

การผลิตแอนติไบนีโปรตีนจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25  
ในระดับถังหมัก 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง



นางสาว วรณวิมล ทรัพย์ดี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ  
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-638-695-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**PRODUCTION OF ALKALINE PROTEASE FROM  
*Bacillus subtilis* TISTR 25 IN A BATCH CULTURE FERMENTER**



**Miss Wanwimon Thabdee**

**สถาบันวิทยบริการ**  
**จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Biotechnology**

**Programme of Biotechnology**

**Graduate School**

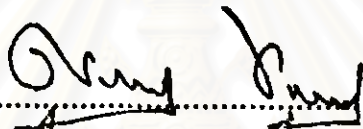
**Chulalongkorn University**

**Academic Year 1997**


**ISBN 974-638-695-6**

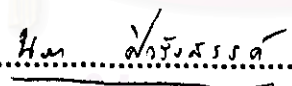
หัวข้อวิทยานิพนธ์      การผลิตแอลกอฮอล์โปรตีนเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25  
                                      ในระดับถังหมัก 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง  
โดย                            นางสาว วรรณวิมล ทรัพย์ดี  
สาขาวิชา                    เทคโนโลยีทางชีวภาพ  
อาจารย์ที่ปรึกษา            ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์  
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม      ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์  
                                      ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นักวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่ง  
ของการศึกษาหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

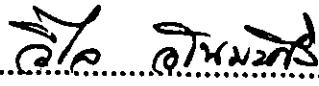
  
.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุภวัฒน์ สุดิวงส์)


คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

  
.....ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ทิมปานี)

  
.....อาจารย์ที่ปรึกษา  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์)

  
.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

  
.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ)

  
.....กรรมการ  
(อาจารย์ ดร. มัญจมาศ เฮงสกุล)

วรรณวิมล ทรัพย์ดี : การผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25  
ในระดับถังหมัก 5 ลิตร แบบไม่ต่อเนื่อง (PRODUCTION OF ALKALINE PROTEASE  
FROM *Bacillus subtilis* TISTR 25 IN A BATCH CULTURE FERMENTER)

อ.ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์, อ.ที่ปรึกษาร่วม:

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ,  
117 หน้า. ISBN 974-638-695-6

*Bacillus subtilis* TISTR 25 สามารถผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอสได้ในปริมาณสูงเมื่อเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารที่ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % (w/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 % (w/v),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001 % (w/v), แยมันสำปะหลัง 0.1 % (w/v) และกากตัวเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับ 0.3 % (v/v) ในปริมาตรทั้งสิ้น 3.5 ลิตร ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักในการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอส คือ ใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1 vvm., อัตราเร็วในการกวนเท่ากับ 250 รอบต่อนาที, อุณหภูมิในการเลี้ยงเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส, pH เริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด 174.82 ยูนิต/กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในชั่วโมงที่ 84

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา .....  
สาขาวิชา .....  
ปีการศึกษา ..... 2540

ลายมือชื่อนิติกร .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

## C727103

BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: MAJOR FERMENTATION OF *Bacillus spp.* / ALKALINE PROTEASE

WANWIMON THABDEE : PRODUCTION OF ALKALINE PROTEASE FROM *Bacillus subtilis* TISTR 25 IN A BATCH CULTURE FERMENTER. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. NAPA SIWARUNGSON, THESIS CO-ADVISOR : ASSIST.PROF. SIRIRAT RENGPIPAT, Ph.D., ASSIST.PROF. WILAI ANOMASIRI, Ph.D. 117 pp. ISBN 974-638-695-6

*Bacillus subtilis* TISTR 25 can produce high amount of alkaline protease in 5 liter fermenter. Culture medium contains  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % ( w/v ),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 % ( w/v ),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001 % ( w/v ), Cassava starch 0.1 % ( w/v ) and mixture of soy bean meal and sunflower seed meal with nitrogen content 0.3 % ( v/v ) in total volume of 3.5 liter. The optimal conditions for culturing were as follows : inoculum size at 0.5 % ( 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 174.82 unit/ gram cell dry weight. at 84 hours.

