



การผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครสจากการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus siamensis* KKSB4 และ *Bacillus velezensis* KKSB6 แบบกะป๋อง

Levansucrase Production of *Bacillus siamensis* KKSB4 and *Bacillus velezensis* KKSB6 in Fed-Batch Culture

วิรดา แก้วโยธา และ วียะดา มงคลธนารักษ์ *

Wirada Kaewyotha and Wiyada Mongkolthanaruk *

สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย

Department of Microbiology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Thailand

Received : 28 February 2024, Received in revised form : 1 May 2024, Accepted : 20 May 2024

Available online : 31 May 2024

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์และที่มา : ลิแวนเป็นโพลิเมอร์ของฟรุกโตสจากธรรมชาติทั้งพืชและจุลินทรีย์ โครงสร้างลิแวนประกอบด้วย หมู่ D-fructofuranosyl ที่เชื่อมโยกันด้วยพันธะ β -(2, 6) และมีหมู่ D-glucosyl ที่ปลายสายโซ่ เป็นโพลิเมอร์ที่มีประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร เกษตรกรรม เครื่องสำอาง และเชิงพาณิชย์ ลิแวนผลิตได้จากกิจกรรมเอนไซม์ลิแวนซูเครส โดยมีน้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้น *Bacillus siamensis* KKSB4 และ *Bacillus velezensis* KKSB6 ที่แยกได้จากถั่วเหลืองหมักและสามารถผลิตลิแวนได้ด้วยการทำงานของลิแวนซูเครส นำมาศึกษาการเจริญ ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสม และการเลี้ยงเชื้อแบบกะป๋องเพื่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครสที่ดี

วิธีดำเนินการวิจัย : การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *B. siamensis* KKSB4 และ *B. velezensis* KKSB6 ในสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ และการผลิตเอนไซม์ โดยศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ ค่าพีเอชเริ่มต้น และแหล่งคาร์บอนหลัก (ซูโครส) โดยวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลิแวนซูเครสด้วยวิธี dinitrosalicylic acid (DNS) วัดค่า OD600 นาโนเมตรสำหรับการเจริญ และวัดค่าปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหลืออยู่ นอกจากนี้ศึกษาสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบกะป๋อง โดยเติมอาหารเลี้ยงเชื้อหรือเติมน้ำตาล หรือเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาล ในระหว่างการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

ผลการวิจัย : สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและกิจกรรมเอนไซม์ลิแวนซูเครสของ *B. siamensis* KKSB4 และ *B. velezensis* KKSB6 คือเพาะเลี้ยงในอาหาร Luria-Bertani (LB) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, พีเอชเริ่มต้น 7 โดยมีปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร และ 20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงแบบกะป๋องเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ พบว่า *B. siamensis* KKSB4 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่ *B. velezensis* KKSB6 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงในสภาวะที่มีการเติมอาหาร LB ที่มีน้ำตาลซูโครสที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

สรุปผลการวิจัย : *B. siamensis* KKSB4 และ *B. velezensis* KKSB6 สามารถผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครสได้ มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 5.06 และ 4.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ การเลี้ยงเชื้อแบบกะป๋องของ *B. siamensis* KKSB4 เพื่อผลิต



เอนไซม์ได้ดีในสภาวะอาหารที่มีน้ำตาล 30 กรัมต่อลิตร และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่ *B. velezensis* KKS6 มีสภาวะการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตเอนไซม์ในสภาวะที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร และเติมอาหารที่มีน้ำตาล 10 กรัมต่อลิตร ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อ

คำสำคัญ : ลีแวน ; ลีแวนซูเครส ; *Bacillus siamensis* ; *Bacillus velezensis*

Abstract

Background and Objectives : Levan is a natural homopolymer of fructose from both plants and microorganisms.

Levan structure consists of D-fructofuranosyl groups linked to each other by β -(2, 6) bonds and D-glucosyl at the end of chain. Microbial levans have wide range of applications in food, pharmaceutical, cosmetic and commercial industries; they are produced by levansucrase with sucrose as a substrate. *Bacillus siamensis* KKS4 and *Bacillus velezensis* KKS6 were isolated from fermented soybeans and contained the ability to produce levan by levansucrase. Therefore, these strains were investigated the optimal culture, sucrose concentration and fed-batch cultivation for growth and levansucrase production.

Methodology : The optimal culture conditions of *B. siamensis* KKS4 and *B. velezensis* KKS6 were determined for suitable growth and maximizing enzyme production by various parameters of temperature, initial pH and sucrose concentration. The levansucrase activity was determined by dinitrosalicylic acid (DNS) method. The optical density (OD₆₀₀ nm) and the amount of sucrose were also detected. The conditions of fed-batch cultivation were investigated by the addition of LB medium, sucrose solution or LB with sucrose during the cultivation period.

Main Results : The results showed that *B. siamensis* KKS4 and *B. velezensis* KKS6 had high growth and levansucrase activity when cultured in Luria-Bertani (LB) at 37°C, pH 7 with 30 g/L and 20 g/L of sucrose, respectively. The fed-batch cultivation was studied to increase enzyme production; *B. siamensis* KKS4 gave the highest enzyme activity by the addition of LB medium at 24 and 48 hours of cultivation. Whereas, *B. velezensis* KKS6 indicated high activity by the addition of LB medium with sucrose as a substrate at 24 and 48 hours of cultivation.

Conclusions : *B. siamensis* KKS4 and *B. velezensis* KKS6 showed enzyme activity at 5.06 U/ml and 4.03 U/ml, respectively. The optimal condition of fed-batch cultivation was high sucrose medium (30 g/L) with adding only nutrient at 24 and 48 hours for *B. siamensis* KKS4. On the other hand, *B. velezensis* KKS6 used the condition of the medium with low amount of sucrose (10 g/L) and adding nutrient with sucrose during cultivation.

Keywords : Levan ; Levansucrase ; *Bacillus siamensis* ; *Bacillus velezensis*

*Corresponding author. E-mail : wiymon@kku.ac.th

บทนำ

ลิแวนเป็นโพลิเมอร์ของฟรุกโตสที่ได้จากพืชและจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ มีประโยชน์มาก และถูกนำไปใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมที่หลากหลาย การสังเคราะห์ลิแวนทางชีวภาพได้รับความสนใจในเรื่องประโยชน์ต่อสุขภาพจากคุณสมบัติฟรีไบโอติก นอกจากนี้การถูกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ การนำกลับมาใช้ใหม่ ความยืดหยุ่น และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เป็นคุณสมบัติของลิแวนที่ได้รับความสนใจ (Rapala *et al.*, 2015)

