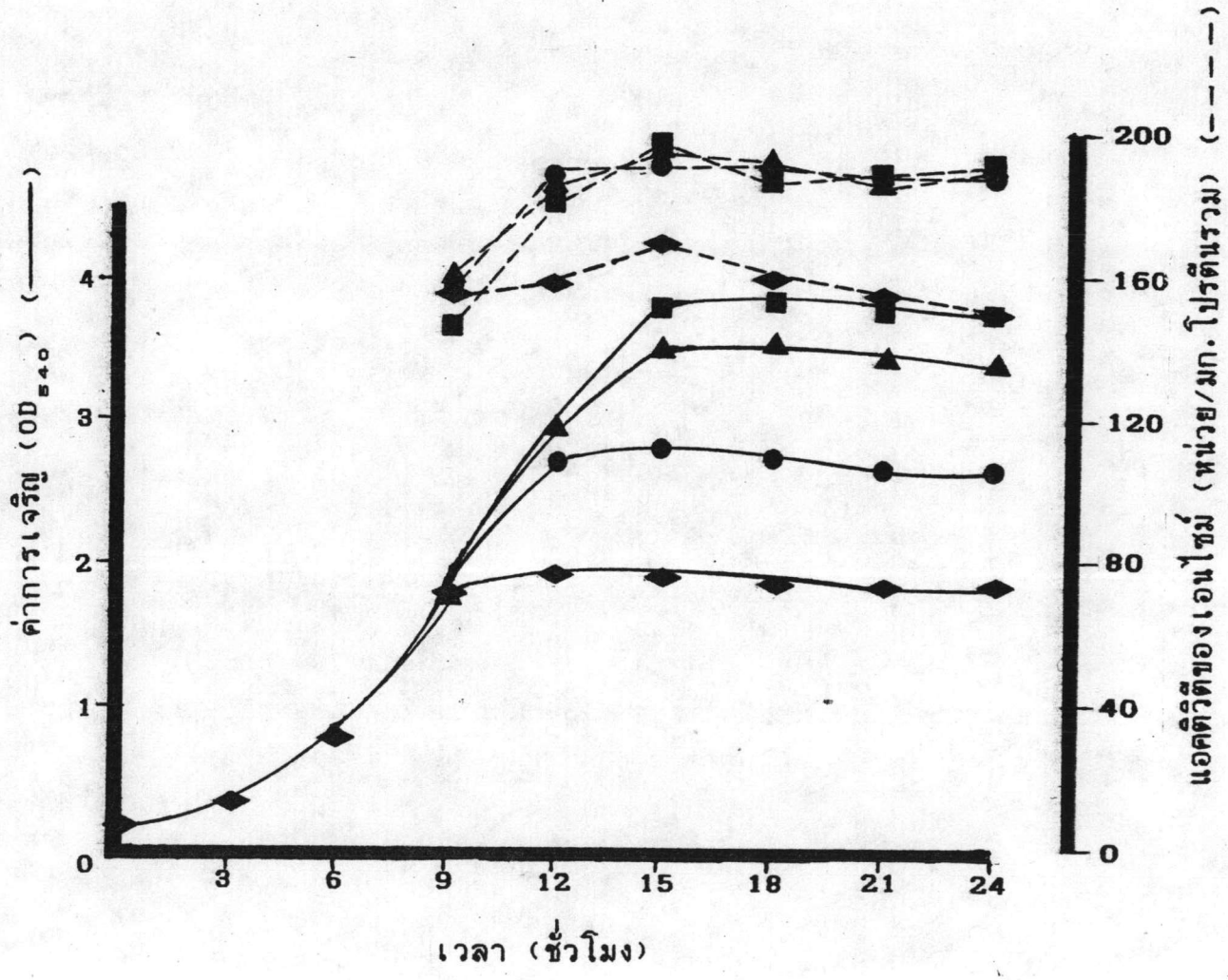
รูปที่ 3.5 แสดงรูปแบบการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.4% เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05% ถึง 0.15% เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 28° ซ. เขย่าที่ความเร็ว 150-200 รอบ ต่อ นาที

แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% (◆)

แอมโมเนียมซัลเฟต 0.075% (●)

แอมโมเนียมซัลเฟต 0.10% (▲)

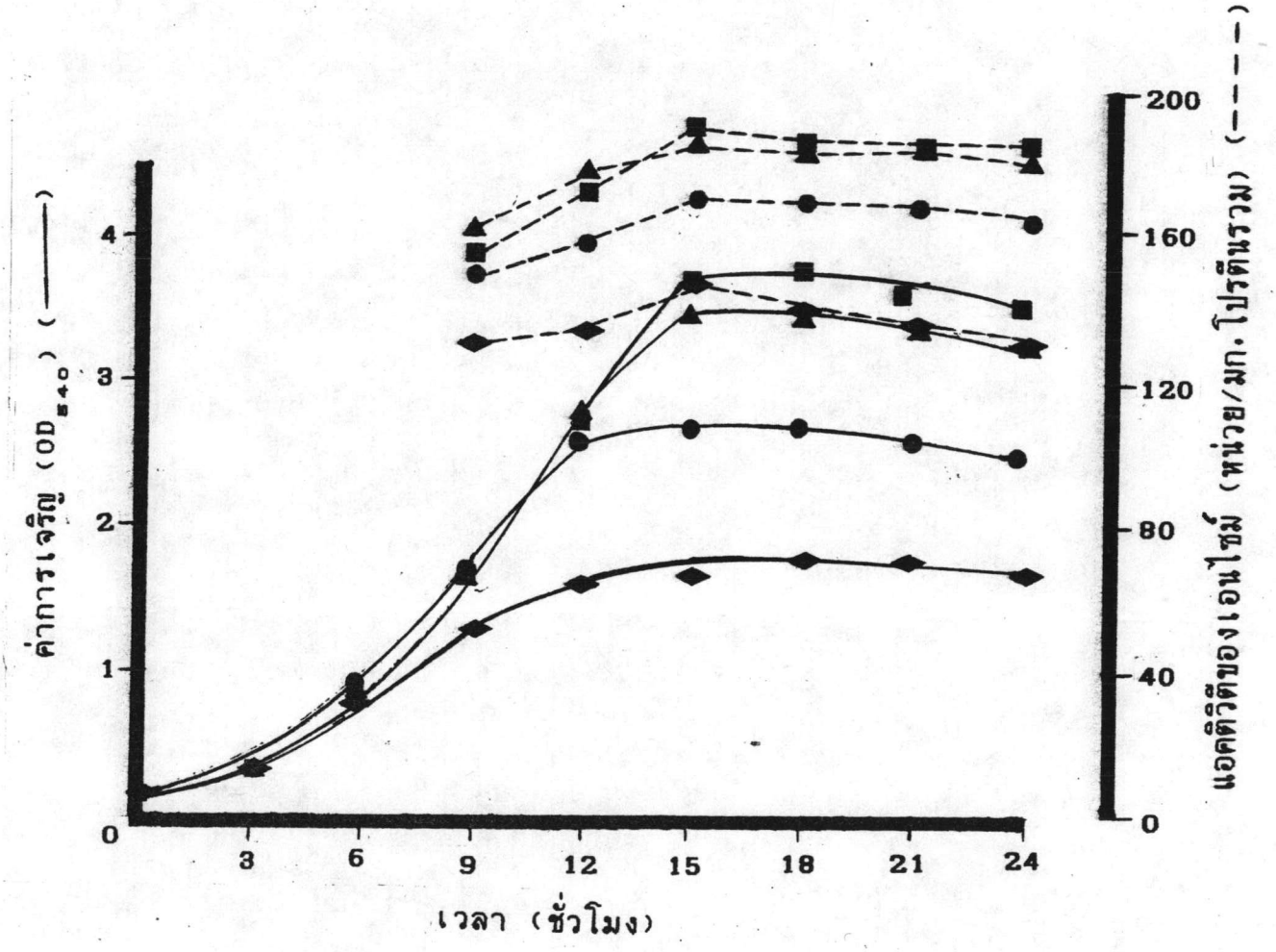
แอมโมเนียมซัลเฟต 0.15% (■)



