

สรุปผลการทดลอง

การทดลองหมัก *Bacillus* sp. A39 ในอาหารเหลว BMSM medium เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส เช่น ฟิเอช DO ปริมาณกลูโคสและ skimmed milk โดยดำเนินการหมักแบบ Batch culture และเพิ่มประสิทธิภาพในการหมักให้สูงขึ้น โดยใช้ constantly fed-batch culture ผลการทดลองสรุปได้ดังต่อไปนี้

1. *Bacillus* sp. A39 สามารถเจริญได้ในช่วงฟิเอช 7.5 ถึง 10 แต่ฟิเอชที่เหมาะสมที่สุดต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสคือ 9.5

2. ความเข้มข้นของออกซิเจนละลาย (dissolved oxygen, DO) ที่เหมาะสมคือ 80 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว ทำให้ได้ค่า μ และ q_p เท่ากับ 0.472 h^{-1} และ $20,869 \text{ units/g cell.h}$ แต่ถ้าเพิ่มค่า DO เป็น 90 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว จะทำให้ μ และ q_p ลดลง ซึ่งอาจเกิดจาก overoxygenation

3. สำหรับแหล่งอาหารที่สำคัญของ *Bacillus* sp. A39 ได้ศึกษาปริมาณกลูโคสและ skimmed milk ผลการทดลองมีดังนี้

3.1 ปริมาณกลูโคสที่เหมาะสม คือ 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะทำให้ค่า μ และ q_p สูงสุด คือ 0.511 h^{-1} และ $23,556 \text{ units/g cell.h}$ ตามลำดับ การเติมกลูโคสต่ำกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้ A39 มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานไม่เพียงพอ แต่ถ้าเติมมากเกินไป คือ 3 และ 4.5 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้เกิด overfeeding อัตราการเจริญและการผลิตเอนไซม์ต่ำลง ซึ่งเกิดกับการผลิตเอนไซม์และยาปฏิชีวนะหลายชนิด

3.2 skimmed milk เป็นอาหารซึ่งมี casein เป็น โปรตีนสำคัญและเป็นสารเหนียวนำไปให้เกิดการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. A39 ความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลองคือ 0.25 เปอร์เซ็นต์

4. รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของ *Bacillus* sp. A39 ในการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture จะคล้ายกันมาก ช่วงแรกเป็นช่วง growth phase มีการเจริญของเซลล์เป็นหลัก เริ่มจากเซลล์จะเข้าสู่ระยะ exponential phase ชั่วโมงที่ 6 ถึง 10 ที่กลางหรือปลายระยะนี้เริ่มมีการสร้างเอนไซม์

เล็กน้อย ช่วงที่ 2 เป็นช่วง enzyme production phase เริ่มจากเซลล์เข้าสู่ระยะ deceleration phase ณ ชั่วโมงที่ 10 ถึง 14 จะมีการสร้างเอนไซม์ในอัตราสูงสุด และหยุดลงเมื่อกลูโคส ซึ่งเป็น limiting substrate ในการทดลองนี้หมด แต่หากยังมีเหลือเพียงพอ เช่น ที่กลูโคส 3 และ 4.5 เปอร์เซ็นต์ จะมีการสร้างเอนไซม์ต่อเนื่องไปจนถึงระยะ stationary phase จนกลูโคสหมดหรือสารอาหารอื่นที่จำเป็นต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ คือ skimmed milk หมดลง รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์ลักษณะนี้มีแนวโน้มเป็น growth associate pattern

5. ในการศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยบางอย่างที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยง โดยวิธี constantly fed-batch ได้ผลการทดลองดังนี้

5.1 ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเริ่มเติมอาหารใหม่ลงในถังหมัก พบว่าเมื่อการเจริญของเชื้อในการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ (batch culture) อยู่ deceleration phase จะเป็นช่วงที่เหมาะสมที่สุด เพราะอาหารที่เติมจะถูกนำไปใช้ในการผลิตเอนไซม์ได้มากกว่าการเจริญ

5.2 เมื่อใช้ BMSM medium ที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่า และมีกลูโคส 4 เปอร์เซ็นต์ เป็นอาหารใหม่ที่จะนำมาเติมในถังหมัก และใช้ค่าอัตราการเจือจาง (dilution rate, D) 0.05 h^{-1} ปรากฏว่าได้ค่า μ และ q_p สูงสุด คือ 0.048 h^{-1} และ $28,484 \text{ units/g cell.h}$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ batch culture ที่สภาวะกลูโคส 2 และ 4.5 เปอร์เซ็นต์ จะมี total alkaline protease activity สูงกว่า 4.5 และ 1.18 เท่า ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อพิจารณาที่เวลาในการเพาะเลี้ยงจะสั้นกว่าของกลูโคส 4.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ใช้เวลาถึง 68 ชั่วโมง แต่แบบ fed-batch culture ณ สภาวะนี้ใช้เวลาเพียง 30 ชั่วโมง สั้นกว่า 38 ชั่วโมง

ข้อเสนอแนะและแนวทางแก้ไข

1. การศึกษาและการทดลองที่กล่าวมาสามารถปรับปรุงการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus* sp. A39 ในถังหมักให้มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นในระดับหนึ่ง โดยการหมักแบบ constantly fed-batch culture ซึ่งพบว่าการรักษาหรือควบคุมอัตราการเจริญให้เหมาะสมและคงที่ตลอดการทดลอง จะทำให้มีการสร้างเอนไซม์ในอัตราที่ควบคุมได้ เห็นได้ชัดเจนในการทดลองใช้ความเข้มข้นของสับสเตรทเป็น 2 เท่าของปกติ ซึ่งมีผลให้การสร้างเอนไซม์มีประสิทธิภาพมากขึ้น และคาดว่าถ้ามีการเพิ่มความเข้มข้นของ BMSM medium และกลูโคสต่อไปจะมีแนวโน้มที่ดีขึ้น แต่อาจทำได้ในระดับหนึ่งเท่านั้น เนื่องจากมีข้อจำกัดในเรื่องการเตรียมอาหารที่ไม่สามารถเตรียมได้ในความเข้มข้นสูงๆ เนื่องจากสารบางชนิด โดยเฉพาะเกลือที่ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถละลายได้สูงสุดเพียง 4 g/L เท่านั้น