ลิแวนมีแนวโน้มในการนำมาใช้ทดแทนสารฟรุกแทนประเภทอื่นในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากคุณสมบัติทางชีวภาพ ขนาดน้ำหนักโมเลกุล และคุณสมบัติฟรีไบโอติกที่ส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ในลำไส้ของระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ (Pongtorn *et al.*, 2022) มีการใช้งานที่หลากหลายในเครื่องสำอาง และยา เนื่องจากคุณสมบัติของลิแวนที่สำคัญต่างๆ เช่น สารเพิ่มความหนืด สารทำให้คงตัว สารอิมัลซิไฟเออร์ และสารก่อเจล (Pongtorn *et al.*, 2022) โดยใช้ในผลิตภัณฑ์ดูแลเส้นผม สเปรย์ปรับอากาศ ผลิตภัณฑ์ดูแลผิวหน้าและผิวกาย ไวท์เทนนิ่งต่างๆ (Ebru *et al.*, 2016) และยังมีการใช้งานทางเภสัชกรรมและการแพทย์ที่หลากหลาย เช่น ลิแวนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำถูกนำมาใช้เพื่อส่งเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ต้านการอักเสบ และยังสามารถลดการเกิด lipid peroxidation กำจัดอนุมูล 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Marta *et al.*, 2019) ลิแวนถูกนำมาใช้เป็นอนุภาคนาโนที่ช่วยเพิ่มการขนส่งเปปไทด์ต่างๆ เช่น สารต้านเนื้องอก สารป้องกันการระคายเคือง สารต้านอนุมูลอิสระและสารต้านการอักเสบ (Pongtorn *et al.*, 2022) นอกจากนี้ลิแวนถูกใช้ในการรักษาบาดแผล และเนื้อเยื่อที่ถูกไฟไหม้ ลดน้ำหนัก ลดคอเลสเตอรอล และยังใช้ในการเพาะเลี้ยงสเต็มเซลล์อีกด้วย (Ebru *et al.*, 2016)

ลิแวนที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์จึงเป็นโพลิเมอร์ชีวภาพที่มีคุณค่า และมีประโยชน์ในอนาคต ซึ่งการผลิตลิแวนจากจุลินทรีย์เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ลิแวนซูเครส ที่เกิดกระบวนการไฮโดรไลซิสน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นโมเลกุลคู่ เปลี่ยนเป็นกลูโคสและฟรุกโทสที่เป็นโมเลกุลเดี่ยว และเชื่อมต่อกับน้ำตาลฟรุกโตสผ่านปฏิกิริยาฟรุกโตซิลทรานส์เฟอเรสได้เป็นลิแวน (Pongtorn *et al.*, 2022) เอนไซม์ลิแวนซูเครสมีรายงานในแบคทีเรียหลายสปีชีส์ ได้แก่ *Acetobacter diazotrophicus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus aryabhattai*, *Brachybacterium phenoliresistens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Lactobacillus reuteri* และ *Zymomonas mobilis* (Hernández *et al.*, 1999)

การผลิตลิแวนจากจุลินทรีย์นั้นขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิตเกี่ยวข้องกับสภาวะแวดล้อมต่างๆ เช่น ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ การเติมอากาศ และการกวน ซึ่งจะต้องเหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิดเพื่อให้ได้ผลผลิตในปริมาณที่มาก ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีความสนใจศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรีย *Bacillus siamensis* KKS4 และ *Bacillus velezensis* KKS6 ที่สามารถผลิตลิแวนได้ และศึกษารูปแบบการเลี้ยงเชื้อแบบกะป๋องเพื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ลิแวนซูเครส ส่งผลต่อการเพิ่มผลผลิตลิแวน

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

Bacillus siamensis KKS4 (PP731977) และ *Bacillus velezensis* KKS6 (PP731824) แยกได้จากถั่วเหลืองหมัก (Yuensuk, 2021) นำมาทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครส โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง Luria Bertani

(LB) ประกอบด้วย ทริปโตเน สารสกัดจากยีสต์ และโซเดียมคลอไรด์ ปริมาณ 10.5 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อ 1 หลบ ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ผสมซูโครส 10 กรัมต่อลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น โดยนำเชื้อที่เจริญในอาหารเหลวมาเจือจางให้มีค่าความขุ่น (OD 600 นาโนเมตร) อยู่ในช่วง 0.8-1.0 (มีเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml) ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Jenway 6505 UV/VIS Spectrophotometer)

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครสด้วยการเลี้ยงเชื้อแบบกะ (batch cultivation)

2.1 การทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครส

นำเชื้อตั้งต้นปริมาตร 0.6% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 3 ชนิด ได้แก่ LB Nutrient broth (NB ประกอบด้วยเปปโตเน และสารสกัดจากเนื้อ ปริมาณ 5 และ 3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) และ Glucose Yeast extract Calcium carbonate (GYC) อย่างละ 30 10 และ 10 ตามลำดับ ผสมน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วทำการเก็บตัวอย่างเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง (ทำ 2 ข้ำ จากอาหารชนิดละ 2 ฟลาสก์) จากนั้นนำไปวัดค่าการเจริญที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำส่วนใสไปทำการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ลิแวนซูเครส เพื่อคัดเลือกอาหารที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด

2.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครส

นำเชื้อตั้งต้นปริมาตร 10.0% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผสมซูโครส 10 กรัมต่อลิตร พี่เชืตั้งต้น 7 นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30, 35, 37 และ 40 องศาเซลเซียส โดยทำการเก็บตัวอย่างเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง (ทำ 2 ข้ำต่อฟลาสก์ จำนวน 2 ฟลาสก์ต่อการทดลอง) จากนั้นนำไปวัดค่าการเจริญที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำส่วนใสไปทำการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ลิแวนซูเครส

2.3 การศึกษาความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครส

นำเชื้อตั้งต้นปริมาตร 10.0% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผสมซูโครส 10 กรัมต่อลิตร และปรับค่าพีเอชของอาหารตั้งต้นเป็น 5, 6, 7, 8 และ 9 จากนั้นนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทำการเก็บตัวอย่างเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 12, 24, 36, และ 48 ชั่วโมง (ทำ 2 ข้ำต่อฟลาสก์ จำนวน 2 ฟลาสก์ต่อการทดลอง) จากนั้นนำไปวัดค่าการเจริญที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำส่วนใสไปทำการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ลิแวนซูเครส

2.4 การศึกษาความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครส

นำเชื้อตั้งต้นปริมาตร 10.0% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผสมซูโครส 0, 10, 15, 20, 25 และ 30 กรัมต่อลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทำการเก็บตัวอย่างเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 และ 48 ชั่วโมง (ทำ 2 ซ้ำต่อฟลาสก์ จำนวน 2 ฟลาสก์ต่อการทดลอง) จากนั้นนำไปวัดค่าการเจริญที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที นำส่วนใสไปทำการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ลิแวนซูเครส

3. การศึกษาการเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครสด้วยการเลี้ยงเชื้อแบบกะป้อน (Fed batch cultivation)

3.1 การเลี้ยงเชื้อแบบเติมแหล่งอาหารและน้ำตาลซูโครส

นำเชื้อตั้งต้นปริมาตร 10.00% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 70 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีชุดทดสอบ 3 สภาวะ ได้แก่ 1) อาหาร LB ผสมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร (สำหรับ KKS4) และ 20 กรัมต่อลิตร (สำหรับ KKS6) โดยเติมเฉพาะอาหาร LB ปริมาตร 20 มิลลิลิตร 2) อาหาร LB ผสมซูโครส 10 กรัมต่อลิตร โดยเติมเฉพาะน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร (สำหรับ KKS4) และเติมเฉพาะน้ำตาลซูโครส 5 กรัมต่อลิตร (สำหรับ KKS6) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และ 3) อาหาร LB ผสมซูโครส 10 กรัมต่อลิตร โดยเติมอาหาร LB ผสมกับน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร (สำหรับ KKS4) และเติมอาหาร LB ผสมกับน้ำตาลซูโครส 5 กรัมต่อลิตร (สำหรับ KKS6) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยเติมที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างหลังจากที่มีการเติมสารอาหาร เก็บตัวอย่างเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง (ทำ 2 ซ้ำต่อฟลาสก์ จำนวน 2 ฟลาสก์ต่อการทดลอง) นำไปวัดค่าการเจริญที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วนำส่วนใสไปทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครสด้วย Hand Refractometer (N.O.W.TOKYO) และกิจกรรมของเอนไซม์ลิแวนซูเครส

