

สารบัญ

| | หน้า |
|--|------|
| สารบัญ..... | (1) |
| สารบัญตาราง..... | (2) |
| สารบัญภาพ..... | (4) |
| คำอธิบายสัญลักษณ์..... | (8) |
| คำนำ..... | 1 |
| วัตถุประสงค์..... | 3 |
| การตรวจเอกสาร..... | 4 |
| อุปกรณ์และวิธีการทดลอง..... | 62 |
| ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง..... | 78 |
| สรุปผลการทดลอง..... | 111 |
| ข้อเสนอแนะและแนวทางแก้ไข..... | 113 |
| เอกสารและสิ่งอ้างอิง..... | 114 |
| ภาคผนวก..... | 122 |
| ภาคผนวก ก อาหารเพาะเลี้ยงที่ใช้ในการทดลอง..... | 123 |
| ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ทางเคมี..... | 125 |
| ภาคผนวก ค ถังหมักและการคำนวณค่าทางจลนพลศาสตร์..... | 130 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | หน้า |
|---|------|
| 1 ตัวอย่างของ exopeptidase และการทำงานของเอนไซม์..... | 8 |
| 2 ตัวอย่างของ endopeptidase และการทำงานของเอนไซม์..... | 9 |
| 3 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของจุลินทรีย์บางชนิด..... | 35 |
| 4 การจำแนกการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch culture..... | 43 |
| 5 การผลิตทางการค้าของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส..... | 54 |
| 6 องค์ประกอบของเอนไซม์ในผงซักฟอก..... | 56 |
| 7 เปรอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของ 16s rDNA sequence ของเชื้อสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. A39..... | 61 |
| 8 อิทธิพลของพีเอชต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. A39 | 72 |
| 9 อิทธิพลของค่าการละลายออกซิเจนต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. A39..... | 78 |
| 10 อิทธิพลของกลูโคสต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. A39..... | 88 |
| 11 อิทธิพลของ skimmed milk ต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. A39..... | 96 |
| 12 อิทธิพลของการเพาะเลี้ยงแบบ constantly fed-batch culture เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. A39..... | 104 |
| | |
| ตารางผนวกที่ | |
| ค1 การเปลี่ยนแปลงค่าการละลายออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งแต่การหยุดการให้อากาศ การให้อากาศ ไปจนถึงจุดอิ่มตัวของค่าการละลายออกซิเจน ณ สภาวะควบคุมที่ 80 เปรอร์เซ็นต์อากาศอิ่มตัว..... | 133 |
| ค2 ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการคำนวณค่า K_La แบบ dynamic method of gassing out..... | 136 |
| ค3 ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการคำนวณค่า K_La แบบ static method of gassing out..... | 138 |

สารบัญตาราง (ต่อ)

| ตารางผนวกที่ | หน้า |
|---|------|
| ค4 ข้อมูลที่เกี่ยวข้องในการคำนวณค่า q_p ในการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture กลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ และ skimmed milk 0.5 เปอร์เซ็นต์..... | 140 |
| ค5 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{660nm})..... | 141 |

สารบัญภาพ

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|--|------|
| 1 | คำที่มีความหมายคล้ายกันของเอนไซม์โปรติเอส | 5 |
| 2 | กลไกของ serine peptidases..... | 14 |
| 3 | กลไกของ cysteine peptidases..... | 15 |
| 4 | กลไกของ aspartic peptidases..... | 16 |
| 5 | กลไกของ metallopeptidases..... | 17 |
| 6 | การเปลี่ยนแปลงพีเอชระหว่างการเจริญของ alkalophilic bacteria ชนิดหนึ่ง..... | 19 |
| 7 | การกระจายตัวของ alkalophilic bacteria ที่สภาวะพีเอชต่างๆในดิน..... | 20 |
| 8 | ผลของความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเหลวต่ออัตราการใช้ออกซิเจนจำเพาะของเซลล์จุลินทรีย์..... | 36 |
| 9 | รูปแบบการเจริญของจุลินทรีย์ในการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture..... | 39 |
| 10 | ลักษณะแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. A39 ภายใต้น้ำย้อมด้วย Gram's stain..... | 59 |
| 11 | ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. A39 บนอาหาร BMSM agar อายุ 24 ชั่วโมง..... | 60 |
| 12 | ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย <i>Bacillus</i> sp. A39 บนอาหาร BMSM agar อายุ 48 ชั่วโมง..... | 60 |
| 13 | ความสัมพันธ์ระหว่างพีเอช specific growth rate และ specific alkaline protease production rate ในการศึกษาผลของพีเอชต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. A39 ในการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture..... | 73 |
| 14 | รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. A39 ในการศึกษาสภาวะพีเอชที่เหมาะสม โดยการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture ควบคุม DO 60 เปอร์เซ็นต์อากาศอิ่มตัว พีเอช 9.5..... | 74 |
| 15 | ความสัมพันธ์ระหว่าง DO, specific growth rate, $K_L a$, และ specific alkaline protease production rate ในการศึกษาผลของ DO ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. A39 ในการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture..... | 79 |

สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|---|------|
| 16 | ความสัมพันธ์ระหว่าง $K_L a$, specific growth rate และ specific alkaline protease production rate ในการศึกษาผลของ DO ต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. A39 ในการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture..... | 80 |
| 17 | รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. A39 ในการศึกษาสภาวะ DO ที่เหมาะสม โดยการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture ควบคุม DO 60 เปอร์เซ็นต์อากาศอิ่มตัว พีเอช 9.5..... | 81 |
| 18 | รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. A39 ในการศึกษาสภาวะ DO ที่เหมาะสม โดยการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture ควบคุม DO 70 เปอร์เซ็นต์อากาศอิ่มตัว พีเอช 9.5..... | 82 |
| 19 | รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. A39 ในการศึกษาสภาวะ DO ที่เหมาะสม โดยการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture ควบคุม DO 80 เปอร์เซ็นต์อากาศอิ่มตัว พีเอช 9.5..... | 83 |
| 20 | รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. A39 ในการศึกษาสภาวะ DO ที่เหมาะสม โดยการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture ควบคุม DO 90 เปอร์เซ็นต์อากาศอิ่มตัว พีเอช 9.5..... | 84 |
| 21 | ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคส specific growth rate และ specific alkaline protease production rate ในการศึกษาผลของปริมาณกลูโคสต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. A39 ในการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture..... | 89 |
| 22 | รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. A39 ในการศึกษาปริมาณกลูโคสที่เหมาะสม โดยการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture กลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ ควบคุม DO 80 เปอร์เซ็นต์อากาศอิ่มตัว พีเอช 9.5..... | 90 |
| 23 | รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. A39 ในการศึกษาปริมาณกลูโคสที่เหมาะสม โดยการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture กลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ ควบคุม DO 80 เปอร์เซ็นต์อากาศอิ่มตัว พีเอช 9.5..... | 91 |
| 24 | รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. A39 ในการศึกษาปริมาณกลูโคสที่เหมาะสม โดยการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture กลูโคส 3 เปอร์เซ็นต์ ควบคุม DO 80 เปอร์เซ็นต์อากาศอิ่มตัว พีเอช 9.5..... | 92 |

สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|--|------|
| 25 | รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. A39 ในการศึกษาปริมาณกลูโคสที่เหมาะสม โดยการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture กลูโคส 4.5 เปอร์เซ็นต์ ควบคุม DO 80 เปอร์เซ็นต์อากาศอิ่มตัว พีเอช 9.5..... | 93 |
| 26 | รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. A39 ในการศึกษาปริมาณ skimmed milk ที่เหมาะสม โดยการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture กลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ skimmed milk 0.25 เปอร์เซ็นต์ ควบคุม DO 80 เปอร์เซ็นต์อากาศอิ่มตัว พีเอช 9.5 | 97 |
| 27 | รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. A39 ในการศึกษาปริมาณ skimmed milk ที่เหมาะสม โดยการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture กลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ skimmed milk 0.50 เปอร์เซ็นต์ ควบคุม DO 80 เปอร์เซ็นต์อากาศอิ่มตัว พีเอช 9.5..... | 98 |
| 28 | รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. A39 ในการศึกษาระยะการเติมอาหารที่เหมาะสม โดยการเพาะเลี้ยงแบบ constantly fed-batch culture ควบคุม DO 80 เปอร์เซ็นต์อากาศอิ่มตัว พีเอช 9.5 กลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ skimmed milk 0.25 เปอร์เซ็นต์ dilution rate 0.05 h^{-1} เติมอาหารระยะ stationary phase (การทดลองที่ 1)..... | 106 |
| 29 | รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. A39 ในการศึกษาระยะการเติมอาหารที่เหมาะสม โดยการเพาะเลี้ยงแบบ constantly fed-batch culture ควบคุม DO 80 เปอร์เซ็นต์อากาศอิ่มตัว พีเอช 9.5 กลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ skimmed milk 0.25 เปอร์เซ็นต์ dilution rate 0.05 h^{-1} เติมอาหารระยะ deceleration phase (การทดลองที่ 2)..... | 107 |
| 30 | รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. A39 ในการศึกษา dilution rate ที่เหมาะสม โดยการเพาะเลี้ยงแบบ constantly fed-batch culture ควบคุม DO 80 เปอร์เซ็นต์อากาศอิ่มตัว พีเอช 9.5 กลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ skimmed milk 0.25 เปอร์เซ็นต์ dilution rate 0.075 h^{-1} เติมอาหารระยะ deceleration phase (การทดลองที่ 3)..... | 108 |

