

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยขนไก่ด้วยเอนไซม์เคราตินเนส

Optimization of Feather Degradation by Enzymatic Hydrolysis

พัชรภรณ์ เสรีใจธรรม นนทกา วิบูลย์เดชาโชค และ วรพจน์ สุนทรสุข*
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
Email: worapot.sun@kmutt.ac.th*

บทคัดย่อ

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยขนไก่ด้วยเอนไซม์เคราตินเนสที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* FK 1 โดยออกแบบการทดลองด้วยวิธี 2^k Factorial Design และ Central Composite Design พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยขนไก่ คือ อุณหภูมิ 50 °C และ อัตราส่วนของปริมาณขนไก่ต่อปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 0.8 กรัมต่อ 133 มิลลิกรัม โปรตีน (0.8g/10 ml) โดยมีการย่อยขนไก่สูงสุดคือ 27.36 % สภาวะที่เหมาะสมต่อปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้นคือ อุณหภูมิ 40 °C อัตราส่วนของปริมาณขนไก่ต่อปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 0.9 กรัมต่อ 133 มิลลิกรัมโปรตีน (0.8g/10 ml) โดยมีปริมาณโปรตีนสูงสุดคือ 13.67 mg/ml และสภาวะที่เหมาะสมต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่เกิดขึ้นคือ 50 °C และ อัตราส่วนของปริมาณขนไก่ต่อปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 0.9 กรัมต่อ 133 มิลลิกรัมโปรตีน (0.8 g/10 ml) โดยมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระสูงสุดคือ 16.27 mg/ml

คำสำคัญ: เอนไซม์เคราตินเนส / การย่อยขนไก่ / การศึกษาสภาวะที่เหมาะสม / แบคทีเรีย / การออกแบบการทดลอง

1. บทนำ

ปัจจุบันการเลี้ยงสัตว์ปีกโดยเฉพาะไก่เนื้อในประเทศไทยมีการเลี้ยงกันอย่างกว้างขวางมากขึ้น ซึ่งในอดีตก็มีการเลี้ยงกันอย่างที่เป็นแบบการเลี้ยงในระดับครัวเรือน แต่จากความต้องการการบริโภคภายในประเทศมีเพิ่มมากขึ้นรวมไปถึงมีการส่งออกไก่สดและเนื้อไก่แปรรูปในปริมาณที่มากขึ้น จึงทำให้มีการพัฒนาการเลี้ยงสัตว์ปีกมากขึ้นจนถึงในระดับอุตสาหกรรม สำนักเศรษฐกิจการเกษตรรายงานการเลี้ยงไก่เนื้อในปี 2545 ซึ่งมีปริมาณสูงถึง 900 ล้านตัว จึงเป็นเหตุให้เกิดของเหลือทิ้งจากการแปรรูปในปริมาณที่มากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นเลือด เครื่องใน กระดูกไก่ และขนไก่ โดยเฉพาะขนไก่เหลือทิ้งคาดว่าจะมีประมาณถึง 60,000 - 90,000 ตันต่อปี แต่ถึงอย่างไรก็ยังมีมีการนำของเหลือทิ้งในส่วนที่เป็นขนไก่มาใช้ให้เกิดประโยชน์ อาทิ เครื่องนอน อุปกรณ์กีฬา

แต่ถึงกระนั้นก็ยังมีความเหลือทิ้งอีกจำนวนมากซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมได้เนื่องจากขนไก่มีองค์ประกอบหลักเป็นโปรตีนคือ เคราติน ประมาณ 90% ขององค์ประกอบทั้งหมด (Lin และคณะ, 1992) ซึ่งต้องอาศัย เอนไซม์เคราตินเนสมาย่อยสลายจึงจะได้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยขนไก่นั้นคือ กรดอะมิโนและเปปไทด์สายสั้นๆสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ต่อไปดังนั้นจึงจำเป็นต้องหาวิธีการหรือกระบวนการในการนำขนไก่เหล่านี้มาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพเข้ามาช่วย

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมหัวเชื้อ *Bacillus licheniformis* FK1 เพื่อผลิตเอนไซม์เคราตินเนส