3.2 การเลี้ยงเชื้อแบบเติมอาหาร LB สำหรับเชื้อ KKS4

นำเชื้อตั้งต้นของ KKS4 ปริมาตร 10.0% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 70 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผสมซูโครส 30 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทดสอบการเติมอาหาร LB 2 แบบ คือ เติมปริมาณ 10 มิลลิลิตร และเติมปริมาณ 20 มิลลิลิตร โดยเติมที่เวลา 18 ชั่วโมง และเติมอีกครั้งที่เวลา 30 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างหลังจากที่มีการเติมสารอาหาร เก็บตัวอย่างเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง (ทำ 2 ซ้ำต่อฟลาสก์ จำนวน 2 ฟลาสก์ต่อการทดลอง) นำไปวัดค่าการเจริญที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วนำส่วนใสไปทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส และกิจกรรมของเอนไซม์ลิแวนซูเครส

3.3 การเลี้ยงเชื้อแบบเติมอาหาร LB ผสมกับน้ำตาลซูโครสสำหรับเชื้อ KKS6

นำเชื้อตั้งต้นของ KKS6 ปริมาตร 10.00% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเหลว LB ปริมาตร 70 มิลลิลิตร ในฟลasks ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผสมซูโครส 10 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทดสอบโดยเติมอาหาร LB ผสมกับน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ โดยเก็บตัวอย่างหลังจากที่มีการเติมสารอาหาร เก็บตัวอย่างเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง (ทำ 2 ซ้ำต่อฟลask จำนวน 2 ฟลask ต่อการทดลอง) นำไปวัดค่าการเจริญที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วนำส่วนใสไปทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส และกิจกรรมของเอนไซม์ลิแวนซูเครส

4. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ลิแวนซูเครส (Xu et al., 2021)

นำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายน้ำตาลซูโครส 1.0% ในน้ำกลั่น ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาการย่อยสลายซูโครสด้วยวิธี DNS โดยการเติม 3, 5-Dinitrosalicylic acid (DNS) reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นในอ่างน้ำ และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส คำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาเปลี่ยนสับสเตอร์ได้น้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมลต่อนาที

ผลการวิจัย

1. สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครสในการเลี้ยงเชื้อแบบกะ (batch cultivation)

1.1 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครสในอาหารชนิดต่างๆ

จากการทดลองอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิดได้แก่ LB NB และ GYC ที่ผสมซูโครส 10 กรัมต่อลิตร แล้วเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง จนครบ 48 ชั่วโมง พบว่าทั้งเชื้อ KKS4 และ KKS6 มีการเจริญคงที่ในช่วง 12-36 ชั่วโมง และพบค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดในอาหาร LB ที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากัน คือ 0.241 ± 0.014 และ 0.249 ± 0.010 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Figure 1) เอนไซม์ลิแวนซูเครสเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่ขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ เช่น ปริมาณน้ำตาลซูโครส เช่นเดียวกับ *Bacillus subtilis* M ที่มีการเจริญรวดเร็วในช่วงแล้ว แล้วเริ่มคงที่ พร้อมๆ กับการผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครสที่พบปริมาณน้อยในช่วงแรก แล้วเพิ่มสูงขึ้น (Esawy et al., 2013) จากผลการทดลองจึงเลือกอาหาร LB ที่ผสมซูโครส 10 กรัมต่อลิตร ใช้เลี้ยงเชื้อในการทดสอบต่อไป

1.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครส

จากการทดสอบเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 30 35 37 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าการเจริญของทั้ง 2 สายพันธุ์มีลักษณะการเจริญไปในทิศทางเดียวกันและเกาะกลุ่มกัน โดยพบการเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เนื่องจาก

เชื้อ *Bacillus* มีความสามารถในการสร้างสปอร์ และทนความร้อนได้ แต่อุณหภูมิสูง เอนไซม์จึงถูกยับยั้งทำให้ผลิตเอนไซม์เครสคือ 37 องศาเซลเซียส ทั้ง KKSB4 และ KKSB6 ซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดดัง Figure 2

1.3 ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครส

จากการทดลองพีเอชตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการศึกษาที่พีเอช 5 6 7 8 และ 9 โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ มีการเจริญในแต่ละ pH ไปในทิศทางเดียวกันไม่แตกต่างกัน (Figure 3) เจริญได้ในอาหารที่เป็นกรดและด่าง เนื่องจากคุณสมบัติของเชื้อ *Bacillus* ที่สามารถเจริญได้ในช่วงความเป็นกรดต่างที่กว้าง (Gauvry *et al.*, 2021) โดยที่มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ พีเอช 7 ส่วนพีเอชอื่นๆ พบกิจกรรมของเอนไซม์เช่นกัน แสดงว่าแบคทีเรียผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครส สอดคล้องกับการเจริญของเซลล์ พบว่าที่ 12 ชั่วโมง กิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อ KKSB6 สูงสุดที่ pH 7 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 0.488 ± 0.008 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาเป็น pH 6 ในขณะที่ KKSB4 เจริญเติบโตได้ช้ากว่าในช่วง 12 ชั่วโมงแรก พบกิจกรรมเอนไซม์ที่เวลา 24 ชั่วโมง ที่ pH 7 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 0.639 ± 0.016 หน่วยต่อมิลลิลิตร ได้น้อยซึ่งตรงข้ามกับการเจริญ (Natthiwut, 2021) ที่เวลา 24 ชั่วโมง จะเห็นว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ลิแวน

