

บทที่ 2

อุปกรณ์ และ วิธีการทดลอง

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
3,5-Dinitrosalicylic acid	Aldrich
Agar	Difco
Beef extract	Difco
Bovine serum albumin	Sigma
Calcium chloride	Merck
Casein	BDH
Citric acid	Fluka
Coomassie brilliant Blue G 250	Fluka
Copper (II) sulfate anhydrous	Merck
Disodium hydrogen phosphate anhydrous	BDH
Ethanol, 95%	-
Glucose	-
Glycine	Fluka
Hexane	-
Hydrochloric acid	J.T.Baker
Magnesium sulphate	M&B
Methyl red	-
Peptone	HiMedia Laboratories
Phenolphthalene	-
Phosphoric acid	J.T.Baker
Potassium hydrogen phthalate	Carlo Erba
Skim milk	HiMedia Laboratories
Sodium carbonate	Carlo Erba

สารเคมี

Sodium dihydrogen phosphate
 Sodium hydroxide
 Sodium potassium tartrate
 Sulfuric acid
 Trichloroacetic acid
 Tris(hydroxymethyl)-aminomethane
 Trisodium citrate
 Tyrosine
 Yeast extract

บริษัทผู้ผลิต

Fluka
 Thasco
 J.T.Baker
 Lab-Scan
 Carlo Erba
 BDH
 -
 Difco

2.2 เครื่องมือ**เครื่องมือ**

กล้องจุลทรรศน์
 เตาเผา Model SCF 1200
 ตู้น้ำเย็น
 Analytical balance
 Blender
 Centrifuge JS-MC
 Crucible
 Desiccator
 Heating mantle
 Hot plate/stirrer
 Micropipette 200-1000 μl
 Micropipette 50-200 μl
 pH Meter 25
 Shaker/water bath
 Spectrophotometer UV/vis
 Spectronic 21

บริษัทผู้ผลิต

Olympus
 Carbolite
 Toshiba
 Satorius
 Moulinex
 Beckman
 Tomas scientific
 -
 Electromantle
 Heidolph
 Gilson
 Biohit
 Radiometer
 Heto
 Perkin Elmer
 Milton Roy

2.3 วัดคุณภาพ

2.3.1 แป้งมัสตาร์ด

แป้งมัสตาร์ด 10 ชนิด (M1-M10) ผลิตภัณฑ์ที่ห้องพัฒนาและวิจัยเพื่อเพิ่มผลผลิต สนับสนุนโดยบริษัทลานนาโปรดักท์ ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2.3.2 กากมัสตาร์ด

กากมัสตาร์ดเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตน้ำมันหอมระเหยมัสตาร์ด (mustard meal) จากบริษัทลานนาโปรดักท์ นำมาทำให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นและสกัดไขมันออกโดยใช้ Soxhlet extraction apparatus มี เอ็กเซนเป็นตัวทำละลาย สกัดนาน 3 ชั่วโมง หรือจนไขมันออกหมด นำออกมาตากให้เอ็กเซน ระเหยออกจนหมด เก็บใส่ภาชนะนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เรียก กากมัสตาร์ดหลังการสกัดไขมันนี้ว่า Defatted mustard meal (DMM)

2.3.3 ตัวอย่างกากมัสตาร์ดเพื่อการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

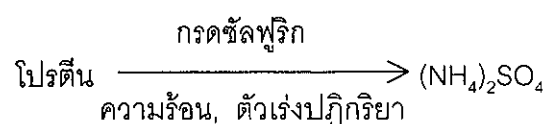
เก็บตัวอย่างกากมัสตาร์ด จากแหล่งที่มีการทิ้ง กากมัสตาร์ด และมัสตาร์ดที่เหลือจากการใช้เป็นอาหารสัตว์นำมาคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

2.4 การหาองค์ประกอบทางเคมีของแป้งมัสตาร์ด และ กากมัสตาร์ด

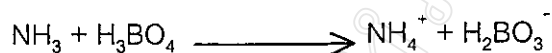
2.4.1 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมด⁽³¹⁾

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมด เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ในสารประกอบอินทรีย์ต่างๆ (Organic nitrogen content) โดยมีโปรตีนและ สารประกอบอื่นที่ไม่ใช่โปรตีน แต่มีไนโตรเจน (Non protein nitrogen) รวมอยู่ด้วย โดยตัวอย่างจะถูกย่อยด้วยกรดกำมะถันเข้มข้น ที่มีโซเดียมหรือโพแทสเซียมซัลเฟต เพื่อเพิ่มจุดเดือดของการย่อย และมีคอปเปอร์ซัลเฟต หรือเมอร์คิวริกออกไซด์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาให้เกิดเร็วขึ้น โดยเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไนโตรเจนอินทรีย์ (Organic nitrogen) ได้เป็นแอมโมเนียซัลเฟตและแอมโมเนียซัลเฟตที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยาต่อ กับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นที่มากเกินไป จะได้ก๊าซแอมโมเนียออกมา แล้วไล่ก๊าซแอมโมเนียออกโดยการกลั่นโดยตรง หรือการกลั่นไอน้ำ (steam distillation) จับก๊าซแอมโมเนียด้วยสารละลายกรดบอริก แล้วไทเทรตหาปริมาณแอมโมเนียด้วยสารละลายกรดกำมะถันมาตรฐาน แสดงได้ดังสมการข้างล่างดังนี้

การย่อย (Digestion)



การทำให้เป็นกลางและการกลั่น (Neutralization and Distillation)



การไทเทรต (Titration)



ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมด ในการทดลองนี้ใช้วิธีของ Kjeldahl

ก.สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมด

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์
ซิงโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับ ปริมาตรเป็น 1 ลิตร ในขวดวัดปริมาตร
2. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 โมลาร์
เจือจางกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (MW. 36.46 37.4%) ปริมาตร 8.26 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ในขวดวัดปริมาตร
3. สารละลายโบแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1000 โมลาร์
ซิงโบแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.0423 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร
4. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40%(W/V)
ซิงโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตร
5. กรดกำมะถันเข้มข้น (96-98%)
6. เมทิลเรด 1%(W/V)
7. ฟีนอล์ฟทาลีน 1%(W/V)
8. คอปเปอร์ซัลเฟต แอนไฮดรัส

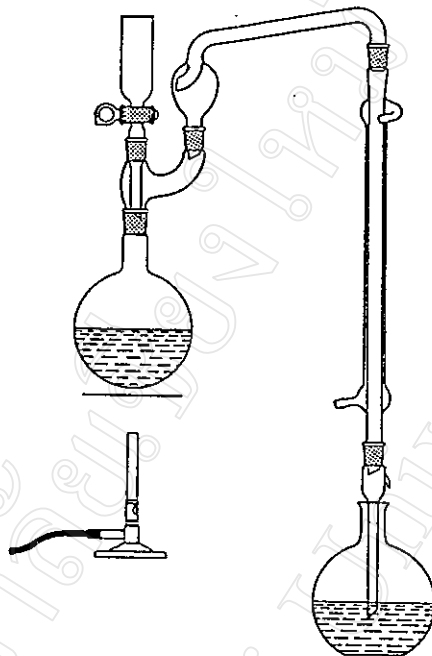
ข. การทำมาตรฐานสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และกรดไฮโดรคลอริก
 ปิเปต สารละลายโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1000 โมลาร์ ปริมาตร 10.0 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วทำการไทเทรต ด้วยสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ใช้ฟีนอล์ฟทาไลน์เป็นอินดิเคเตอร์ ทำซ้ำ 3 ครั้ง ใช้ค่าเฉลี่ยของสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทำให้สารละลายในขวดรูปชมพู่เปลี่ยนเป็นสีบานเย็น แล้วคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของ โซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วทำแบบเดิม แต่ใช้สารละลายไฮโดรคลอริก แทน สารละลายโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต แล้วคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของกรดไฮโดรคลอริก

ค. วิธีวิเคราะห์หาโปรตีนทั้งหมด

ชั่งแบ่งมัสตาร์ด หรือกากมัสตาร์ด 0.2000 กรัม ใส่ในขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร ใส่ boiling chip 5-10 เม็ด เติมคอปเปอร์ซัลเฟตแอนไฮดรัส 0.5 กรัม และเติมกรด กำมะถันเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ทำการต่อชุด รีฟลักซ์แล้วให้ความร้อน โดย heating mantle จนได้ สารละลายสีฟ้าใส หรือใช้เวลารีฟลักซ์ประมาณ 3-4 ชั่วโมง โดยทำในตู้คว้นแล้วหยุดให้ความร้อน รอจนสารละลายเย็นนำไปทำการทดลองต่อทันที

รินสารละลายในขวดก้นกลมลงในปิ๊กเกอร์ที่มีน้ำประมาณ 100 มิลลิลิตร แล้วริน คืบลงในขวด ล้างปิ๊กเกอร์ และ เทผ่านคอนเดนเซอร์โดยใช้น้ำประมาณ 100 มิลลิลิตร และเพิ่ม boiling chip ลงไปเพื่อป้องกันการเกิด super heating แล้วใช้ขวดก้นกลมคอยาวเติม 0.1 โมลาร์ สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 40 มิลลิลิตร เติมเมทิลเรด 2-3 หยดเป็นอินดิเคเตอร์ แล้วทำการ ต่อชุดกลั่นโดยระหว่างข้อต่างๆใส่ grease แล้วเติม 40 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาณ 90 มิลลิลิตร ลงในขวดก้นกลมด้านบนโดยผ่านกรวย ระวังอย่าให้เข้าคอนเดนเซอร์ แล้วรีบปิดจุก ทันทันที ทำการกลั่นจนกระทั่งกาชแอมโมเนียหมด ทดสอบโดยกระดาษลิตมัสขึ้น อังที่ปลาย คอนเดนเซอร์ (การต่อชุดกลั่นควรวางตำแหน่งของเครื่องกลั่นให้เหมาะสมดังรูป 2.1)

นำสารละลายในขวดก้นกลมคอยาว ที่มีสารละลายไฮโดรคลอริก ไปทำการ ไทเทรตกลับ (Back titration) กับสารละลายมาตรฐาน 1.0 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ บันทึก ปริมาตรของสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทำให้สารละลายเปลี่ยนเป็นสีไม่มีสี แล้วนำไป คำนวณกลับเป็นปริมาณโปรตีนทั้งหมด



รูป 2.1 Distillation apparatus

ง. วิธีการคำนวณ

การทำมาตรฐานสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และสารละลายกรด ไฮโดรคลอริก ให้สูตรคำนวณคือ

$$M_1 V_1 = M_2 V_2$$

M_1 = ความเข้มข้นของโปแทสเซียมไฮดรเจนฟอสเฟต คือ 0.1000 โมลาร์

V_1 = ปริมาตรของโปแทสเซียมไฮดรเจนฟอสเฟต คือ 10.0 มิลลิลิตร

M_2 = ความเข้มข้นที่แน่นอนของโซเดียมไฮดรอกไซด์

V_2 = ปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไทเทรต

การหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

โมลของกาซแอมโมเนีย = โมลของไนโตรเจนในสารตัวอย่าง

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน} = \frac{(A-B) \times 14 \times 100}{1000 \times W}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์โปรตีน} = \frac{(A-B) \times 14 \times 100 \times 6.25}{1000 \times W}$$

A = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานไฮโดรคลอริก (มล.) x ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (โมลาร์)

B = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (มล.) x ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (โมลาร์)

W = น้ำหนักสารตัวอย่าง (กรัม)

2.4.2 การวิเคราะห์ไขมัน⁽³²⁾

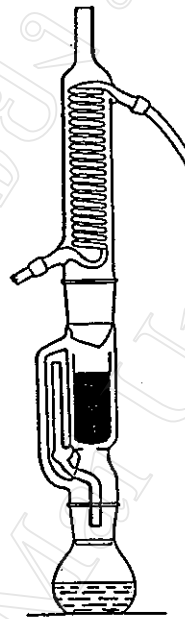
ไขมันในอาหารมี สองชนิดคือ ไขมันอิสระ (free lipid) และไขมันที่อยู่รวมกับสารอื่น (bound lipid) ไขมันจะถูกสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ต่างๆ โดยเป็นตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (non-polar solvent) ไขมันที่สกัดได้จะเป็น crude fat และ ไขมันอิสระ แต่ถ้าทำการสกัดด้วย ตัวทำละลายที่มีขั้ว (polar solvent) ไขมันที่สกัดได้จะมี bound lipid ปนอยู่ด้วย แต่ bound lipid สามารถสลายได้โดยการไฮโดรไลส์ หรือใช้ปฏิกิริยาเคมีย่อยสลายให้เป็นไขมันอิสระ ส่วนประกอบสำคัญในไขมันอิสระคือ ไตรกลีเซอไรด์และมีกรดไขมันอิสระบ้างเล็กน้อยสามารถวิเคราะห์ได้โดยตรง (Direct extraction method) โดยใช้ชุด Soxhlet extraction apparatus ดังนั้นปริมาณของไขมันในอาหารที่สกัดออกมาได้จึงขึ้นกับวิธีการสกัด⁽³³⁾

ก. วิธีการวิเคราะห์ไขมัน

ทำการสกัดไขมันในชุด Soxhlet extraction apparatus (รูป 2.2) โดยชั่งแป้งมัสตาร์ด 2-3 กรัม จดน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ใน thimble ต่อชุดกลั่น และใช้ตัวทำละลายเฮกเซน ทำการสกัดนาน 5-6 ชั่วโมงหรือจนกระทั่งไขมันออกมาหมด แล้วนำเฮกเซน ที่มีไขมันอยู่ไปทำการระเหย เฮกเซน ออกจนหมดด้วยเครื่องระเหย แล้วชั่งหาน้ำหนักของไขมันที่เหลืออยู่

ข. วิธีการคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไขมัน} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันที่เหลืออกอยู่ (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักแป้งมาตรฐานเริ่มต้น (กรัม)}}$$