รูปที่ 3.6 แสดงรูปแบบการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.4% เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน และใช้ยูเรียความเข้มข้นตั้งแต่ 0.0225% ถึง 0.067% เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 28° ซ. เขย่าที่ความเร็ว 150-200 รอบต่อนาที

ยูเรีย 0.0225% (◆) ยูเรีย 0.0338% (●)

ยูเรีย 0.045% (▲) ยูเรีย 0.067 (■)



รูปที่ 3.7 แสดงรูปแบบการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส0.4% เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน และใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนเดี่ยว และเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต ที่อุณหภูมิ 28° ซ. เขย่าที่ความเร็ว 150-200 รอบ ต่อ นาที

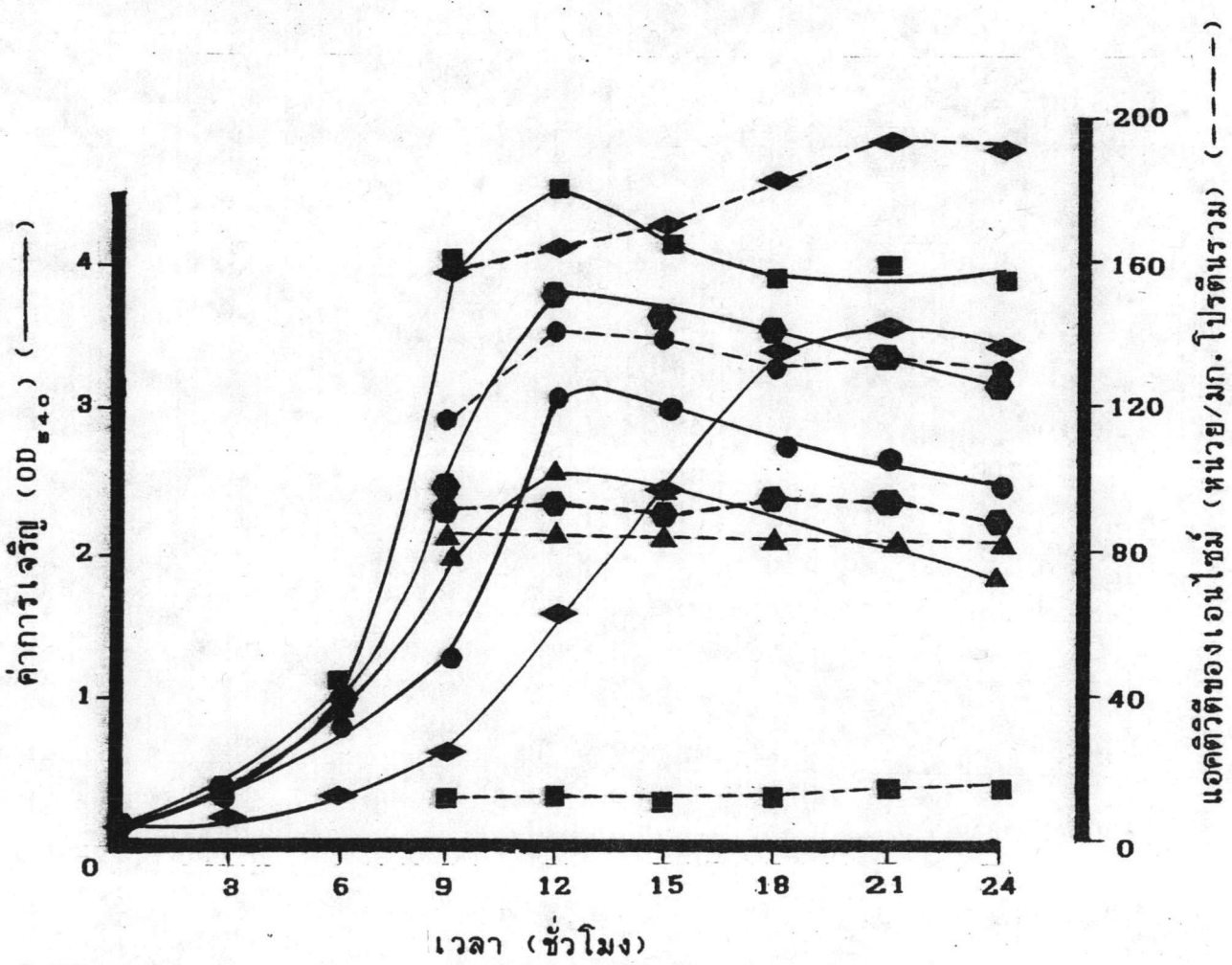
แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% ร่วมกับ สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง 2.9% (●)

แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% ร่วมกับ สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง 5.8% (●)

สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง 5.8% (▲)

สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง 11.6% (■)

แอมโมเนียมซัลเฟต 0.10% (◆)