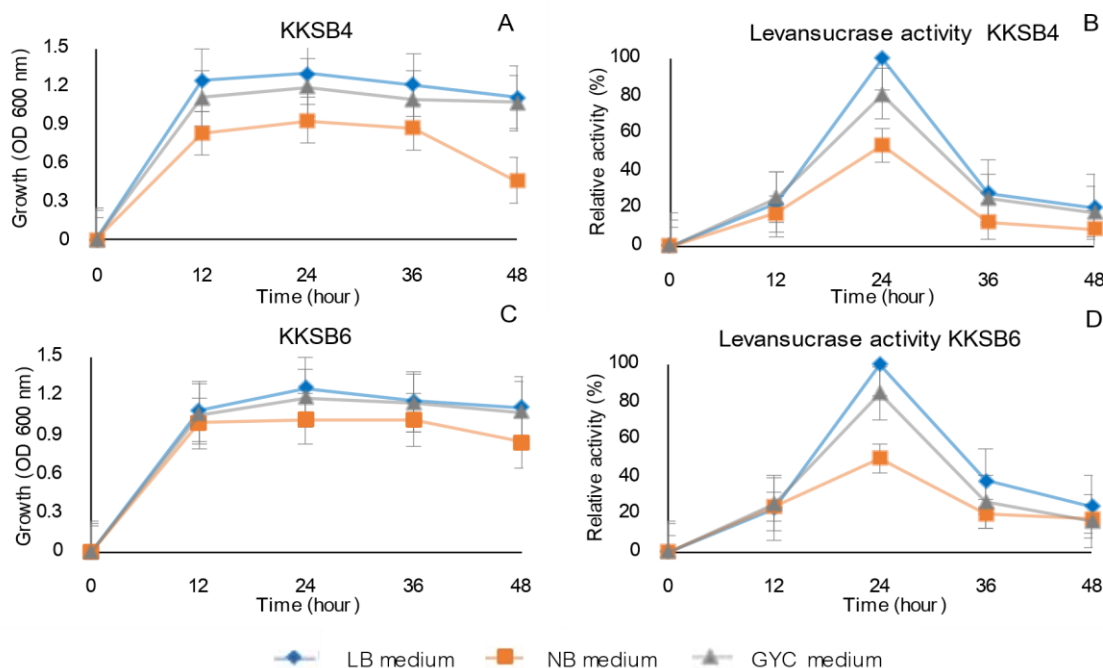


Figure 1 Growth (A, C) and levansucrase activity (B, D) of *Bacillus siamensis* KKSB4 and *Bacillus velezensis* KKSB6 cultured in different media at 37°C

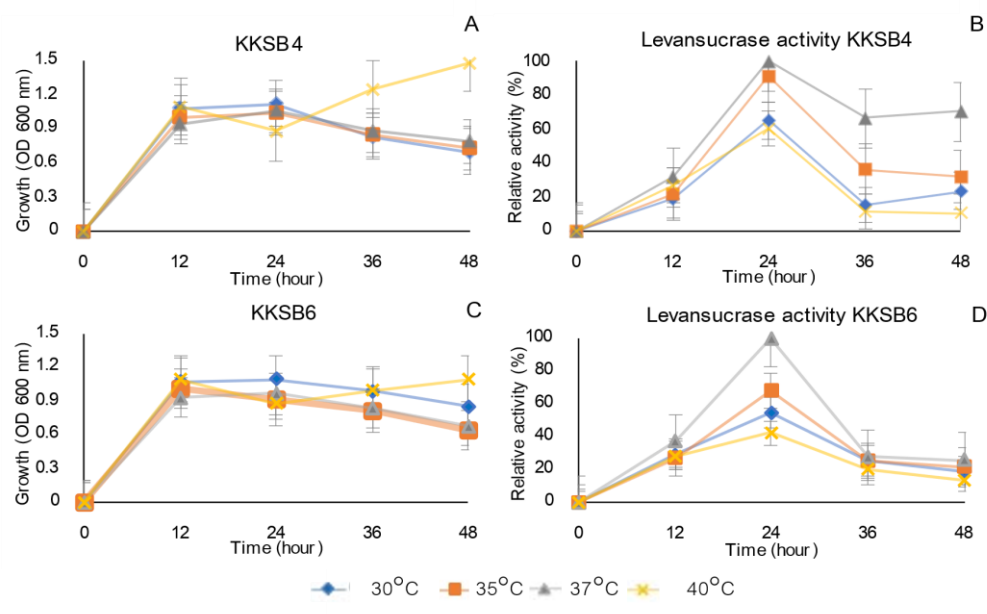


Figure 2 Effect of temperature on growth (A, C) and levansucrase activity (B, D) of *Bacillus siamensis* KKSB4 and *Bacillus velezensis* KKSB6 cultured in LB with 10 g/L of sucrose at pH 7

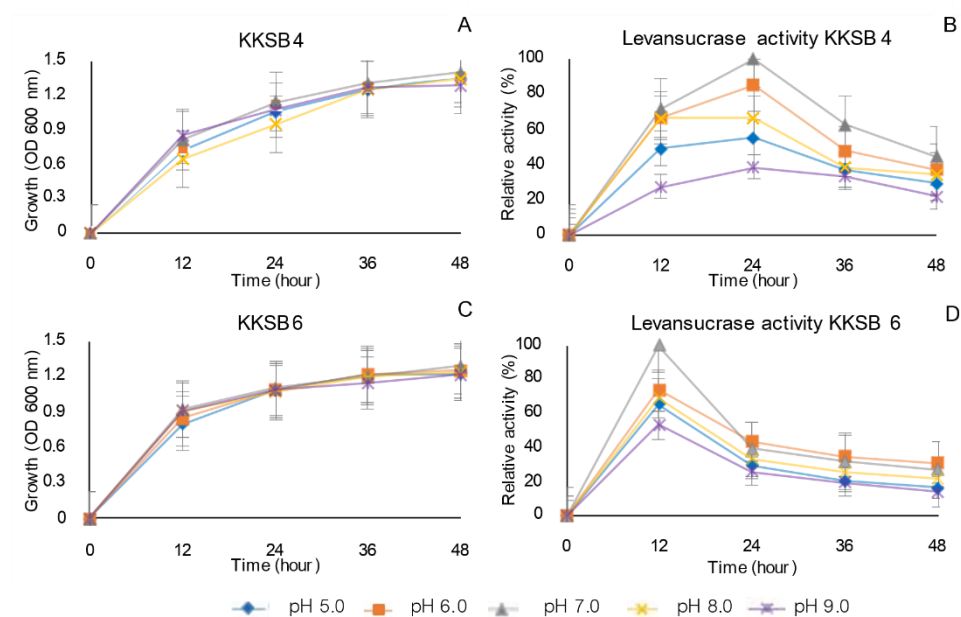


Figure 3 Effect of pH on growth (A, C) and levansucrase activity (B, D) of *Bacillus siamensis* KKSB4 and *Bacillus velezensis* KKSB6 cultured in LB medium at 37°C

1.4 ความเข้มข้นของซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ดีแวนซูเครส

จากการทดลองความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในการเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของซูโครส 0 10 15 20 25 และ 30 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7 พบว่า การเจริญ และกิจกรรมของเชื้อ KKSB4 ที่ความเข้มข้นซูโครส สูงสุด 30 กรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ โดยมีค่า OD600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.751 และกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 5.060 ± 0.043 หน่วยต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อ KKSB6 มีการเจริญ และกิจกรรมสูงสุดที่ความเข้มข้นซูโครส 20 กรัมต่อลิตร โดยมีค่า OD600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.448 และให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 4.034 ± 0.014 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Figure 4)