รูป 2.2 Soxhlet Extraction Apparatus

2.4.3 การวิเคราะห์หาความชื้น⁽³⁴⁾

ความชื้นคือ สารที่สูญเสียไปจากการเพิ่มความร้อนให้สารนั้น โดยความร้อนที่ให้จะต้องมีอุณหภูมิไม่สูงกว่าจุดเดือดของน้ำ หรือ อาจปล่อยสารตั้งทิ้งไว้ในสารดูดความชื้น (dehydrating agent) หรือโดยการให้ความร้อนในสภาพสุญญากาศ น้ำหนักที่ลดลงคือ สารที่ระเหยได้ทั้งหมด (total volatile matter) ที่หายไป ณ ที่อุณหภูมินั้น ส่วนกากหรือของแข็งแห้งที่เหลืออยู่หลังจากการระเหยออกไปหมดแล้ว เรียกว่า ของแข็งทั้งหมด (total solid) พบว่าน้ำในอาหาร มี 3 รูป ได้แก่ Bound water คือ น้ำที่รวมอยู่กับสารประกอบในสารด้วยพันธะทางเคมี (chemical bound) เป็นน้ำที่รวมอยู่ในผลึก (water of crystallization หรือ hydrated) ชนิดที่ 2 คือ Adsorbed water เป็นน้ำที่ถูกดูดซับอยู่ที่ชั้นผิวนอกของส่วนประกอบในสาร เป็นการรวมกัน

ทางกายภาพ (physical bound) และชนิดสุดท้ายคือ Bulk หรือ Free water เป็นน้ำที่เป็นส่วนประกอบในสารที่แยกอยู่เป็นอิสระ และระเหยกลายเป็นไอน้ำได้ง่าย เมื่อนำสารไปอบหรือทำให้แห้งอาหารทุกชนิดประกอบด้วยส่วนประกอบทางเคมีชนิดต่างๆเป็น heterogeneous mixtures และมีน้ำทั้ง 3 ชนิดเป็นส่วนประกอบในปริมาณที่แตกต่างกัน ซึ่งวิธีวิเคราะห์หาความชื้นมีหลายวิธีได้แก่ 1. วิธีการอบแห้ง (Drying method) 2. วิธีการกลั่น (Distillation method) 3. วิธีทางเคมี (Chemical method) และ 4. วิธีใช้เครื่องมือ (Instrumental method) ในการหาความชื้นของแป้งมัสตาร์ดเลือกใช้วิธีการอบแห้ง น้ำที่สูญเสียไปจะเป็นส่วน free water⁽³³⁾

ก. วิธีการอบแห้ง (Drying method)

ใช้จานเพาะเชื้อ (Petridish) ที่มีฝาปิดอบให้แห้งสนิทที่อุณหภูมิ 100 – 105 องศาเซลเซียสในตู้อบประมาณ 30 นาที ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น (Desiccator) แล้วชั่ง น้ำหนักที่แน่นอน หลังจากนั้นชั่งแป้งมัสตาร์ด 5 กรัมใส่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่จดน้ำหนักที่แน่นอน นำไปอบในตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้ให้มีอุณหภูมิ 100 – 105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมงปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักที่เหลืออยู่ นำไปอบซ้ำ 2-3 ครั้งจนน้ำหนักคงที่ ค่าที่ได้ต้องไม่แตกต่างกันเกิน 0.05 กรัม ชั่งน้ำหนักของของแข็งที่เหลืออยู่ คำนวณหาน้ำหนักที่หายไปและคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นได้ดังนี้

ข. วิธีการคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{(\text{น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)} - \text{น้ำหนักที่เหลือ (กรัม)}) \times 100}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)}}$$

2.4.4 การวิเคราะห์หาเส้นใย^(34,35)

เส้นใยในอาหาร คือ ส่วนของสารประกอบอินทรีย์ที่ไม่ละลาย และเหลืออยู่หลังจากที่สารตัวอย่างผ่านขั้นตอนการสกัด ด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ส่วนประกอบหลักของเส้นใยอาหารคือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส เพกติน ไฮโดรคอลลอยด์ และ ลิกนิน วิธีการสกัดที่ต่างกันจะได้ส่วนของเส้นใยที่เหลืออยู่ต่างกันไป วิธีการสกัดที่ใช้ สารละลายกรดกำมะถันเจือจาง และ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง ส่วนที่เหลือจากการสกัดคือเส้นใยที่มีส่วนประกอบหลักเป็น เซลลูโลส โดยส่วนที่เหลือเป็นลิกนิน สำหรับเฮมิเซลลูโลส เพกติน และ ไฮโดรคอลลอยด์เป็นส่วนที่ละลายได้จึงตรวจไม่พบ ดังนั้นชนิดของเส้นใยแปรผันขึ้นกับชนิดของอาหารตัวอย่างและวิธีในการวิเคราะห์

ก. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาเส้นใย

1. สารละลายกรดกำมะถัน 1.25% (W/V)

ปีเปตสารละลายกรดกำมะถัน 96 % ปริมาตร 13.02 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1000 มิลลิลิตร

2. ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.25% (W/V)

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 98% 12.75 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 มิลลิลิตร

3. เอทิลแอลกอฮอล์ 95%

ข. วิธีการวิเคราะห์หาเส้นใย

ชั่งแบ่งมัดสตาร์ดหนัก 2-3 กรัมจัดน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดกำมะถัน 1.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 200 มิลลิลิตร การเติมสารละลายกรดกำมะถันเริ่มต้นให้เติม 30-40 มิลลิลิตรก่อนเพื่อช่วยให้แบ่งที่แห้งกระจายตัวได้ดีแล้วจึงเติมจนครบ 200 มิลลิลิตร ต้มให้เดือดนาน 30 นาที การต้มต้องทำด้วยความระมัดระวัง ขณะต้มควรปิดด้วยกระจกนาฬิกา เพื่อรักษาระดับของสารละลายให้คงที่ ถ้าปริมาตรลดลงให้เติมน้ำร้อนลงไปจนปริมาตรเท่าเดิม ขณะต้มควรเขย่าเป็นครั้งคราว

กรองโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No. 54 ต่อกับ Buchner funnel ค่อย ๆ เทน้ำเดือดใส่ลงในกรวยปล่อยทิ้งไว้ให้กรวยร้อนแล้วจึงเปิด suction เทสารที่ต้มไว้ลงในกรวย กรองกากทั้งหมดให้เสร็จภายใน 10 นาที ล้างกากที่กรองได้ด้วยน้ำอุ่นครั้งละประมาณ 50 มิลลิลิตร 3 ครั้ง นำกระดาษกรองที่มีตะกอนอยู่มาล้างตะกอนในขวดรูปชมพู่ด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 200 มิลลิลิตร แล้วนำกระดาษกรองออก นำไปต้มให้เดือดนาน 30 นาที แล้วนำไปกรองผ่านกระดาษ Whatman No. 41 ที่อบที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ที่ทราบน้ำหนักแล้ว ล้างตะกอนที่ได้ด้วย 25 มิลลิลิตรของสารละลายกรดกำมะถัน 1.25 เปอร์เซ็นต์ ล้างด้วยน้ำอุ่น 3 ครั้ง ครั้งละ 50 มิลลิลิตร และล้างครั้งสุดท้ายด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร พับกระดาษกรองที่มีกากไว้ใน crucible ที่เผาที่ 600 องศาเซลเซียส 30 นาทีและชั่งหาน้ำหนักแล้ว นำไปอบในตู้อบอุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น นำทั้งหมดไปชั่งหาน้ำหนักกาก แล้วนำไปเผาต่อในเตาเผาให้เป็นเถ้าที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที รวณอุณหภูมิลดต่ำลงเหลือประมาณ 120-150 องศาเซลเซียส เอา crucible ออกปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งหาน้ำหนักเถ้าที่ได้ นำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เส้นใย

