การผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสโดยเชื้อ BACILLUS SUBTILIS TISTR 25

นาย เกษม พงษ์มณี

วิทยานิพนธ์นี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2536

ISBN 97-582-728-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

019427 i17357357A

PRODUCTION OF ALKALINE PROTEASE BY BACILLUS SUBTILIS TISTR 25

Mr.Kasem Phongmanee

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Sciences

Program Biotechnology

Graduate School

Chulalongkorn University

1993

ISBN 974-582-728-2

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสโดยเชื้อ BACILLUS SUBTILIS TISTR 25
โดย	นาย เกษม พงษ์มณี
สาขาวิชา	หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. ถาวร วัชราภัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

เกษม พงษ์มณี : การผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส์โดยเชื้อ BACILLUS SUBTILIS TISTR 25 (PRODUCTION OF ALKALINE PROTEASE BY BACILLUS SUBTILIS TISTR 25) อ.ที่ปรึกษา : ผศ. นภา คีวรังสรรค์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ.ดร.เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์, 94 หน้า ISBN 974-582-728-2

การผลิตเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส์โดยเชื้อ Bacillus subtilis TISTR 25 โดยการการคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมในการใช้เป็นสูตรอาหารพื้นฐานของแหล่งต้นตอคาร์บอนและไนโตรเจน ผลการทดลองพบว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมและให้แอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุด ประกอบด้วย KH_2PO_4 0.1%, $MgSO_4$ 0.05%, $CaCl_2$ 0.001%, แป้งข้าวเหนียว 0.25% w/v และวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันในอัตราส่วน 1:1 ในปริมาณรวม 2.0% w/v ซึ่งได้ผ่านการย่อยสลายด้วยกรดซัลฟูริก 1 นอร์มอล สภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ. ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ pH 10.5 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานสูงสุดของเอนไซม์ เมื่อทำการตกตะกอนน้ำใสที่ใช้เลี้ยงเชื้อด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 70% และอบแห้งที่ 45 °ซ. เป็นเวลา 8 - 12 ชั่วโมง จะได้ตะกอนเอนไซม์ในสภาวะผง เมื่อนำผงเอนไซม์ไปทดสอบการเก็บรักษาที่อุณหภูมิระหว่าง -20° ถึง 60 °ซ. พบว่าที่อุณหภูมิ -20° ถึง 30 °ซ. สามารถเก็บรักษาเอนไซม์ไว้ได้อย่างน้อย 120 วัน โดยไม่สูญเสียแอคติวิตีของเอนไซม์เลย แต่เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 45 °ซ. และ 60 °ซ. เป็นเวลา 120 วัน จะมีแอคติวิตีเหลืออยู่ 85.2 และ 52.5% ตามลำดับ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C326397 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEY WORD: ALKALINE PROTEASE / BACILLUS PROTEASE / SERINE PROTEASE
KASEM PHONGMANEE : PRODUCTION OF ALKALINE PROTEASE BY BACILLUS SUBTILIS TISTR 25. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. NAPA SIWARUNGSON, THESIS CO-ADVISOR : ASSO. PROF. PIAMSOOK PONGSAWASDI, Ph.D., 94 pp., ISBN 974-582-728-2

The production of alkaline protease from Bacillus subtilis TISTR 25 was performed by selecting the optimum formulation of the medium which would used by as basic formulation of carbon and nitrogen sources. The results showed that the suitable composition of the medium for the highest enzyme activity composed of 0.1% KH_2PO_4, 0.05% $MgSO_4$, 0.001% $CaCl_2$, 0.25% w/v glutinous rice starch and 2.0% w/v of a 1:1 combination of soybean meal and sunflower seed meal which was preliminary digested with 1 N sulfuric acid. Cultivation was performed at 37 °C, and was shaked with the speed of 250 rpm for 48 hours. The enzymatic activity was assayed at pH 10.5 which was the optimum pH for maximal catalytic activity of the enzyme. The enzyme was prepared in powder form by precipitating the crude enzyme broth with 70% $(NH_4)_2SO_4$ and dried at 45 °C for 8 - 12 hours. The enzyme powder can be stored between -20 to 30 °C for at least 120 days without loosing any activity. But the activity dropped to 85.2 and 52.5% if enzyme was stored at 45° and 60 °C for 120 days, respectively.