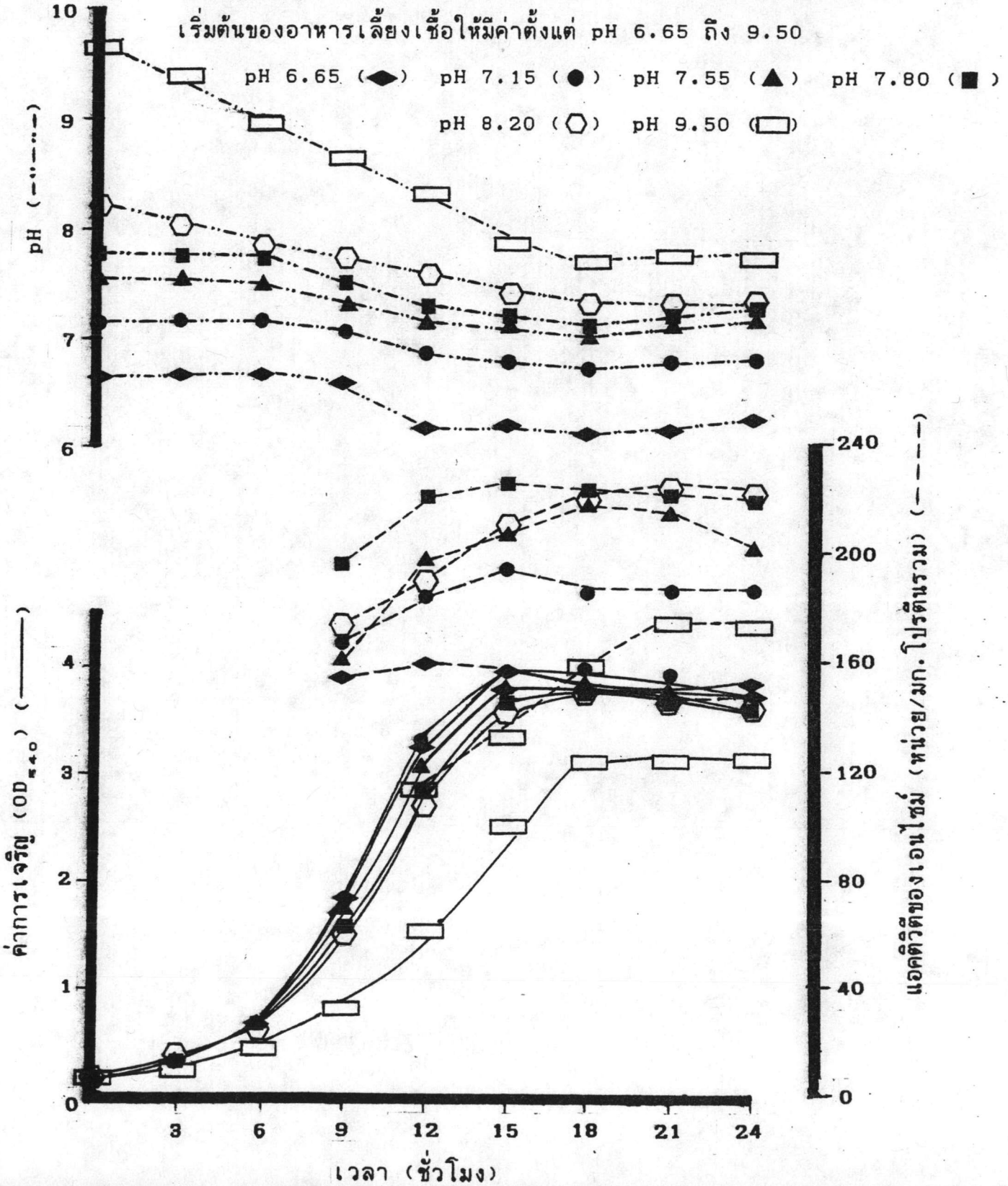
5.8 % ร่วมกับ แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนนั้น จะให้ค่าการเจริญ (OD_{540}) ที่สูงกว่า ในการทดลองที่ใช้สารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง 2.8 % ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต และในตัวอย่างที่เจริญในสารละลายย่อยด้วยกรด-กำมะถันของกากถั่วเหลืองเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนเดี่ยวที่ความเข้มข้น 5.8 % ด้วย ในขณะที่ ความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ต่อปริมาณโปรตีนรวมทั้งหมดของ *Proteus rettgeri* ที่เจริญในอาหารที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับสารละลายย่อยด้วยกรดกำมะถันของกากถั่วเหลือง 5.8 %จะอยู่ในระดับต่ำกว่า เซลล์โปรเตียสที่เจริญในอาหารที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1% เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนเดี่ยวถึงประมาณ 50 %

3.1.3 ผลกระทบของปัจจัยทางกายภาพที่มีต่อการเจริญ และการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri*

3.1.3.1 ความเป็นกรดด่าง(pH)

เมื่อเจริญ *Proteus rettgeri* SPS-6 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่ใช้กลูโคส 0.4% เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนและใช้ 0.1% แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน เลี้ยงที่อุณหภูมิ 28° ซ. โดยทำการแปรเปลี่ยนค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 6.6 - 9.5 ติดตามการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ตามวิธีในข้อ 2.3.3 และ 2.7 ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.8 พบว่า *Proteus rettgeri* SPS-6 สามารถเจริญได้ดีในช่วง pH 6.6 - 8.2 โดยให้ค่าการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกันมาก แต่เมื่อเพิ่มค่าความเป็นกรดด่างในอาหารเลี้ยงเชื้อให้สูงขึ้น เป็น pH 9.5 แบคทีเรียจะมีการเจริญได้ต่ำลง เมื่อมาพิจารณาถึงความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส พบว่า โปรเตียสที่เลี้ยงในอาหารที่มีสภาพค่อนข้างเป็นด่างจะให้แอคติวิตีของเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสได้ดี คือตั้งแต่ที่ pH 7.1, 7.5, 7.8 แอคติวิตีของเอนไซม์ที่ตรวจวัดได้นั้นจะสูงขึ้นเป็นลำดับ จาก 185, 210 และ 220 หน่วย ต่อ มิลลิกรัมโปรตีนรวมของเซลล์ แต่เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพเป็นด่างสูงขึ้น ถึง pH 8.2 จะเริ่มเห็นว่าระยะเวลาในการผลิตเอนไซม์สูงสุดจะช้าลง แต่ยังให้ค่าแอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์อยู่ในระดับสูง แต่เมื่อสภาพความเป็นด่างสูงขึ้นไปจนถึง pH 9.5 จะทำให้ความสามารถในการผลิตเอนไซม์ต่ำลงอย่างเห็นได้ชัด