ค. วิธีการคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์เส้นใย} = \frac{(\text{น้ำหนักกาก(กรัม)} - \text{น้ำหนักเถ้า(กรัม)}) \times 100}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น(กรัม)}}$$

2.4.5 การวิเคราะห์หาเถ้า⁽³⁶⁾

เถ้าของอาหาร คือ สารประกอบอนินทรีย์ที่เหลืออยู่ (Inorganic residue) หลังจากการเผาไหม้ให้สารประกอบอินทรีย์ (Organic matter) สลายไปหมดแล้ว เป็นส่วนหนึ่งของการประเมินคุณค่าทางอาหารเพราะปริมาณของเถ้าที่ได้เป็นตัวบ่งถึงปริมาณเกลือแร่ (mineral) ในอาหารด้วย แต่ไม่จำเป็นต้องเท่ากับจำนวนสารประกอบอนินทรีย์ที่มีอยู่ในสารเสมอไป เพราะอาจมีบางส่วนของเถ้าหายไป เนื่องจากการระเหย (Volatilization) หรือเกิด interaction ระหว่างส่วนประกอบ⁽³³⁾

ก. วิธีการวิเคราะห์หาเถ้า

เผา crucible ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาเถ้าในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที รอจนอุณหภูมิในเตาเผาตกลงเหลือประมาณ 120-130 องศาเซลเซียส จึงนำออกมาปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้นข้ามคืน แล้วนำไปชั่งหาน้ำหนักของ crucible ซึ่งแบ่งมาตรฐานให้ได้ น้ำหนักที่แน่นอน 1-2 กรัม ใน crucible นำไปเผาด้วยตะเกียงเบนเสนจนไม่มีควันดำเสียก่อน แล้วจึงนำไปเผาต่อในตู้เผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง รอจนอุณหภูมิในเตาเผาตกลงเหลือประมาณ 120-130 องศาเซลเซียส จึงนำออกมา ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้นข้ามคืน แล้วนำไปชั่งหาน้ำหนักของ เถ้าที่เหลืออยู่

ข. วิธีการคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์เถ้า} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้า(กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น(กรัม)}}$$

2.4.6 การหาเปอร์เซ็นต์ของคาร์โบไฮเดรต⁽³⁷⁾

คาร์โบไฮเดรตที่พบในส่วนประกอบในอาหารประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นโมโนแซคคาไรด์, โอลิโกแซคคาไรด์ และ โพลีแซคคาไรด์ โดยโพลีแซคคาไรด์แบ่งย่อยได้เป็น 2 ส่วนคือ โพลีแซคคาไรด์ ที่เป็นโครงสร้าง (Structural polysaccharide) และโพลีแซคคาไรด์ที่เป็นสารอาหาร (nutrient polysaccharide) เช่น แป้ง และ ไกลโคเจน ดังนั้นคาร์โบไฮเดรตในอาหารสามารถหาได้จากการคำนวณ โดยผลรวมของโปรตีนทั้งหมด ไขมัน ความชื้น และเถ้า ลบออกจากร้ำหนักรวม

ของอาหาร ในที่นี้ให้น้ำหนักรวมของอาหารเป็น 100 เปอร์เซ็นต์แล้วลบออกด้วยผลรวมของโปรตีน เส้นใย เถ้า ความชื้น และไขมันที่เป็นเปอร์เซ็นต์ดังนี้

$$\% \text{ คาร์โบไฮเดรต} = 100 - (\% \text{โปรตีน} + \% \text{เส้นใย} + \% \text{เถ้า} + \% \text{ความชื้น} + \% \text{ไขมัน})$$

2.5 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งมัสตาร์ด และกากมัสตาร์ด ^(28,30)

2.5.1 การเตรียมอาหารเหลว

2.5.1.1 การเตรียมอาหารมัสตาร์ดในน้ำกลั่น (สูตร 1 (1% w/v))

สูตร 1ก ชั่งแป้งมัสตาร์ด M1-M10 อย่างละ 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดนาน 5 นาที นำไปปั่นแยกส่วนที่ไม่ละลาย ออก ที่แรงเหวี่ยง 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายที่ได้มาปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับค่า พีเอช 7.0 ด้วย 1.0 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก หรือ 1.0 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ นำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนิ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตาราง นิ้ว หรือ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

สูตร 1ข (4% w/v) ชั่งแป้งมัสตาร์ด M1 M7 M10 และกากมัสตาร์ด อย่างละ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เตรียมเหมือนสูตร 1ก

2.5.1.2 การเตรียมอาหารมัสตาร์ดสูตรเพิ่มเปปไทน์หรือแอมโมเนียมคลอไรด์ (สูตร 2)

วิธีเตรียมเหมือน สูตร 1ข แต่เพิ่ม เปปไทน์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ หรือแอมโมเนียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำไปปรับค่าพีเอชให้เป็น 7.0

2.5.1.3 การเตรียมอาหารมัสตาร์ดในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (สูตร 3 (4%w/v))

ชั่งแป้งมัสตาร์ดและกากมัสตาร์ด อย่างละ 4 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่มีความเข้มข้น 0.0001, 0.001, 0.10, 0.15 และ 0.20 โมลาร์ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดนาน 5 นาที นำไปปั่นแยกส่วนที่ไม่ละลาย ออก ที่แรงเหวี่ยง 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายที่ได้มาปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับค่า พีเอช 7.0 ด้วย 1.0 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก หรือ 1.0 โมลาร์

โซเดียมไฮดรอกไซด์ นำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว หรือ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.5.1.4 การเตรียมอาหารมัสตาร์ดในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

(สูตร 4)

ก. อาหารเพื่อการเจริญของเชื้อ (Inoculum medium) (4% w/v)

ชั่งแป้งมัสตาร์ดหรือกากมัสตาร์ดอย่างละ 2 กรัม ละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปต้มเดือดนาน 5 นาทีแล้วนำไปปั่นแยกส่วนที่ไม่ละลายออก นำสารละลายที่ได้ไปปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นและพีเอชเป็น 7.0 ด้วย 1.0 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริก หรือ 1.0 โมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

ข. อาหารเพื่อการผลิตโปรตีน (Production medium) สูตร 4 (1-4% w/v)

ชั่งแป้งมัสตาร์ดหรือกากมัสตาร์ด 0.5-2.0 กรัม ละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปต้มเดือดนาน 5 นาที รอจนเย็นนำไปปรับพีเอชเป็น 7.0 ด้วย 1.0 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริก หรือ 1.0 โมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