2. การใช้เทคนิคการเติมอาหารแบบอื่นๆ เช่น การใช้การเติมอาหารแบบ exponential fed-batch ที่สามารถควบคุมอัตราการเจริญจำเพาะได้ ทำให้ควบคุมหรือคาดการณ์ผลการสร้างเอนไซม์ได้ หรือแบบ intermittent addition ที่มีการเติมเป็นระยะๆ โดยเฉพาะ skimmed milk ที่เป็นสารเหนียวนำการสร้างเอนไซม์ หรือการเพาะเลี้ยงแบบ continuous culture สามารถควบคุมค่า μ ได้น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถปรับปรุงการเพาะเลี้ยงเพื่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ให้มีประสิทธิภาพต่อไปได้ แต่การหมักแบบ continuous culture มีปัญหาเกี่ยวกับการปนเปื้อน เนื่องจากใช้เวลาการหมักที่ยาวนานมาก

3. อาจมีการใช้สภาวะกลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ ในการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture เป็นสภาวะที่เหมาะสมแทนการใช้กลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากมีค่าผลได้ของเอนไซม์สูงกว่ามาก แม้ว่า q_p จะต่ำกว่า ซึ่งอาจได้ผลที่ดีขึ้นได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กัญจนนา วีระกุล. 3537. เอกสารประกอบการสอนวิชาสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ (419451) และ สรีรวิทยาของแบคทีเรีย (419551). ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, ม. เกษตรศาสตร์.
- จุฑาทพร แสงแก้ว. 2543. การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ อัลคาไลน์โปรติเอส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สมใจ ศิริโชค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ, กรุงเทพฯ.
- สุดธิดา แสงยนต์. 2545. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส. รายงานปัญหาพิเศษ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Aoyama, M., M. Yasuda, K. Nakachi, N. Kohamoto, H. O. Ok and F. Kato. 2000. Soybean-milk-coagulating activity of *Bacillus pumilus* derives from a serine proteinases. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 53: 390-395.
- Banerjee, U. C., R. K. Sani, W. Azmi and R. Soni. 1999. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as laundry detergent additive. **Process Biochem.** 35: 213-219.
- Barret, A. J. 2001. Proteolytic enzymes: nomenclature and classification, pp. 1-21. In R. Beynon and J. S. Bond, eds. **Proteolytic Enzymes**. 2nd ed. Oxford University. Press Inc, Newyork.
- Beg, Q. K. and R. Gupta. 2003. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavenis*. **Enzyme Microb. Technol.** 32: 294-304.

- Beg, Q. K., R. K. Saxena and R. Gupta. 2002. De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed-batch operation. **Process Biochem.** 37: 1103-1109.
- Brown, A. 1990. Fed-batch and continuous culture. Pp 113-130. B. Maneil and L. M. Harvey. Eds. **Fermentation a practical approach.** Oxford university Press. 226 pp.
- Budaveri, S. 1996. **Merck Index: an encyclopedia of chemical, drug and biological.** 12th. Whitehouse Station.
- Calik, P., E. Bilir, G. Calik and T. H. Ozdamar. 2002. Influence of pH conditions on metabolic regulation in serine alkaline protease production by *Bacillus licheniformis*. **Enzyme Microb. Technol.** 31: 685-697.
- _____, G. Calik, S. Takac and T. H. Ozadamar. 2000a. Metabolic flux analyses for serine alkaline protease production. **Enzyme Microb. Technol.** 27: 793-805.
- _____, N. Kalender and T. H. Ozadamar. 2003. Overexpression of serine alkaline protease encoding gene in *Bacillus* species: performance analyses. **Enzyme Microb. Technol.** 33: 967-974.
- _____, S. takac, G. Calik and T. H. Ozadamar. 2000b. Serine alkaline protease overproduction capacity of *Bacillus licheniformis*. **Enzyme Microb. Technol.** 26: 45-60.
- _____ and T. H. Ozadamar. 2001. Carbon source affect metabolic capacities of *Bacillus* species for the production of industrial enzymes: theoretical anlyses for serine and neutral protease and α -amylase. **Biochem. Bioeng.** 8: 61-81.
- Chapin, M. F. and C. Bucke. 1990. **Enzyme Technology.** The Press Syndicate of the University, Cambridge. 264 pp.

- Chakrabarti, S. K., N. Natrumura and R. S. Ranu. 2000. Purification and characterization of extracellular Serine protease from *Aspergillus terreus* IJIRA 6.2. **Curr. Microbiol.** 40: 239-244.
- Cheryan, M. 1986. **Ultrafiltration Hand book.** Lancaster, PA: Technomic Publishing Co. Inc.
- Dalev, P. G. 1994. Utilization of waste feather from poultry slaughter for production of a protein concentration. **Bioresorce Technol.** 48: 265-267.
- Dayanandan, A., J. Kanagaraj, L. Sonderraj, R. Govindaraj and G. Sureela Rajkuma. 2003. Application of an alkaline protease in leather processing: an ecofriendly approach. **Journal of Cleaner Production.** 11: 533-536.
- Dunn, B. N. 2001. Proteolytic enzymes: nomenclature and classification, pp. 1-21. In R. Beynon and J. S. Bond, eds. **Proteolytic Enzymes.** 2nd ed. Oxford university. Press Inc, Newyork.
- D'soza, D. R. Kaur, S. Pajni and P. Sharma. 1997. Isolation of thermophilic bacteria using bacteriological grade agar at temperature above 80 °C. **Bio. Techniques.** 22: 1072-1078.
- Elibol, M. and A. R. Moreira. 2003. Production of extracellular alkaline protease by immobilization of the marine bacterium *Teredinobacter tarnirae*. **Process Biochem.** 38: 1445-1450.
- Feng, Y. Y., W. B. Yang, S. L. Ong, J. Y. Hn and W. J. Gg. 2001. Fermentation of starch for enhanced alkaline protease production by constructing an alkalophilic *Bacillus pumilus* strain. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 57:153-160.
- Ferrero, M. A., G. R. Cartro, C. M. Abate, M. B. Baigori and F. Sineriz. 1996. Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: Isolation prodction and charaterization. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 45: 327-332.