เชื้อ *Bacillus licheniformis* FK1 จากอาหาร NA slant ที่บ่ม ณ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเชื้อเชื้อจาก NA slant ลง NB ปริมาตร 100 ml. บ่มใน incubator shaker 37 °C ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาปรับความชื้นให้ มีความเข้มข้นเท่ากับ No. 0.5 McFarland ปริมาตร 150 มิลลิลิตรโดยใช้ 0.85% NaCl

2.2 การผลิตเอนไซม์เคราตินเนสจาก

Bacillus licheniformis FK1

2.2.1 การเตรียมสารละลายเอนไซม์เคราตินเนส

ถ่ายสารละลายเชื้อที่มีความเข้มข้นเท่ากับ No. 0.5 McFarland ปริมาตร 2 % ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ใส่ลงใน Basal medium 250 ml. ที่มีชนไก่ 1% เป็นองค์ประกอบ จำนวน 24 ฟลาสก์ มีปริมาตรรวมเท่ากับ 6 L. และปรับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ 10.5 โดยใช้ 0.1N NaOH บ่มใน incubator shaker 45 °C ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลา 3 วัน ทำการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 x g เป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อตกตะกอนจุลินทรีย์ออกจากสารละลายเอนไซม์ (crude enzyme)

2.2.2 การเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เคราตินเนสด้วยวิธี Ultrafiltration

นำสารละลายเอนไซม์ที่ผลิตได้มาทำให้เข้มข้นขึ้น 10 เท่า ด้วยวิธี Ultrafiltration โดยใช้เมมเบรนที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 10,000 ดาลตัน

2.3 การวิเคราะห์ทางเคมี

ทำการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เคราตินเนส (Keratinase Activity) (Bressolier และคณะ, 1999) ปริมาณโปรตีน (Protein Content) โดยวิธีของ Lowry (Lowry, 1951) และปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (Free amino acid) โดยวิธีของ Ninhydrin Method (Rosen, H., 1957)

2.4 การเตรียมชนไก่

นำชนไก่ตัดเอาส่วนก้านออก นำมาล้างน้ำสะอาดในหม้อน้ำความดัน จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 °C

2.5 การย่อยชนไก่ด้วยเอนไซม์เคราตินเนส

ใส่เอนไซม์ปริมาตร 10 ml. ลงในหลอดทดลองที่มีชนไก่แล้วทำการย่อยชนไก่ในหลอดทดลองภายใต้สภาวะตามการออกแบบการทดลอง ในตารางที่ 2.1 และ 2.2 โดยทุกสภาวะที่ทำการทดลองต้องทำชุดควบคุม โดยการใส่บัฟเฟอร์ pH 7.5 ปริมาตร 10 ml. (แทนสารละลายเอนไซม์) ลงในหลอดทดลองที่มีชนไก่ แล้วบ่มที่สภาวะเดียวกับตัวอย่าง และการใส่เอนไซม์เคราตินเนสปริมาตร 5 ml. ลงในหลอดทดลองเปล่า และไว้ที่สภาวะเดียวกับตัวอย่าง

2.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำผลการวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยชนไก่ ปริมาณโปรตีน และปริมาณอะมิโนอิสระ ที่ได้ไปวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม Design Expert Version 6.0.5 โดยใช้วิธี Response Surface Methodology

ตารางที่ 2.1 การกำหนดค่าตัวแปรต่างๆ ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยชนไก่ด้วยเอนไซม์เคราตินเนส

Factors	Symbol	Levels		
		-1	center point	1
Temp. (°C)	A	40	50	60
Ratio (g/10ml)	B	0.1	0.5	1
Shake (rpm)	C	100	150	200
Time (day)	D	1	2	3

3. ผลการทดลองและอภิปรายผล

3.1 การผลิตและการทำให้เอนไซม์เคราตินเนสเข้มข้น

จากการผลิตและการทำให้เอนไซม์เคราตินเนสเข้มข้นขึ้นโดยวิธี Ultrafiltration พบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์เคราตินเนส เท่ากับ 42 Units/ml ปริมาณโปรตีน เท่ากับ 13.3 mg/ml และปริมาณอะมิโนอิสระ เท่ากับ 0.63 mg/ml