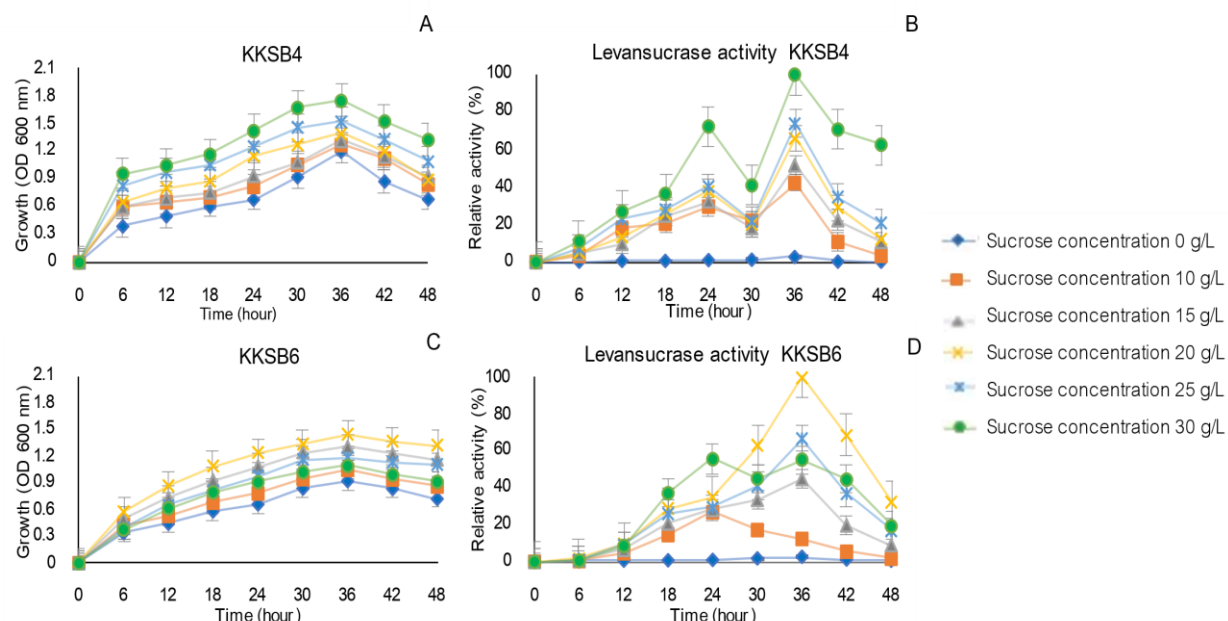


Figure 4 Effect of sucrose concentration on growth (A, C) and levansucrase activity (B, D) of *Bacillus siamensis* KKSB4 and *Bacillus velezensis* KKSB6 cultured in LB medium, pH 7 at 37°C

2. การเพิ่มผลผลิตดีแวนซูเครสด้วยการเลี้ยงเชื้อแบบกะป้อน (Fed batch cultivation)

2.1 การเลี้ยงเชื้อแบบเติมแหล่งอาหารและน้ำตาลซูโครส

จากการทดลองการเลี้ยงเชื้อแบบเติมแหล่งอาหารและน้ำตาลซูโครส อาหารเริ่มต้นของสภาวะที่เติมเฉพาะอาหาร ใสซูโครส 30 กรัมต่อลิตร (สำหรับ KKSB4) และ 20 กรัมต่อลิตร (สำหรับ KKSB6) ในขณะที่ยีก 2 สภาวะเริ่มต้นด้วยอาหาร LB ผสมกับซูโครส 10 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7 จากนั้นเติมเฉพาะซูโครสหรืออาหาร LB ที่มีซูโครส ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยเติมซูโครสให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร (สำหรับ KKSB4) และ 20 กรัมต่อลิตร (สำหรับ KKSB6) ผลการทดลองของ KKSB4 แสดงดัง Figure 5 พบว่าเชื้อ KKSB4 มีค่ากิจกรรมสูงสุดใน

สภาวะที่ใส่น้ำตาลทั้งหมด 30 กรัม/ลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ต้น และเติมเฉพาะอาหาร LB ที่เวลาต่างๆ ถึงแม้ว่าการเติมเฉพาะซูโครสให้กิจกรรมเอนไซม์สูงเช่นเดียวกัน แต่ใช้ระยะเวลานานถึง 72 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ KKS6 นั้นมีค่ากิจกรรมสูงสุดด้วยการเติมอาหาร LB ผสมซูโครส 5 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมงและมีน้ำตาลลดลงเหลือ 0.6% brix (Figure 6) เนื่องจากเชื้อมีการใช้อาหารอย่างช้าๆ ทำให้การเติมน้ำตาลและอาหาร (สภาวะที่ 3) ส่งผลให้การผลิตเอนไซม์ต่อเนื่อง โดยพบว่าหลังจาก 48 ชั่วโมง กิจกรรมเอนไซม์ลดลง ไม่มีการใช้น้ำตาล เนื่องจากปริมาณน้ำตาลเหลือน้อย ส่วนการเติมอาหารเพียงอย่างเดียว (สภาวะที่ 1) เชื้อเจริญลดลงหลังจากเติมอาหารที่เวลา 24 ชั่วโมง และไม่มีการใช้น้ำตาล พบการใช้น้ำตาลในช่วงที่เติมอาหารในครั้งที่ 2 (ที่เวลา 48 ชั่วโมง) โดยที่กิจกรรมของเอนไซม์ไม่เพิ่มขึ้น ส่วนการเติมน้ำตาลเพียงอย่างเดียว พบมีการใช้น้ำตาลอย่างต่อเนื่อง แต่ไม่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครส ซึ่งพบการผลิตเอนไซม์ค่อยๆ เกิดขึ้นตามปริมาณน้ำตาลและการเจริญของเชื้อ

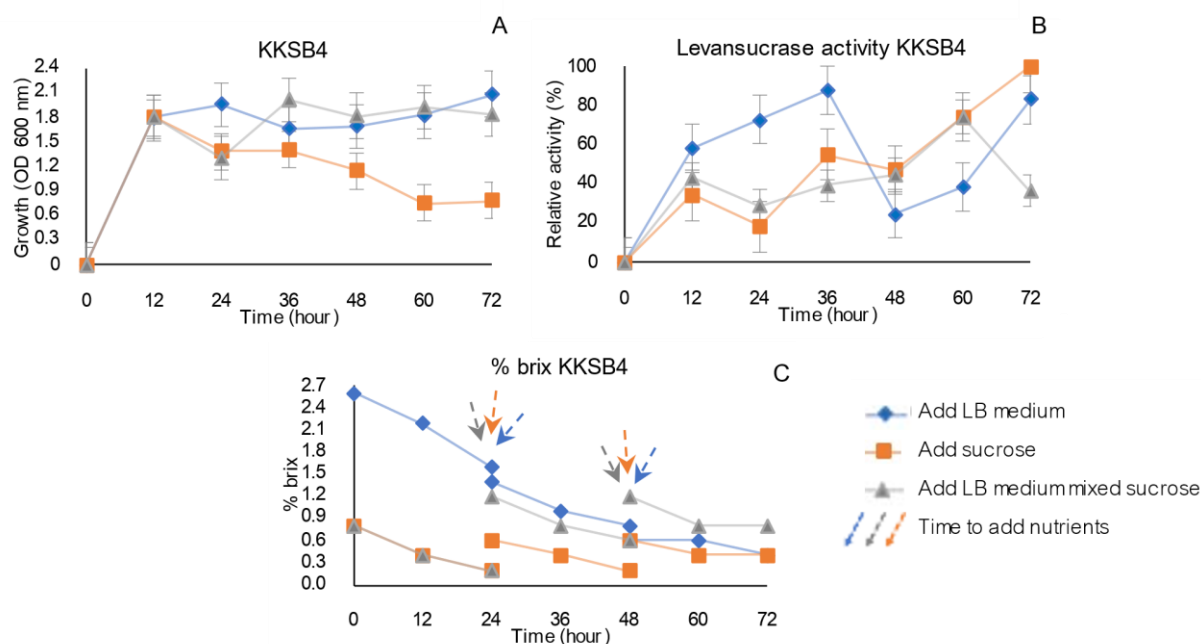


Figure 5 Fed-batch culture of *Bacillus siamensis* KKS4 was determined growth (A), enzyme activity (B) and sucrose amount (C) under conditions of adding medium, sucrose or medium with sucrose at 24 and 48 hours of cultivation. The nutrients were added into the culture after sample taken