- Frankena, J., G. M. Koningstein, H. W. Van Verseveld and A. H. Stouthamer. 1986. Effect of different limitations in chemostat cultures on growth and production of exocellular protease by *Bacillus licheniformis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 24: 106-112.
- Fu, Z., B. T. Suhali, A. B. Hamid, Che Nyonya, A. Razak, Mahiran Barsi, Abu Bakar Salleh and Raja Noor Zaliha Abd Rahman. 2003. Secretory expression in *Escherichia coli* and single-step purification of heat-stable alkaline protease. **Protein Expression and Purification.** 28: 63-68.
- George, S., B. Sivasankar, K. Jayaraman and M. A. Vijayalakshmi. 1997. Production and separation of the methionine-rich fraction from chick pea protein hydrolysate generated by protease of *Bacillus amyloliquefaciens*. **Process Biochem.** 32: 401-404.
- Gessesse, A., R.H.Kaul, B.A.Gassbe and Bo.Mattiasson. 2003. Novel alkaline protease from alkalophilic bacteria grown on chicken feature. **Enzyme Microb. Technol.** 32: 519-524.
- Grant, W. D., A. A. Mills and A. K. Schofield. 1979. An alkalophilic species of *Ectothiorhodospira* from a Kenyan soda lake. **J. Gen. Microbiol.** 110:137-142.
- Gupta, R., Q.K. Beg and P. Lorenz. 2002. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 59: 15-32.
- Gupta, R., R. K. Saxzena and S. Khan. 1999. Bleach-stable, alkaline protease from *Bacillus* sp. **Biotechnol. Lett.** 21: 135-138.
- Hirose, Y. 1986. Biochemical effect of oxygen supply and carbondioxide removal. In K. Aida, I. chihata, K. Nakayama, K. Takinami and H. Yamada. Eds. **Progress in Industrial microbiology.** 24: biotechnology of amino acid production. pp 340. Elsevier, Newyork, Tokyo.
- Horikoshi, K. 1991. **Microorganism in Alkaline Environments.** Kodansha Ltd., Tokyo. 275 pp.

- Johnversly, B. and G. R. Naik. 2001. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. **Process Biochem.** 37: 139-144.
- Joo, H. S., G. C. Park, K. M. Kim, S. R. Paik and C. S. Chang. 2001. Novel alkaline protease from the polychaeta, *Periserrula leucophryna*: Purification and characterization. **Process Biochem.** 36: 893-900.
- Jorgenzen, P. L. , M. Tangney, P. E. Pedersen, S. Hastrup, B. Diderichsen and S. T. Jorgensen. 2000. Cloning and sequencing of an alkaline protease gene from *Bacillus lentus* and amplification of the gene on the *B. lentus* chromosome by an improved Technique. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 825-827.
- Kobayashi, T., Y. Hakamata, K. Koike and S. Ito. 1996. Purification of alkaline protease from a *Bacillus* strain and their possible interrelationship. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 45: 63-71
- Kobayashi, T., Y. Hakamada, S. Adachi, J. Hitomi, T. Yoshimats, K. Koike, S. Kawai and S. Ito. 1995. Prification and properties of an alkaline protease from alkalophilic *Bacillus* sp. KSM-K16. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 43: 473-481.
- Krulwich, T. A. 1986. Bioenergetics of alkalophilic bacteria. **J. Membrane. Biol.** 89: 113-125.
- Krulwich, T. A. and A. A. Guffanti. 1983. Physiology of acidophilic and alkalophilic bacteria. **Adv. Microb. Physiology.** 24: 173-214.
- Krulwich, T. A. and A. A. Guffanti. 1989. Alkalophilic bacteria. **Ann. Rev. Microbiol.** 43: 435-463.
- Kumar, C. G. and H. Takagi. 1999. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. **Biotechnol. Adv.** 17: 561-594.

- Lowry, O.H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1991. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.
- Merhotra, S., P. K., Pandey, R. Gaur and N. S. Darwal. 1999. The production of alkaline protease by a *Bacillus* species isolate. **Bioresource. Technol.** 67: 201-203.
- Moat, A. G. and J. W. Foster. 1995. **Microbial Physiology**. 3rd. A John Wiley&Sons, Inc., Publication.
- Moon, S. H. and S. J. Parulekar. 1991. A parametric study of protease production in batch and fed-batch culture of *Bacillus firmus*. **Biotechnol. Bioeng.** 37: 467-483.
- Morihara, K. 1974. Comparative specificity of microbial proteinases. **Adv. Enzymol.** 41:179-243.
- Nelson, N. 1994. A photometric adaption of somogyi method for the determinations of glucose. **J. Biol. Chem.** 153: 375-380.
- Neurath, H. 1989. Proteolytic enzymes: nomenclature and classification, pp. 1-12. In R. Beynon and J. S. Bond, eds. **Proteolytic Enzymes**. Oxford university. Press Inc, Newyork.
- Patke, D. and S. Dey. 1998. Proteolytic activity from thermophilic *Streptomyces megasporus* strain SD P4. **Let. Appl. Microb.** 26: 171-174.
- Parekh, S., V. A. Vinci and R. J. Strobul. 2000. Improvement of microbial strains and fermentation process. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 54: 287-301.
- Parulekar, S. J. and H.C. Lim. 1972. Modeling, optimization and control of semi-batch bioreactors: **Adv. Biochem. Biotechnol.** 50: 207-215.

- Pentinate, S. D. G., M. H. Branquinha, R. Coelho, A. B. Vermelho and S. Giovanni-De-Simone. 1999. Purification of an extracellular serine-proteinase of *Streptomyces cyaneus* isolated from Brazilian cerrado soil. **J. Appl. Microbiol.** 87: 557-563.
- Phadtare, S., M. Rao and V. Deshpanda. 1997. A serine alkaline protease from the fungus *Conidiobolus coronatus* with a distinctly different structure than the serine protease Subtilisin Carlsberg. **Arch. Microbio.** 166: 414-417.
- Putten, A. B., F. Spitzenberger, G. Kretzmer, B. Hitmann, M. Dors, R. Simutis and K. Schugerl. 1996. Improvement of the production of Subtilisin Carlsberg alkaline protease by *Bacillus licheniformis* by on-line process monitoring and control in a stirred reactor. **J. Biotechnol.** 49: 83-93.
- Singh, J., N. Batra and R. C. Sobti. 2001. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSP1. **Process Biochem.** 36: 781-785.
- Singh, J., R. M. Vohra and D. K. Sahoo. 1999. Alkaline protease from new obligate alkalophilic isolate of *Bacillus sphaericus*. **Biotechnol. Lett.** 21: 921-924.
- _____, _____, _____. 2004. Enhance productions of alkaline protease by *Bacillus sphaericus* using fed-batch culture. **Process Biochem.** 39: 1093-1101.
- Stanbury, P. F., A. Whitaker and S. J. Hall. 1999. **Principle Fermentation Technology.** 7th. MPG Books Ltd, Bodmin, Cornwall. 357 pp.
- Strach, M. A. and J. A. Hoch. 1993. Transition-state regulators: sentineles of *Bacillus subtilis* post-exponential phase gene expression. **Molecular Microbiol.** 7: 337-342.
- Taguchi, H and A. E. Humphrey. 1966. Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation system. **J Ferm Technol.** 44: 881-889.