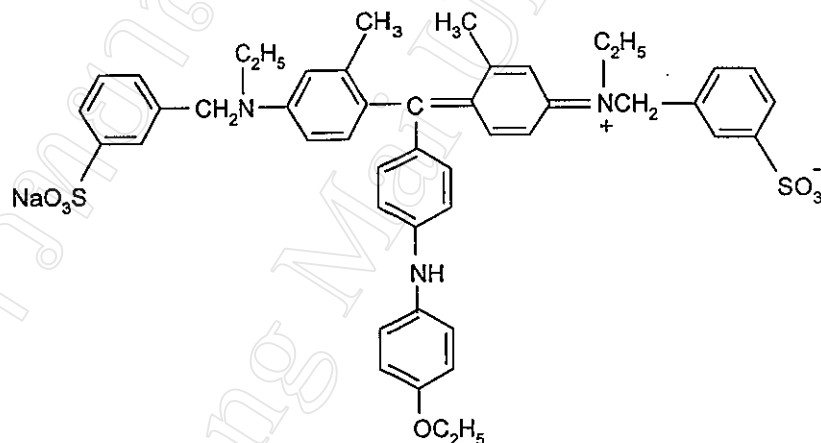
2.5.2 การเตรียมอาหารแข็ง

การเตรียมมัสตาร์ดในสภาพอาหารแข็งทำได้โดยการเพิ่มผงวุ้น (agar) ที่ความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ลงในอาหารเหลวที่เตรียมได้แล้วนำไปต้มอีกครั้งจนผงวุ้นละลายหมดแล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้นำไปใส่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 นาที หรือรอจนกระทั่งอุณหภูมิต่ำลงเหลือประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงนำไปเทลงในจานเพาะเชื้อที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 15-20 มิลลิลิตรต่อจาน โดย aseptic technique หรือเตรียมเป็นอาหารวุ้นแข็งโดยบีบเปิดใส่หลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตรและเอียงทำมุม 30 องศา รอจนอาหารแข็ง เก็บใส่ถุงพลาสติกมัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.5.3 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและกลูโคสในอาหารเหลว

2.5.3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Bradford ⁽³⁸⁾

จากสูตรโครงสร้างของสี Coomassie Brilliant Blue G 250 (รูป 2.3) โครงสร้างส่วนใหญ่เป็นวงแหวน 6 วง จะจับกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำของโปรตีน ด้วยแรงที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic interaction) ตรงกรดอะมิโนประเภท aromatic และ aliphatic ได้แก่ tryptophan, phenylalanine, methionine, proline, isoleucine, leucine, valine และ alanine และโครงสร้างของสีส่วนน้อยที่มีประจุจะจับกับกรดอะมิโน lysine, arginine และ histidine ด้วยแรงดึงดูดระหว่างประจุ (ionic interaction) เมื่อสี Coomassie จับกับโปรตีนสีจะเปลี่ยนจาก red form เป็น blue form และดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ค่า A_{595} แปรผันตรงตามความเข้มข้นของโปรตีน สารที่รบกวนการจับสีคือ Sodium dodecyl sulfate (SDS) และ Triton X-100



รูป 2.3 สูตรโครงสร้างเคมีของ Coomassie Brilliant Blue G-250

ก. สารเคมี

1. Coomassie reagent

ชั่ง Coomassie Brilliant Blue G 250 0.100 กรัม ละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติม 85 เปอร์เซ็นต์ กรดฟอสฟอริก ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น ถ้ามีตะกอนให้กรองด้วยกระดาษ Whatman No. 1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้นานประมาณ 1 สัปดาห์

2. สารละลายมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ชั่ง BSA 0.0200 กรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ข. การทำกราฟมาตรฐาน BSA

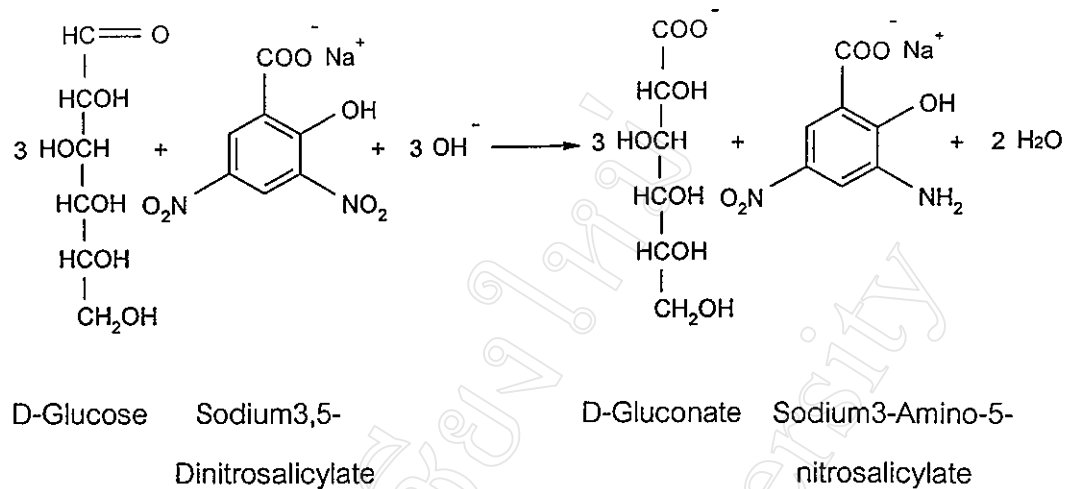
ปิเปตสารละลายมาตรฐาน BSA ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เจือจางให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 2-12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้สารละลายมาตรฐานตั้งแต่ 50-300 ไมโครลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีปริมาตรเป็น 0.5 มิลลิลิตร เติม Coomassie reagent ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของโปรตีนหน่วยเป็น ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หยอดเปรียบเทียบใช้น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Coomassie reagent 4.5 มิลลิลิตร

ค. การหาปริมาณโปรตีน

เจือจางสารละลาย ที่ต้องการหาปริมาณโปรตีน ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติม Coomassie reagent 4.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้ง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปเทียบหาปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน สำหรับหอดเปรียบเทียบใช้น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Coomassie reagent 4.5 มิลลิลิตร

2.5.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)⁽³⁹⁾

สารละลาย Dinitrosalicylate ประกอบด้วย 3,5-dinitrosalicylic acid ในสารละลายเบส โดย DNS จะถูกรีดิวซ์ด้วยน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสี (รูป 2.4) ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของน้ำตาล และความเข้มข้นของสี วัดได้จากการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร



รูป 2.4 การเกิดปฏิกิริยาระหว่างกลูโคสและ Dinitrosalicylic acid

ก. สารเคมี

1. DNS reagent

ชั่งสาร 3,5-dinitrosalicylic acid น้ก 2.5 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้ความร้อนเพื่อช่วยให้สารละลายจนหมด แล้วละลาย sodium potassium tartrate 75 กรัม ในน้ำกลั่น 125 มิลลิลิตร ผสมสารทั้งสองและปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. สารละลายมาตรฐาน กลูโคสความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์

