

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญตาราง	ฐ
สารบัญรูป	ฒ
อักษรย่อ	ด
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 เอนไซม์โปรติเอสและกรรมวิธีการผลิตทางอุตสาหกรรม	1
1.1.1 เอนไซม์โปรติเอสจากพืช	4
1.1.2 เอนไซม์โปรติเอสจากสัตว์	5
1.1.3 เอนไซม์โปรติเอสจากจุลินทรีย์	6
1.2 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก 11	
1.2.1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ	11
1.2.2 วัตถุประสงค์ที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในอุตสาหกรรมหมัก	15
1.2.2.1 กากน้ำตาล	15
1.2.2.2 กากถั่วเหลือง	15
1.2.2.3 กากมันฝรั่ง	16
1.3 งานวิจัยเกี่ยวกับการใช้มันฝรั่งเป็นแหล่งวัตถุดิบในกระบวนการหมัก	21
1.4 วัตถุประสงค์การทดลอง	22
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	23
2.1 สารเคมี	23
2.2 เครื่องมือ	24
2.3 วัตถุดิบ	25
2.3.1 แป้งมันฝรั่ง	25
2.3.2 กากมันฝรั่ง	25
2.3.3 ตัวอย่างกากมันฝรั่งเพื่อการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย	25

2.4	การหาค่าประกอบทางเคมีของแป้งและกากมันสตาร์ด	25
2.4.1	การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด	25
2.4.2	การวิเคราะห์หาไขมัน	29
2.4.3	การวิเคราะห์หาความชื้น	30
2.4.4	การวิเคราะห์หาเส้นใย	31
2.4.5	การวิเคราะห์หาเถ้า	33
2.4.6	การหาเปอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรต	33
2.5	การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งและกากมันสตาร์ดและการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและกลูโคส	34
2.5.1	การเตรียมอาหารเหลว	34
2.5.1.1	การเตรียมอาหารมันสตาร์ดที่ละลายในน้ำกลั่น (สูตร 1ก และ 1ข)	34
2.5.1.2	การเตรียมอาหารมันสตาร์ดที่เพิ่มเปปโทนหรือแอมโมเนียมคลอไรด์ (สูตร2)	34
2.5.1.3	การเตรียมอาหารมันสตาร์ดที่ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (สูตร3)	34
2.5.1.4	การเตรียมอาหารมันสตาร์ดที่ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (สูตร 4)	35
2.5.2	การเตรียมอาหารแข็ง	35
2.5.3	การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและน้ำตาลกลูโคสในอาหารเหลว	36
2.5.3.1	การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Bradford	36
2.5.3.2	การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสโดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)	37
2.6	การศึกษาลักษณะของชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของแบคทีเรีย	39
2.6.1	การศึกษาลักษณะของอาหารเหลว สูตร 1ก ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา	39
2.6.2	การศึกษาลักษณะของอาหารสูตร 1ข และสูตร 2 ต่อการเจริญของ <i>B.subtilis</i>	39

2.6.3	การศึกษามูลของอาหารสูตร 3 ต่อการเจริญของแบคทีเรีย ยีสต์ และรา	39
2.7	การแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตโปรตีนบนอาหารแข็งสก็มมิลค์	40
2.7.1	การเตรียมอาหารแข็งสก็มมิลค์	40
2.7.2	การคัดเลือกเบื้องต้น	40
2.7.3	การศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อแบคทีเรีย	41
2.7.4	การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีนปริมาณสูงในอาหารเหลว	41
2.7.5	การหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีน	42
2.8	การศึกษามูลของอาหารมัสตาร์ดต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรตีนของเชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i>	44
2.8.1	การศึกษามูลของอาหารมัสตาร์ด สูตร 3 ต่อการเจริญของเชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i>	44
2.8.2	การศึกษามูลของอาหารมัสตาร์ดสูตร 4 ต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีนของเชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i>	44
2.9	การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรตีนจากเชื้อ <i>B. licheniformis</i>	44
2.9.1	ศึกษามูลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีน	44
2.9.2	ศึกษามูลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีน	45
2.9.3	ศึกษามูลของเวลาต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีน	45
2.10	การศึกษาสัมบัติทั่วไปของเอนไซม์โปรตีนที่ผลิตจากเชื้อ <i>B.licheniformis</i>	45
2.10.1	ศึกษามูลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีน	45
2.10.2	ศึกษามูลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีน	47
2.10.3	ศึกษามูลของเวลาต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีน	47
2.10.4	ศึกษาปริมาณเอนไซม์ต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีน	47
2.10.5	ศึกษามูลของความเข้มข้นสับสเตรทต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีน	47
บทที่ 3	ผลการทดลอง	49
3.1	องค์ประกอบทางเคมีของแป้งและกากมัสตาร์ด	49