- Takagi, H., M. Kondou, T. Hisatsaka, S. Nakamori, V. C. Tsai and M. Yamasaki. 1992. Effect of an alkaline elastase from an alkalophilic *Bacillus* strain on the tenderization of beef meat. **J. Agaric. Food. Chem.** 40: 2364-2368.
- Takami, H., T. Akiba and K. Horokoshi. 1992. Substrate specificity of thermstable alkaline protease from *Bacillus* sp. No. AH-101. **Biosci. Biotech. Biochem.** 56: 333-334.
- Taylor, M. M., D. G. Bailey and S. H. Fearheller. 1987. A review of the use of enzymes in the tannery. **J. Am. Leather. Chem. Assoc.** 31: 557-558.
- Tramper, J. and P.B. Poulsen. 2000. Enzymes as Processing aids and Final Products. pp. 55-90. In Adrie J. J. Straathof and Patrick Adlercre, eds. **Applied Biocatalysis**. 2nd ed. Hardwood academic publishers.
- Tunga, R., B. Shrivastava and R. Banerjee. 2003. Purification and characterization of protease solid-state cultures of *Aspergillus parasiticus*. **Process Biochem.** 38: 1553-1558.
- Tunga, R., Banejee and B. C. Battacharya. 1998. Optimizing some factors affecting protease production under solid-state fermentation. **Bioprocess. Eng.** 21: 135-138.
- Ulrich, E. G., G. Bierbaum., H. R. Spohn and C. Wandrey. 1991. Production of alkaline protease with *Bacillus licheniformis* in a controlled fed-batch process. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 35: 720-724.
- Wise, W. S. 1951. **The measurement of aeration of culture media.** J. Gen. Micro. 5: 167-177.
- Yamane, T. and S. Shimizu. 1984. Fed-batch techniques in microbial processes, pp. 147-195. In a fiechter, ed. **Advance in Biochemical Engineering and Biotechnology.**

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดลอง

1. **Basal medium agar pH 10.0 (BMSM agar) (ดัดแปลงจากจุฬาพร, 2543)**

ส่วนที่ 1

กลูโคส	10	g
ยีสต์เอกซ์แทรก (Biobasic)	5.0	g
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O)	1.3	g
แมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.2	g
วุ้น (Agar)	15.0	g
น้ำกลั่น (distilled water)	980	ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

ส่วนที่ 2

skimmed milk 10 เปอร์เซ็นต์ 50 ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ส่วนที่ 3

โซเดียมคาร์บอเนต 20 เปอร์เซ็นต์ 28 ml

ละลายโซเดียมคาร์บอเนตในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 100 ml ด้วย volumetric flask

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ผสมส่วนที่ 1 และ 2 ให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมส่วนที่ 3 ลงไปเขย่าให้เข้ากัน

หมายเหตุ ในการเตรียมแบบอาหารเหลวไม่ต้องเติมวุ้นลงไปเป็นส่วนผสมในส่วนที่ 1

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางเคมี

1. การวิเคราะห์ปริมาณไทโรซีนโดยวิธี Lowry's method (Lowry et al., 1954)

1.1 สารละลาย

1.1.1 สารละลาย A : สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 g และโซเดียมซिटเรต 1 g ในน้ำกลั่น 100 ml

1.1.2 สารละลาย B : ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 20.0 g และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4.0 g ในน้ำ 1 L

1.1.3 สารละลาย C : นำสารละลาย A มา 1 ml ผสมกับสารละลาย B 50 ml

1.1.4 สารละลาย D : สารละลาย 1 N Folin-ciocalte

1.1.5 สารละลายมาตรฐานไทโรซีน ชั่งไทโรซีนด้วยเครื่องชั่งสารอย่างละเอียด 0.1000 g ลงใน volumetric flask ขนาด 100 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 ml เก็บเป็นสารละลาย stock จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของไทโรซีนตั้งแต่ 20 ถึง 100 $\mu\text{g/ml}$

1.2 วิธีวิเคราะห์

1.2.1 หากกราฟมาตรฐานของไทโรซีน โดยเจือจางสารละลายมาตรฐานไทโรซีนให้มีความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 $\mu\text{g/ml}$

1.2.2 ใส่สารละลายตัวอย่างและสารละลายมาตรฐานไทโรซีน 0.5 ml ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอดส่วนหลอดควบคุมจะใช้น้ำกลั่นแทน

1.2.3 เติมสารละลาย C 2.5 ml ลงในตัวอย่าง ทิ้งไว้ 5 ถึง 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย D 0.25 ml ทิ้งไว้ 20 ถึง 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับหาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานแล้วคำนวณหาค่าปริมาณไทโรซีนที่มีในตัวอย่าง

2. การวิเคราะห์ปริมาณ reducing sugar โดยวิธีดัดแปลงวิธีวิเคราะห์ของ Nelson-Somogyi (Nelson, 1944)

2.1 สารเคมี

2.1.1 Somogyi reagent (copper reagent, solution A)

2.1.1.1 ละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตต (sodium potassium tartate) 12 g โซเดียมคาร์บอเนต 24 g ในน้ำกลั่น 250 ml

2.1.1.2 เติมคอปเปอร์ซัลเฟต 4 g ที่ละลายในน้ำกลั่น 5 ml ผสมให้เข้ากัน

2.1.1.3 เติมโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต 16 g ผสมให้เข้ากัน

2.1.1.4 เติมโซเดียมซัลเฟต 180 g ที่ละลายในน้ำกลั่น 500 ml

2.1.1.5 ปรับปริมาตรให้ครบ 1 L เก็บสารละลายนี้ไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ขวดสีชา) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนนำไปใช้ (ถ้ามีตะกอนให้กรองออก)

2.1.2 Nelson reagent (solution B)

2.1.2.1 ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต (ammonium molybdate) 25 g ในน้ำกลั่น 450 ml

2.1.2.2 เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc sulfuric acid) และไดโซเดียมไฮโดรเจนอาร์ซีเนต (disodium hydrogen arsenate) 3 g ที่ละลายในน้ำกลั่น 25 ml

2.1.2.3 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 L ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ขวดสีชา) ประมาณ 24 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้

2.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส

2.2.1 เตรียม D-กลูโคส (D-glucose) ความเข้มข้น 20, 40, 100, 120, 140, และ 160 $\mu\text{g/ml}$ จากสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่เก็บแบบแช่เยือกแข็ง

2.3 วิธีวิเคราะห์

2.3.1 คูณสารละลายตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลในช่วง 20 ถึง 160 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 1 ml ใส่งในหลอดทดลอง