รูปที่ 3.8 แสดงรูปแบบการเจริญ, การผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส และการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการเจริญของ *Proteus rettgeri* SPS-6 เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.4% เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.10% เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 28° ซ. เขย่าที่ความเร็ว 150-200 รอบ ต่อ นาที โดยปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่าตั้งแต่ pH 6.65 ถึง 9.50



ส่วนรูปแบบการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า มีลักษณะของการเปลี่ยนแปลงที่คล้ายคลึงกันมาก คือ ในช่วงแรกของการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อค่อยๆ มีสภาพเป็นกรดเพิ่มขึ้น (ทำให้ pH ค่อยๆ ลดลง) เว้นแต่ ในสูตรอาหารที่ถูกปรับให้มี pH เริ่มต้นสูงขึ้นถึง 9.5 นั้น ค่า pH ลดลงอย่างรวดเร็ว จนเมื่อการเจริญเติบโตของโปรเตียสเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตเต็มที่ (stationary phase) ค่าความเป็นกรดด่างจะเริ่มคงที่ตลอดระยะเวลาของการเจริญสูงสุด เป็นที่น่าสังเกตุว่าช่วง pH ที่มีการสังเคราะห์เอนไซม์สูงสุดจะมี pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อคงที่ระหว่าง pH 7.5 - 8.0

3.1.3.2 อุณหภูมิ(Temperature)

เมื่อทำการเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *Proteus rettgeri* SPS-6 นี้ ในช่วงอุณหภูมิ 25° - 40° ซ. ในอาหารที่ไม่มีการปรับ pH ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.9 พบว่า เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อให้สูงขึ้น แบคทีเรียจะมีการเจริญเข้าสู่ช่วงการเจริญสูงสุด (Stationary phase) ได้เร็วขึ้นด้วย โดยจากการทดลองจะเห็นว่า การเจริญของโปรเตียสที่อุณหภูมิ 25° ซ.จะเข้าสู่ช่วงการเจริญสูงสุดช้ากว่าที่ 28° ซ. ประมาณ 3 ชั่วโมง สำหรับพวกที่เจริญที่อุณหภูมิ 35° ซ. นั้นจะเจริญเติบโตได้เร็วที่สุด แต่การเจริญของแบคทีเรียที่ทั้ง 3 อุณหภูมิก็จะให้ค่าการเจริญ(OD_{540})สูงสุดใกล้เคียงกัน ในขณะที่ เมื่อลดอุณหภูมิของการเลี้ยงเชื้อจาก 28° ซ.ลงมาเป็น 25° ซ.นั้น เซลล์โปรเตียสจะให้แอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์ต่อ ปริมาณโปรตีนรวมของเซลล์ สูงขึ้นประมาณ 30 % แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 35° ความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสกลับต่ำลงกว่าที่ 28° ซ.ถึง 60 % และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการเลี้ยงให้สูงขึ้นถึง 40° ซ. เชื้อจะไม่สามารถเจริญเติบโตได้เลย

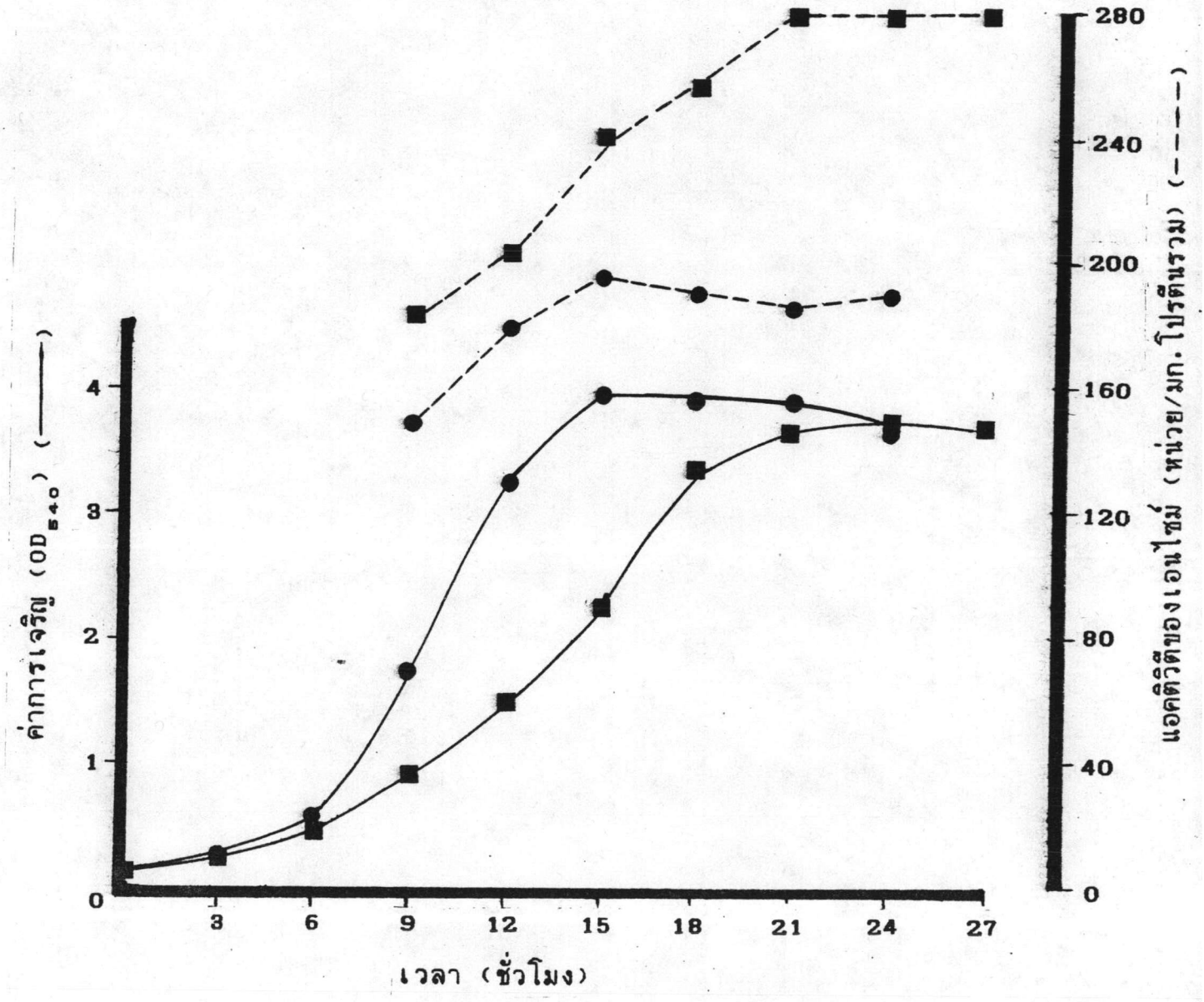
เมื่อทำการแปรเปลี่ยนอุณหภูมิควบคู่ไปพร้อม ๆกับ pH ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 3.10 พบว่า เมื่อเจริญ *Proteus rettgeri* SPS-6 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่ถูกปรับ pH เป็น 7.8 ที่อุณหภูมิ 25° ซ. จะทำให้แอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเกือบ 50 % แม้ว่าจะมีอัตราการเจริญ(ในช่วง log phase 0.3 หน่วย/ชม.) ช้ากว่า โปรเตียสที่เจริญที่อุณหภูมิ 28° ซ.ในอาหารสูตรปรับต่ำที่ไม่มีการปรับ pH (0.5 หน่วย/ชม.) เล็กน้อย แต่ก็สามารถให้ค่าการเจริญ(OD_{540})ที่ใกล้เคียงกัน