ชั่งกลูโคส 0.0360 กรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตร

ข. การทำกราฟมาตรฐานกลูโคส

ปิเปตสารละลายมาตรฐานกลูโคส เจือจางให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.0288 - 0.1728 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้ปริมาตรตั้งแต่ 0.4-2.4 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนครบ 3.0 มิลลิลิตร แล้วเติม DNS reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำเย็นทันที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร Blank ที่ใช้ คือน้ำกลั่น 3.0 มิลลิลิตรแทนสารมาตรฐานกลูโคส นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของกลูโคสหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ค. การหาปริมาณกลูโคส

เจือจางสารละลายตัวอย่างให้มีปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติม DNS reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยแช่ในน้ำเย็นทันที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร หลดเปรียบเทียบกับน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตรแทนสารละลายตัวอย่างนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วนำไปเทียบหาปริมาณกลูโคสจากกราฟมาตรฐาน

2.6 การศึกษาผลของชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญของแบคทีเรีย

2.6.1 การศึกษาผลของอาหาร สูตร 1ก ต่อการเจริญของแบคทีเรีย และเชื้อรา

เชื้อเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. และเชื้อรา *Aspergillus* sp. ลงในอาหารเหลว M1-M10 สูตร 1ก ที่ละลายในน้ำกลั่นความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สำหรับแบคทีเรียนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อจากความขุ่นที่เพิ่มขึ้นส่วนการเลี้ยงเชื้อรานำไปตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญจาก pellet ที่พบในอาหาร และทำการเลือกอาหารเหลว M1 M7 และ M10 มาศึกษาต่อโดยเชื้อเชื้อ *B.subtilis* และ *E.coli* ลงในอาหารเหลว รวมทั้งในอาหาร Nutrient broth (NB) และ Luria broth (LB) ด้วยและวัดการเจริญของเชื้อจากการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร

2.6.2 การศึกษาผลของอาหาร สูตร 1ข และสูตร 2 ต่อการเจริญของ *B.subtilis*

เชื้อเชื้อ *B.subtilis* ลงในอาหารเหลว M1 M7 M10 สูตร 2 คืออาหารที่ละลายในน้ำ และอาหารที่เพิ่ม 0.5 เปอร์เซ็นต์ เปปไทน์ หรือ 1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมคลอไรด์ และขีดเชื้อ (streak) ลงบนอาหารแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว

2.6.3 การศึกษาผลของอาหาร สูตร 1ข และ สูตร 3 ต่อการเจริญของแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา

เชื้อเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp., *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus megaterium*, *Sterophomonas maltophilia* เชื้อยีสต์ *Rhodotorula* sp. และเชื้อรา *Aspergillus* sp. และ *Rhizopus* sp. ลงในอาหารเหลวและอาหารแข็งที่เตรียมจากแป้งมัสตาร์ดที่ละลายในน้ำ (สูตร 1ข) และละลายในสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (สูตร 3) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อในอาหารเหลวจากความขุ่น

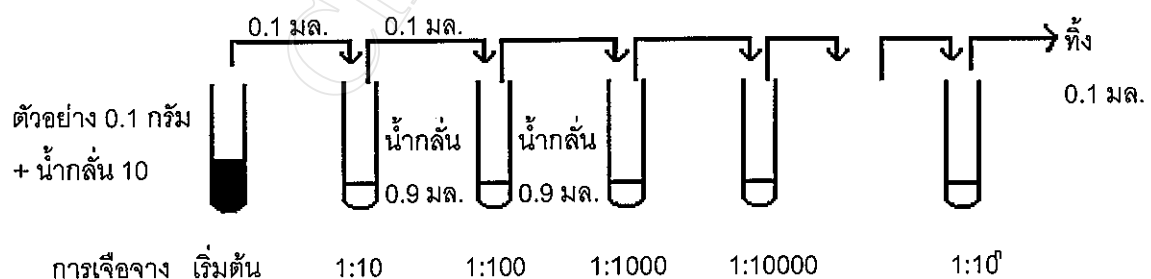
2.7 การแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตโปรตีนอาหารแข็งสกีมมิลค์ ^(40,10)

2.7.1 การเตรียมอาหารแข็งสกีมมิลค์ (skim milk agar)

ชั่งอาหารสำเร็จรูป Nutrient broth (Difco) 8.0 กรัมและผงวุ้น 20 กรัม นำไปละลายและต้มในน้ำ 975 มิลลิลิตร ต้มจนสารละลายใสแล้วเติมสารละลาย 15 เปอร์เซ็นต์ สกีมมิลค์ ที่ละลายในน้ำปริมาตร 25 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว หรืออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากนั้นรอกให้เย็นอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเทบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำให้ปราศจากเชื้อแล้วปริมาตร 15-20 มิลลิลิตร รอกจนอาหารแข็งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.7.2 การคัดเลือกเบื้องต้น

นำตัวอย่างกากมัสตาร์ดตามแหล่งต่างๆ อย่างละ 0.1 กรัมใส่หลอดทดลองที่มีฝาเกลียวปิดที่ทำให้ปราศจากเชื้อ แล้วเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 10 มิลลิลิตร เขย่าอย่างแรงประมาณ 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ส่วนที่เป็นกากตกตะกอน แล้วดูดส่วนที่เป็นน้ำออกมาเจือจางในระบบ 10 - fold dilution (รูป 2.5) กับน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ให้ความเข้มข้นของเชื้อที่เหมาะสม นำอาหารแข็งสกีมมิลค์ ไปอบเปิดฝาแบบคว่ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมงเพื่อให้หน้าอาหารแห้ง ปิดเชื้อที่อยู่ใน dilution ที่เหมาะสม 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารแข็ง แล้วกระจายเชื้อโดยวิธีเกลี่ยบนอาหารเพาะเชื้อ (spread plate) โดยใช้แท่งแก้วที่ปราศจากเชื้อโดยการแช่ใน 70 เปอร์เซ็นต์ อัลกอฮอล์แล้วผ่านเปลวไฟรอกจนเย็น เกลี่ยให้ทั่วบนอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง ถ้าทำเจือจางได้เหมาะสมควรมีโคโลนีเจริญบนผิวอาหาร 30-200 โคโลนี



รูป 2.5 แสดงการเจือจางแบบ serial ten fold dilution

เชื้อที่คาดว่าจะสามารถผลิตโปรตีนได้ รอบโคโลนีจะเกิดเป็นวงใส (clear zone) ล้อมรอบ แยกเชื้อบริสุทธิ์จากโคโลนีที่มีวงใสล้อมรอบและมีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน เก็บไว้ในอาหารวันเลี้ยงสเต็มมิลค์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.7.3 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของเชื้อแบคทีเรีย

อ่านลักษณะและขนาดของโคโลนี ที่เจริญบนอาหารแข็งสเต็มมิลค์ หลังจากเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง และนำไปย้อมสีแกรม (Gram's stain) และ อ่านลักษณะการติดสี รูปร่าง และลักษณะการเรียงตัวของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า

2.7.4 การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรตีนสูงในอาหารเหลว

ก. การเตรียมอาหาร

1. อาหารเพื่อการเจริญของเชื้อ (Inoculum medium)

กลูโคส	1	กรัม
peptone	0.5	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.02	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.025	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรและนำไปนิ่งฆ่าเชื้อนาน 15 นาที

2. อาหารเพื่อการผลิตโปรตีน (Production medium)