2.3.2 เติมสารละลาย A 1 ml นำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที นำไปแช่ในน้ำเย็นเพื่อหยุดปฏิกิริยา

2.3.3 เติมสารละลาย B ผสมกันทันที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที

2.3.4 เติมน้ำกลั่น 6 ml ผสมกันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 520 nm

3. การตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์ (จุฑาพร, 2543)

3.1 นำส่วนใส่ที่ได้จากการปั่นแยกเซลล์ (crude enzyme) มาเจือจางด้วย glycine-NaOH buffer พีเอช 11 ความเข้มข้น 0.05 M

3.2 บ่มสารละลายเคซีนความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 11 ปริมาตร 1 ml และสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

3.3 เติมสารละลายเอนไซม์ลงไปนสารละลายเคซีน 1 ml บ่มเป็นเวลา 10 นาที

3.4 หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย TCA (trichloroacetic acid) 10 เปอร์เซ็นต์ 2 ml นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นำส่วนใส่ไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณไทโรซีนโดยวิธี Lowry's method (Lowry *et al.*, 1951)

3.5 ทำหลอดควบคุมโดยทำขึ้นตอนเช่นเดียวกับข้อ 3.2 ถึง 3.4 โดยผสมสารละลายเอนไซม์ กับสารละลาย TCA ก่อนจึงเติมสารละลายเคซีนลงไป นำไปบ่มเช่นเดียวกัน การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสดังสมการ

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์ (units/ml)} = \frac{(T_1 - T_0) \times V \times D}{t}$$

T_1 คือความเข้มข้นของไทโรซีนในหลอดทำปฏิกิริยา

T_0 คือความเข้มข้นของไทโรซีนในหลอดควบคุม

V คือปริมาตรทั้งหมดในการทดลองเท่ากับ 4 ml

D คือความเจือจางของเอนไซม์

t คือเวลาที่ใช้ในการบ่มเอนไซม์กับสับสเตรทเท่ากับ 10 นาที

กำหนดให้ 1 units ของเอนไซม์เท่ากับปริมาณของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่สามารถย่อยเคซีนแล้วเกิดไทโรซีน 1 $\mu\text{g/ml}$

ภาคผนวก ค

ถึงหมักและการคำนวณค่าทางจลนพลศาสตร์

1. ถังหมัก Bioflo 3000 ที่ใช้ในการทดลอง



ภาพผนวกที่ ค1 ถังหมัก New Brunswick Bioflo 3000 working volume สูงสุด 5.0 L

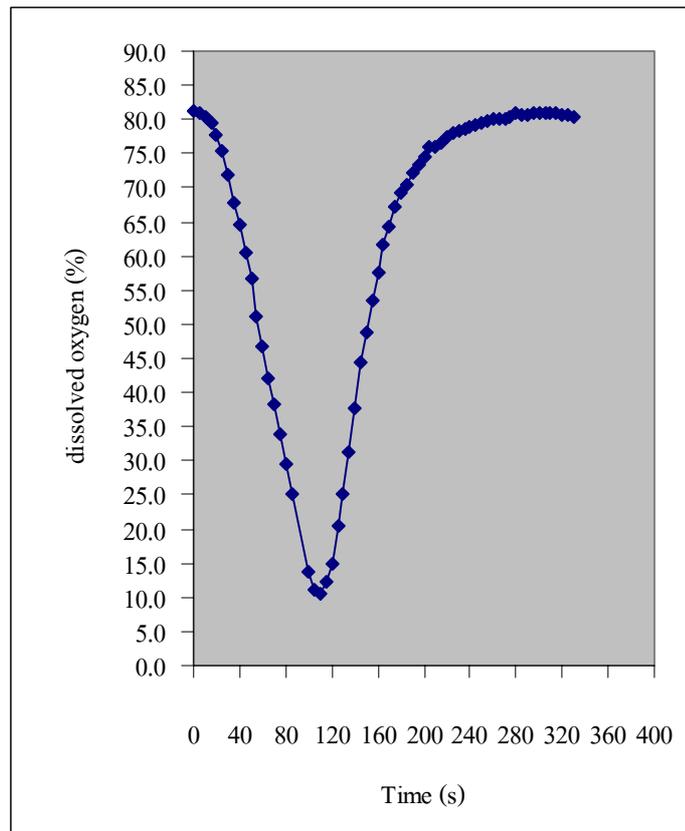
2. การคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจนต่อหน่วยปริมาตร (K_La)

การศึกษาค่า volumetric oxygen-transfer coefficient (K_La) เป็นค่าที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการส่งผ่านออกซิเจนจากฟองอากาศไปสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ และจากอาหารเลี้ยงเชื้อไปสู่เซลล์จุลินทรีย์ โดยทำการศึกษาค่านี้ในระยะเวลา exponential phase โดยทำการทดลองดังนี้

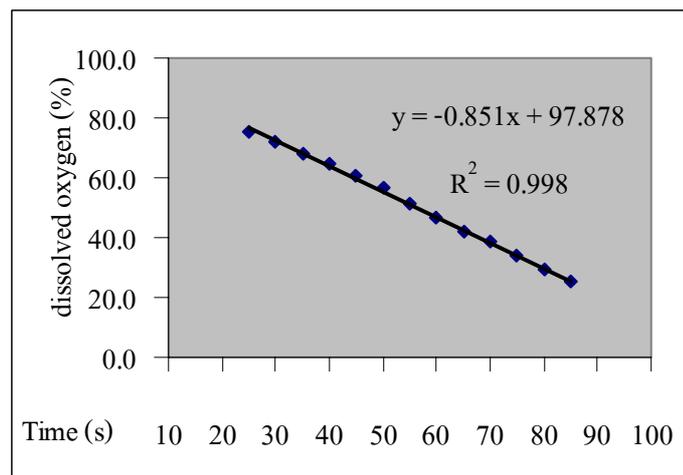
1. เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. A39 ให้อยู่ในระยะ exponential phase (อายุประมาณ 6 ถึง 8 ชั่วโมง) ควบคุมอัตราการกวนใบพัดอยู่ที่ประมาณ 300 ถึง 350 rpm
2. หยุดการให้อากาศพร้อมกับปรับลดอัตราการกวนให้อยู่ที่ 100 rpm ค่า DO จะเริ่มลดลงและลดลงในอัตราที่เร็วขึ้น จนลงมาอยู่ที่ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว เปิดอากาศลงสู่ถังหมักทันทีพร้อมกับเพิ่มอัตราการกวนในอัตราเดียวกันกับสภาพก่อนการปิดอากาศ ทำการบันทึกข้อมูลทุก 5 วินาที นับตั้งแต่การปิดอากาศจนกระทั่งค่า DO มีค่าคงที่
3. นำข้อมูลไปเขียนกราฟระหว่างเวลากับค่า DO ตัวอย่างการคำนวณแสดงในตารางผนวกที่ ค1 และภาพผนวกที่ ค2