ค่าการเจริญ (OD_{540}) (——)
แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มก. โปรตีนรวม) (— — —)
เวลา (ชั่วโมง)
0
1
2
3
4
3
6
9
12
15
18
21
24
27
30
0
40
80
120
160
200
240
280

รูปที่ 3.10 แสดงรูปแบบการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วย กลูโคส 0.4% เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.10% เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน เขย่าที่ความเร็ว 150-200 รอบ ต่อ นาที

ที่อุณหภูมิ 28° ซ. pHเริ่มต้น 7.1 (●)

ที่อุณหภูมิ 25° ซ. pHเริ่มต้น 7.8 (■)



3.1.3.3 การเติมกรดอะมิโน

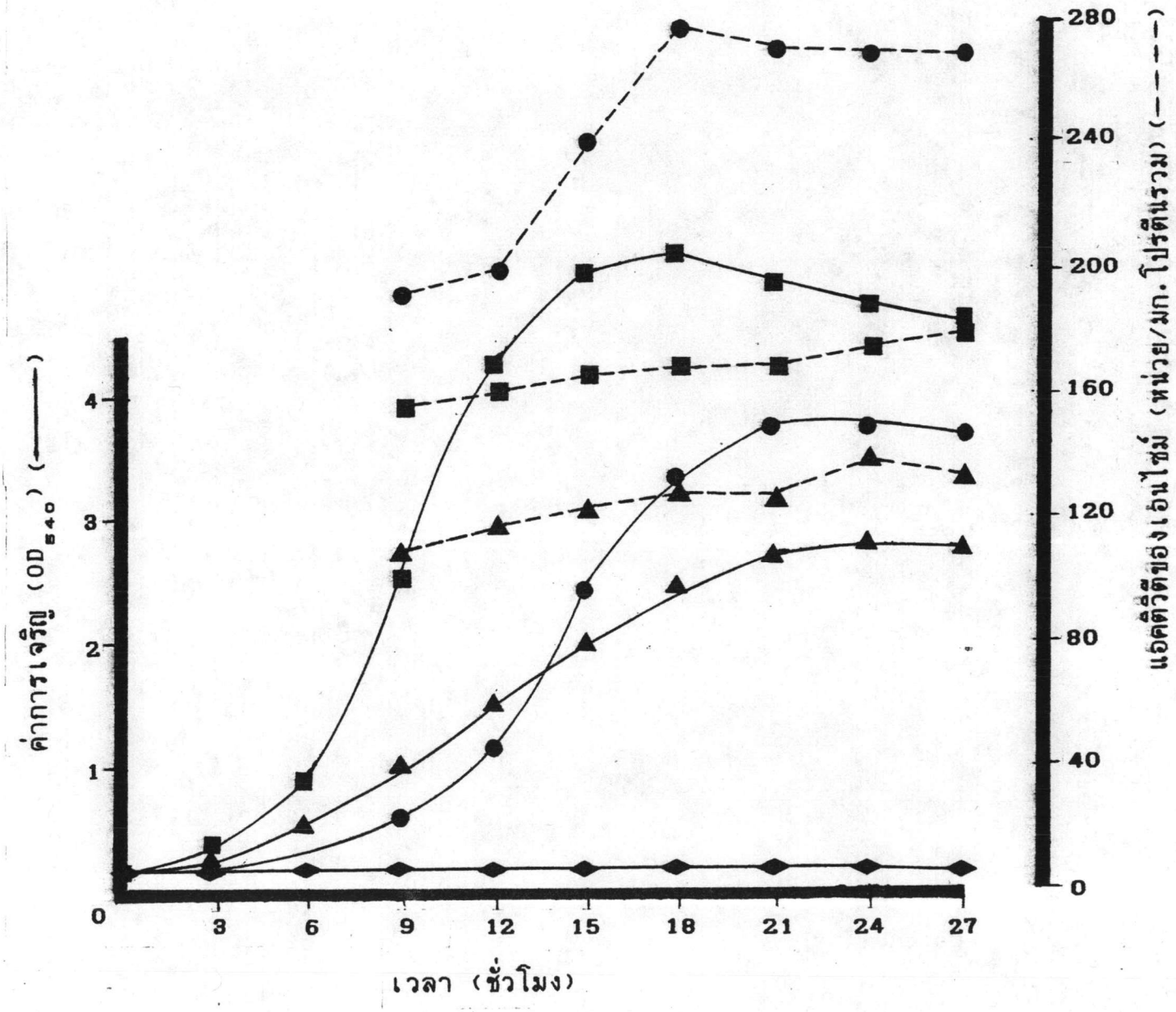
เมื่อเจริญ *Proteus rettgeri* SPS-6 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่ใช้ กลูโคส 0.4 % เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 % เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน เติม Valine Aspartic acid หรือ Cysteine ลงไป โดยใช้ pHเริ่มต้นที่ 7.8 และ ควบคุมอุณหภูมิที่ 25° ซ. แล้วติดตามการเจริญ และการผลิตเอนไซม์ เปรียบเทียบกับเมื่อไม่ได้เติมกรดอะมิโนใด ๆ ที่สภาวะเดียวกัน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.10 พบว่า Aspartic acid ช่วยให้ *Proteus rettgeri* SPS-6 เจริญได้ดีกว่าเมื่อเจริญใน 0.4 % กลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน ประมาณ 1.5 เท่า แต่กลับทำให้แอคติวิตีสูงสุดของเอนไซม์ต่ำลงถึง 40 % ในขณะที่ Valine ทำให้ทั้งการเจริญ และการสังเคราะห์เอนไซม์ต่ำลง ส่วน Cysteine ที่เติมลงไปทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญขึ้นมาได้เลย