3.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งและกากมันสำปะหลังในการศึกษาเบื้องต้น	51
3.2.1 ผลการเตรียมอาหารมันสำปะหลัง สูตร 1ก	51
3.2.2 ผลการเตรียมอาหารมันสำปะหลัง สูตร 1ข	52
3.2.3 ผลการเตรียมอาหารมันสำปะหลัง สูตร 2	54
3.2.4 ผลการเตรียมอาหารมันสำปะหลัง สูตร 3	55
3.3 ชนิดของอาหารมันสำปะหลังต่อการเจริญของจุลินทรีย์	57
3.3.1 ผลของอาหารมันสำปะหลัง สูตร 1ก ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา	57
3.3.2 ผลของอาหารมันสำปะหลัง สูตร 1ข และสูตร 2 ต่อการเจริญของ <i>B.subtilis</i>	59
3.3.3 ผลของอาหารมันสำปะหลัง สูตร 3 ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา	61
3.4 ผลการแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส	62
3.4.1 ผลการคัดเลือกเบื้องต้น	62
3.4.2 การคัดเลือกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสปริมาณสูงในอาหารเหลว	68
3.5 ผลของอาหารมันสำปะหลังต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ <i>B.licheniformis</i>	71
3.5.1 ผลของอาหารมันสำปะหลัง สูตร 1ข และสูตร 3 ต่อการเจริญของเชื้อ <i>B.licheniformis</i>	71
3.5.1.1 คุณสมบัติของอาหาร	71
3.5.1.2 ผลการเจริญและผลิตเอนไซม์โปรติเอส	72
3.5.2 ผลของอาหารมันสำปะหลัง สูตร 4 ต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ <i>B.licheniformis</i>	75
3.5.2.1 คุณสมบัติของอาหาร	75
3.5.2.2 ผลการผลิตเอนไซม์โปรติเอส	76
3.6 สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ <i>B.licheniformis</i>	78
3.6.1 ผลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส	78
3.6.2 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส	79
3.6.3 ผลของเวลาต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส	81

3.7 สมบัติทั่วไปของเอนไทม์โปรตีนที่ผลิตได้จากเชื้อ <i>B.licheniformis</i>	82
3.7.1 ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไทม์โปรตีน	82
3.7.2 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไทม์โปรตีน	84
3.7.3 ผลของเวลาต่อการทำงานของเอนไทม์โปรตีน	86
3.7.4 ผลของปริมาณเอนไทม์ต่อการทำงานของเอนไทม์โปรตีน	87
3.7.5 ผลของความเข้มข้นสับสเตรตต่อการทำงานของเอนไทม์โปรตีน	89
บทที่ 4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	92
4.1 คุณสมบัติของแป้งและกากมันฝรั่ง	92
4.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งและกากมันฝรั่ง	93
4.3 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไทม์โปรตีน	94
4.4 การผลิตเอนไทม์โปรตีนในอาหารมันฝรั่ง	95
4.5 สมบัติทั่วไปและสมบัติทางจุลชีวศาสตร์ของเอนไทม์โปรตีน	96
เอกสารอ้างอิง	98
ภาคผนวก	103
ประวัติผู้เขียน	107