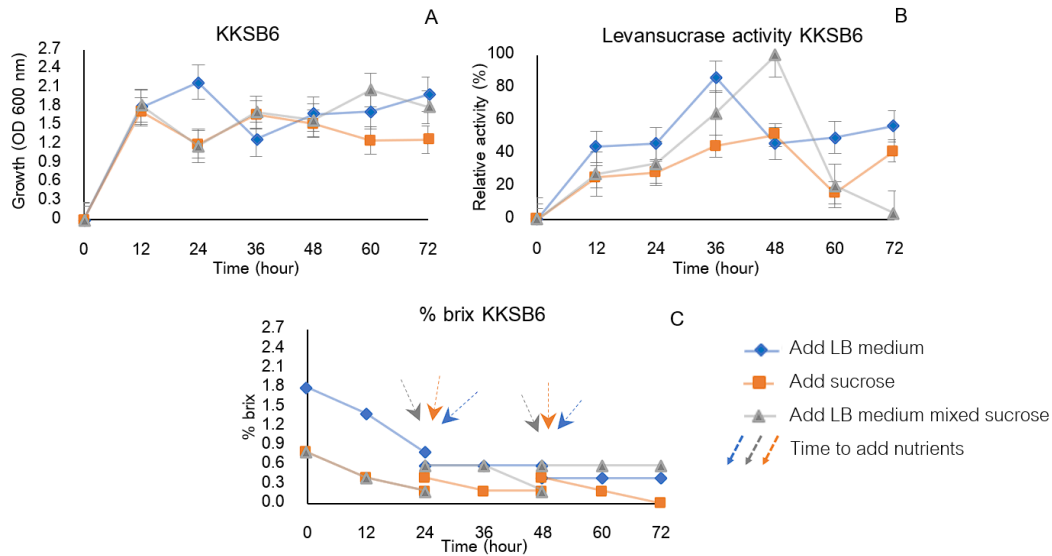


Figure 6 Fed-batch culture of *Bacillus velezensis* KKS6 shown growth (A), enzyme activity (B) and sucrose amount (C) under conditions of adding medium, sucrose or medium with sucrose at 24 and 48 hours of cultivation

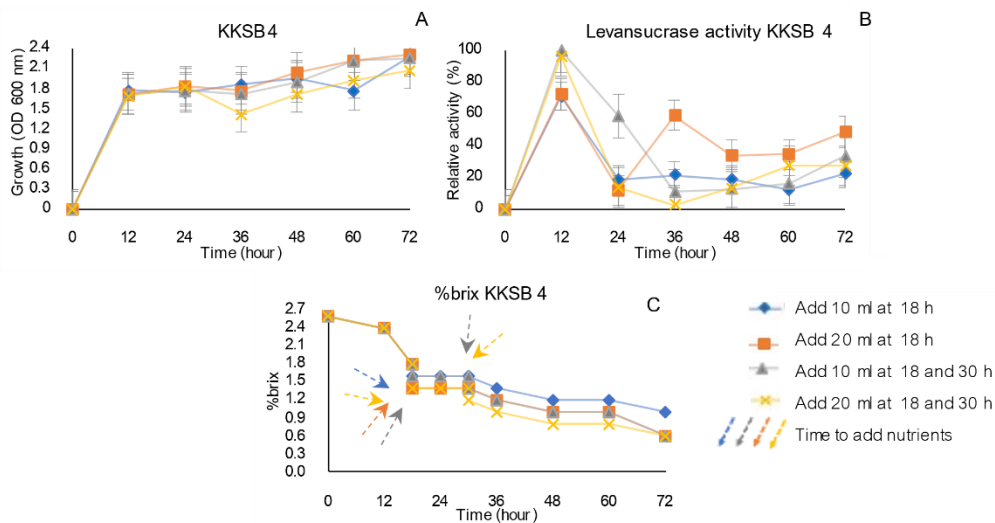


Figure 7 Fed-batch culture of *Bacillus siamensis* KKS4 shown growth (A), enzyme activity (B) and sucrose amount (C) under adding medium once or twice at 18 and 30 hours of cultivation

2.2 การเลี้ยงเชื้อแบบกะป้อนโดยเติมเฉพาะอาหาร LB สำหรับเชื้อ KKS4

จากผลการทดลองเลี้ยงเชื้อ KKS4 แบบกะป้อน พบว่าใช้อาหารตั้งต้น LB ผสมกับซูโครส 30 กรัมต่อลิตร และเติมเฉพาะอาหาร LB ให้ผลดีต่อการผลิตเอนไซม์ และพบว่าช่วงเวลาในการเติมอาหารอาจมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ เมื่อเติมอาหารที่ 48 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง (Figure 5) จึงปรับเวลาในการเติมอาหารเป็น 18 และ 30 ชั่วโมง และเติมอาหาร LB ในปริมาณที่ต่างกัน พบว่า KKS4 ที่เวลา 12 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมสูงสุดด้วยการเติมอาหาร LB ปริมาณ 10 หรือ 20 มิลลิลิตร ที่เวลา 18 และ 30 ชั่วโมง และมีการใช้น้ำตาลซูโครสลดลงเหลือ 0.6% brix (Figure 7)

2.3 การเลี้ยงเชื้อแบบกะป้อนโดยเติมอาหาร LB ผสมกับน้ำตาลซูโครสสำหรับเชื้อ KKS6

จากผลการทดลองการเลี้ยง KKS6 แบบกะป้อนให้ผลดีในสภาวะที่เติมอาหาร LB ผสมซูโครส โดยอาหารเริ่มต้น คือ LB ผสมกับซูโครส 10 กรัมต่อลิตร ทำการเติมอาหาร LB ผสมซูโครสในความเข้มข้น และเวลาที่ต่างกัน โดยเติมอาหารและน้ำตาลครั้งเดียว คือ ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมง และเติมอาหารและน้ำตาล 2 ครั้ง ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าในการเติมอาหารและน้ำตาลเพียงครั้งเดียวที่เวลา 24 หรือ 36 ชั่วโมง ด้วยปริมาณน้ำตาล 10 กรัมต่อลิตร ในปริมาตรอาหาร 20 มิลลิลิตร พบกิจกรรมของเอนไซม์เกิดขึ้นที่เวลา 12 ชั่วโมง (Figure 8) แสดงถึงการใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในอาหารตั้งต้น เมื่อเติมน้ำตาลลงไป เชื้อใช้น้ำตาลอย่างต่อเนื่อง จึงพบการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นหลังจาก 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับ การเติมอาหารและน้ำตาลปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใน 2 ช่วงเวลา (เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง) มีค่ากิจกรรมสูงที่สุดที่เวลา 48 ชั่วโมง แสดงว่าการเลี้ยงเชื้อ KKS6 ควรเติมน้ำตาลและอาหารให้ทีละน้อย เพื่อใช้ในการสร้างเอนไซม์ลิแวนซูเครส หากเติมน้ำตาลซูโครสปริมาณมาก เชื้อสามารถใช้ได้ดี แต่ไม่มีผลกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครส อาจเนื่องจากการผลิตเอนไซม์อื่นๆ ที่ใช้อยู่สลายซูโครส และใช้ในกิจกรรมอื่นแทน