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา..... นายมือชื่อนิต.....  
สาขาวิชา..... นายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....  
ปีการศึกษา..... นายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษารวม.....

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นภา ศิวรังสรรค์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริวิทย์ เสง พิพัฒน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ ที่ได้กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม คอยให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็นต่างๆ และความช่วยเหลือทุกด้านตลอดระยะเวลาในการทำวิจัย รวมทั้งช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิพาพร ลิมปเสนีย์ ที่ได้กรุณาเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และ อาจารย์ ดร. มัญจุมาส เสงสกุล ที่ได้กรุณาเป็นกรรมการสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาเชื้อเพื่อสถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมี ที่ใช้ในการวิจัย รวมทั้งเจ้าหน้าที่ ภาควิชาชีวเคมีทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกระหว่างการทำวิจัย

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับทุนอุดหนุนการวิจัย

ขอขอบคุณ พี่ๆ น้องๆ ชาวศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือทั้งด้านกำลังใจ และความสะดวกในการใช้อุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยด้วยดีตลอดมา และคุณวิรัช ธรรมวินิจัย ที่ได้กรุณาถ่ายสไลด์ประกอบการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ เพื่อนๆ น้องๆ ชาวชีวเคมี และเทคโนโลยีทางชีวภาพทุกท่าน โดยเฉพาะ วิไลล์ แก้วโมง ใสเต้ แม้ว จี นก เปรม แอ๊ด บี เดียร์ เจียบ แอนนี่ ซิน ปอ นะ ที่ได้ช่วยให้กำลังใจ ความช่วยเหลือในทุกๆด้าน

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ ซึ่งล่วงลับไปแล้ว แต่ช่วงเวลาที่ท่านมีชีวิตอยู่ท่านได้ให้กำลังใจและความรักตลอดเวลา ขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่ ที่เคารพรัก พี่ๆ หลานๆ ที่รักทุกท่านที่คอยให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือ ความเข้าใจทั้งกำลังกาย กำลังทรัพย์ และความรัก ตลอดมาจนสำเร็จการศึกษา

## สารบัญ

หน้าที่

บทคัดย่อภาษาไทย	.....	๖
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	.....	๖
กิตติกรรมประกาศ	.....	๗
สารบัญ	.....	๗
สารบัญตาราง	.....	๗
สารบัญรูป	.....	๗
คำย่อ	.....	๗
บทที่		
1	บทนำ	..... 1
	ชนิดและสมบัติของเอนไซม์โปรตีเอส	..... 3
	การสร้างเอนไซม์และความสำคัญ	..... 8
	ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตแอลคาไลน์โปรตีเอส	..... 9
	ประโยชน์และความสำคัญของแอลคาไลน์โปรตีเอสในด้านอุตสาหกรรม	..... 13
	มูลเหตุจูงใจในการทำวิจัย	..... 15
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	..... 19
2	ครุภัณฑ์และเคมีภัณฑ์	
	ครุภัณฑ์	..... 20

บทที่	หน้าที่
เคมีภัณฑ์	22
วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง	23
แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง	24
3 วิธีการทดลอง	
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	25
การเตรียมสารละลาย	28
การเก็บรักษาแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลอง	31
การศึกษาการเจริญของเชื้อ	31
การวัดแอลคาไลน์โปรตีนเอสแอกติวิตี	32
การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl	34
การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีของ Nelson	35
การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford	35
การเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์บางส่วนและทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ผง โดยเก็บที่อุณหภูมิต่างๆ	35
การทดสอบแอกติวิตีของเอนไซม์ผงในช่วง pH ต่างๆ เมื่อมี EDTA และไม่มี EDTA	36
4 ผลการทดลอง	
การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรตีนเอสของ <i>Bacillus subtilis</i> TISTR 25 ในถึงหมักขนาด 5 ลิตร	38