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1.1 การจัดกลุ่มของเอนไซม์โปรติเอส	4
1.2 คุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา	8
1.3 เอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรมและการประยุกต์ใช้	9
1.4 ข้อมูลการนำเข้าของเอนไซม์ทุกชนิดของประเทศไทยตั้งแต่ปี 1991-1997	10
1.5 ปริมาณธาตุที่เป็นองค์ประกอบของจุลินทรีย์	12
1.6 Normal ranges in seed size of Brassica oilseeds by species and form.	19
1.7 Chemical composition and essential amino acids content (%DM) of mustard seed, mustard meal and soybean meal.	20
3.1 ปริมาณโปรตีนในแป้งมัสตาร์ดชนิด M1-M10	49
3.2 องค์ประกอบทางเคมีในแป้งมัสตาร์ด และกากมัสตาร์ด	50
3.3 ปริมาณโปรตีนในอาหารเหลวและความสามารถในการละลายของโปรตีนเมื่อเทียบกับโปรตีนทั้งหมด	52
3.4 ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลกลูโคสในอาหารเหลวและลักษณะอาหารแข็งมัสตาร์ด สูตร 1ข	53
3.5 ปริมาณโปรตีนในอาหารเหลวและลักษณะอาหารแข็งมัสตาร์ด สูตร 2	54
3.6 ปริมาณโปรตีนในอาหารเหลวมัสตาร์ด สูตร 3	56
3.7 ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลกลูโคสในอาหารเหลวมัสตาร์ด สูตร 3	57
3.8 การเจริญของเชื้อ <i>B.subtilis</i> บนอาหารมัสตาร์ด สูตร 1ข และสูตร 2	60
3.9 การเจริญของเชื้อ แบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา ในอาหารมัสตาร์ด สูตร 1ข และสูตร 3	62
3.10 แหล่งที่มาของตัวอย่างกากมัสตาร์ดและจำนวนเชื้อที่แยกได้	63
3.11 ชนิดแบคทีเรียที่แยกได้และลักษณะทาง Macroscopic และ Microscopic	63
3.12 ลักษณะทาง Macroscopic Microscopic และเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone	66
3.13 โปรติเอสแอคติวิตีในน้ำเลี้ยงของแบคทีเรียแต่ละชนิด	69
3.14 ผลทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i>	70
3.15 ปริมาณโปรตีนในอาหารมัสตาร์ด สูตร 1ข และสูตร 3	71
3.16 ปริมาณกลูโคสในอาหารมัสตาร์ด สูตร 1ข และสูตร 3	72

3.17 ผลการเจริญของ <i>B.licheniformis</i> ในอาหารมัสตาร์ดโดยวัดค่า OD 620 นาโนเมตร	73
3.18 ผลการผลิตโปรตีนของเชื้อ <i>B.licheniformis</i> ในอาหารมัสตาร์ดสูตร 1x และสูตร 3	74
3.19 ปริมาณโปรตีนในอาหารมัสตาร์ดสูตร 1x สูตร 3 และสูตร 4	75
3.20 ปริมาณกลูโคสในอาหารมัสตาร์ดสูตร 1x สูตร 3 และสูตร 4	76
3.21 ผลการผลิตโปรตีนของเชื้อ <i>B.licheniformis</i> ในอาหารมัสตาร์ดสูตร 1x สูตร 3 และ สูตร 4	77
3.22 ผลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีนจากเชื้อ <i>B.licheniformis</i>	78
3.23 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีนจากเชื้อ <i>B.licheniformis</i>	80
3.24 ผลของเวลาต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีนจากเชื้อ <i>B.licheniformis</i>	81
3.25 ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีนจากเชื้อ <i>B.licheniformis</i>	83
3.26 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีนจากเชื้อ <i>B.licheniformis</i>	85
3.27 ผลของเวลาต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีนจากเชื้อ <i>B.licheniformis</i>	86
3.28 ผลของปริมาณเอนไซม์ต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีนจากเชื้อ <i>B.licheniformis</i>	88
3.29 ผลของเวลาต่อปริมาณไทโรซีนที่เพิ่มขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์โปรตีน	89
3.30 ผลของความเข้มข้นเคซีนต่อความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา	90