ตารางที่ 2.2 การกำหนดค่าตัวแปรอิสระหรือสภาวะต่าง ๆ ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยขนไก่ด้วยเอนไซม์

Independent Variable	Coded symbol	Levels	
		Coded	Actual
Temperature (°C)	X ₁	1.41	64.14
		1	60
		0	50
		-1	40
		-1.41	35.86
Ratio (g/ml)	X ₂	1.41	1.04
		1	0.9
		0	0.55
		-1	0.2
		-1.41	0.06

3.2 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยขนไก่ด้วยเอนไซม์เคราตินเนส โดยวิธี 2^k Factorial Design

จากการออกแบบและผลการทดลองของวิธี 2^k Factorial Design เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยขนไก่ด้วยเอนไซม์เคราตินเนส ดังแสดงในตารางที่ 3.1 พบว่า เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาที่ทำการย่อยขนไก่ คือ 1 และ 3 วัน ใน Run order ที่ 6 และ 14 โดยปัจจัยอื่นมีค่าเท่ากัน จะพบว่า เปอร์เซ็นต์การย่อยขนไก่ไม่ต่างกัน ในทำนองเดียวกันอัตราการเขย่า คือ 100 และ 200 รอบต่อนาที ใน Run order ที่ 10 และ 14 ก็มี เปอร์เซ็นต์การย่อยขนไก่ไม่ต่างกันเช่นกัน

โดยเมื่อทำการวิเคราะห์ผลทางโปรแกรม Design Expert Version 6.0.5 พบว่า ปัจจัยที่มีผล (Effect) ต่อ เปอร์เซ็นต์การย่อยขนไก่ คือ ปัจจัย A (อุณหภูมิ) และ B (อัตราส่วนของปริมาณขนไก่ต่อปริมาณเอนไซม์) ซึ่งมีผลอย่างมากต่อค่าตอบสนองทั้ง 3 ค่า คือ เปอร์เซ็นต์การย่อยขนไก่ ปริมาณโปรตีน และปริมาณกรดอะมิโนอิสระ ดังนั้น จึงเลือกปัจจัย A (อุณหภูมิ) และ B

(อัตราส่วนของปริมาณขนไก่ต่อปริมาณเอนไซม์) นำมาทำการศึกษาต่อ โดยใช้การออกแบบการทดลองวิธี Central Composite Design ส่วนปัจจัย C (อัตราการเขย่า) D (เวลา) และปัจจัยอื่นที่มีอิทธิพลร่วมกันได้ทำการตัดออกไปไม่นำมาทำการศึกษาต่อ เนื่องจากว่าปัจจัยเหล่านั้นมีผล (Effect) ค่อนข้างน้อยต่อเปอร์เซ็นต์การย่อยขนไก่ ปริมาณโปรตีน และปริมาณกรดอะมิโนอิสระ เมื่อเทียบกับปัจจัย A (อุณหภูมิ) และ B (อัตราส่วนของปริมาณขนไก่ต่อปริมาณเอนไซม์)

ถึงแม้ว่า ปัจจัย A (อุณหภูมิ) มีผลต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระน้อยแต่เนื่องจากมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การย่อยขนไก่ และปริมาณโปรตีนมาก ดังนั้น จึงนำปัจจัย A (อุณหภูมิ) มาศึกษาต่อด้วยเช่นกัน

3.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยขนไก่ด้วยเอนไซม์เคราตินเนส โดยวิธี Central Composite Design

การออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยขนไก่ด้วยเอนไซม์เคราตินเนส แสดงผลในตารางที่ 3.2 จากการวิเคราะห์ผลของการควบคุมปัจจัย (อุณหภูมิและอัตราส่วนของปริมาณขนไก่ต่อปริมาณเอนไซม์) ที่มีต่อค่าตอบสนอง (เปอร์เซ็นต์การย่อยขนไก่ ปริมาณโปรตีน และปริมาณกรดอะมิโนอิสระ) โดยโปรแกรมทางสถิติ พบว่า ความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณโปรตีน และปริมาณกรดอะมิโน กับอุณหภูมิและอัตราส่วนระหว่างปริมาณขนไก่ต่อปริมาณเอนไซม์ แสดงในรูปที่ 3.1 และ 3.2 ตามลำดับ ทั้งนี้โปรแกรมทำการตัดพจน์ที่ไม่มี ความสำคัญออกจากสมการ โดยความสัมพันธ์ของปัจจัยและค่าตอบสนองสามารถแสดงในรูปของสมการ Quadratic Model ดังนี้

$$\text{Feather degradation (\%)} = 27.35 + 0.55 \text{ Temp} - 7.74 \text{ Temp}^2 \quad (1)$$

$$\text{Protein content (mg/ml)} = 3.38 + 1.26 \text{ Temp} + 5.03 \text{ Ratio} + 3.29 \text{ Ratio}^2 - 3.23 \text{ Temp} \cdot \text{Ratio} \quad (2)$$

$$\text{Free amino acid (mg/ml)} = 10.10 - 0.19 \text{ Temp} + 6.17 \text{ Ratio} - 2.70 \text{ Temp}^2 \quad (3)$$

โดยสมการทั้ง 3 สมการ ดังข้างต้น จะสามารถเชื่อถือ และสามารถนำไปทำนายค่าตอบสนองได้ดีเพียงใดนั้น ขึ้นอยู่กับค่าทางสถิติที่แสดงออกมา ดังตารางที่ 3.3 พบว่าจากผลการทดลอง ในสมการที่ (2) และ (3) แสดงให้เห็นว่าค่าตอบสนองจากการทดลองและค่าตอบสนองจากการทำนายของสมการไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งเหมาะที่จะนำสมการทั้งสองไปใช้ทำนายค่าตอบสนองความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนและปริมาณกรดอะมิโนกับอุณหภูมิและ

อัตราส่วนระหว่างปริมาณขี้ไก่ต่อปริมาณเอนไซม์ แสดงในรูปที่ 3.1 - 3.2 ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ผลพบว่า ลักษณะกราฟที่ได้ของค่าตอบสนองของปริมาณโปรตีนและปริมาณกรดอะมิโนอิสระมีแนวโน้มในขอบเขตที่จำกัดในการที่จะเข้าสู่จุดศูนย์กลางซึ่งเป็นจุดที่จะให้ค่าตอบสนองสูงที่สุดจากการวิเคราะห์ผลทางโปรแกรมคอมพิวเตอร์ซึ่งโปรแกรมจะทำการคำนวณสถานะที่เหมาะสมในการย่อยขี้ไก่ด้วยเอนไซม์ของค่าตอบสนองต่างๆ แสดงในตารางที่ 3.4 ซึ่งจะพบว่าค่าตอบสนองที่ได้จากการทดลองนั้นมีค่าใกล้เคียงกับค่าตอบสนองที่ได้จากการทำนายแต่เมื่อสังเกตค่า Actual

ตารางที่ 3.1 ผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยขี้ไก่ด้วยเอนไซม์เครติเนส ด้วยวิธี 2^k Factorial Design

Run order	Temp (A) (° C)	Ratio (B) (g/ml)	Shake (C) (rpm)	Time (D) (day)	Feather degradation (%)	Protein content (mg/ml)	Free amino acid (mg/ml)
1	40	0.1g/10ml	100	1	24.3	0.7	4.8
2	60	0.1g/10ml	100	1	96.5	2.4	7.3
3	40	1g/10ml	100	1	12.8	7.3	15.6
4	60	1g/10ml	100	1	33.7	2.3	26.2
5	40	0.1g/10ml	200	1	21.0	0	2.86
6	60	0.1g/10ml	200	1	61.8	2.4	0
7	40	1g/10ml	200	1	7.6	2.2	15.6
8	60	1g/10ml	200	1	18.6	3.1	16.0
9	40	0.1g/10ml	100	3	48.8	0	5.9
10	60	0.1g/10ml	100	3	60.8	1.6	11.6
11	40	1g/10ml	100	3	40.1	0	27.7
12	60	1g/10ml	100	3	39.9	7.4	48.5
13	40	0.1g/10ml	200	3	10.8	0	4.2
14	60	0.1g/10ml	200	3	59.0	0	1.2
15	40	1g/10ml	200	3	23.4	5.2	23.4
16	60	1g/10ml	200	3	31.0	10.4	26.3
17	50	0.5g/10ml	150	2	52.2	13.5	7.9