ตารางผนวกที่ ๑1 การเปลี่ยนแปลงค่า DO ในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่การหยุดการให้อากาศ การให้อากาศไปจนถึงจุดอิ่มตัวของการละลายของออกซิเจน ณ สภาวะควบคุมที่ 80 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว

Time (s)	dissolved oxygen (% ของอากาศอิ่มตัว)	Time (s)	dissolved oxygen (% ของอากาศอิ่มตัว)
0	81.1	175	67.2
5	81.0	180	69.2
10	80.3	185	70.5
15	79.4	190	72.2
20	77.7	195	73.3
25	75.3	200	74.5
30	71.8	205	75.9
35	67.9	210	75.9
40	64.6	215	76.7
45	60.5	220	77.3
50	56.8	225	77.9
55	51.2	230	78.2
60	46.8	235	78.6
65	42.1	240	78.9
70	38.4	245	79.3
75	33.9	250	79.6
80	29.4	255	79.8
85	25.1	260	80.0
100	13.6	265	80.1
105	11.2	270	80.2
110	10.6	275	80.4
115	12.4	280	80.8
120	15.0	285	80.6
125	20.6	290	80.7
130	25.2	295	80.8
135	31.3	300	80.8
140	37.6	305	80.8
145	44.3	310	80.8
150	48.9	315	80.8
155	53.6	320	80.7
160	57.7	325	80.6
165	61.8	330	80.4
170	64.2		



ภาพผนวกที่ ค2 การเปลี่ยนแปลงค่า DO ในการศึกษาหาค่า $K_L a$ ที่สภาวะ 80 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิมมัตว์



ภาพผนวกที่ ค3 อัตราการเปลี่ยนแปลงค่า DO ในสภาวะ 80 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิมมัตว์ เพื่อศึกษา ค่า xQ_{O_2} ซึ่งได้จากค่าช่วงที่ออกซิเจนถูกใช้ไปหลังจาก air off

2.1 การคำนวณโดยวิธี dynamic method of gassing out (Taguchi and Humphrey, 1966)

จากสมการที่ 1 ในการตรวจเอกสาร จะได้ว่า

$$C_L = -1/K_L a [(dC_L/dt) + xQ_{O_2}] + C^* \dots\dots\dots(13) \quad \text{เมื่อ}$$

C_L คือ ความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเหลว (mmol/L)

C^* คือ ความเข้มข้นอิ่มตัวของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเหลว (mmol/L)

t คือ เวลา (h)

dC_L/dt คือ อัตราการส่งผ่านออกซิเจน (mmol/L.h)

$K_L a$ คือ สัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจนต่อหน่วยปริมาตร (h^{-1})

xQ_{O_2} คือ อัตราจำเพาะการหายใจ (mmol oxygen/g cell.h)

จากสมการที่ 13 สามารถหาค่า xQ_{O_2} ได้จากภาพผนวกที่ ค3 ซึ่งเป็นค่าความชันของกราฟในภาพมีค่าเท่ากับเท่ากับ 0.85 เปอร์เซ็นต์ $O_2/L.s$ และนำข้อมูลที่ได้จะนำไปคำนวณค่าที่เกี่ยวข้องต่อไป ดังตารางผนวกที่ ค2

ตารางผนวกที่ ค2 ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการคำนวณค่า $K_L a$ แบบ dynamic method of gassing out

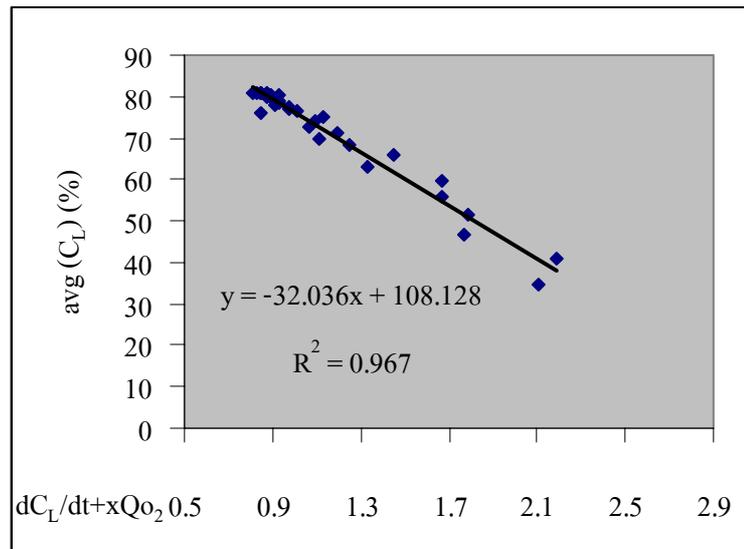
Time (s)	dissolved oxygen, C_L (%)	dC_L/dt (%/s)	xQ_{O_2} (%/L/s)	$dC_L/dt + xQ_{O_2}$	avg (C_L) (%)
120	15.0	1.12	0.85	1.97	17.8
125	20.6	0.92	0.85	1.77	22.9
130	25.2	1.22	0.85	2.07	28.3
135	31.3	1.26	0.85	2.11	34.5
140	37.6	1.34	0.85	2.19	41.0
145	44.3	0.92	0.85	1.77	46.6
150	48.9	0.94	0.85	1.79	51.3
155	53.6	0.82	0.85	1.67	55.7

ตารางผนวกที่ ๒ (ต่อ)