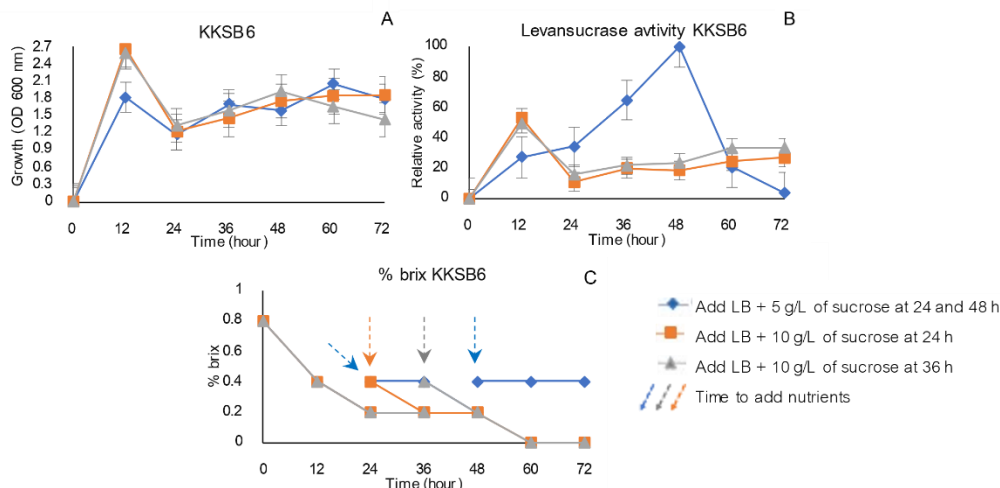


Figure 8 Fed-batch culture of *Bacillus velezensis* KKS6 shown growth (A), enzyme activity (B) and sucrose amount (C) under adding medium with sucrose at 24 and 48 hours or adding once at 24 or 36 hours of cultivation

วิจารณ์ผลการวิจัย

แหล่งอาหารที่สำคัญในการเลี้ยงเชื้อ คือการใช้แหล่งไนโตรเจนจาก yeast extract และ tryptone ที่มีอยู่ในอาหารต่างชนิดกันเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ สอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่า *Bacillus subtilis* NRC33a ใช้ yeast extract ในการผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครสได้ดีกว่าใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนเช่นเดียวกับ tryptone (Ahmed *et al.*, 2005) เนื่องจากส่วนประกอบของสารอาหารใน yeast extract มีทั้งโปรตีน น้ำตาล แร่ธาตุ และวิตามินบี (Tome, 2021) ในขณะที่ peptone มีแหล่งของกรดอะมิโนเป็นส่วนใหญ่ (Davami *et al.*, 2015) จึงทำให้แบคทีเรียเกิดกิจกรรมภายในเซลล์และมีการเจริญได้ดีในอาหารที่มี yeast extract นอกจากนี้แหล่งคาร์บอนที่สำคัญในการผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครสและสารลิแวน คือน้ำตาลซูโครส พบว่า KKS4 เมื่อปริมาณน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น การเจริญของเชื้อเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน ในขณะที่ KKS6 มีผลกระทบของการเจริญหากมีปริมาณของน้ำตาลสูงมาก และกิจกรรมของเอนไซม์จะเกิดขึ้นหลังจากเชื้อเจริญ 6 ชั่วโมง เหตุผลที่อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อใช้อาหารจากแหล่งไนโตรเจนก่อน แล้วจึงใช้น้ำตาลซูโครส การผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครสจึงเกิดขึ้นตามชนิดของแบคทีเรีย โดยการทำงานของเอนไซม์เริ่มจากกิจกรรมการย่อยสลายน้ำตาลซูโครสให้น้ำตาลฟรุกโตสเพื่อนำไปต่อสายเป็นโพลิแซคคาไรด์ ดังนั้นการวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์เป็นผลรวมของกิจกรรมการย่อยสลายและการต่อสายโพลิแซคคาไรด์ ซึ่งการลดลงของเอนไซม์ในบางช่วง อาจเกี่ยวข้องกับกิจกรรมการย่อยสลายน้ำตาลซูโครสลดลง เนื่องจากปริมาณน้ำตาลซูโครสดั้งเดิมลดลง แต่กลับพบการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์จากเชื้อ KKS4 ในช่วงเวลา 36 ชั่วโมง อาจเกิดจากกิจกรรมของ transfructosylation ที่เกิดขึ้นในช่วงหลังยังคงอยู่และมีกิจกรรมสูง ซึ่งพบหลักฐานในเชื้อ *Bacillus siamensis* ที่ตรวจสอบกิจกรรม hydrolysis และ transfructosylation ของการใช้น้ำตาลซูโครส 30% พบว่ากิจกรรมทั้ง 2 กิจกรรม เกิดขึ้นสูงในช่วงแรกของการทำงานของเอนไซม์ หลังจากนั้นกิจกรรมของ hydrolysis จะลดลง ในขณะที่กิจกรรม transfructosylation ยังคงสูง (Pongtorn *et al.*, 2022) การผลิตเอนไซม์ลิแวนซูเครสของเชื้อ KKS6 พบว่าถูกยับยั้งเมื่อน้ำตาลซูโครสเกิน 20% อาจเนื่องมาจากความหนืดของอาหารที่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ (Min *et al.*, 2021)

การเลี้ยงเชื้อแบบกะป๋องของ KKS4 เป็นการเลี้ยงโดยเติมน้ำตาลทั้งหมด 30 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารตั้งต้น และเติมอาหาร LB ช่วยให้เชื้อสามารถเจริญได้อย่างต่อเนื่อง และใช้น้ำตาลซูโครสที่ยังคงเหลืออยู่ในอาหารต่อได้ จึงพบการผลิตเอนไซม์ในช่วง 36 ชั่วโมง เมื่อน้ำตาลเหลือน้อยเพียงแค่ 0.4% brix ที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการเติมอาหาร LB เชื้อมีการเจริญต่อ และมีกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น คาดว่ามาจากกิจกรรมของ hydrolysis ซึ่งมีการศึกษาในสายพันธุ์กล้วยพันธุ์เพื่อเพิ่มขนาดของการผลิตลิแวน พบว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสสูงจะพบกิจกรรมของ transfructosylation และพบกิจกรรม hydrolysis ในช่วงที่น้ำตาลใกล้จะหมด (Yanyan *et al.*, 2017) ส่วนการเติมน้ำตาลอย่างเดียวในการเลี้ยงเชื้อ KKS4 นั้น ทำให้การเจริญของเชื้อไม่ดี ส่งผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ ในขณะที่เติมอาหารและน้ำตาลแบบกะป๋อง พบว่าน้ำตาลถูกใช้หมดไปเป็นระยะทำให้การผลิตเอนไซม์เกิดขึ้นไม่ต่อเนื่อง แสดงให้เห็นว่าปริมาณน้ำตาลเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอต่อการกระตุ้นให้ผลิตเอนไซม์ ยังขึ้นอยู่กับกิจกรรมของแบคทีเรียด้วย