บทที่

หน้าที่

รูปแบบการเปลี่ยน pH การเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรตีน.....	38
ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ .....	39
ผลของอัตราการให้อากาศ .....	46
ผลของอัตราเร็วในการกวน .....	51
ผลของอุณหภูมิของอาหารเลี้ยงเชื้อ .....	57
ผลของ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	62
ผลของปริมาณของแหล่งคาร์บอน .....	68
ผลของปริมาณของแหล่งไนโตรเจน .....	73
การเตรียมแอลคาไลน์โปรตีนให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟตและนำมาทำเป็นเอนไซม์ผง .....	79
การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเอนไซม์ระยะยาว.....	80
การตรวจหาโปรตีนแอกติวิตีของเอนไซม์ผงที่ pH ต่างๆกันเมื่อมี EDTA และไม่มี EDTA .....	83
5 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง .....	86
รายการอ้างอิง .....	99
ภาคผนวก .....	107
กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไทโรซีน .....	108
กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Nelson.....	113
กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน โดยวิธี Bradford. ....	114

หน้าที่

การเตรียมสารละลายฟเฟอร์สำหรับตรวจวัด โปรตีนเอสแอกติวิตี..... 115

ประวัติผู้เขียน ..... 117



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้าที่
1	ข้อมูลการนำเข้าของเอนไซม์ทุกชนิดของประเทศไทยตั้งแต่ปี 1991 - 1997..... 16
2	การทำให้แอตคาไลน์โปรตีนบริสุทธิ์บางส่วนตามขั้นตอนต่างๆ..... 80
3	ผลการเก็บรักษาแอตคาไลน์โปรตีนอส孚ที่อุณหภูมิต่างๆ..... 82
4	ผลของสารยับยั้ง EDTA ต่อการทำงานของเอนไซม์ผงจาก <i>Bacillus subtilis</i> TISTR 25 ..... 85
5	เปรียบเทียบปัจจัยที่ศึกษาในระดับขวดเขย่าและในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร ..... 95

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญรูป

- | รูปที่ | หน้าที่  |
|--------|--|
| 1      | <p>การเจริญและ pH ของ <i>Bacillus subtilis</i> TISTR 25 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math> 0.1 % (w/v), <math>\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math> 0.05 % (w/v), <math>\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}</math> 0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v) โดยไม่มีการควบคุม pH ตลอดการทดลอง..... 41</p>  |
| 2      | <p>เปรียบเทียบการเจริญของ <i>Bacillus subtilis</i> TISTR 25 เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้เป็น 0.1 %, 0.5 %, 1.0 % และ 3.0 % (v/v) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math> 0.1 % (w/v), <math>\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math> 0.05 % (w/v), <math>\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}</math> 0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0..... 42</p>                                      |
| 3      | <p>เปรียบเทียบแอกติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีนเอสที่ได้จากการเลี้ยง <i>Bacillus subtilis</i> TISTR 25 เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้เป็น 0.1 %, 0.5 %, 1.0 % และ 3.0 % (v/v) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย <math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math> 0.1 % (w/v), <math>\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math> 0.05 % (w/v), <math>\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}</math> 0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0..... 43</p> |

- 4 เปรียบเทียบปริมาณน้ำคาลทิวต์ในอาหารเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผัน ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้เป็น 0.1 %, 0.5 %, 1.0 % และ 3.0 % (v/v) โดยเลี้ยงในอาหาร เลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % (w/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 % (w/v),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมถุนคั้นใน สัตส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อัตราเร็วใน การกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0  
..... 44
- 5 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรตีนจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 0.1 %, 0.5 %, 1.0 % และ 3.0 % (v/v) ในช่วงเวลาที่ 84 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % (w/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05% (w/v),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสม กากเมถุนคั้นที่มิไนโตรเจน 0.3 % (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อัตราเร็วใน การกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0..... 45
- 6 เปรียบเทียบการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 vvm., 1.0 vvm., และ 1.5 vvm. โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % (w/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 % (w/v),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมถุนคั้นในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0..... 47