สารบัญภาพ (ต่อ)

| ภาพที่ | | หน้า |
|-------------------|--|------|
| 31 | รูปแบบการเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสของ <i>Bacillus</i> sp. A39 ในการศึกษาความเข้มข้นอาหารที่ใช้เติมใน reservoir ที่เหมาะสม โดยการเพาะเลี้ยงแบบ constantly fed-batch culture ควบคุม DO 80 เปอร์เซ็นต์อากาศอิ่มตัว พีเอช 9.5 กลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ skimmed milk 0.25 เปอร์เซ็นต์ dilution rate 0.05 h ⁻¹ เติมน้ำอาหารระยะ deceleration phase ความเข้มข้นอาหารที่ใช้เติม 2 เท่า (การทดลองที่ 4)..... | 109 |
| 32 | ความสัมพันธ์ระหว่าง specific growth rate และ specific alkaline protease production rate ของ <i>Bacillus</i> sp. A39 ในการเพาะเลี้ยงแบบ constantly fed-batch culture และแปรผันปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องในการเติมน้ำอาหาร..... | 110 |
| ภาพผนวกที่ | | |
| ค1 | ถังหมัก Bioflo 3000 ปริมาตร working volume สูงสุด 5.0 L | 131 |
| ค2 | การเปลี่ยนแปลงค่าการละลายออกซิเจนในการศึกษาหาค่า K _L a ที่สภาวะ 80 เปอร์เซ็นต์อากาศอิ่มตัว..... | 134 |
| ค3 | อัตราการเปลี่ยนแปลงการละลายออกซิเจนในสภาวะ 80 เปอร์เซ็นต์อากาศอิ่มตัว เพื่อหาค่า xQ _{o2} ซึ่งได้จากช่วงที่ออกซิเจนถูกใช้ไปหลังจาก air off..... | 134 |
| ค4 | ค่าความชันจากกราฟระหว่าง dC _L /dt+xQ _{o2} และ avg (C _L)..... | 137 |
| ค5 | กราฟระหว่างเวลาและ Ln (C _L b-C _L)..... | 139 |
| ค6 | กราฟระหว่าง integrate xdt และกิจกรรมของเอนไซม์..... | 141 |
| ค7 | ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งและค่าความขุ่นของเซลล์..... | 142 |

คำอธิบายสัญลักษณ์

| | | |
|-----------|---|---|
| μ | = | อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1}) |
| q_p | = | อัตราการผลิตเอนไซม์จำเพาะ (unit/g cell.h) |
| D | = | อัตราการเจือจาง (h^{-1}) |
| $Y_{x/s}$ | = | ผลได้ของมวลเซลล์ต่อมวลสับสเตรท (g cell/g substrate) |
| $Y_{p/s}$ | = | ผลได้ของเอนไซม์ต่อมวลสับสเตรท (unit/g substrate) |
| $Y_{p/x}$ | = | ผลได้ของเอนไซม์ต่อมวลเซลล์ (g cell/g substrate) |
| VVM | = | ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของอาหารเพาะเลี้ยงต่อนาที |
| rpm | = | อัตราการกวน (rotation/min) |
| t | = | เวลา (h) |
| x | = | ความเข้มข้นมวลเซลล์ (g/L) |
| Q_{O_2} | = | อัตราการใช้ออกซิเจนจำเพาะ (mmol/g cell.h) |
| DO | = | dissolved oxygen concentration |