Time (s)	dissolved oxygen, CL (%)	dCL/dt (%/s)	xQo2 (%/L/s)	dCL/dt+ xQo2	avg (CL) (%)
160	57.7	0.82	0.85	1.67	59.8
165	61.8	0.48	0.85	1.33	63.0
170	64.2	0.60	0.85	1.45	65.7
175	67.2	0.40	0.85	1.25	68.2
180	69.2	0.26	0.85	1.11	69.9
185	70.5	0.34	0.85	1.19	71.4
190	72.2	0.22	0.85	1.07	72.8
195	73.3	0.24	0.85	1.09	73.9
200	74.5	0.28	0.85	1.13	75.2
205	75.9	0.00	0.85	0.85	75.9
210	75.9	0.16	0.85	1.01	76.3
215	76.7	0.12	0.85	0.97	77.0
220	77.3	0.12	0.85	0.97	77.6
225	77.9	0.06	0.85	0.91	78.1
230	78.2	0.08	0.85	0.93	78.4
235	78.6	0.06	0.85	0.91	78.8
240	78.9	0.08	0.85	0.93	79.1
245	79.3	0.06	0.85	0.91	79.5
250	79.6	0.04	0.85	0.89	79.7
255	79.8	0.04	0.85	0.89	79.9
260	80.0	0.02	0.85	0.87	80.1
265	80.1	0.02	0.85	0.87	80.2
270	80.2	0.04	0.85	0.89	80.3
275	80.4	0.08	0.85	0.93	80.6
280	80.8	-0.04	0.85	0.81	80.7
285	80.6	0.02	0.85	0.87	80.7
290	80.7	0.02	0.85	0.87	80.8
295	80.8	0.00	0.85	0.85	80.8
300	80.8	0.00	0.85	0.85	80.8
305	80.8	0.00	0.85	0.85	80.8
310	80.8	0.00	0.85	0.85	80.8
315	80.8	-0.02	0.85	0.83	80.8

หมายเหตุ C_L คือค่าที่วัดได้หลังจากการ air on อีกครั้ง

avg C_L คือเฉลี่ยระหว่างค่า 2 ค่า เช่น ที่ 15.0 และ 20.6 มีค่า avg C_L เท่ากับ 17.8 เป็นต้น



ภาพผนวกที่ ๓4 ค่าความชันจากกราฟระหว่าง $dC_L/dt + xQ_{O_2}$ และ avg(C_L)

เมื่อได้ค่าความชันจากกราฟระหว่าง $dC_L/dt + xQ_{O_2}$ และ avg(C_L) ตามสมการที่ 13 แล้ว จะได้ค่า K_{La} มีค่าเท่ากับ $1/\text{ความชันของกราฟ}$ คือ เท่ากับ $1/32.036$ เท่ากับ 0.031 s^{-1} หรือ 111.6 h^{-1}

2.2 การคำนวณโดยวิธี static method of gassing out (Wise, 1951)

จากสมการที่ (1) สามารถคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจนต่อหน่วย ปริมาตรได้จากกราฟระหว่างเวลาและ $\ln(C^* - C_L)$

$$\ln(C^* - C_L) = -K_{La}t \dots \dots \dots (14) \quad \text{เมื่อ}$$

C_L คือ ความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเหลว (mmol/L)

C^* คือ ความเข้มข้นอิ่มตัวของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเหลว (mmol/L)

t คือ เวลา (h)

K_{La} คือ สัมประสิทธิ์การส่งผ่านออกซิเจนต่อหน่วยปริมาตร (h^{-1})

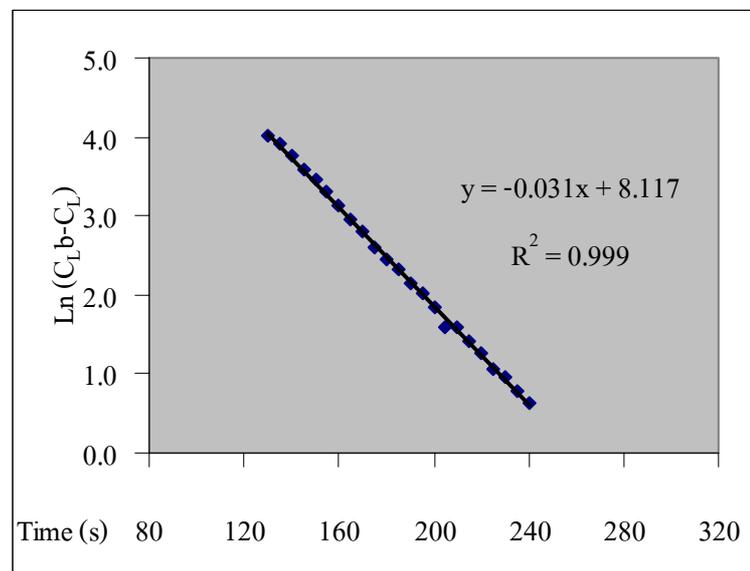
ตารางผนวกที่ ๓ ข้อมูลที่เกี่ยวข้องในการคำนวณค่า $K_L a$ แบบ static method of gassing out

Time (s)	dissolved oxygen, C_L (%)	$C_L b - C_L$	$\ln C_L b - C_L$
120	15.0	65.8	4.19
125	20.6	60.2	4.10
130	25.2	55.6	4.02
135	31.3	49.5	3.90
140	37.6	43.2	3.77
145	44.3	36.5	3.60
150	48.9	31.9	3.46
155	53.6	27.2	3.30
160	57.7	23.1	3.14
165	61.8	19.0	2.94
170	64.2	16.6	2.81
175	67.2	13.6	2.61
180	69.2	11.6	2.45
185	70.5	10.3	2.33
190	72.2	8.6	2.15
195	73.3	7.5	2.01
200	74.5	6.3	1.84
205	75.9	4.9	1.59
210	75.9	4.9	1.59
215	76.7	4.1	1.41
220	77.3	3.5	1.25
225	77.9	2.9	1.06
230	78.2	2.6	0.96
235	78.6	2.2	0.79
240	78.9	1.9	0.64
245	79.3	1.5	0.41
250	79.6	1.2	0.18
255	79.8	1.0	0.00
260	80.0	0.8	-0.22
265	80.1	0.7	-0.36
270	80.2	0.6	-0.51
275	80.4	0.4	-0.92
280	80.8	0.0	-
285	80.6	0.2	-
290	80.7	0.1	-
295	80.8	0.0	-
300	80.8	0.0	-
305	80.8	0.0	-
310	80.8	0.0	-

ตารางผนวกที่ ค3 (ต่อ)

Time (s)	dissolved oxygen, CL (%)	CLb-CL	In CLb-CL
315	80.8	0.0	-
320	80.7	0.1	-
325	80.6	0.2	-
330	80.4	0.4	-

หมายเหตุ C_{Lb} หมายถึงค่าการละลายของออกซิเจนในสภาวะอิ่มตัวซึ่งในที่นี้เท่ากับ 80.8เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว



ภาพผนวกที่ ค5 กราฟระหว่างเวลาและ $\ln(C_{Lb}-C_L)$

จากภาพผนวกที่ ค5 จะได้ค่าความชัน ซึ่งคือค่า K_{La} ที่คำนวณแบบ static method of gassing out มีค่าเท่ากับ 0.031 s^{-1} หรือ 111.6 h^{-1}