ในทางตรงข้ามกับ KKS6 พบว่าปริมาณอาหารที่เติมไม่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ เมื่อเปรียบเทียบการเติมอาหารช่วงเวลาเดียว คือ 18 ชั่วโมง กับเติม 2 ช่วงเวลา คือ 18 และ 30 ชั่วโมง พบว่าการเติมอาหารในช่วง 12 ชั่วโมง

ส่งผลต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ที่สูง โดยไม่จำเป็นต้องเติมอาหารในครั้งที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ โดยการเติมอาหารในช่วง 24 ชั่วโมง ส่งผลต่อระยะเวลาในการผลิตเอนไซม์และการใช้น้ำตาล พบว่าหากใส่อาหารเร็ว การใช้น้ำตาลมีประสิทธิภาพน้อยกว่า คงเหลือน้ำตาลมากกว่า แต่การผลิตเอนไซม์เกิดขึ้นได้เร็วกว่า แสดงว่าเชื้อสายพันธุ์นี้มีการใช้อาหารหลายแหล่งในระยะเวลาเดียวกัน ดังนั้นการเติมอาหารและน้ำตาลในระยะเวลา log phase นั้น จึงสัมพันธ์ต่อการนำอาหารและน้ำตาลไปใช้ในกิจกรรมภายในเซลล์ จากผลการทดลองพบว่า levansucrase เป็น inducible enzyme ที่ต้องการน้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอนไซม์ จึงสามารถนำไปต่อยอดการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง (continuous culture) หรือการเพิ่มขนาดการผลิต เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์ และการผลิตลิแวน รวมถึงการใช้แหล่งอาหารราคาถูก เช่น โมลาส น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมที่ยังมีน้ำตาลซูโครสเหลืออยู่ เพื่อลดต้นทุนในการผลิต

สรุปผลการวิจัย

สภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์ลิแวนของ *Bacillus siamensis* KKSB4 คือสภาวะอาหาร LB ผสมความเข้มข้นซูโครส 30 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอชตั้งต้นของอาหารเท่ากับ 7 หากเลี้ยงเชื้อในสภาวะกะป๋องเหมาะสมโดยการเติมน้ำตาลเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และเติมอาหาร LB เพิ่มที่เวลา 12 ชั่วโมง สำหรับ *Bacillus velezensis* KKSB6 เลี้ยงด้วยอาหาร LB ผสมความเข้มข้นซูโครส 20 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7 โดยการเลี้ยงเชื้อแบบกะป๋อง เลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำตาลตั้งต้น 10 กรัมต่อลิตร และเติมอาหารและน้ำตาลซูโครสเป็นระยะ 5 กรัมต่อลิตร ในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง การเลือกใช้อาหาร อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และความเข้มข้นของซูโครสให้เหมาะสมนั้นมีผลเป็นอย่างมากต่อการผลิตเอนไซม์ กิจกรรมของเอนไซม์ รวมถึงส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งเห็นได้จากการเลี้ยงเชื้อแบบกะป๋องที่เชื้อมีการใช้น้ำตาลมาก แต่ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ นั่นคือเชื้อเจริญต่อเนื่องมีการผลิตเอนไซม์ได้ดีแต่ไม่แตกต่างกับการเลี้ยงเชื้อแบบคราวเดียว (batch culture)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย Fundamental Fund ภายใต้มหาวิทยาลัยขอนแก่น และสาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์ เครื่องมือ อุปกรณ์ และห้องปฏิบัติการระหว่างดำเนินงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Ahmed, F. A. F., Doaa, A. R. M., & Mona, A. T. E. (2005). Production of levansucrase from *Bacillus subtilis* NRC 33a and enzymic synthesis of levan and fructo-oligosaccharides. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 51, 402-407.



- Davami, F., Eghbalpour, F., Nematollahi, L., Barkhordari, F., & Mahboudi, F. (2015). Effects of peptone supplementation in different culture media on growth, metabolic pathway and productivity of CHO DG44 Cells; a new insight into amino acid profiles. *Iranian Biomedical Journal*, 19(4), 194-205.
- Ebru, T., Lázaro, H., & Joan, C. (2016). Review of levan polysaccharide: from a century of past experiences to future prospects. *Biotechnology Advances*, 5 (34), 827-844.
- Esawy, M. A., Amer, H., Gamal-Eldeen, A. M., El Enshasy, H. A., Helmy, W. A., Abo-Zeid, M. A. M., Malek, R., Ahmed, E. F., & Awad, G. E. A. (2013). Scaling up, characterization of levan and its inhibitory role in carcinogenesis initiation stage. *Carbohydrate Polymers*, 95, 578-587.
- Gauvry, E., Mathot, A. G., Couvert, O., Leguerinel, I., & Coroller, L. (2021). Effects of temperature, pH and water activity on the growth and the sporulation abilities of *Bacillus subtilis* BSB1. *International Journal of Food Microbiology*, 337, 108915.
- Hernández, L., Arrieta, J., Betancourt, L., Falcón, V., Madrazo, J., & Coego, A. (1999). Levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* SRT4 is secreted via periplasm by a signal-peptide-dependent pathway. *Current Microbiology*, 39 (3), 146-152.
- Marta, D., Agnieszka, L., Anna, J., Marek, W., Robert, P., & Marcin, L. (2019). Fermentation parameters and conditions affecting levan production and its potential applications in cosmetics. *Bioorganic Chemistry*, 93, 102787.
- Min, X., Lixia, Z., Fangkun, Z., Jingyue, W., Bo, Z., Zhijiang, Z., & Ye H. (2021). Cloning and expression of levansucrase gene of *Bacillus velezensis* BM-2 and enzymatic synthesis of levan. *Processes*, 9 (2), 317.
- Natthiwut, T. (2021). A study of biological properties of prebiotic (levan)-producing *Bacillus siamensis* and skin-affecting condition for potential application in cosmetics. *Burapha University*.
- Pongtorn, P., Nattapong, T., Tanawat, R., Nuttinee, T., Gary, A. L., & Witawat, J. (2022). Characterization of levansucrase produced by novel *Bacillus siamensis* and optimization of culture condition for levan biosynthesis. *Heliyon*, 12.
- Rapala, S., Chinta, H. S., S. R., Gudimalla, S., Janaki, R. M., & Kiran B. U., (2015). Review on production, characterization and applications of microbial levan. *Carbohydrate Polymers*, 120, 102-114.



Tomé, D. (2021). Yeast extracts: nutritional and flavoring food ingredients. *ACS Food science and technology*, 4, 487-494.

Xu, M., Zhang, L., Zhao, F., Wang, J., Zhao, B., Zhou, Z., & Han, Y. (2021). Cloning and expression of levansucrase gene of *Bacillus velezensis* BM-2 and enzymatic synthesis of levan. *Processes*, 9(2), 317.

Yanyan, G., Jiayi, Z., Jun, F., Mingfeng, C., Weixia, G., Yufen, Q., Yulei, D., Yi, W., Shufang, W., & Cunjiang, S. (2017). Improvement of levan production in *Bacillus amyloliquefaciens* through metabolic optimization of regulatory elements. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101, 4163-4174.

Yuensuk, S. (2021) Isolation of fructan – levan producing bacteria from fermented soybean. Research report, Khon Kaen University, Khon Kaen. (in Thai)