สารบัญรูป

รูป	หน้า
1.1 ปฏิบัติการสร้างและสลายพันธะเปปไทด์โดยเอนไซม์โปรติเอส	1
1.2 แผนผังกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหย	17
1.3 ลักษณะดอกมัสตาร์ด	18
1.4 ลักษณะดอกมัสตาร์ด	18
2.1 Distillation apparatus	28
2.2 Soxhlet extraction apparatus	30
2.3 สูตรโครงสร้างเคมีของ Coomassie Brilliant Blue G-250	36
2.4 การเกิดปฏิกิริยาระหว่างกลูโคสและ Dinitrosalicylic acid	38
2.5 การเจือจางแบบ Serial ten fold dilution	40
3.1 ลักษณะของแป้งและกากมัสตาร์ด	51
3.2 อาหารเหลวมัสตาร์ด สูตร 1ข	53
3.3 อาหารแข็งมัสตาร์ด สูตร 1ข	53
3.4 อาหารแข็งมัสตาร์ด สูตร 2	55
3.5 อาหารเหลวมัสตาร์ด สูตร 3	57
3.6 การเจริญของแบคทีเรีย (<i>B.subtilis</i>) ในอาหารมัสตาร์ด M1 M7 M10 สูตร 1ก และ Nutrient broth	58
3.7 การเจริญของแบคทีเรีย (<i>E.coli</i>) ในอาหารมัสตาร์ด M1 M7 M10 สูตร 1ก และ Luria broth	58
3.8 ลักษณะโคโลนีของ <i>B.subtilis</i> เมื่อเจริญบนอาหารมัสตาร์ด M1 สูตร 2	60
3.9 ลักษณะโคโลนีของ <i>B.subtilis</i> เมื่อเจริญบนอาหารมัสตาร์ด M7 สูตร 2	61
3.10 ลักษณะโคโลนีของ <i>B.subtilis</i> เมื่อเจริญบนอาหารมัสตาร์ด M10 สูตร 2	61
3.11 เชื้อ <i>Bacillus licheniformis</i> บนอาหารแข็งสกีมมิลค์ ที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง	68
3.12 ผลการเจริญของเชื้อ <i>B.licheniformis</i> ในอาหารมัสตาร์ดโดยวัดค่า OD 620 นาโนเมตร	73
3.13 ผลการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ <i>B.licheniformis</i> ในอาหารมัสตาร์ดสูตร 1ข และสูตร 3	74

3.14 ผลการผลิตเอนไซม์โปรตีนของเชื้อ <i>B.licheniformis</i> ในอาหารมัสตาร์ด สูตร 3 และสูตร 4	77
3.15 ผลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีนจากเชื้อ <i>B.licheniformis</i>	79
3.16 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีนจากเชื้อ <i>B.licheniformis</i>	80
3.17 ผลของเวลาต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีนจากเชื้อ <i>B.licheniformis</i>	82
3.18 ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีนจากเชื้อ <i>B.licheniformis</i>	84
3.19 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีนจากเชื้อ <i>B.licheniformis</i>	85
3.20 ผลของเวลาต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีนจากเชื้อ <i>B.licheniformis</i>	87
3.21 ผลของปริมาณเอนไซม์ต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีนจากเชื้อ <i>B.licheniformis</i>	88
3.22 ผลของเวลาต่อปริมาณไทโรซีนที่เพิ่มขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์โปรตีน	90
3.23 ผลของความเข้มข้นเคซีนต่อความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา	91
3.24 Lineweaver-Burk Plot	91

อักษรย่อ

มก.	มิลลิกรัม
มล.	มิลลิลิตร
AU	Acid protease Unit
BTU	Bromelain Tyrosine Unit
CFU	Colony Forming Unit
DM	Dry Mass
HU	Haemoglobin Unit
ml	mililiter
mM	milimolar
M	molar
MW	molecular weight
nm	nanometer
OD	optical density