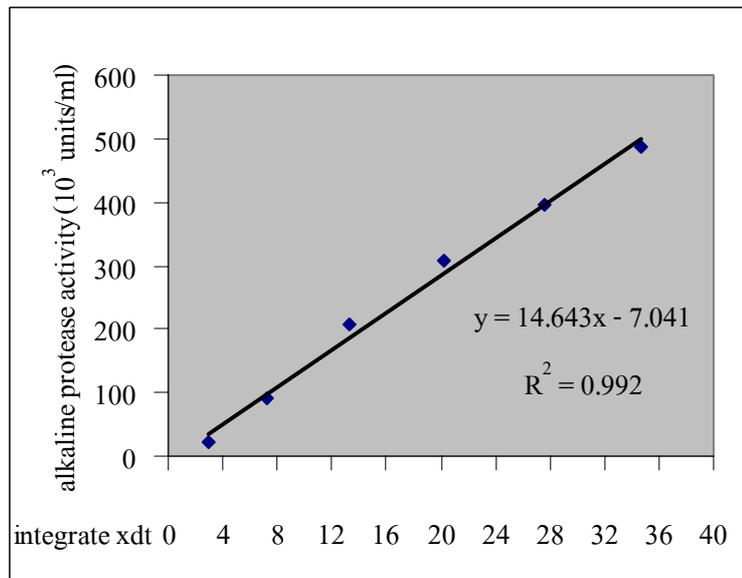
3. การคำนวณค่าอัตราการผลิตเอนไซม์จำเพาะ (specific enzyme production rate)

การคำนวณค่า specific enzyme production rate (q_p) จะใช้ตัวอย่างของการเลี้ยงแบบ batch culture ความเข้มข้นกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ และ skimmed milk 0.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ข้อมูลที่ใช้ดังตารางผนวกที่ ค4

ตารางผนวกที่ ค4 ข้อมูลที่เกี่ยวข้องในการคำนวณค่า q_p ในการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture
กลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ และ skimmed milk 0.5 เปอร์เซ็นต์

Time (h)	OD ₆₆₀	dt (h)	cell mass (g/L)	delta cell mass (g/L)	delta cell mass×dt	integrate xdt	activity (u/L)
0	0.300	0.000	0.000				3,462
2	0.200	2.000	0.000	0.000	0.000		-385
4	0.230	2.000	0.000	0.000	0.000		1,154
6	0.330	2.000	0.037	0.018	0.037	0.037	-5,385
8	0.620	2.000	0.168	0.102	0.205	0.242	-3,462
10	1.280	2.000	0.469	0.318	0.637	0.879	-3,077
12	3.680	2.000	1.560	1.014	2.028	2.907	20,769
14	6.240	2.000	2.724	2.142	4.284	7.191	89,615
16	7.520	2.000	3.306	3.015	6.030	13.221	207,692
18	8.400	2.000	3.706	3.506	7.012	20.233	307,692
20	8.320	2.000	3.670	3.688	7.376	27.609	395,385
22	7.680	2.000	3.379	3.524	7.049	34.658	486,154
28	6.000	6.000	2.615	2.997	17.981	52.639	514,615
32.5	4.880	4.500	2.106	2.360	10.621	63.260	503,846
36.5	4.160	4.000	1.778	1.942	7.768	71.028	503,077
40	3.680	3.500	1.560	1.669	5.842	76.870	509,231
44	3.600	4.000	1.524	1.542	6.167	83.037	523,846

จากตารางนำไปเขียนกราฟระหว่าง integrate xdt และกิจกรรมของเอนไซม์ ค่าความชัน
ระหว่างกราฟคือค่า q_p นั่นเอง



ภาพผนวกที่ ๑๖ กราฟระหว่าง integrate xdt และกิจกรรมของเอนไซม์

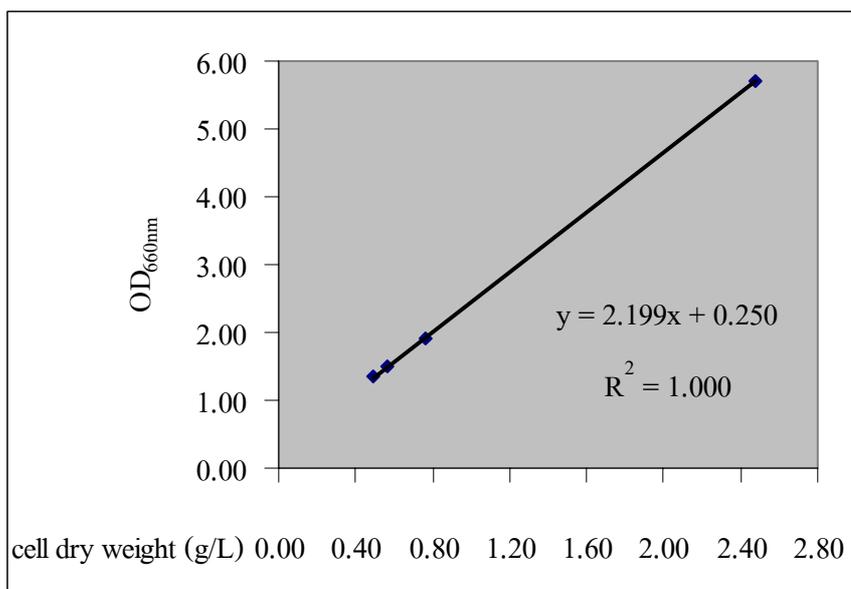
จากกราฟระหว่าง integrate xdt และ กิจกรรมของเอนไซม์ในภาพผนวกที่ ๑๖ จะได้ค่าความชันของกราฟก็คือค่า q_p มีค่าเท่ากับ 14,643 units/g cell.h

4. การหาคำนวนหาค่า cell factor ของเชื้อ *Bacillus sp. A 39*

เนื่องจาก skimmed milk ที่ใช้ในการทดลองมีความขุ่นเนื่องจากไม่สามารถละลายน้ำหรือละลายได้ไม่ดี จึงใช้เปปโตนในการเพาะเลี้ยง *Bacillus sp. A39* แทน ข้อมูลการศึกษาดังตารางผนวกที่ ๑๕

ตารางผนวกที่ ๑๕ ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{660nm})

Time (h)	cell dry weight (g/L)	OD_{660nm}
0	0.0000	0.055
5	0.4925	1.340
11	2.4775	5.700
17	0.5650	1.500
24	0.7675	1.920



ภาพผนวกที่ ค7 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักรเซลล์แห้งและค่าความขุ่นของเซลล์

จากสมการเมื่อทราบค่าความขุ่นของเซลล์ สามารถนำไปคำนวณหาค่าน้ำหนักรเซลล์แห้งได้