หมายเหตุ ผลการทดลองเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 3.2 ผลการศึกษาสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในการย่อยขนไก่ด้วยเอนไซม์เคราตินสอออกแบบการทดลองวิธี Central Composite Design

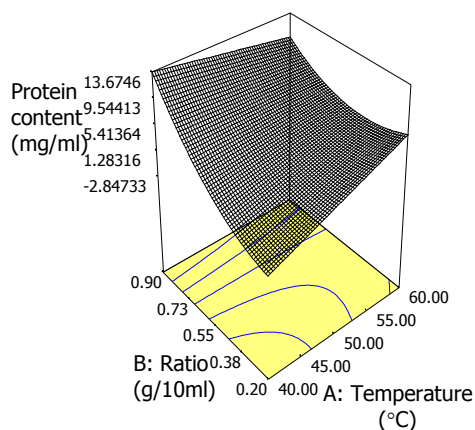
Run order	Temp (° C)	Ratio (g/10ml)	Feather degradation (%)		Protein content (mg/ml)		Free amino acid (mg/ml)	
			Actual	Predicted	Actual	Predicted	Actual	Predicted
			value	value	value	value	value	value
6	40	0.2	2.5	19.0	0	0	0.3	1.4
18	40	0.2	8.1	19.0	0	0	0.3	1.4
5	60	0.2	23.4	20.1	7.8	6.1	1.1	1.0
8	60	0.2	22	20.1	8.0	6.1	1.5	1.0
1	40	0.9	13.1	19.0	11.1	13.6	11.9	13.7
19	40	0.9	7.1	19.0	8.9	13.6	15.8	13.7
9	60	0.9	18	20.1	6.8	9.7	10.8	13.3
10	60	0.9	16.3	20.1	6.8	9.7	10.0	13.3
11	35.86	0.55	26.1	11.0	1.1	1.6	1.9	4.9
15	35.86	0.55	23.2	11.0	1.9	1.6	8.6	4.9
3	64.14	0.55	10.7	12.6	7.1	5.1	6.4	4.4
16	64.14	0.55	10.4	12.6	1.0	5.1	5.4	4.4
13	50	0.06	42.5	27.3	0	2.8	2.2	1.3
14	50	0.06	37.6	27.3	0.8	2.8	3	1.3
4	50	1.04	30.3	27.3	27.3	17.0	24.0	18.8
17	50	1.04	30.7	27.3	15.3	17.0	18.9	18.8
2	50	0.55	25	27.3	3	3.3	9.9	10.0
7	50	0.55	24.7	27.3	5.6	3.3	7.2	10.0
12	50	0.55	23.4	27.3	7.3	3.3	8.9	10.0

ตารางที่ 3.3 ค่าทางสถิติของสมการที่ใช้ทำนายความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยและค่าตอบสนอง

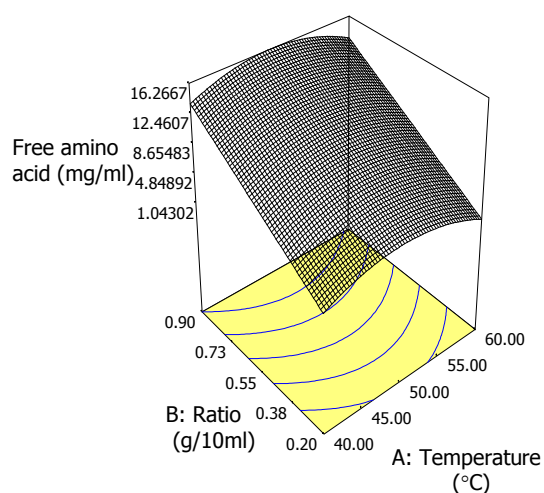
Model	Response	P	Lack of fit	R ²
Feather				
(1)	degradation	0.047	< 0.0001	0.3174
(2)	Protein content	0.0005	0.0872	0.7413
Free amino				
(3)	acid	< 0.0001	0.1641	0.8777