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2535 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์ ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา คอยให้คำแนะนำ และความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาที่ผู้เขียนศึกษาอยู่

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพาพร ลิมปเสนีย์ ที่กรุณาให้คำแนะนำต่อผู้เขียน รวมทั้งกรุณารับเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ คุณ สราวุธ วัฒนาศิริตระกูล ที่ช่วยเหลือในการจัดทำสไลด์ประกอบการเสนอวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณนิสิตหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต ในภาควิชาชีวเคมี และเทคโนโลยีชีวภาพที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาอนุเคราะห์ทุนอุดหนุนการวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และขอขอบคุณ ญาติพี่น้อง ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจแก่ผู้เขียนจนสำเร็จการศึกษา

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญรูป..... ญ

คำย่อ..... ฑ

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 ครุภัณฑ์ และเคมีภัณฑ์

2.1 ครุภัณฑ์..... 17

2.2 เคมีภัณฑ์..... 19

2.3 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง..... 20

2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง..... 20

3 วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมสารละลาย..... 21

3.2 การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง..... 25

3.3 การศึกษาการเจริญของเชื้อ..... 26

3.4 การหาสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ..... 26

3.5 การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส..... 26

3.6 การหา pH ที่เหมาะสมในการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส..... 27

3.7 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี..... 28

3.8 การหาปริมาณของไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl..... 28

3.9 การหาแหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสมจะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 29
3.10 การหาแหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสมจะใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 30
3.11 การขยายส่วนในการผลิตและการศึกษาหาสภาวะการเขย่าให้ อากาศที่เหมาะสม..... 30
3.12 การเตรียมเอนไซม์ในรูปผงและความเสถียรของเอนไซม์ ที่อุณหภูมิต่างๆ..... 31
4 ผลการทดลอง
4.1 การหาสูตรอาหารพื้นฐานที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ Bacillus subtilis TISTR 25..... 33
4.2 การหา pH ที่เหมาะสมในการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์..... 35
4.3 การคัดเลือกวัตถุดิบที่เหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งต้นตอ ไนโตรเจน..... 35
4.4 การคัดเลือกวัตถุดิบที่เหมาะสมในการใช้เป็นแหล่งต้นตอ คาร์บอน..... 51
4.5 การขยายส่วนในการผลิตและการศึกษาหาสภาวะการเขย่า ให้อากาศที่เหมาะสม..... 62
4.6 การเตรียมเอนไซม์รีปรตีเอสในรูปผงและการเก็บรักษาเอนไซม์ ที่สภาวะอุณหภูมิต่างๆ..... 65
5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 70
เอกสารอ้างอิง..... 83
ภาคผนวก..... 90
กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีลอรี..... 90
กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณไทโรซีน..... 91
วัตถุดิบที่ใช้ในการศึกษา..... 92
ประวัติผู้เขียน..... 94

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงมูลค่าและส่วนแบ่งทางการตลาดของเอนไซม์โปรตีเอสที่ได้จาก พืช สัตว์ และจุลชีพต่างๆ.....	2
2	แสดงมูลค่าและส่วนแบ่งทางการตลาดของเอนไซม์โปรตีเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ.....	3
3	การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์โปรตีเอสในทางอุตสาหกรรม.....	4
4	ผลของ pH และ EDTA ในการตรวจสอบแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสจากเชื้อ B. subtilis TISTR 25.....	36
5	ผลการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนรวมและโปรตีนทั้งหมดของวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน.....	45
6	การเตรียมเอนไซม์โปรตีเอสในรูปผงโดยวิธีต่างๆ.....	67
7	แอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอสผงที่เตรียมโดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซนต์ เปรียบเทียบระหว่างการเติมผงเซลลูโลส 0.5 เปอร์เซนต์ และไม่เติมเซลลูโลส.....	67
8	ผลการเก็บรักษาเอนไซม์โปรตีเอสผงซึ่งเตรียมโดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 70 เปอร์เซนต์.....	69

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1ก	การเจริญ แอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส และรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่ 1.....	34
1ข	การเจริญ แอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีเอส และรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสูตรที่ 2.....	34
2	ค่า pH ที่เหมาะสมในการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 โดยเปรียบเทียบระหว่างการเติม EDTA 5 mM กับไม่เติม EDTA.....	37
3ก	เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนในปริมาณต่างๆ.....	39
3ข	เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอส เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนในปริมาณต่างๆ.....	39
3ค	เปรียบเทียบรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนในปริมาณต่างๆ.....	40
4ก	เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี 2 เปอร์เซนต์ สารสกัดจากยีสต์ หรือวัตถุดิบชนิดต่างๆซึ่งย่อยสลายด้วยกรด เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน....	41