3.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ และการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

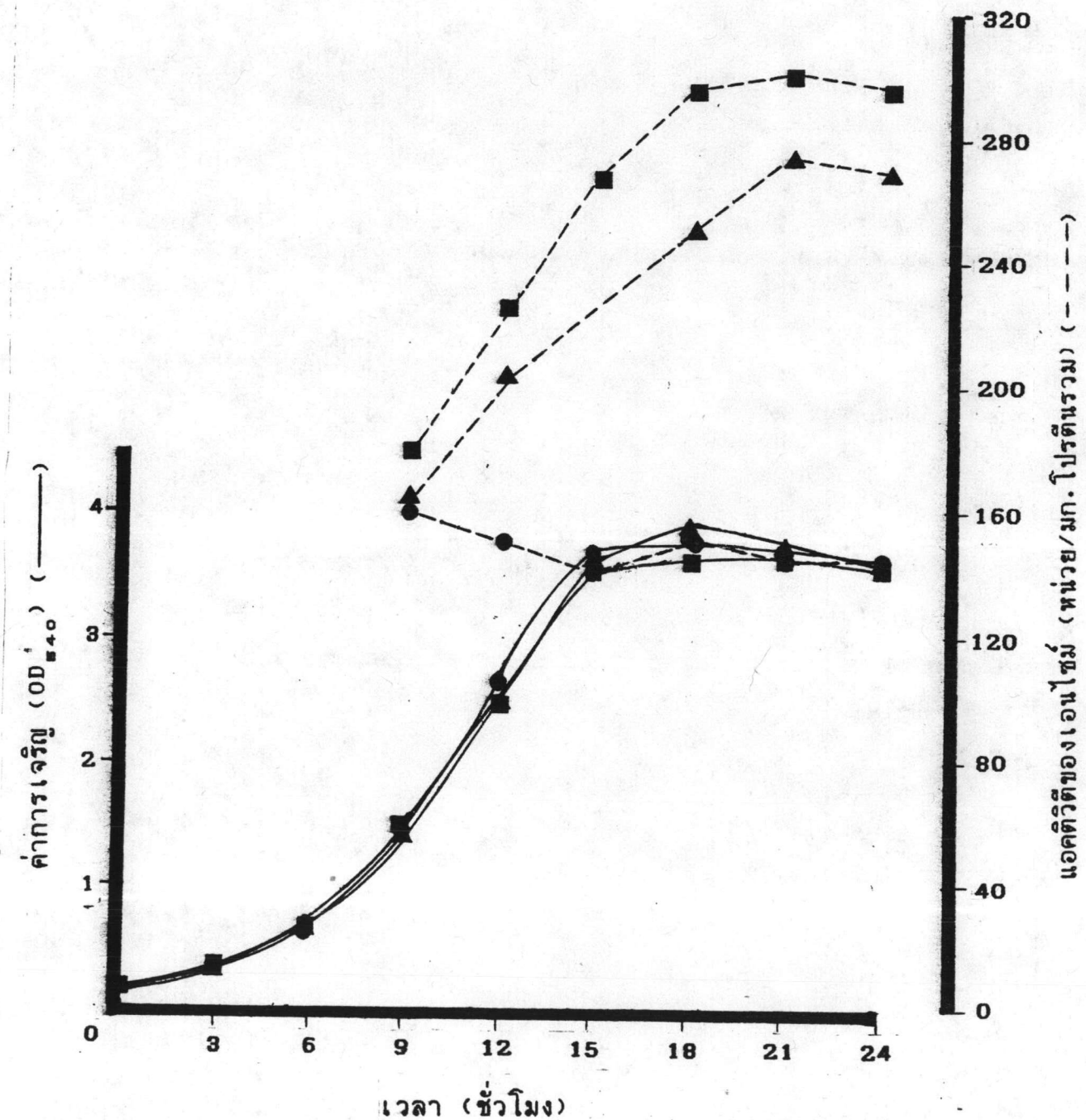
3.2.1 อัตราเร็วในการกวน(Agitation speed)

เมื่อเจริญ *Proteus rettgeri* SPS-6 ในอาหารสูตรปรับต่ำที่มี 0.4 % กลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน และ 0.1 % แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน ปรับ pHเริ่มต้นเป็น 7.80 และเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25°ซ. ตามสภาวะที่เหมาะสมในระดับขวดเขย่า แล้วให้อากาศที่อัตราการป้อนอากาศ 2 ปริมาตรอากาศต่อ ปริมาตรน้ำหมัก ต่อ นาที (vvm) และแปรเปลี่ยนอัตราเร็วในการกวนเป็น 300, 400 และ 500 รอบ ต่อ นาที ติดตามการเจริญ และการสังเคราะห์เอนไซม์ ตามวิธีที่กล่าวไว้ในข้อ 2.3.3 และ 2.7 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.12 พบว่า ที่อัตราเร็วในการกวนทั้ง 3 อัตรา ให้ค่าการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกันมาก แต่ที่อัตราเร็วในการกวนต่ำจะทำให้ความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ โปรเตียสเกิดขึ้นได้ดีกว่า เมื่อใช้อัตราเร็วในการกวนสูงๆ โดยจะเห็นได้จาก เมื่อเจริญโปรเตียสในถังหมักที่ใช้อัตราเร็วในการกวน 300 รอบ ต่อ นาที

รูปที่ 3.11 แสดงรูปแบบการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.4% เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.10% เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน ( ) แล้วเติมด้วย Valine 0.15% ( ), Aspartic acid 0.22% ( ), Cysteine 0.25% ( ) ที่อุณหภูมิ 25° ซ. pHเริ่มต้น 7.8 เขย่าที่ความเร็ว 150-200 รอบ ต่อ นาที



รูปที่ 3.12 แสดงรูปแบบการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.4% เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.10% เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 25° ซ. pHเริ่มต้น 7.8 อัตราการป้อนอากาศ 2 ปริมาตรอากาศ ต่อ ปริมาตรน้ำหมัก ต่อ นาที และให้อัตราเร็วในการกวนเป็น 300 (■), 400 (▲), 500 (●) รอบ ต่อ นาที ในถังหมัก 5 ลิตร



จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงกว่าที่ใช้อัตราเร็ว 400 รอบ ต่อ นาที เล็กน้อย แต่จะมีความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์สูงกว่าในเซลล์ที่เจริญในถังหมักที่ใช้อัตราเร็ว 500 รอบ ต่อ นาที เกือบ 100 %

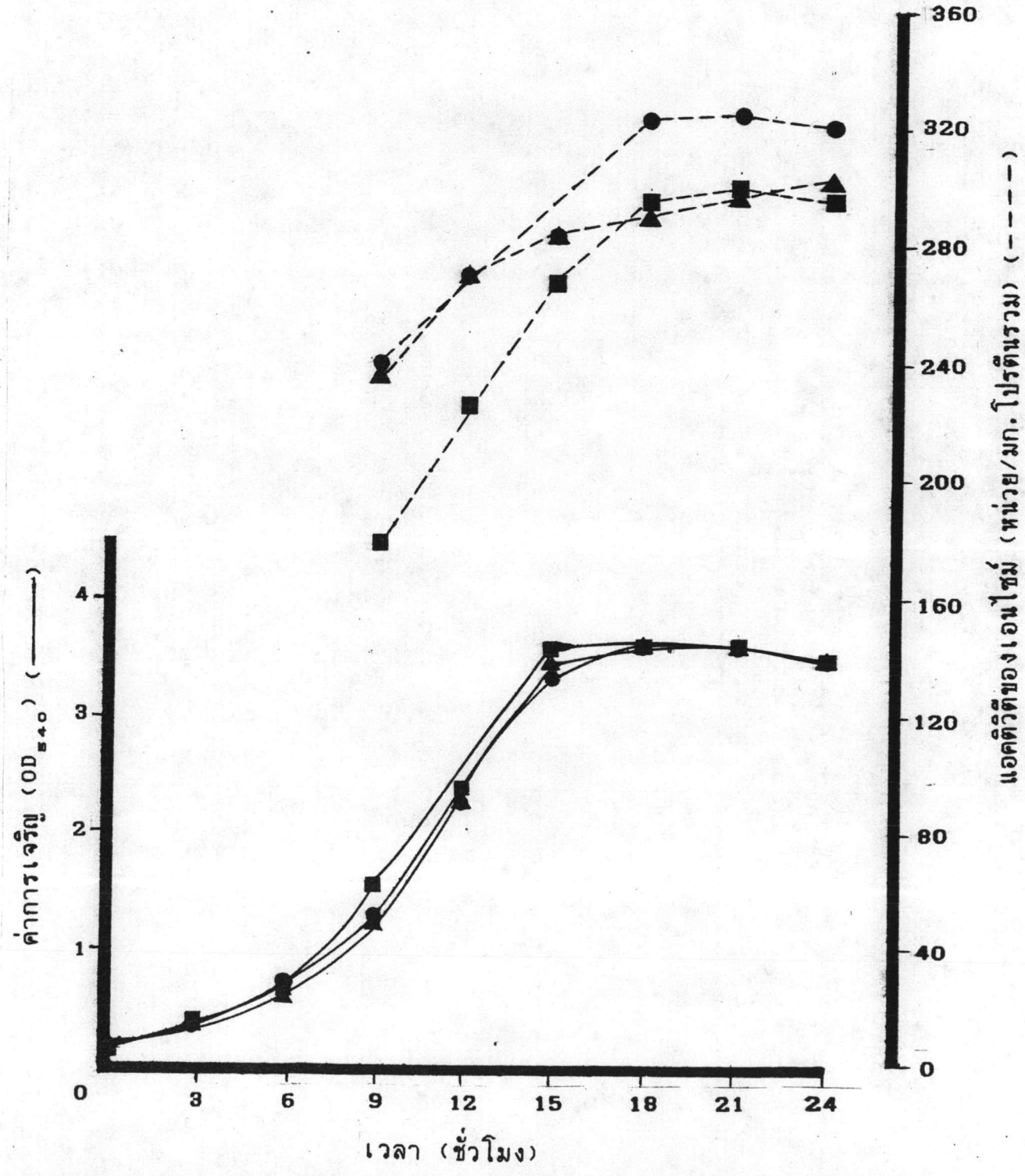
3.2.2 อัตราการป้อนอากาศ(Aeration rate)

เจริญ *Proteus rettgeri* SPS-6 ในสภาวะเดียวกับที่ใช้ในข้อ 3.2.1 โดยใช้อัตราเร็วในการกวน 300 รอบ ต่อ นาที แล้วแปรเปลี่ยนอัตราการป้อนอากาศ จาก 0.5-2 ปริมาตรอากาศ ต่อ ปริมาตรน้ำหมัก ต่อ นาที (vvm) ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 3.13 พบว่า การใช้อัตราการป้อนอากาศในช่วง 0.5-2.0 ปริมาตร อากาศ ต่อ ปริมาตรน้ำหมัก ต่อ นาที จะให้การเจริญเติบโตของเชื้อได้ไม่แตกต่างกัน แต่จะมีผลต่อความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของแบคทีเรีย โดยที่ แบคทีเรียซึ่งเจริญในน้ำหมักที่มีอัตราการป้อนอากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศ ต่อ ปริมาตรน้ำหมัก ต่อ นาที จะให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงที่สุด ซึ่งจะสูงกว่าที่อัตราการป้อนอากาศ 1.0 และ 2.0 ปริมาตรอากาศ ต่อ ปริมาตรน้ำหมัก ต่อ นาที เล็กน้อย