กลูโคส	1	กรัม
Peptone	0.5	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.02	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.025	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรและนำไปนิ่งฆ่าเชื้อนาน 15 นาที

ข. การเลี้ยงแบคทีเรีย

นำเชื้อที่ให่วงใสรอบโคโลนีทั้งหมดที่มีลักษณะแตกต่างกัน มาศึกษาการผลิตเอนไซม์ในอาหารเหลว โดยเชื้อบริสุทธิ์มาใส่ในอาหารเหลว inoculum medium 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมงในเครื่องเขย่า

ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที หลังจากนั้นถ่ายเชื้อลงในอาหารที่เตรียมไว้ (production medium) ที่มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาตรเชื้อที่ใส่ 5 มิลลิลิตร (10 เปอร์เซ็นต์) นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นแยกส่วนที่เป็นเซลล์ทิ้งที่แรงเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาโปรตีนแอคติวิตี เชื้อที่ให้แอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีนสูงที่สุดจะคัดเลือกไว้เพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์ต่อไป

2.7.5 การหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีน ⁽⁴¹⁾

แอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีน กำหนดให้ 1 หน่วยแอคติวิตีเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนและให้กรดอะมิโนไทโรซีน 1 ไมโครกรัมในเวลา 1 นาทีภายใต้สภาวะที่กำหนด โดยนำส่วนใสที่ได้หลังจากการปั่นแยกเซลล์แล้ว ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทรีสไฮโดรคลอริก บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ทำการย่อยสับสเตรท 1% เคซีนใน 50 มิลลิโมลาร์ ทรีสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 นาที

ก. การเตรียมสารสำหรับหาแอคติวิตีเอนไซม์โปรตีนด้วยวิธีไฮโดร

ไลซ์เคซีน

1. สารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ ทรีสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0
ซึ่ง Tris(hydroxymethyl)-aminomethane 3.02 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร แล้วปรับ พีเอช เป็น 7.0 ด้วย 6.0 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก และปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตร
2. 1% เคซีน
ซึ่งเคซีน 1.0 กรัม ละลายใน 50 มิลลิโมลาร์ ทรีสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้ความร้อนช่วยให้เคซีนละลายจนหมดเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส
3. 10% Trichloroacetic acid (TCA)
ซึ่ง Trichloroacetic acid 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส
4. สารละลายมาตรฐานไทโรซีนความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
ซึ่ง ไทโรซีน 0.0100 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยขวดวัดปริมาตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

ข. การทำกราฟมาตรฐานไทโรซีน

เจือจางสารละลายมาตรฐานไทโรซีนให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10-90 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้สารละลายไทโรซีนตั้งแต่ 1-9 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนครบ 10 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของไทโรซีน หน่วยเป็น ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ค. การหาแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส

เจือจางเอนไซม์โปรติเอสที่เป็นน้ำเลี้ยงที่ได้จากการปั่นแยกเซลล์ ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ให้มีปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมกับสารละลาย 1% เคซีน นาน 5 นาที แล้วเริ่มปฏิกิริยาโดยการเติมสับสเตรท 1% เคซีนปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในเอนไซม์ที่เจือจางและจับเวลา 30 นาทีพอดี แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 10% TCA ปริมาณ 3 มิลลิลิตรเขย่าและตั้งทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส จนตะกอนตกสมบูรณ์ประมาณ 20 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นแยกตะกอนที่แรงเหวี่ยง 4000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำสารละลายใสที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร เทียบหาปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นจากกราฟมาตรฐาน ไทโรซีน แล้วคำนวณหาโปรติเอสแอกติวิตี สำหรับหลอดเปรียบเทียบทำเหมือนหลอดทดสอบทดลองทุกประการโดยมีสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางแล้วแต่ไม่เติมสับสเตรท เมื่อเริ่มจับเวลาจนครบเวลาแล้วเติม 10% TCA ก่อนแล้วจึงเติมสับสเตรท

ง. การคำนวณ

$$\text{แอกติวิตีของเอนไซม์} = \frac{(A \times 5)}{T} \times \frac{1000}{B} \quad \text{Units/ml}$$

A= ปริมาณไทโรซีนที่เทียบได้จากกราฟมาตรฐานไทโรซีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

B= ปริมาตรของเอนไซม์นำไปเจือจาง (ไมโครลิตร)

T= เวลาในการเกิดปฏิกิริยา (นาที)

2.8 การศึกษาผลของอาหารมัสตาร์ดต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ

Bacillus licheniformis

2.8.1 การศึกษาผลของอาหารมัสตาร์ด สูตร 1x และ สูตร 3 ต่อการเจริญของเชื้อ

Bacillus licheniformis

เตรียมอาหารเหลวจากแป้งและกากมัสตาร์ด สูตร 1x คืออาหารที่เตรียมจากการละลายในน้ำ และสูตร 3 ใช้ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็น 0.10 โมลาร์ แล้วเจือจางอาหารที่เตรียมได้จากสูตร 3 ด้วยน้ำกลั่นให้มีอัตราส่วนเป็น 1:2, 1:4, 1: 8 และ 1:16 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ *B.licheniformis* ที่เจริญในอาหาร inoculum medium ที่ 37 องศาเซลเซียส 20 ชั่วโมง (มีปริมาณเชื้อ 10^9 Colony forming unit (CFU)/มล.) ลงในอาหารทุกชนิดที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง วัดการเจริญของเชื้อโดยวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำไปปั่นแยกเซลล์ นำส่วนใสไปวิเคราะห์หาโปรติเอสแอกติวิตี

2.8.2 การศึกษาผลของอาหารมัสตาร์ด สูตร 4 ต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของ

เชื้อ *Bacillus licheniformis*

เจือเชื้อ *B.licheniformis* จาก stock culture ลงใน inoculum medium (ตามวิธี 2.5.1.4 (ก)) แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่าที่ 120 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 ชั่วโมง (เชื้อมีปริมาณ 10^9 CFU/มล.) แล้วถ่ายเชื้อลงในอาหารเพื่อการผลิตโปรติเอส (ตามวิธี 2.5.1.4 (ข)) ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำทั้งหมดไปปั่นแยกเซลล์ที่แรงเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปหาโปรติเอสแอกติวิตี ความเข้มข้นของอาหารที่ทำให้เชื้อสามารถผลิตโปรติเอสได้สูงสุดจะคัดเลือกไว้ทำการศึกษาต่อไป

2.9 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Bacillus licheniformis*

2.9.1 ศึกษาความเป็นกรด-เบส ต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

เตรียมอาหารเพื่อการผลิตโปรติเอสจากแป้งมัสตาร์ด (M10) ที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สูตร 4 โดยปรับพีเอช ของอาหารเริ่มต้นเป็น 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 แล้วถ่ายเชื้อ *B.licheniformis* ที่เจริญใน Inoculum medium (M10) หลังจากเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 20 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณเชื้อ 10^9 CFU/มล. โดยใช้ inoculum size 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที เมื่อครบเวลา

นำไปปั่นแยกเซลล์ที่แรงเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปหาโปรตีนเอสแอกติวิตี

2.9.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอส

เตรียมอาหารเพื่อการผลิตโปรตีนเอสจากแป้งมันสำปะหลัง (M10) ที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สูตร 4 โดยปรับพีเอช ของอาหารเริ่มต้นเป็น 6.0 แล้วถ่ายเชื้อ *B.licheniformis* ที่เจริญใน Inoculum medium (M10) หลังจากเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 20 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณเชื้อ 10^9 CFU/มล. โดยใช้ inoculum size 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28, 32, 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นแยกเซลล์ที่แรงเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปหาโปรตีนเอสแอกติวิตี

2.9.3 ศึกษาผลของเวลาต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีนเอส

เตรียมอาหารเพื่อการผลิตโปรตีนเอสจากแป้งมันสำปะหลัง (M10) ที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ สูตร 4 โดยปรับพีเอช ของอาหารเริ่มต้นเป็น 6.0 แล้วถ่ายเชื้อ *B.licheniformis* ที่เจริญในอาหาร Inoculum medium (M10) หลังจากเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 20 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณเชื้อ 10^9 CFU/มล. โดยใช้ inoculum size 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที เก็บน้ำเลี้ยงทุกๆ 6 ชั่วโมง จนครบ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปปั่นแยกเซลล์ที่แรงเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปหาโปรตีนเอสแอกติวิตี

2.10 การศึกษาสมบัติทั่วไปของเอนไซม์โปรตีนเอสที่ผลิตจากเชื้อ *B.licheniformis*

2.10.1 ศึกษาความเป็น กรด-ด่าง ต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอส⁽⁴²⁾

ก. สารเคมี

1. 0.05 โมลาร์ สารละลายกรดซิตริกโซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ (Citric acid-Sodium citrate buffer) พีเอช 4.0 และ 5.0

ซึ่ง citric acid (MW. 210.14) 1.0501 กรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น และซึ่ง Trisodium citrate (MW. 294.12) 1.4704 กรัม ละลายและ

ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น แล้วใช้สารละลาย 0.05 โมลาร์ Trisodium citrate ค่อยๆเติมลงในสารละลาย citric acid แล้วปรับพีเอช เป็น 4.0 และใช้สารละลาย 0.05 โมลาร์ citric acid เติมลงในสารละลาย Trisodium citrate และปรับพีเอช เป็น 5.0

2. 0.05 โมลาร์ สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Sodium phosphate buffer) พีเอช 6.0, 7.0 และ 8.0

ชั่ง $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MW.178.05) 4.45 กรัม ละลายและปรับปริมาตร เป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น และชั่ง $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MW.156.01) 3.90 กรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น สำหรับบัฟเฟอร์ที่พีเอช 6.0 ค่อยๆเติมสารละลาย Na_2HPO_4 ลงในสารละลาย NaH_2PO_4 แล้วปรับให้ได้พีเอชที่ต้องการ และเติมสารละลาย NaH_2PO_4 ลงในสารละลาย Na_2HPO_4 แล้วปรับเป็นพีเอช เป็น 7.0 และ 8.0 ตามลำดับ

3. 0.05 โมลาร์ สารละลายไกลซีนโซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ (Glycine-NaOH buffer) พีเอช 9.0 และ 10.0

ชั่ง Glycine (MW.75.07) 1.876 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำ กลั่นเป็น 500 มิลลิลิตร และชั่ง NaOH 0.2 กรัม ละลายและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย น้ำกลั่น แล้วใช้สารละลาย NaOH ปรับค่าพีเอชของสารละลาย Glycine เป็น 9.0 และ 10.0 ตาม ลำดับ

4. 0.05 โมลาร์ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) พีเอช 11.0 และ 12.0

ชั่ง $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (MW.178.05) 0.890 กรัม ละลายและปรับปริมาตร เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น และปรับเป็นพีเอช 11.0 และ 12.0 ด้วยสารละลาย 0.05 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์

ข. วิธีการทดลอง

นำน้ำเลี้ยงที่ปั่นแยกได้จากการเลี้ยงเชื้อ *B.licheniformis* ในอาหาร M10 สูตร 4 ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 6.0 และเขย่าที่ ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาศึกษาการทำงานของเอนไซม์ โปรติเอส โดยนำไปหาโปรติเอสแอคติวิตี ในสภาวะที่ความเป็นกรดต่างๆ กัน ตั้งแต่พีเอช 4.0-12.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และพีเอช ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์มากที่สุดจะ ถูกนำไปศึกษาผลของอุณหภูมิต่อไป

2.10.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

นำน้ำเลี้ยงที่ปั่นแยกได้จากการเลี้ยงเชื้อ *B.licheniformis* ในอาหาร M10 สูตร 4 ที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 6.0 และเขย่าที่ ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาศึกษาการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส โดยนำไปหาโปรติเอสแอคติวิตี ที่พีเอช 10.0 โดยแปรผันอุณหภูมิต่างๆกัน คือ 30, 37, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์มากที่สุดจะถูกนำไปศึกษาต่อไป

2.10.3 ศึกษาผลของเวลาต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

นำน้ำเลี้ยงที่ปั่นแยกได้จากการเลี้ยงเชื้อ *B.licheniformis* ในอาหาร M10 สูตร 4 ที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ในจากสภาวะที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 6.0 และเขย่าที่ ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาศึกษาการทำงานของเอนไซม์ โปรติเอส โดยนำไปหาโปรติเอสแอคติวิตี ที่พีเอช 10.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้ทำปฏิกิริยาจนครบเวลา 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาทีพอดีตามลำดับ เวลาที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์มากที่สุดจะถูกนำไปศึกษาต่อไป

2.10.4 ศึกษาปริมาณเอนไซม์ต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

นำน้ำเลี้ยงที่ปั่นแยกได้จากการเลี้ยงเชื้อ *B.licheniformis* ในอาหาร M10 สูตร 4 ที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 6.0 และเขย่าที่ ความเร็ว 120 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาศึกษาการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส โดยนำไปหาปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้น ที่พีเอช 10.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเวลา 15 นาทีพอดี แต่ใช้ปริมาณของเอนไซม์ต่างๆกัน คือ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 ไมโครลิตร

2.10.5 ศึกษาผลของความเข้มข้นสับสเตรทต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

ความเร็วของปฏิกิริยาวัดได้โดยติดตามการลดลงของปริมาณสารตั้งต้น หรือการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารผลิตภัณฑ์เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ดังนั้นการนำเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้ทำปฏิกิริยากับสับสเตรท เคซีนที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 และ 1.6 % ตามลำดับ เพื่อหาปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นหลังจากทำปฏิกิริยาเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น จนปริมาณสารผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้นเริ่มคงที่แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร ไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณไทโรซีนกับเวลา และหาความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาที่เคซีนความเข้มข้น

ต่างๆ จากค่าความชันของกราฟ และนำไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $1/\text{ความเร็วเริ่มต้น}$ ($1/V_o$) กับ $1/\text{ความเข้มข้นของสับสเตรต}$ ($1/[S]$) เป็น Lineweaver-Burk Plot เพื่อหาค่า K_m จากจุดตัดบนแกน X และหาค่า V_{max} จากจุดตัดบนแกน Y