4ข เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จากเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 ในอาหารที่มี 2 เปอร์เซนต์สารสกัดจากยีสต์ หรือวัตถุดิบชนิดต่างๆซึ่งย่อสลายด้วยกรด เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน..... 41

4ค เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลง pH เมื่อเลี้ยง *B. subtilis* TISTR 25 ในอาหารที่มี 2 เปอร์เซนต์ สารสกัดจากยีสต์ หรือวัตถุดิบชนิดต่างๆซึ่งย่อยสลายด้วยกรด เป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน..... 42

5ก เปรียบเทียบการเจริญของ *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบต่างๆที่ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยกรดเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน..... 43

5ข เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบชนิดต่างๆที่ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยกรดเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน..... 43

5ค เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลง pH เมื่อเลี้ยง *B. subtilis* TISTR 25 ในอาหารที่มีวัตถุดิบชนิดต่างๆที่ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยกรดเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน..... 44

6ก เปรียบเทียบการเจริญของ *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมชนิดต่างๆเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน..... 47

6ข เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *B. subtilis* TISTR 25 ในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมชนิดต่างๆเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน..... 47

6ค เปรียบเทียบรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH ระหว่างการเลี้ยง *B. subtilis* TISTR 25 ในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมชนิดต่างๆเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจน..... 48

7ก เปรียบเทียบการเจริญของ *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนในปริมาณต่างๆ..... 49

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7ข เปรียบเทียบแอคติวิตีเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนในปริมาณต่างๆ..... 49

7ค เปรียบเทียบรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH ระหว่างการเลี้ยง *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับกากเมล็ดทานตะวันเป็นแหล่งต้นตอไนโตรเจนในปริมาณต่างๆ..... 50

8ก เปรียบเทียบการเจริญของ *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในปริมาณต่างๆ..... 52

8ข เปรียบเทียบแอคติวิตีเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในปริมาณต่างๆ..... 52

8ค เปรียบเทียบรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH ระหว่างการเลี้ยง *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในปริมาณต่างๆ..... 53

9ก เปรียบเทียบการเจริญของ *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบชนิดต่างๆเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน..... 55

9ข เปรียบเทียบแอคติวิตีเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบชนิดต่างๆเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน..... 55

9ค เปรียบเทียบรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH ระหว่างการเลี้ยง *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบชนิดต่างๆเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน..... 56

10ก เปรียบเทียบการเจริญของ *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมชนิดต่างๆเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน..... 58

10ข เปรียบเทียบแอคติวิตีเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมชนิดต่างๆเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน..... 58

10ค เปรียบเทียบรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH ระหว่างการเลี้ยง *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบผสมชนิดต่างๆเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอน..... 59

11ก เปรียบเทียบการเจริญของ *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบแป้งข้าวเหนียวเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในปริมาณต่างๆ..... 60

11ข เปรียบเทียบแอคติวิตีเอนไซม์แอลคาไลน์โปรตีเอสที่ได้จาก *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบแป้งข้าวเหนียวเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในปริมาณต่างๆ..... 60

11ค เปรียบเทียบรูปแบบการเปลี่ยนแปลง pH ระหว่างการเลี้ยง *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีวัตถุดิบแป้งข้าวเหนียวเป็นแหล่งต้นตอคาร์บอนในปริมาณต่างๆ..... 61

12ก เปรียบเทียบการเจริญของ *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อให้ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศต่างๆกัน..... 63

12ข เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์ที่ได้จาก *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อให้ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศต่างๆกัน..... 63

12ค เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลง pH เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TISTR 25 เมื่อให้ความเร็วรอบในการเขย่าให้อากาศต่างๆกัน..... 64

คำย่อ

มก.	=	มิลลิกรัม
^{o}ซ	=	องศาเซลเซียส
Enz.Act.	=	Enzyme Activity
ml	=	milliliter
U/g	=	Units/gram
mM	=	millimolar
rpm	=	revolution per minute
µg	=	microgram