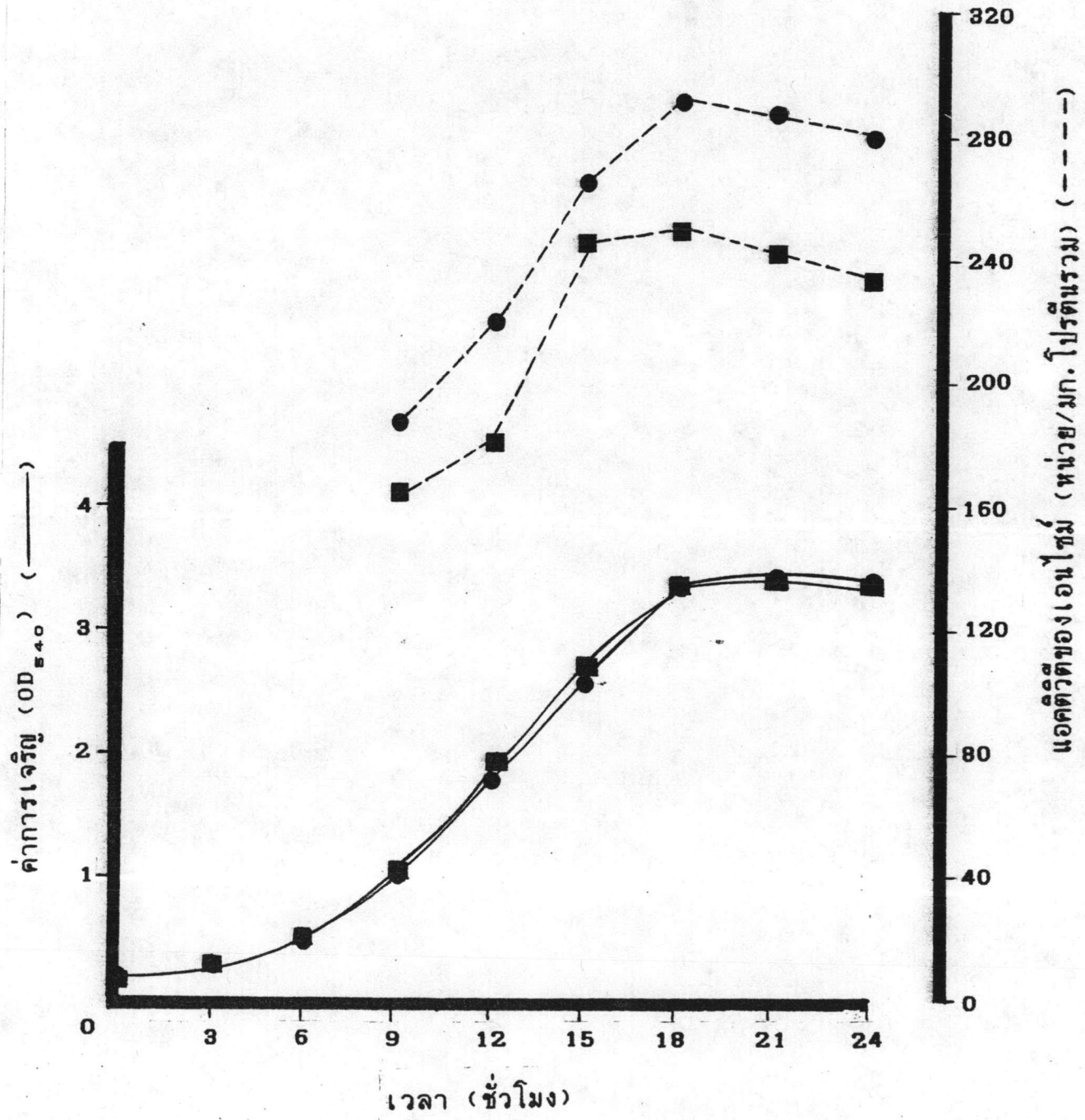
3.2.3 การควบคุมความเป็นกรด-ด่าง

ในระหว่างการเลี้ยง *Proteus rettgeri* SPS-6 ในสภาวะเดียวกับที่ใช้ในข้อ 3.2.1 โดยใช้อัตราเร็วในการกวน 300 รอบ ต่อ นาที และใช้อัตราการป้อนอากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศ ต่อ ปริมาตรน้ำหมัก ต่อ นาที แล้วควบคุมความเป็นกรด-ด่าง ให้คงที่ ที่ 2 ค่า คือ pH 7.1 และ pH 7.8 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.14 พบว่า การควบคุม pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้คงที่ตลอดการทดลองไม่ได้มีผลกระทบต่อ การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย คือ เชื้อยังสามารถเจริญเติบโตได้อย่างปกติ แต่เมื่อมาพิจารณาถึงความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของแบคทีเรียในถังหมักที่มีการควบคุม pH นั้น จะเห็นว่า การควบคุม pH ไว้ที่ pH 7.8 เชื้อให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงกว่าที่ pH 7.1 เล็กน้อย

รูปที่ 3.13 แสดงรูปแบบการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.4% เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.10% เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 25° ซ. pHเริ่มต้น 7.8 อัตราเร็วในการกวน 300 รอบ ต่อ นาที และให้อัตราการป้อนอากาศเป็น 0.5 (●), 1.5 (▲), 2.0 (■) ปริมาตรอากาศ ต่อ ปริมาตรน้ำหมัก ต่อ นาที ในถังหมัก 5 ลิตร



รูปที่ 3.14 แสดงรูปแบบการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลส ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 เมื่อเจริญในอาหารสูตรปรับต่ำที่เสริมด้วยกลูโคส 0.4% เป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.10% เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 25° ซ. อัตราเร็วในการกวน 300 รอบ ต่อ นาที และให้อัตราการป้อนอากาศเป็น 0.5 ปริมาตรอากาศ ต่อ ปริมาตรน้ำหมัก ต่อ นาที แล้วควบคุมความเป็นกรด-ด่างไว้ที่ pH 7.1 (■) และ pH 7.8 (●) ในถังหมัก 5 ลิตร



3.2.4 <u>การเติมกลูโคสอย่างต่อเนื่อง</u>

เจริญเชื้อ *Proteus rettgeri* SPS-6 ที่สภาวะเดียวกับที่ใช้ในข้อ 3.2.3 โดยไม่มีการควบคุม pH แต่มีการเติมกลูโคสลงไปเป็นช่วงๆ โดยใช้กลูโคส 40% เติมลงไป หลังชั่วโมงที่ 9 เป็นปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ อีกทุกๆ 3 ชั่วโมง ครั้งละ 5 มิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.15 พบว่า การเติมกลูโคสอย่างต่อเนื่อง ไม่สามารถช่วยเพิ่มค่าการเจริญสูงสุดของโปรเตียสได้ และความสามารถในการสังเคราะห์เอนไซม์ของ *Proteus rettgeri* SPS-6 นี้ค่อนข้างจะคงที่ภายหลังการเจริญเติบโตเต็มที่แล้ว ไม่ว่าจะเติมกลูโคสให้ได้ปริมาณคงที่ประมาณ 2 - 3 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร ไปนานถึง 20 ชั่วโมง ก็ไม่พบการเพิ่มระดับของการสังเคราะห์เอนไซม์เพนนิซิลิน เอซิเลสแต่อย่างใด

ปริมาณกลูโคส (มก./มล.) (—○—)
ค่าการเจริญ (OD_{540}) (—●—)
แอคติวิตีของเอนไซม์ (หน่วย/มก. โปรตีนรวม) (●- - -●)
0
1
2
3
4
40
80
120
160
200
240
280
3
6
9
12
15
18
21
24
27
เวลา (ชั่วโมง)