จากตารางที่ 3.4 จะพบว่าค่าตอบสนองที่ได้นั้นไม่ใช่ค่าตอบสนองที่มีค่าสูงสุด เมื่อเทียบกับตารางที่ 3.2 แสดงว่า สมการที่ได้อาจจะไม่ถูกต้อง จึงทำให้นำไปใช้ในการทำนายค่าตอบสนองได้ไม่ดีนัก อาจเนื่องมาจากในขั้นตอนการคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อค่าตอบสนองมาทำการศึกษา จะพบว่าปัจจัยร่วมบางปัจจัย ที่มีผลต่อค่าตอบสนองที่ค่อนข้างสูง แต่เนื่องจากไม่ได้นำมาทำการศึกษาต่อจึงอาจส่งผลต่อค่าตอบสนองที่ได้จากการออกแบบการทดลอง โดยวิธี Central Composite

Design ประกอบกับการกำหนดค่าปัจจัยต่างๆ ที่ไม่เหมาะสมนัก กล่าวคือ ไม่ได้นำสภาวะที่ให้ค่าตอบสนองสูงสุดจากการออกแบบการทดลองโดยวิธี 2^k Factorial Design มากำหนดเป็น Center point โดยวิธี Central Composite Design จึงทำให้การทำนายค่าตอบสนอง และรูปกราฟที่ได้ออกมายังไม่เข้าใกล้สภาวะที่เหมาะสมจริงเท่าใดนัก



รูปที่ 3.1 Surface plot แสดงผลของอุณหภูมิและอัตราส่วนระหว่างปริมาณขี้ไก่ต่อปริมาณเอนไซม์ต่อปริมาณโปรตีนที่เกิดขึ้น



รูปที่ 3.2 Surface plot แสดงผลของอุณหภูมิและอัตราส่วนระหว่างปริมาณขี้ไก่ต่อปริมาณเอนไซม์ต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่เกิดขึ้น

ตารางที่ 3.4 สภาวะที่เหมาะสมต่อค่าตอบสนองจากการทำนายเทียบกับการทดลอง

Response	Opt. condition		Response values	
	Temp. (°C)	Ratio (g/10ml)	Predicted	Actual
Feather degradation (%)	50.3	0.8	27.3	25.0
Protein content (mg/ml)	40.0	0.9	13.6	10.0
Free amino acid (mg/ml)	49.6	0.9	16.2	18.9

4. สรุปผลการทดลอง

จากการออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยขี้ไก่ด้วยเอนไซม์เครติเนส โดยวิธี 2^k Factorial Design และ Central Composite Design พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อเปอร์เซ็นต์การย่อยขี้ไก่คือ อุณหภูมิ 50 °C และ อัตราส่วนของปริมาณขี้ไก่ต่อปริมาณเอนไซม์เท่ากับ 0.8 g/10 ml มีการย่อยสูงสุดจากการทำนาย คือ 27.36 %

กิตติกรรมประกาศ

ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยฝ่ายอุตสาหกรรม โครงการโครงการอุตสาหกรรม สำหรับนักศึกษาปริญญาตรี ประจำปี 2546

เอกสารอ้างอิง

- Bressollier, P., Letourneau, F., Urdaci, M. and Verneuil, B., 1999, *J. Microbiol.*, 31: 243-250.
- Lin, X., Lee, C.G., Casale, E.S. and Shih, J.C.H., 1992, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3271-3275.
- Lowry, 1951, *J. Biol.Chem.*, 193 : 267-275.
- Rosen, H., 1957, *Arch. Biochem. Biophys.*, 67: 10-15.