- 7 เปรียบเทียบแอกติวิตีของแอกคาไลน์โปรตีนที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 vvm., 1.0 vvm., และ 1.5 vvm โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % (w/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 % (w/v),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001 % (w/v), แยมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0 ..... 48
- 8 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลทิวต์ในอาหารเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 vvm., 1.0 vvm., และ 1.5 vvm. โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % (w/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 % (w/v),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001 % (w/v), แยมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0 ..... 49
- 9 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตแอกคาไลน์โปรตีนจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศเป็น 0.5 vvm. , 1.0 vvm. และ 1.5 vvm. ในชั่วโมงที่ 84 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % (w/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 % (w/v),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001 % (w/v), แยมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อ

- เริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0 ..... 50
- 10 เปรียบเทียบการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันอัตราเร็วในการกวน เป็น 150 rpm., 250 rpm. และ 350 rpm. โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % (w/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 % (w/v),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0..... 53
- 11 เปรียบเทียบแอกติวิตีของแอลคาไลน์โปรติเอสที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันอัตราเร็วในการกวนเป็น 150 rpm., 250 rpm. และ 350 rpm. โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % (w/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 % (w/v),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0 ..... 54
- 12 เปรียบเทียบปริมาณน้ำคาวรีควีสในอาหารเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันอัตราเร็วในการกวนเป็น 150 rpm., 250 rpm. และ 350 rpm. โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % (w/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 % (w/v),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ด

- ทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0 ..... 55
- 13 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรตีนจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันอัตราเร็วในการกวนเป็น 150 rpm., 250 rpm. และ 350 rpm. ในชั่วโมงที่ 84 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % (w/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 % (w/v),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0..... 56
- 14 เปรียบเทียบการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเป็น 30 °C, 37 °C และ 40 °C โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % (w/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 % (w/v),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0..... 58
- 15 เปรียบเทียบแอกติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีนที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเป็น 30 °C, 37 °C และ 40 °C โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % (w/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 % (w/v),



- CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0 ..... 59
- 16 เปรียบเทียบปริมาณน้ำคาวฤทธิ์ในอาหารเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเป็น 30 °C, 37 °C และ 40 °C โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 % (w/v), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05 % (w/v), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0 ..... 60
- 17 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตออกคาไลน์โปรตีนจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันอุณหภูมิในการเลี้ยงเป็น 30 °C, 37 °C และ 40 °C ในชั่วโมงที่ 84 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 % (w/v), MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05 % (w/v), CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0 ..... 61

- 18      เปรียบเทียบการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผัน pH เริ่มต้นของอาหาร  
 เลี้ยงเชื้อเป็น 7.0, 8.0 และ 9.0 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 %  
 (w/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 % (w/v),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 %  
 (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 %  
 (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อัตราเร็วใน  
 การกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C ..... 64
- 19      เปรียบเทียบแอกติวิตีของแอกตาโทนีโปรตีนที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus subtilis*  
 TISTR 25 เมื่อแปรผัน pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0, 8.0 และ 9.0 โดยเลี้ยงใน  
 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % (w/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 % (w/v),  
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ด  
 ทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ  
 0.5 % (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิใน  
 การเลี้ยง 37 °C ..... 65
- 20      เปรียบเทียบปริมาณน้ำคาทรินิวตในอาหารเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25  
 เมื่อแปรผัน pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0, 8.0 และ 9.0 โดยเลี้ยงในอาหาร  
 เลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % (w/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 % (w/v),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
 0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวัน  
 ในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v),  
 อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm.,

- อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C ..... 66
- 21 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรตีนจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผัน pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0, 8.0 และ 9.0 ในช่วงเวลาที่ 84 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % (w/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 % (w/v),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001 % (w/v), แยมันสำปะหลัง 0.5 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C ..... 67
- 22 เปรียบเทียบการเจริญของ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันปริมาณของ แยมันสำปะหลังเป็น 0 %, 0.10 %, 0.25 %, 0.50 %, 0.75 % และ 1.00 % (w/v) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % (w/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 % (w/v),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มี ปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0 ..... 69
- 23 เปรียบเทียบแอกติวิตีของแอลคาไลน์โปรตีนที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันปริมาณของแยมันสำปะหลังเป็น 0 %, 0.10 %, 0.25 %, 0.50 %, 0.75 % และ 1.00 % (w/v) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 %

รูปที่

หน้าที่

- (w/v),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05 % (w/v),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.001 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0..... 70
- 24 เปรียบเทียบปริมาณน้ำคาลริคูลินในอาหารเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันปริมาณของแป้งมันสำปะหลังเป็น 0 %, 0.10 %, 0.25 %, 0.50 %, 0.75 % และ 1.00 % (w/v) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย  $KH_2PO_4$  0.1 % (w/v),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05 % (w/v),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.001 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0..... 71
- 25 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตแอลกอฮอล์โปรตีนจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันปริมาณของแป้งมันสำปะหลังเป็น 0 %, 0.10 %, 0.25 %, 0.50 %, 0.75 % และ 1.00 % (w/v) ในชั่วโมงที่ 84 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย  $KH_2PO_4$  0.1 % (w/v),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.05 % (w/v),  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.001 % (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0..... 72

- 26 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันปริมาณไนโตรเจน จากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 เป็น 0.1 % , 0.2 % , 0.3 % และ 0.4 % (v/v) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % (w/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 % (w/v),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001 % (w/v), ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 0.1 % (w/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0..... 75
- 27 เปรียบเทียบแอกติวิตีของแอกตาโตนโปรตีนที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันปริมาณไนโตรเจนจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 เป็น 0.1 % , 0.2 % , 0.3 % และ 0.4 % (v/v) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % (w/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 % (w/v),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001 % (w/v), ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 0.1 % (w/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0..... 76
- 28 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผัน ปริมาณไนโตรเจนจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 เป็น 0.1 % , 0.2 % , 0.3 % และ 0.4 % (v/v) โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % (w/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 % (w/v),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001 % (w/v), ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 0.1 % (w/v), ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราการให้อากาศ

- 1.0 vvm., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0 ..... 77
- 29 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตแอลคาไลน์โปรตีนจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อแปรผันปริมาณไนโตรเจนจากกากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวัน ในสัดส่วน 1:1 เป็น 0.1 % , 0.2 % , 0.3 % และ 0.4 % (v/v) ในชั่วโมงที่ 84 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % (w/v) ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 % (w/v) ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001 % (w/v) , แป้งมันสำปะหลัง 0.10% (w/v) , ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm., อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C, pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเท่ากับ 7.0..... 78
- 30 แสดงการเจริญ, แอลคาไลน์โปรตีนแอสคิติวิตี, น้ำตาลรีดิวซ์ ในการเลี้ยง *Bacillus subtilis* TISTR 25 ในสูตรอาหารที่ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 % (w/v),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 % (w/v),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001 % (w/v), แป้งมันสำปะหลัง 0.10% (w/v), กากถั่วเหลืองผสมกากเมล็ดทานตะวันในสัดส่วน 1:1 ที่มีปริมาณไนโตรเจน 0.3 % (v/v) , ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 % (v/v), อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm., อัตราเร็วในการกวน 250 rpm. , อุณหภูมิในการเลี้ยง 37 °C , pH เริ่มต้นในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ..... 81
- 31 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 เมื่อวัดแอสคิติวิตีของเอนไซม์ที่ 45 °C เป็นเวลา 20 นาที..... 84

## คำย่อ

°C	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์
µg	=	ไมโครกรัม
ml	=	มิลลิลิตร
vvm.	=	ปริมาณอากาศต่อปริมาณอาหารต่อนาที
rpm.	=	รอบต่อนาที
N	=	นอร์มอล
v/v	=	ปริมาณต่อปริมาณ
w/v	=	น้ำหนักต่อปริมาณ



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย