

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 องค์ประกอบทางเคมีของแป้งมันสำปะหลังและกากมันสำปะหลัง

เมื่อนำแป้งมันสำปะหลังชนิด M1-M10 มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl ได้ผลดังตาราง 3.1 พบว่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้จากแป้งมันสำปะหลัง M1-M10 มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 32-35 เปอร์เซ็นต์ โดยแป้งมันสำปะหลัง M5 มีปริมาณโปรตีนมากที่สุดคือ 42.53 เปอร์เซ็นต์

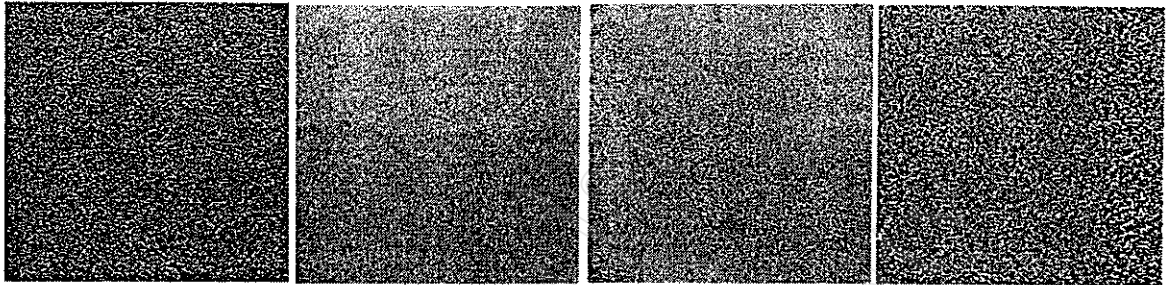
ตาราง 3.1 ปริมาณโปรตีนในแป้งมันสำปะหลังชนิด M1-M10

แป้งมันสำปะหลัง	โปรตีน %(w/w) Kjeldhal method
M1	33.95
M2	35.10
M3	31.62
M4	34.60
M5	42.53
M6	31.08
M7	35.32
M8	34.15
M9	32.55
M10	32.72

สำหรับแป้งมัสตาร์ด M1 M7 M10 (Lot.2) และกากมัสตาร์ด ที่เลือกนำมาศึกษาต่อได้จากการเตรียมครั้งใหม่ ดังนั้นจึงทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่เปอร์เซ็นต์ ของโปรตีนทั้งหมด เส้นใย เถ้า ความชื้น ไขมัน และ คาร์โบไฮเดรต แสดงดัง ตาราง 3.2 จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldhal แป้งมัสตาร์ด M10 มีปริมาณของโปรตีนรวมมากที่สุด 51.22 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ M1 และ M7 มีค่าใกล้เคียงกันประมาณ 47 เปอร์เซ็นต์ และพบปริมาณโปรตีนน้อยที่สุดใน กากมัสตาร์ด (Defatted mustard meal) 33.16 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการวิเคราะห์เส้นใยพบว่ามัสตาร์ดมีปริมาณเส้นใยมากที่สุด (12.87 เปอร์เซ็นต์) ในส่วนที่เป็นกากมัสตาร์ดมากกว่าแป้งมัสตาร์ดประมาณ 2-3 เท่า ปริมาณเถ้าที่วิเคราะห์ได้เป็นตัวบ่งบอกถึงปริมาณเกลือแร่พบว่าแป้งมัสตาร์ด M10 มีเปอร์เซ็นต์เถ้ามากที่สุด 14.22 ของน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ M7, M1 และ กากมัสตาร์ด ความชื้นที่พบในแป้งมัสตาร์ด M1 M7 และ M10 มีค่า 18.36, 14.00 และ 12.11 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ตามลำดับ และในกากมัสตาร์ดมีค่าความชื้นเท่ากับ 11.25 เปอร์เซ็นต์ (w/w) แป้งและกากมัสตาร์ดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้สกัดเอาไขมันออกไปแล้วเมื่อนำมาวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ไขมันจึงพบว่ามัสตาร์ดมีปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น คือ 1.15, 0.28, 0.73 และ 0.80 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ในแป้งมัสตาร์ด M1 M7 M10 และ กากมัสตาร์ด ตามลำดับ สำหรับเปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต มีค่าใกล้เคียงกันในแป้งมัสตาร์ดทั้ง 3 ชนิด มีประมาณ 18-20 เปอร์เซ็นต์ (w/w) และมีค่าปริมาณมากที่สุดในกากมัสตาร์ดคือ 36.66 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 3.2 องค์ประกอบต่างๆทางเคมีในแป้งมัสตาร์ดและกากมัสตาร์ด

แป้ง/กาก มัสตาร์ด	โปรตีนทั้งหมด % (w/w)	เส้นใย %(w/w)	เถ้า %(w/w)	ความชื้น %(w/w)	ไขมัน %(w/w)	คาร์โบไฮเดรต %(w/w)
M1	47.20	5.29	7.01	18.36	1.15	20.99
M7	47.80	3.42	12.90	14.00	0.28	21.60
M10	51.22	3.11	14.22	12.11	0.73	18.61
DMM	33.16	12.87	5.26	11.25	0.80	36.66



แป้งมัสตาร์ด M1

แป้งมัสตาร์ด M7

แป้งมัสตาร์ด M10

กากมัสตาร์ด

รูป 3.1 ลักษณะของแป้งและกากมัสตาร์ด

3.2 ผลการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งและกากมัสตาร์ดในการศึกษาเบื้องต้น

3.2.1 ผลการเตรียมอาหารมัสตาร์ด สูตร 1ก

เมื่อนำแป้งมัสตาร์ดชนิด M1-M10 จากการเตรียมครั้งแรกไปละลายและต้มในน้ำที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) (สูตร 1ก) เพื่อเตรียมเป็นอาหารเหลวพบว่าปริมาณโปรตีนที่ละลายในน้ำ (soluble protein) ที่วิเคราะห์โดย Biuret method ในอาหาร M1-M10 แสดงในตาราง 3.3 มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 10-20 เปอร์เซ็นต์ (w/w) และพบว่าอาหารเหลวที่เตรียมจากแป้งมัสตาร์ด M10 มีปริมาณโปรตีนมากที่สุด 28.0 เปอร์เซ็นต์ (w/w) คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของโปรตีนที่ละลายได้จากโปรตีนทั้งหมด 85.57 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 3.3 ปริมาณโปรตีนในอาหารเหลว และความสามารถในการละลายของโปรตีนเมื่อเทียบกับโปรตีนทั้งหมด

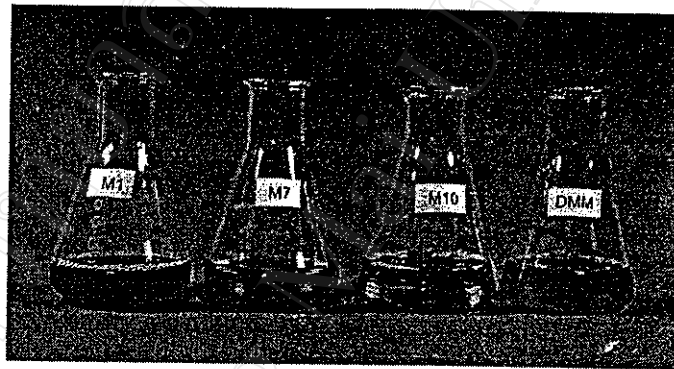
แป้งมัสตาร์ด	โปรตีนทั้งหมด %(w/w) Kjeldhal method	Soluble protein %(w/w) Biuret method	Protein Solubility (%)
M1	33.95	16.5	48.60
M2	35.10	14.0	39.88
M3	31.62	11.5	36.37
M4	34.60	10.5	30.34
M5	42.53	10.5	24.69
M6	31.08	11.0	35.39
M7	35.32	14.5	39.63
M8	34.15	18.0	52.70
M9	32.55	22.5	78.34
M10	32.72	28.0	85.57

3.2.2 ผลการเตรียมอาหารมัสตาร์ด สูตร 1ข

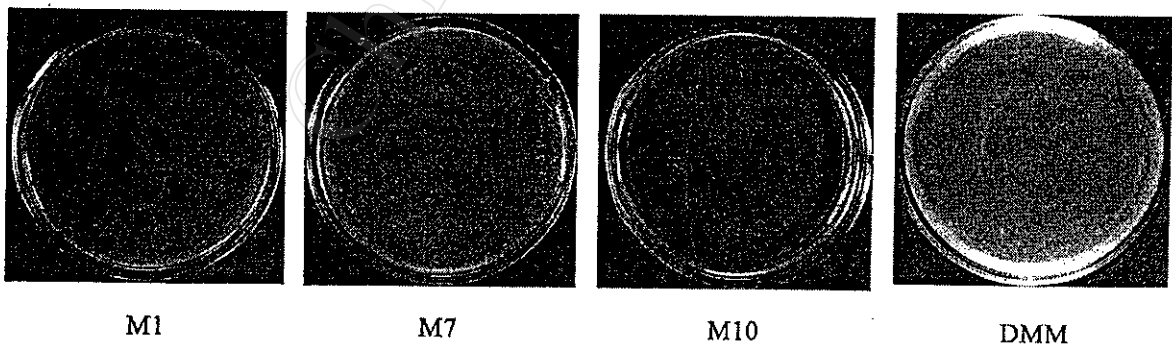
ในการนำแป้งมัสตาร์ด M1 M7 M10 และกากมัสตาร์ดจากการเตรียมครั้งใหม่มาเตรียมเป็นอาหารเหลวโดยการละลายและต้มในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 4%(w/v) (สูตร 1ข) พบว่าอาหารที่เตรียมได้จากแป้งมัสตาร์ด M1 มีปริมาณโปรตีนที่ละลายและน้ำตาลกลูโคสสูงสุด คือ 0.135 และ 3.88 มก/มล. ตามลำดับ ดังตาราง 3.4 และอาหารที่มีปริมาณโปรตีนและน้ำตาลกลูโคสรองลงมาคืออาหารที่เตรียมจากแป้งมัสตาร์ด M7, M10 และ DMM ตามลำดับ และลักษณะของอาหารเหลวที่เตรียมได้แสดงดังรูป 3.2 อาหารเหลวที่เตรียมได้มีสีเหลืองถึงเหลืองเข้ม และขุ่น ยกเว้นอาหารที่เตรียมจากแป้งมัสตาร์ด M10 มีสีเหลืองใส ดังนั้นเมื่อนำมาเตรียมเป็นอาหารแข็งแสดงดังรูป 3.3 จะเห็นว่าอาหารแข็ง M10 ให้ลักษณะอาหารที่ใสและมีสีใกล้เคียงกับอาหาร Nutrient agar (NA) ขณะที่อาหารแข็งที่เตรียมจากแป้งมัสตาร์ด M1 M7 และ DMM ได้อาหารแข็งที่มีสีเหลืองขุ่น

ตาราง 3.4 ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลกลูโคสที่ละลายในอาหารเหลวและลักษณะของอาหารแข็ง
มัสตาร์ดสูตร 1ข

แบ่ง/กาก มัสตาร์ด	โปรตีน มก/มล.	น้ำตาลกลูโคส มก/มล.	ลักษณะอาหาร เหลว	ลักษณะอาหาร แข็ง
M1	0.135	3.88	สีเหลือง ชุ่น	สีเหลือง ชุ่น
M7	0.081	1.22	สีเหลือง ชุ่น	สีเหลือง ชุ่น
M10	0.071	1.10	สีเหลือง ไส	สีเหลือง ไส
DMM	0.024	0.392	สีเหลือง ชุ่น	สีน้ำตาล ชุ่น



รูป 3.2 อาหารเหลวมัสตาร์ด สูตร 1ข



รูป 3.3 อาหารแข็งมัสตาร์ด สูตร 1ข

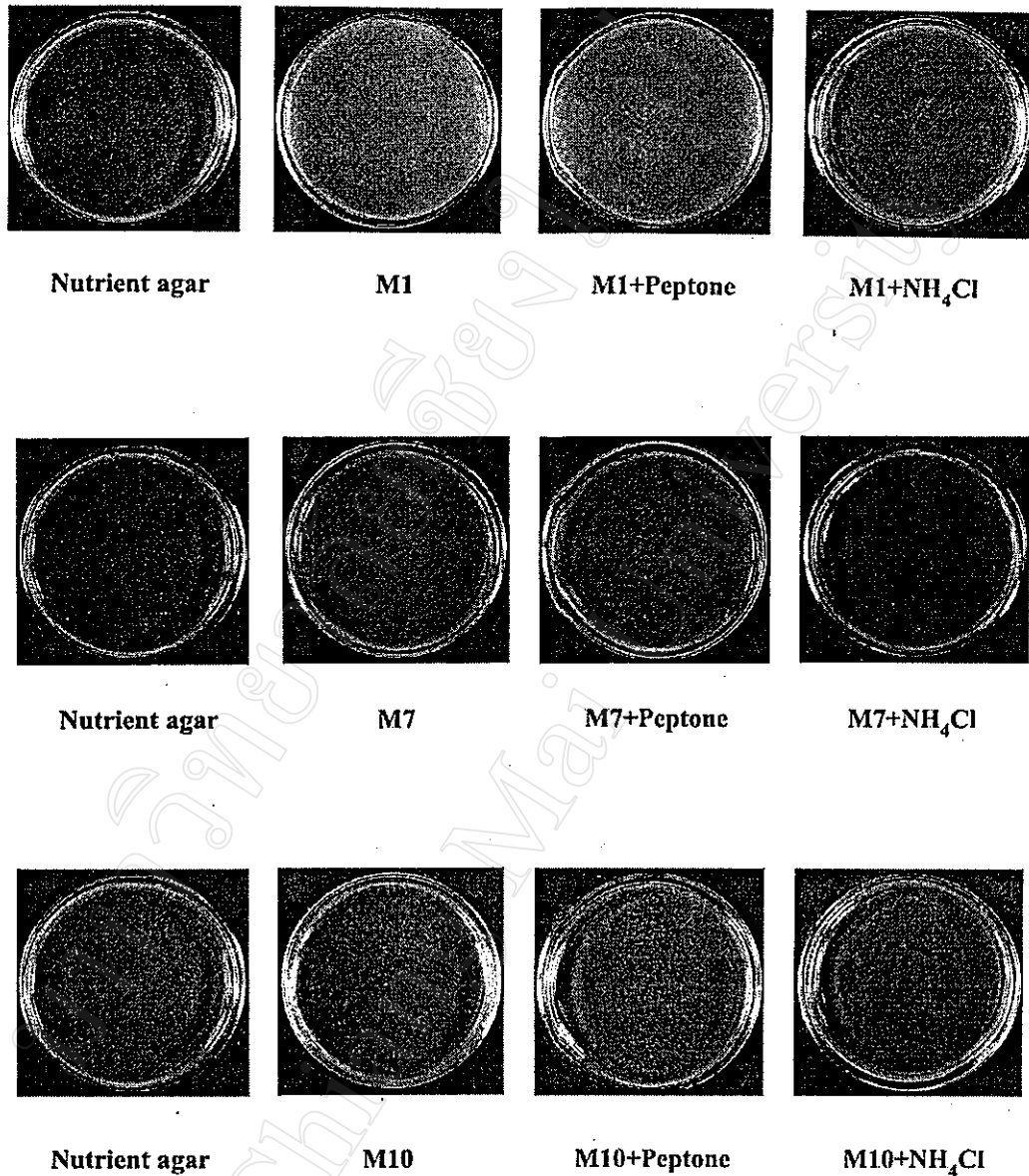
3.2.3 ผลการเตรียมอาหารมัสตาร์ด สูตร 2

เปปโตนเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ รวมทั้งแอมโมเนียมคลอไรด์ที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน และช่วยในการละลายของโปรตีน จากการทดลองเมื่อเพิ่มสารอาหารทั้ง 2 ชนิด คือเปปโตน (peptone) หรือแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) และนำมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน แสดงดังตาราง 3.6 พบว่าอาหารมัสตาร์ด M1 M7 และ M10 ที่เพิ่ม 0.5 เปอร์เซ็นต์ เปปโตนมีปริมาณโปรตีนมากขึ้น 2 เท่าจาก 2.6, 1.3 และ 1.2 มก./มล. ไปเป็น 4.2, 2.6 และ 2.6 มก./มล. ตามลำดับ และสีของอาหารเหลว M1 มีสีเหลือง ขุ่น และอาหารเหลว M7 และ M10 สีเหลืองใส เมื่อเตรียมเป็นอาหารแข็ง M1 และ M7 มีสีเหลือง ขุ่น ยกเว้นอาหาร M10 มีสีใส (รูป 3.4) แต่เมื่อเพิ่ม 1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมคลอไรด์ มีผลต่อปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยและมีผลทำให้อาหารเหลวและอาหารแข็งมีสีเข้มขึ้น แต่ความขุ่นลดลงแสดงดังตาราง 3.5 และรูป 3.4

ตาราง 3.5 ปริมาณโปรตีนในอาหารเหลวและลักษณะอาหารแข็งมัสตาร์ด สูตร 2

กลุ่ม	อาหาร	โปรตีน มก./มล.	สี ลักษณะ อาหารเหลว	สี ลักษณะ อาหารแข็ง
ควบคุม	Nutrient	2.0	สีเหลือง ใส	ใส
1	M1	2.6	เหลือง มีตะกอน	เหลือง ขุ่น ++
	M1+Peptone	4.2	"	"
	M1+ NH_4Cl	2.8	เหลือง ตะกอนน้อย	เหลืองน้ำตาล ขุ่น+
2	M7	1.3	เหลืองน้ำตาล ใส	เหลือง ขุ่น +
	M7+Peptone	2.6	"	"
	M7+ NH_4Cl	1.5	สีเข้มขึ้น ใส	เหลืองน้ำตาล ใส
3	M10	1.2	เหลืองน้ำตาล ใส	เหลือง ใส
	M10+Peptone	2.6	"	"
	M10+ NH_4Cl	1.4	สีเข้มขึ้น ใส	"

หมายเหตุ ; ขุ่น + : ขุ่นน้อย , ขุ่น ++ : ขุ่นมาก



รูป 3.4 อาหารแข็งมาตรฐาน M1 M7 และ M10 สูตร 2

3.2.4 ผลการเตรียมอาหารมาตรฐาน สูตร 3

ในการเตรียมอาหารเหลวจากแป้งและกากมาตรฐานโดยนำไปละลายและต้มในสารละลายไฮเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.0001, 0.001, 0.10, 0.15 และ 0.20 โมลาร์ หลังจากนั้นนำอาหารเหลวที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน แสดงดังตาราง 3.6 พบว่าแป้งมาตรฐาน M1 มีปริมาณโปรตีนสูงสุด 2.290 มก/มล. เมื่อละลายใน 0.15 โมลาร์ ไฮเดียมไฮดรอกไซด์ สำหรับแป้ง

ไซด์ ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ ดังนั้นความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เลือกใช้ในการเตรียมเป็นอาหารเหลวมาตรฐานคือ 0.10 โมลาร์

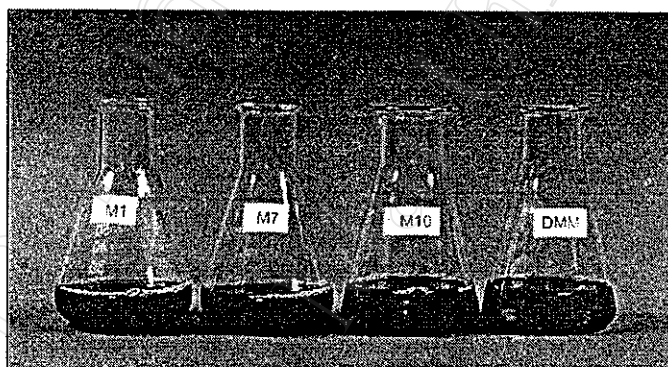
ตาราง 3.6 ปริมาณโปรตีนที่ละลายในอาหารเหลวมาตรฐาน สูตร 3

ตัวทำละลาย	โปรตีน(มก/มล.) ในอาหาร M1	โปรตีน(มก/มล.) ในอาหาร M7	โปรตีน(มก/มล.) ในอาหาร M10	โปรตีน(มก/มล.) ในอาหาร DMM
น้ำกลั่น	1.116	0.081	0.068	0.022
0.0001 M NaOH	1.075	0.050	0.073	0.025
0.001 M NaOH	1.042	0.048	0.072	0.024
0.10 M NaOH	2.235	1.136	1.048	0.360
0.15 M NaOH	2.290	1.104	1.028	0.358
0.20 M NaOH	2.248	0.990	1.026	0.340

ตาราง 3.7 แสดงให้เห็นว่าเมื่อนำแป้งและกากมาตรฐานมาละลายใน 0.10 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่ละลายและน้ำตาลกลูโคส พบว่าปริมาณโปรตีนที่ได้มีมากกว่าปริมาณโปรตีนที่ได้จากการเตรียมแบบละลายในน้ำ สูตร 1x (ตาราง 3.4) 4-15 เท่า ซึ่งมีโปรตีนมากที่สุดในอาหาร M10 1.048 มก/มล.สำหรับปริมาณกลูโคสพบว่าไม่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการเตรียมแบบละลายในน้ำ และปริมาณกลูโคสมีมากที่สุดในอาหาร M1 4.176 มก/มล. ลักษณะของอาหารเหลวที่เตรียมได้มีสีน้ำตาลเข้ม ชุ่ม แสดงดังรูป 3.5 และพบว่าปริมาณโปรตีนไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อละลายใน 0.01 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 และฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลาไลน์ (Phosphate buffer saline) พีเอช 7.0

ตาราง 3.7 ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลกลูโคสที่ละลายในอาหารเหลวมัสตาร์ด สูตร 3

แป้ง/กาก มัสตาร์ด	โปรตีน มก/มล.	น้ำตาลกลูโคส มก/มล.	ลักษณะอาหารเหลว
M1	0.488	4.176	สีน้ำตาลเข้ม ชุ่ม
M7	1.038	0.904	สีน้ำตาลเข้ม ชุ่ม
M10	1.048	0.936	สีน้ำตาลเข้ม ไส
DMM	0.360	0.420	สีน้ำตาล ไส



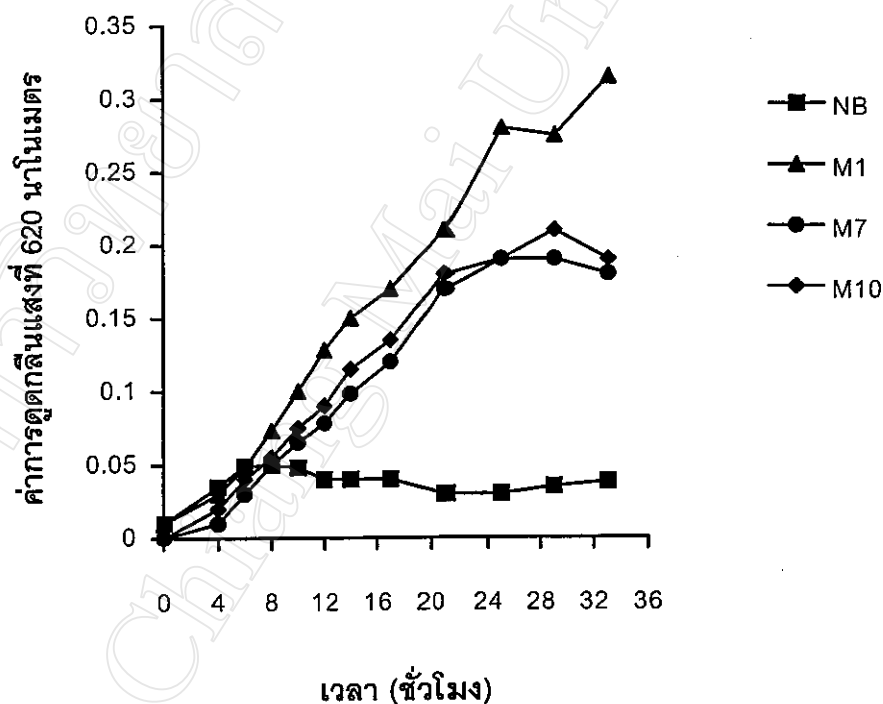
รูป 3.5 อาหารเหลวมัสตาร์ด สูตร 3 ที่ละลายใน 0.10 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์

3.3 ผลของชนิดอาหารต่อการเจริญของจุลินทรีย์

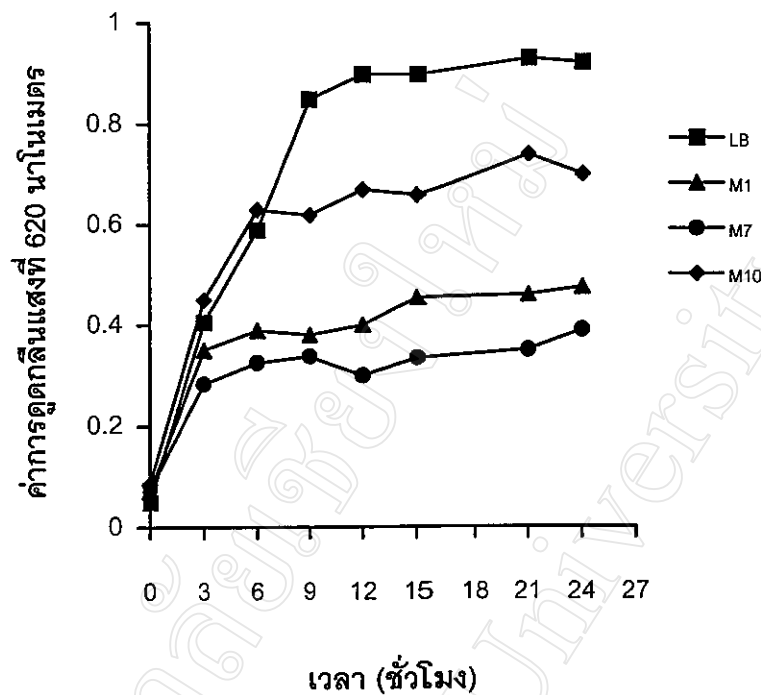
3.3.1 ผลของอาหารมัสตาร์ด สูตร 1ก ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

จากการศึกษาผลของอาหารเหลวทั้งหมดที่เตรียมได้จากแป้งมัสตาร์ด M1-M10 สูตร 1ก ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. และเชื้อรา *Aspergillus* sp. สามารถเจริญได้ในอาหารเหลวดังกล่าว สังเกตได้จากความชุ่มของอาหารเลี้ยงเชื้อ และชนิดของโปรตีนในอาหารทั้ง M1-M10 อาจจะเป็นชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันก็ได้ ดังนั้นจึงเลือกแป้งมัสตาร์ด M1 M7 และ M10 มาศึกษาต่อ โดยเชื้อแบคทีเรีย *B.subtilis* และ *E.coli* ลงในอาหารที่เตรียม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดการเจริญของเชื้อจากความชุ่มที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร เทียบกับการเจริญของเชื้อในอาหาร

Nutrient broth (NB) และ Luria broth (LB) แสดงดังรูป 3.6 และ 3.7 (ตามลำดับ) จากรูป 3.6 แสดงการเจริญของเชื้อ *B.subtilis* ในอาหาร M1 M7 และ M10 เทียบกับอาหาร NB จากกราฟการเจริญเติบโต พบว่าเชื้อ *B.subtilis* เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่เตรียมจากแป้งมันสำปะหลัง M1 รองลงมาคือ M10 และ M7 ที่เวลาเดียวกัน และพบว่าในอาหาร NB เชื้อเจริญได้น้อยกว่าในอาหารจากมันสำปะหลัง สำหรับรูป 3.7 แสดงการเจริญของเชื้อ *E.coli* ในอาหาร M1 M7 และ M10 เทียบกับอาหาร LB ซึ่งเป็น enrichment media สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E.coli* ดังนั้นจากกราฟการเจริญพบว่าเชื้อ *E.coli* เจริญได้ดีที่สุดในอาหาร LB รองลงมาในอาหารจากแป้งมันสำปะหลัง M10 M1 และ M7 ตามลำดับ



รูป 3.6 การเจริญของแบคทีเรีย (*B.subtilis*) ในอาหารมันสำปะหลัง M1 M7 M10 และ Nutrient broth



รูป 3.7 การเจริญของแบคทีเรีย (*E.coli*) ในอาหารมัสตาร์ด M1 M7 M10 และ Luria broth

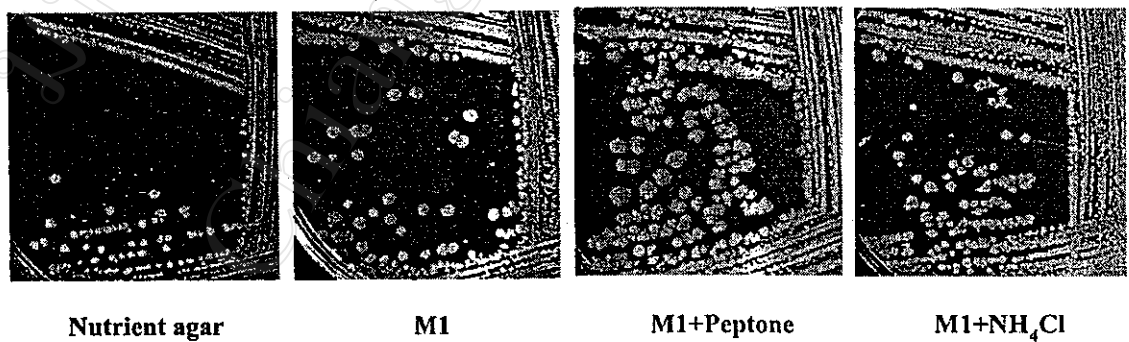
3.3.2 ผลของอาหารมัสตาร์ด สูตร 1 และ สูตร 2 ต่อการเจริญของ *B.subtilis*.

จากการเชื้อ *B.subtilis* ลงในอาหารเหลว และขีดเชื้อลงบนอาหารแข็งที่เตรียมจากแป้งมัสตาร์ด M1 M7 และ M10 ที่มีการเพิ่มเปปไทน์ หรือแอมโมเนียมคลอไรด์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการเจริญของเชื้อในอาหารเหลวที่สังเกตได้จากความขุ่น แสดงดังตาราง 3.9 เปรียบเทียบกับอาหาร NB พบว่าเชื้อ *B.subtilis* เจริญได้ดีในกลุ่มอาหารเหลวที่เตรียมจากแป้งมัสตาร์ด M1 รองลงมาคือ M7 และ M10 ในอาหารกลุ่มเดียวกันพบว่าความขุ่นของเชื้อในอาหารที่เพิ่ม แอมโมเนียมคลอไรด์ ในกลุ่ม 1 และ 2 เชื้อเจริญได้น้อยกว่าอาหารที่เป็นแป้งมัสตาร์ดอย่างเดียวและอาหารมัสตาร์ดที่เพิ่มเปปไทน์ แต่พบว่าผลการเจริญของเชื้อไม่แตกต่างกันในอาหารกลุ่มที่ 3 ที่เตรียมจากแป้งมัสตาร์ด M10 สำหรับผลการเจริญบนอาหารแข็ง แสดงในตาราง 3.8 และรูป 3.8-3.10 ในตาราง 3.8 แสดงความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนีของเชื้อเมื่อเจริญบนอาหารแข็งที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *B.subtilis* เมื่อเจริญบนอาหารแข็ง NA ให้ขนาดโคโลนี 1.5-2.5 มิลลิเมตร เชื้อมีขนาดโคโลนีใหญ่มากขึ้นเมื่อเจริญบนอาหารทุกกลุ่มที่มีการเพิ่มเปปไทน์ รองลงมาคือบนอาหาร M1 และ M10 ที่ไม่ได้เพิ่มทั้งเปปไทน์และแอมโมเนียมคลอไรด์ และเชื้อที่เจริญบนอาหารทุกกลุ่ม ที่มีการเพิ่มแอมโมเนียมคลอไรด์มีขนาดใกล้เคียงกับเชื้อที่เจริญบน NA ลักษณะโคโลนี แสดงในรูป 3.8-3.10

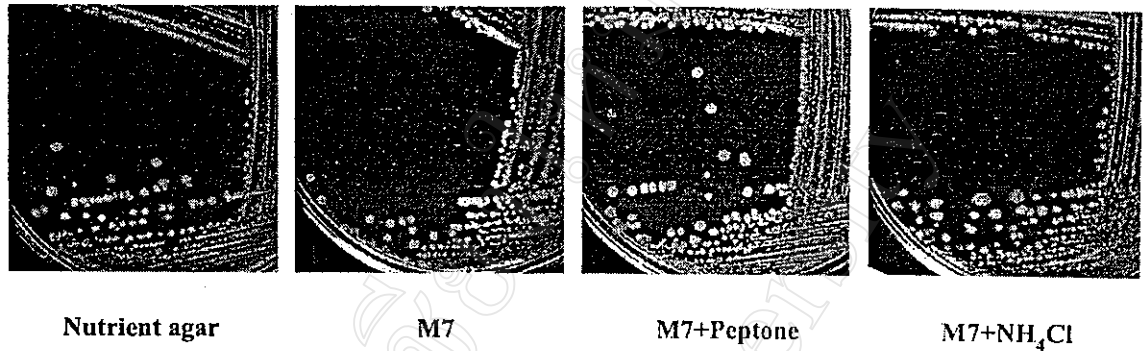
ตาราง 3.8 การเจริญของเชื้อ *B.subtilis* บนอาหารหมักสตาร์ต สูตร 1x และสูตร 2

กลุ่ม	อาหาร	ความขุ่นของ <i>B.subtilis</i> เมื่อเจริญในอาหารเหลว	ขนาดโคโลนีของ <i>B.subtilis</i> เมื่อเจริญบน อาหารแข็ง (มม.)
ควบคุม	Nutrient	ขุ่นน้อยมาก	1.5-2.5
1	M1(สูตร 1x)	+++	2.5-3.0
	M1+peptone	+++	3.0-4.0
	M1+NH ₄ Cl	++	1.5-2.5
2	M7(สูตร 1x)	++	1.5-2.0
	M7+peptone	++	2.0-2.5
	M7+NH ₄ Cl	+	1.5-2.5
3	M10(สูตร 1x)	+	2.5-4.0
	M10+peptone	+	3.0-4.0
	M10+NH ₄ Cl	+	1.5-2.0

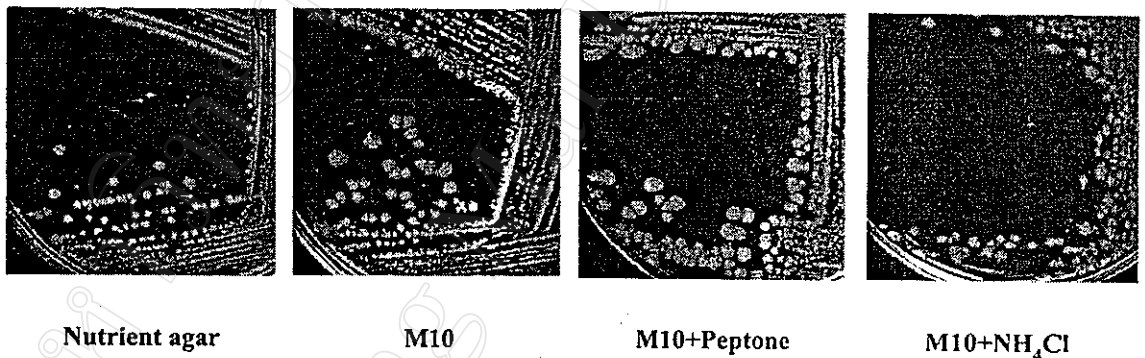
หมายเหตุ ; + ขุ่นน้อย, ++ ขุ่นปานกลาง, +++ ขุ่นมาก



รูป 3.8 ลักษณะโคโลนีของ *B.subtilis* เมื่อเจริญบนอาหารหมักสตาร์ต M1



รูป 3.9 ลักษณะโคโลนีของ *B.subtilis* เมื่อเจริญบนอาหารมัสตาร์ด M7



รูป 3.10 ลักษณะโคโลนีของ *B.subtilis* เมื่อเจริญบนอาหารมัสตาร์ด M10

3.3.3 ผลของอาหารมัสตาร์ด สูตร 1x และ สูตร 3 ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา

ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของแป้งและกากมัสตาร์ดพบว่ามีส่วนประกอบที่จะเป็นแหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ในการเจริญของจุลินทรีย์ดังนั้นเมื่อนำมาเตรียมเป็นอาหารเหลว จากการเตรียมทั้ง 2 วิธี คือละลายในน้ำกลั่น (สูตร 1x) และละลายในสารละลาย 0.10 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (สูตร 3) มาทดสอบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp., *E. coli*, *M. luteus*, *B.megaterium* และ *S. maltophilia* เชื้อยีสต์ *Rhodotorula* sp. และเชื้อรา *Aspergillus* spp. และ *Rhizopus* spp. ลงในอาหารเหลวและขีด (streak) ลงบนอาหารแข็ง ผลการเจริญในอาหารเหลวสังเกตจากความขุ่นของเชื้อ แสดงดังตาราง

3.9 พบว่าแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ สามารถเจริญได้ทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็ง นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อรา และยีสต์ก็สามารถเจริญได้บนอาหารเหล่านี้ด้วย จากการสังเกตพบว่าปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้นในอาหารที่ละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ ไม่มีส่วนทำให้เชื้อเจริญได้มากขึ้น

ตาราง 3.9 การเจริญของแบคทีเรีย ยีสต์ และเชื้อรา ในอาหารมัสตาร์ด สูตร 1x และสูตร 3

จุลินทรีย์ที่ทดสอบ	M1		M7		M10	
	สูตร 1x	สูตร 3	สูตร 1x	สูตร 3	สูตร 1x	สูตร 3
<i>B.subtilis</i>	++	++	+	+	+	+
<i>E.coli</i>	++	++	++	++	++	++
<i>Bacillus</i> spp.	+	++	+	+	+	+
<i>M.luteus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>B.megaterium</i>	++	+	+	+	+	+
<i>S.maltophilia</i>	++	++	++	+	++	+
<i>Rhodotorula</i> sp	ND	+	ND	+	ND	+
<i>Aspergillus</i> spp.	+	+	+	+	+	+
<i>Rhizopus</i> spp.	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ ; + ขุ่นน้อย, ++ ขุ่นมาก, ND: Not detected

3.4 ผลการแยกสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส

3.4.1 ผลการคัดเลือกเบื้องต้น

ในการคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสเบื้องต้น ทำโดยแยกเชื้อจุลินทรีย์ ที่สนใจออกจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ปะปนอยู่ ในการทดลองนี้จุลินทรีย์ที่สนใจคือแบคทีเรียที่สามารถผลิตโปรติเอสได้ โดยให้เชื้อเจริญบนอาหารแข็งสกีมมิลค์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อจะให้ลักษณะเป็นวงใสรอบโคโลนี (Clear zone) พบว่าสามารถแยกเชื้อได้ 44 isolates จากจำนวนตัวอย่าง 9 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มจะเป็นการนำตัวอย่างจากแหล่งที่มาคล้ายกัน มารวมกัน แสดงดังตาราง 3.10 และนำไปย้อมสีแกรมให้ลักษณะการย้อมสีแกรม (Gram's stain) รูปร่าง และการเรียงตัวเมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ต่างกันในแต่ละตัวอย่าง ซึ่งตาราง 3.11 แสดงลักษณะโคโลนี การเรียงตัว การย้อมติดสีแกรม และเอนโดสปอร์ที่พบภายในเซลล์

ตาราง 3.10 แหล่งที่มาของตัวอย่างกากมัสตาร์ดและจำนวนเชื้อที่แยกได้

กลุ่ม	แหล่งของแบคทีเรีย	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวนเชื้อที่ให้ Clear zone
1	กองมัสตาร์ด มัสตาร์ดบนดิน มัสตาร์ดแห้ง	17	9
2	ข้างกองฟาง กองฟาง	7	5
3	มัสตาร์ดบนมูลวัว	5	4
4	มัสตาร์ดบนมูลแพะ ฝังใส่มัสตาร์ดให้แพะกิน	7	5
5	มัสตาร์ดที่มีราสีขาว	5	5
6	มัสตาร์ดในเล้าเปิด	5	4
7	มัสตาร์ดในคอกหมู	2	6
8	มัสตาร์ดที่มีรด้า	2	2
9	มัสตาร์ดข้างถังขยะ	3	4
รวม		49	44

ตาราง 3.11 ชนิดแบคทีเรียที่แยกได้และลักษณะทาง Microscopic และ Macroscopic

กลุ่ม	ลักษณะโคโลนี	การย้อมติดสีแกรม, การเรียงตัว และขนาด (ไมโครเมตร)	เอนโดสปอร์
1	1 กลม แบน เทา ขอบไม่เรียบ ϕ 2-5 มม	+ve rod cluster short chain 0.5-0.7x2	+
	2 กลม แบน ขาว ขอบไม่เรียบ ϕ 1-2 มม	+ve rod long chain 0.5-0.7x1.5-2	+
	3 กลม แบน ขาว ϕ 0.5 มม	+ve rod cluster 0.5x1	-
	4 กลม นูน ใส	+ve rod cluster 0.5x1	-
	5 ขึ้นเป็นก้อน ขาวขุ่น	+ve rod cluster 0.5-0.7x1-1.5	-
	6 กลม ด้าน เทา ขอบไม่เรียบ ϕ 1-3	+ve rod cluster 0.5x1	-
	7 กลม นูน เหลือง เล็ก	+ve straight rod cluster 0.5-0.7x2	-
	8 กลม นูน ด้าน ขาว	+ve cocci cluster ϕ 0.3-0.5	-
	9 กลม แบน ใส	- ve rod cluster oval spore 0.5x1-1.5	+
2	1 กลม แบน เทา ขอบไม่เรียบ ϕ 3-5 มม	+ve rod long chain 0.5x2	-
	2 กลม แบน เทา ขอบไม่เรียบ ϕ 2-3 มม	+ve straight rod cluster 0.5x2	-

ตาราง 3.11 ชนิดแบคทีเรียที่แยกได้และลักษณะทาง Microscopic และ Macroscopic (ต่อ)

กลุ่ม	ลักษณะโคโลนี	การย้อมติดสีแกรม, การเรียงตัว และขนาด (ไมโครเมตร)	เอนโดสปอร์
2	3 ด้าน ขาว ϕ 0.5-0.7 มม 4 กลม แบน ขาวขุ่น 5 กลม แบน ใส	+ve rod cluster 0.5x1 - ve rod cluster 0.5x1 - ve rod cluster short chain 0.5x1-2	+ + -
3	1 กลม นูน มันวาว ขาวขุ่น ϕ 0.5-0.7 มม 2 กลม นูน เหลือง มันวาว 3 กลม นูน เหลือง ใส 4 กลม นูน ส้มใส	+ve rod cluster 0.3x1-1.5 +ve cocci cluster short chain 0.3-0.5 +ve cocci cluster ϕ 0.3 +ve cocci cluster ϕ 0.3	- - - -
4	1 กลม แบน ด้าน ขาวขุ่น 2 กลม แบน ขาวขุ่น ขอบไม่เรียบ 3 กลม แบน มันวาว ขาว 4 กลม แบน มันวาว ขาว 5 กลม แบน เทา ขอบไม่เรียบ	+ve rod long chain 0.7-1x2-2.5 +ve rod cluster 0.5x1-1.5 +ve rod cluster 0.5x1 +ve rod cluster 0.5x1 +ve rod cluster short chain 0.5-0.7x1	+ + + - -
5	1 กลม แบน ด้าน ขอบไม่เรียบ ขาวขุ่น 2 กลม แบน เหลือง 3 กลม แบน ขาว 4 กลม แบน เทา 5 กลม นูน ขาวด้าน	+ve rod long chain 0.7-1x2-2.5 +ve rod cluster 0.5x1 +ve rod cluster 0.5x1 +ve rod cluster 0.3x1 - ve fungi-like bacteria	- + + - -
6	1 กลม แบน ด้าน ขอบไม่เรียบ ขาวขุ่น 2 กลม แบน ขาวขุ่น 3 กลม นูน เทา 4 กลม นูน ใส เล็ก	+ve rod long chain 0.7-1x2 +ve rod cluster 0.3x1 +ve rod cluster 0.5x1-1.5 - ve rod cluster short chain 0.5x1.5	+ - - -
7	1 กลม แบน ด้าน ขาว ขอบไม่เรียบ 2 กลม ขาวเหลือง มันวาว ขอบไม่เรียบ 3 กลม เหลือง มันวาว 4 กลม แบน ด้าน เหลืองส้ม 5 กลม แบน มันวาว เหลือง 6 กลม แบน ขาวฝ้า เหนียว	+ve rod long chain 0.5x2 +ve rod cluster 0.5x1-1.5 +ve rod long chain 0.7-1x2 +ve rod long chain 0.5x1-1.5 +ve rod cluster 0.5x1-1.5 +ve rod cluster 0.5x1-1.5	- - + - + +

ตาราง 3.11 ชนิดแบคทีเรียที่แยกได้และลักษณะทาง Microscopic และ Macroscopic (ต่อ)

กลุ่ม	ลักษณะโคโลนี	การย้อมติดสีแกรม, การเรียงตัว และขนาด (ไมโครเมตร)	เอนโดสปอร์
8	1 กลม แบน ด้าน ขาว	+ve straight rod long chain 0.5x2	-
	2 กลม แบน ขาว ขอบไม่เรียบ	+ve rod cluster 0.5x1	-
9	1 กลม แบน ด้าน ขาว	+ve rod cluster short chain 0.5x1.5-2	+
	2 กลม แบน ทึบ ขอบไม่เรียบ	+ve rod cluster 0.3x1-1.5	-
	3 กลม แบน เทา มั่น	+ve rod long chain 1x2	-
	4 กลม นูน เทา เล็ก	+ve rod cluster oval spore 0.3-0.5x1	+

หมายเหตุ ; ϕ : เส้นผ่านศูนย์กลาง, +ve : ย้อมติดสีแกรมบวก, -ve : ย้อมติดสีแกรมลบ, rod :

เชลล์รูปแท่ง, cocci : เชลล์รูปกลม, cluster : การเรียงตัวเป็นกลุ่ม, long (short) chain : การเรียงตัวเป็นสายยาว (สั้น), + : พบเอนโดสปอร์ และ - : ไม่พบเอนโดสปอร์

จากแต่ละตัวอย่างมีเชื้อที่เข้าด้วยลักษณะของโคโลนี การย้อมสีแกรม และการเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังนั้นจึงนำมาจัดเรียงใหม่ มีทั้งหมด 20 isolates และวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี และวงใสรอบโคโลนี เมื่อ stab เชื้อลงบนอาหารแข็งสกีมมิลค์ หลังจากบ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แสดงดังตาราง 3.12 จากลักษณะของโคโลนีและลักษณะการเรียงตัวและการย้อมติดสีแกรม เชื้อส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม Bacillus ซึ่งมีลักษณะโคโลนีใหญ่ สีขาวด้าน ย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อนที่มีขนาดต่างๆกัน และสร้างเอนโดสปอร์โดยมีลักษณะเป็นวงรีที่ย้อมไม่ติดสีอยู่ภายในเซลล์

ตาราง 3.12 ลักษณะทาง Microscopic และ Macroscopic ของเชื้อ และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone

รหัสเชื้อ	เส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนี (มม)	เส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone (มม)	ลักษณะโคโลนี	การย้อมติดสีแกรม, การเรียงตัว และขนาด (ไมโครเมตร)	เอนโดสปอร์
A	7.0	14.0	กลม แบน ด้าน ขาวครีม ขอบไม่เรียบ ϕ 3-5 มม	+ ve rod cluster short chain 0.5-0.7x2 ไมครอน	+
B	5.0	16.0	กลม แบน ด้าน ขาวครีม ขอบไม่เรียบ ϕ 1-2 มม	+ ve rod long chain 0.5-0.7x2 ไมครอน	+
C	3.0	12.0	กลม นูน มั่น ขาวครีม ϕ 0.5-1.0 มม.	+ ve rod cluster 0.5x1-2.0 ไมครอน	+
D	2.0	7.0	กลม นูน มั่น เหลือง ϕ 1 มม	+ ve rod cluster 0.5-0.7x1-1.5 ไมครอน	-
E			ขึ้นเป็นก้อนๆ	+ ve rod cluster 0.5x1 ไมครอน	-
F	3.0	8.0	แบน มั่น ขอบไม่เรียบ ϕ 1.5-2.0 มม	+ ve straight rod cluster 0.5-0.7x2 ไมครอน	-
G	1.0	6.0	กลม ขนาดเล็ก สีเหลือง	+ ve cocci cluster 0.5-0.7x2 ไมครอน	-
H	1.5	4.0	กลม ขนาดเล็ก ขาวเหลือง เหมือนแป้ง	+ ve fungi-like bacteria	-
I	4.0	14.0	กลม นูน ขนาดเล็ก สีครีม ϕ 0.3 มม	+ve rod cluster 0.5x1 ไมครอน	+
J	1.5	5.0	กลม ขนาดเล็ก ใส	-ve rod short chain cluster 0.5x1-2 ไมครอน	-
K	2.0	11.0	กลม ขนาดเล็ก สีเหลืองใส	+ve cocci cluster ϕ 0.3 ไมครอน	-
L	2.0	12.0	กลม นูน ขนาดเล็ก สีส้มใส ϕ 0.5 มม	+ve cocci cluster ϕ 0.3 ไมครอน	-
M	5.0	20.0	แบน ด้าน ขอบไม่เรียบ สีครีม	+ve rod long chain 0.7-1x2-3 ไมครอน	+

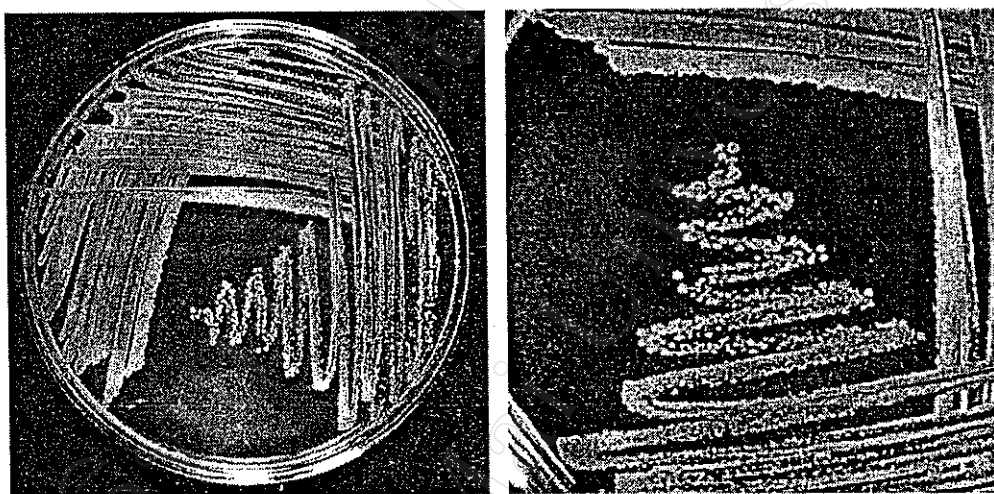
ตาราง 3.12 ลักษณะทาง Microscopic และ Macroscopic ของเชื้อ และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (มม)	เส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone (มม)	ลักษณะโคโลนี	การย้อมติดสีแกรม, การเรียงตัว และขนาด (ไมโครเมตร)	เอนโดสปอร์
N	2.0	15.0	กลม นูน เหลืองใส ϕ 1-1.5 มม	+ve rod cluster 0.5x1-1.5 ไมครอน	+
O	3.0	16.0	กลม นูน มันวาวใส ϕ 1 มม	+ve rod cluster 0.5x1 ไมครอน	-
P	4.5	12.0	กลม แบนด้าน เทา ϕ 1.5-2.0 มม	+ve rod long chain 0.5x2 ไมครอน	-
Q	4.0	14.0	กลม แบน มั่น เหลือง ϕ 1-2 มม	+ve rod cluster 0.5x1-1.5 ไมครอน	-
R	2.0	8.0	กลม แบน ด้าน เหลือง ϕ 1.5-2.0 มม	+ve rod long chain 0.5x1-1.5 ไมครอน	-
S	5.0	12.0	กลม นูน ฝ้า ขาว ϕ 1-2 มม	+ve rod cluster 0.5x1-1.5 ไมครอน	+
T	2.0	9.0	กลม แบน มั่น ขาวเหลือง ϕ 1-1.5 มม.	+ve rod long chain 1x2	-

หมายเหตุ ; ϕ : เส้นผ่านศูนย์กลาง, +ve : ย้อมติดสีแกรมบวก, -ve : ย้อมติดสีแกรมลบ, rod : เซลล์รูปแท่ง, cocci : เซลล์รูปกลม, cluster : การเรียงตัวเป็นกลุ่ม, long (short) chain : การเรียงตัวเป็นสายยาว (สั้น), + : พบเอนโดสปอร์ และ - : ไม่พบเอนโดสปอร์

3.4.2 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสปริมาณสูงในอาหารเหลว

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสปริมาณสูงในอาหารเหลว นำเชื้อทั้งหมด 20 เชื้อ จากการคัดเลือกเบื้องต้นมาเลี้ยงในอาหาร inoculum medium เพื่อให้เชื้อเจริญเต็มที่และนำไปเลี้ยงต่อใน production medium เพื่อให้ผลิตเอนไซม์โปรติเอส ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อที่ผลิตโปรติเอสได้มากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้ออื่นๆ คือ เชื้อ C แสดงในตาราง 3.13 และรูป 3.11



รูป 3.11 เชื้อ *Bacillus licheniformis* บนอาหารแข็งสгимิลค์ที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

จากลักษณะโคโลนี การย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง ขนาด 0.5x1-2.0 ไมโครเมตร มีเอนโดสปอร์เป็นรูปไข่ (oval) เชื้อ C น่าจะอยู่ในวงศ์ Bacillus หลังจากการส่งเชื้อพิสูจน์พบว่า คือ *Bacillus licheniformis* ให้ผลทดสอบทางชีวเคมี ดังตาราง 3.14

ตาราง 3.13 โปรตีนแอคติวิตีในน้ำเลี้ยงของแบคทีเรียแต่ละชนิด

เชื้อ	โปรตีนแอคติวิตี (ยูนิต/มล.)
A	0.85
B	25.55
C	137.65
D	10.10
E	2.85
F	5.45
G	2.70
H	0.70
I	9.80
J	0
K	2.15
L	9.35
M	17.00
N	1.70
O	2.60
P	0
Q	5.05
R	4.30
S	12.25
T	3.30

ตาราง 3.14 ผลการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ C

การทดสอบ	ผล
Catalase	+
Lecitinase	-
Citrate	+
Esculin hydrolysis	+
Nitrate reduction	+
Starch hydrolysis	+
Manital fermentation	+
Penicillin (10 Units)	susceptible
Hemolysis บน Blood agar	beta-hemolysis

หมายเหตุ : + , Positive reaction

- , Negative reaction

3.5 ผลของอาหารมัสตาร์ดต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *Bacillus licheniformis*

3.5.1 ผลของอาหารมัสตาร์ด สูตร 1x และสูตร 3 ต่อการเจริญของ *B.licheniformis*

3.5.1.1 คุณสมบัติของอาหารที่เตรียม

จากคุณสมบัติของอาหารเหลวที่เตรียมได้พบว่า อาหารที่เตรียมโดยการนำไปละลายและต้มใน 0.10 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (สูตร 3) ทำให้มีปริมาณโปรตีนเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับละลายในน้ำ (สูตร 1x) ดังนั้นในตาราง 3.15 แสดงปริมาณโปรตีนในอาหารเหลวมัสตาร์ด สูตร 3 ที่เจือจางกับน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วน 1:2, 1:4, 1:8 และ 1:16 เทียบกับปริมาณโปรตีนในอาหารมัสตาร์ด สูตร 1x โดยมีปริมาณโปรตีนมากที่สุดในอาหารมัสตาร์ด M10 (0.63 มก.ต่อมล.) สูตร 3 รองลงมาคือ M7 M1 และ DMM สูตร 3 ตามลำดับ ในขณะที่อาหารมัสตาร์ด สูตร 1x พบว่า มีปริมาณโปรตีนมากที่สุด (0.130 มก.ต่อมล.) ในอาหาร M1 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในอาหารมัสตาร์ด M1 M7 M10 และ DMM สูตร 1x มีปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกับโปรตีนในอาหารมัสตาร์ด สูตร 3 ที่ถูกเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:2, 1:8, 1:8 และ 1:4 ตามลำดับ สำหรับปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากตาราง 3.16 พบว่าอาหารมัสตาร์ด M1 และ DMM จากวิธีการเตรียมทั้ง 2 วิธีปริมาณกลูโคสไม่แตกต่างกัน แต่ในอาหาร M7 และ M10 เมื่อเตรียมตามสูตร 1x มีปริมาณกลูโคสมากกว่าสูตร 3 ประมาณ 1 เท่า และพบว่ามียีสจำนวนมากที่สุดในอาหาร M1 สูตร 3 (1.81 มก.ต่อมล.) และปริมาณโปรตีนและกลูโคสมีค่าลดลงเป็นลำดับเมื่อเจือจางกับน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วน 1:2, 1:4, 1:8 และ 1:16

ตาราง 3.15 แสดงปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในอาหารเหลวมัสตาร์ด

อาหาร มัสตาร์ด	สูตร 1x	สูตร 3	สูตร 3 เจือจาง 1:2	สูตร 3 เจือจาง 1:4	สูตร 3 เจือจาง 1:8	สูตร 3 เจือจาง 1:16
M1	0.130	0.211	0.121	0.067	0.032	0.007
M7	0.029	0.480	0.274	0.119	0.027	0
M10	0.049	0.630	0.304	0.122	0.072	0.029
DMM	0.032	0.190	0.088	0.044	0.024	0.010

ตาราง 3.16 แสดงปริมาณกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในอาหารเหลวมีสตาร์ด

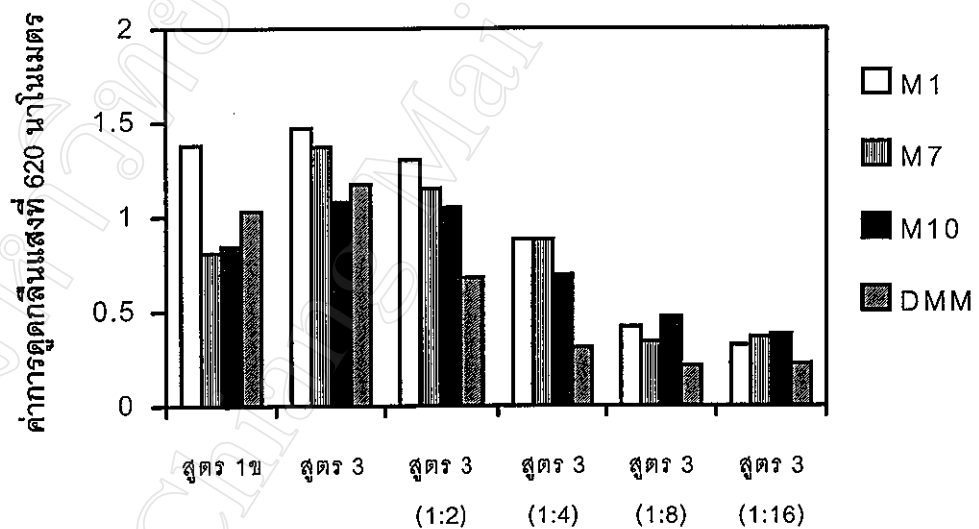
อาหาร มีสตาร์ด	สูตร 1ข	สูตร 3	สูตร 3 เจือจาง 1:2	สูตร 3 เจือจาง 1:4	สูตร 3 เจือจาง 1:8	สูตร 3 เจือจาง 1:16
M1	1.72	1.81	0.84	0.41	0.29	0.27
M7	1.79	0.98	0.75	0.36	0.32	0.29
M10	1.66	0.87	0.76	0.36	0.31	0.29
DMM	0.71	0.77	0.64	0.33	0.29	0.28

3.5.1.2 ผลการเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

เชื้อเชื้อ *Bacillus licheniformis* ลงในอาหารเหลวมีสตาร์ดสูตร 1ข สูตร 3 และสูตร 3 ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นเป็นอัตราส่วน 1:2, 1:4, 1:8 และ 1:16 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ในเครื่องเขย่า แล้ววัดค่าการเจริญของเชื้อที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร แสดงดังตาราง 3.17 และรูป 3.12 พบว่าอาหารจากแป้งมีสตาร์ด M1 สูตร 3 (1:2) ที่มีปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกับอาหาร M1 สูตร 1ข มีค่าการเจริญของเชื้อใกล้เคียงกันรวมทั้งอาหารสูตร 3 แบบไม่เจือจางด้วย สำหรับปริมาณโปรตีนในอาหารมีสตาร์ด M7(1:8) M10(1:8) และ DMM (1:4) มีปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกับโปรตีนในอาหารสูตร 1ข แต่ค่าการเจริญของเชื้อที่วัดได้จากความขุ่นน้อยกว่าการเจริญของเชื้อในอาหารสูตร 1ข และเมื่อนำน้ำเลี้ยงหลังจากวัดค่าการเจริญของเชื้อแล้วไปหาโปรติเอสแอกติวิตีได้ผลดังตาราง 3.18 และรูป 3.13 โดย แอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในอาหารมีสตาร์ด M1 M7 M10 และ DMM (สูตร 1ข) เป็น 111.40 64.00 54.90 และ 124.70 ยูนิตต่อมล.ตามลำดับ และให้ปริมาณโปรติเอสแอกติวิตีสูงขึ้นในอาหารมีสตาร์ด M1 M7 และ M10 เป็น 154.60 104.20 และ 132.40 ยูนิตต่อมล. ตามลำดับ ยกเว้นในอาหารมีสตาร์ด DMM ที่ให้ปริมาณโปรติเอสน้อยลงเป็น 82.80 ยูนิตต่อมล.

ตาราง 3.17 ผลการเจริญของเชื้อ *B.licheniformis* ในอาหารมัสตาร์ดโดยวัดค่า OD 620 นาโนเมตร

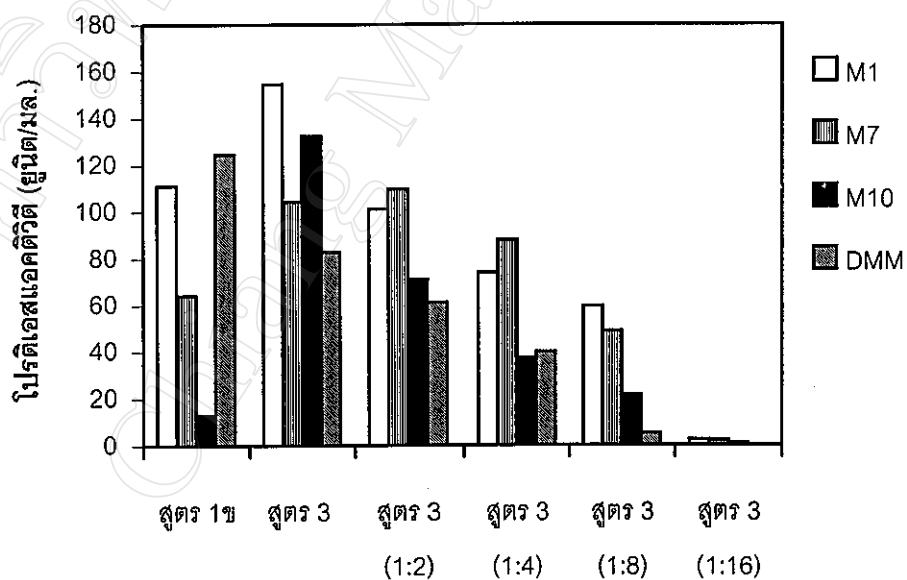
อาหาร มัสตาร์ด	สูตร 1ข	สูตร 3	สูตร 3 เจือจาง 1:2	สูตร 3 เจือจาง 1:4	สูตร 3 เจือจาง 1:8	สูตร 3 เจือจาง 1:16
M1	1.38	1.47	1.30	0.880	0.419	0.320
M7	0.810	1.37	1.15	0.880	0.340	0.365
M10	0.845	1.08	1.050	0.695	0.470	0.380
DMM	1.030	1.170	0.680	0.310	0.213	0.223



รูป 3.12 การเจริญของเชื้อ *B.licheniformis* ในอาหารมัสตาร์ดโดยวัดค่า OD 620 นาโนเมตร

ตาราง 3.18 ผลการผลิตโปรตีน (ยูนิตต่อมล.) ของเชื้อ *B.licheniformis* ในน้ำเลี้ยงอาหาร
มัสตาร์ด

อาหาร มัสตาร์ด	สูตร 1ข	สูตร 3	สูตร 3 (1:2)	สูตร 3 (1:4)	สูตร 3 (1:8)	สูตร 3 (1:16)
M1	111.40	154.60	101.20	73.85	59.45	2.30
M7	64.00	104.20	109.75	87.95	48.65	2.10
M10	54.90	132.40	70.85	37.10	21.25	1.25
DMM	124.70	82.80	61.05	39.65	5.05	0



รูป 3.13 ผลการผลิตโปรตีน (ยูนิตต่อมล.) ของเชื้อ *B.licheniformis* ในน้ำเลี้ยงอาหารมัสตาร์ด

3.5.2 ผลของอาหารมัสตาร์ดสูตร 4 ต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ

B.licheniformis

3.5.2.1 คุณสมบัติของอาหาร

จากผลการทดลองที่ผ่านมาพบว่าอาหารที่เหมาะสมที่จะนำมาเตรียมเป็นอาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส เป็นแป้งมัสตาร์ดที่นำมาละลายและต้มใน 0.10 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (สูตร 3) โดยในขั้นตอนการเตรียมได้มีการแยกส่วนที่ไม่ละลายออก ซึ่งอาจเป็นส่วนของกากมัสตาร์ดที่ติดมาในขั้นตอนการเตรียมแป้งมัสตาร์ดและมีบางส่วนของโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำรวมอยู่ด้วย ซึ่งโปรตีนในอาหารสามารถเหนี่ยวนำให้เชื้อมีการผลิตโปรติเอสได้ สำหรับอาหารมัสตาร์ดสูตร 4 โดยไม่แยกส่วนของโปรตีนที่ไม่ละลายออก ที่ความเข้มข้น 1-4 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีปริมาณโปรตีนที่ละลายในอาหารแสดงในตาราง 3.19 และน้ำตาลกลูโคส แสดงในตาราง 3.20 ปริมาณโปรตีนที่ละลายในอาหารมัสตาร์ด M1 M7 M10 และ DMM สูตร 4 เมื่อเตรียมที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณโปรตีนสูงสุดเป็น 0.743, 1.123, 1.042 และ 0.413 มก./มล. ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารมัสตาร์ด สูตร 3 ที่ความเข้มข้นเท่ากัน 4 เปอร์เซ็นต์ ให้โปรตีน 0.292, 0.574, 0.726 และ 0.293 ตามลำดับ และในตารางที่ 3.20 แสดงปริมาณกลูโคสโดยในอาหารมัสตาร์ด M1 M7 M10 และ DMM สูตร 3 มีกลูโคส 1.370 1.017 0.793 และ 0.520 มก./มล. ตามลำดับ ในอาหารมัสตาร์ดสูตร 4 ที่ 4 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณกลูโคสใกล้เคียงกัน ยกเว้นอาหารมัสตาร์ด M10 สูตร 1x ให้ปริมาณกลูโคส(1.206 มก./มล.) มากกว่าใน สูตร 3 (0.793 มก./มล.) และสูตร 4 (0.711 มก./มล.)

ตาราง 3.19 ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ละลายในอาหารมัสตาร์ด

อาหาร มัสตาร์ด	สูตร 1x 4%(w/v)	สูตร 3 4%(w/v)	สูตร 4 1% (w/v)	สูตร 4 2% (w/v)	สูตร 4 3% (w/v)	สูตร 4 4% (w/v)
M1	0.152	0.292	0.217	0.405	0.531	0.743
M7	0.032	0.574	0.257	0.454	0.787	1.123
M10	0.051	0.726	0.279	0.514	0.776	1.045
DMM	0.028	0.293	0.069	0.249	0.360	0.413

ตาราง 3.20 ปริมาณกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในอาหารมัสตาร์ด

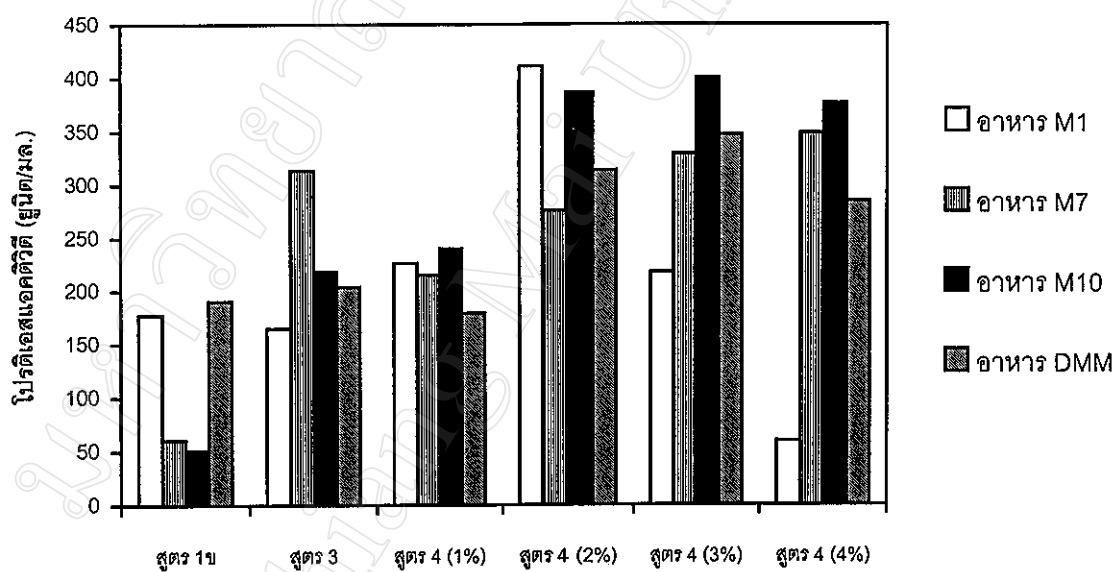
อาหาร มัสตาร์ด	สูตร 1ข 4%(w/v)	สูตร 3 4%(w/v)	สูตร 4 1% (w/v)	สูตร 4 2% (w/v)	สูตร 4 3% (w/v)	สูตร 4 4% (w/v)
M1	1.250	1.370	0.44	0.537	1.366	1.284
M7	1.288	1.017	0.432	0.499	0.726	1.042
M10	1.206	0.793	0.411	0.493	0.752	0.711
DMM	0.385	0.520	0.229	0.312	0.479	0.506

3.5.2.2 ผลการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *B.licheniformis*

เมื่อถ่ายเชื้อ *B. licheniformis* ลงในอาหารแต่ละชนิดเพื่อดูความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ได้ผลดังตาราง 3.21 และรูป 3.14 จากการทดลองพบว่าโปรตีนที่เพิ่มมากขึ้นในอาหารมัสตาร์ดสูตร 3 ทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้มากขึ้น แต่พบว่าเอนไซม์โปรติเอสจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อใช้อาหารมัสตาร์ดสูตร 4 โดยอาหาร M1 สามารถ ทำให้เชื้อผลิตโปรติเอสได้ แอคติวิตีสูงสุดเมื่อใช้ที่ความเข้มข้นของแป้งมัสตาร์ดเป็น 2% (w/v) 82.19 หน่วย/มิลลิลิตร แป้งมัสตาร์ด M7 ที่ความเข้มข้น 4% (w/v) 69.71 หน่วย/มิลลิลิตร สำหรับ M10 และ DMM เตรียมที่ความเข้มข้น 3 % (w/v) ให้แอคติวิตีเป็น 79.98 และ 69.39 หน่วย/มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาผลของแอคติวิตีร่วมกับเปอร์เซ็นต์ร้อยละในการเตรียมแป้งมัสตาร์ดจากของเหลว มัสตาร์ด จากการคำนวณพบว่าในของเหลวมัสตาร์ดเริ่มต้น 1 มิลลิลิตร สามารถเตรียมเป็นแป้งมัสตาร์ด M1 M7 และ M10 แล้วใช้เป็นอาหารเพื่อผลิตเอนไซม์ได้ 535.45 386.25 และ 676.45 หน่วย ตามลำดับ ดังนั้นแป้งมัสตาร์ด M10 ให้แอคติวิตีของโปรติเอสสูงสุด อาหารที่เหมาะสมที่จะนำมาเตรียมเป็นอาหารเพื่อการผลิตโปรติเอสเป็นอาหารที่เตรียมจากแป้งมัสตาร์ด M10 ที่นำละลายและต้มในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 3%(w/v) สูตร 4

ตาราง 3.21 ผลการผลิตโปรตีน (หน่วยต่อมล.) ของเชื้อ *B.licheniformis* ในอาหารมัสตาร์ด

อาหาร มัสตาร์ด	สูตร 1ข 4%	สูตร 3 4%	สูตร 4 1% (w/v)	สูตร 4 2% (w/v)	สูตร 4 3% (w/v)	สูตร 4 4% (w/v)
M1	177.60	164.80	226.30	410.95	217.75	59.25
M7	60.50	313.50	215.20	275.90	328.90	348.55
M10	51.10	218.65	240.00	386.15	399.90	376.30
DMM	190.40	204.10	179.30	313.50	346.80	284.45



รูป 3.14 ผลการผลิตโปรตีน (หน่วยต่อมล.) ของเชื้อ *B.licheniformis* ในอาหารมัสตาร์ด

3.6 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. licheniformis*

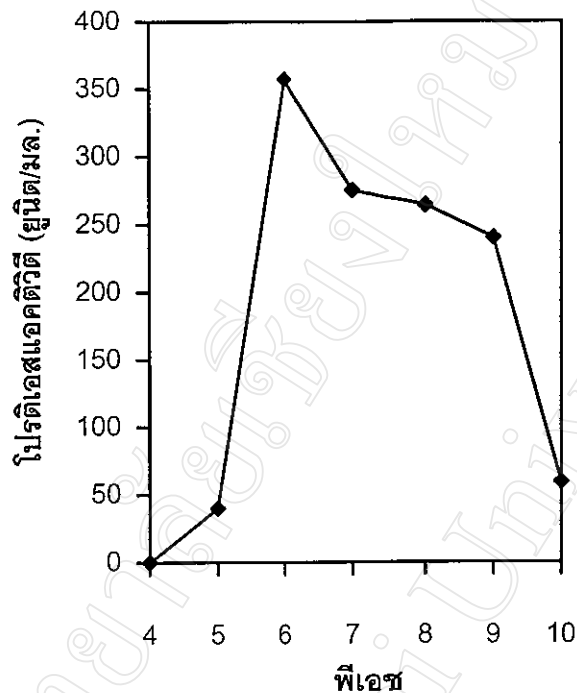
3.6.1 ผลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ในการทดลองเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอส ใช้อาหารที่เตรียมจากแป้งมันสำปะตาร์ด M10 โดยละลายใน 0.10 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้นของอาหาร 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สูตร 4 โดยเตรียมให้มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 และเติมเชื้อ *B. licheniformis* ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อเป็น 10^9 CFU/ml ในปริมาณ 10 % (v/v) แล้วนำไปเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วเก็บน้ำเลี้ยงมาบั่นแยกเซลล์ เพื่อนำไปหาโปรติเอสแอกติวิตีที่ผลิต ได้ผลดังตาราง 3.22 และรูป 3.15

จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ *B. licheniformis* ไม่สามารถผลิตโปรติเอสที่พีเอช 4.0 และให้แอกติวิตีสูงสุด ที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.0 มีค่า relative activity เป็น 100.00 % ที่พีเอช 7 8 9 และ 10 มี relative activity เป็น 77.03 73.91 67.21 และ 16.59 % ตามลำดับ

ตาราง 3.22 ผลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. licheniformis*

พีเอช	โปรติเอสแอกติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	Relative activity (%)
4	0	0
5	40.00	11.20
6	357.05	100.00
7	275.05	77.03
8	263.90	73.91
9	240.00	67.21
10	59.25	16.59



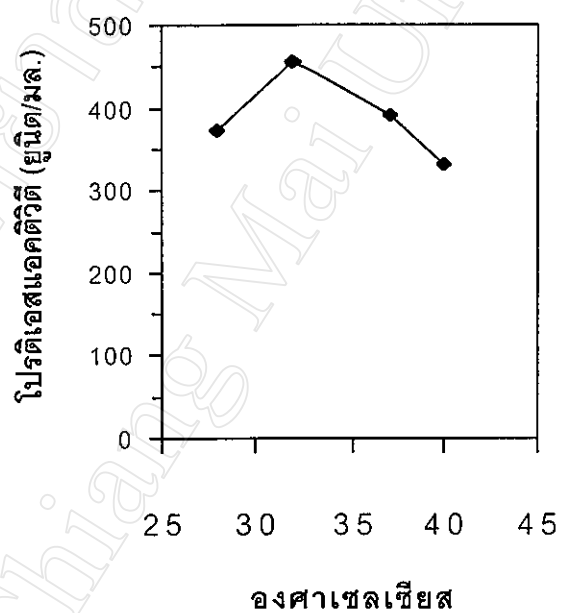
รูป 3.15 ผลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์โพรติเอสจากเชื้อ *B. licheniformis*

3.6.2 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์โพรติเอส

ในการทดลองเพื่อผลิตเอนไซม์โพรติเอส ใช้อาหารที่เตรียมจากแป้งมัลต์ดาร์ต M10 ที่ละลายใน 0.10 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้นของอาหาร 3 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สูตร 4 โดยเตรียมให้มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็นพีเอช 6 และเติมเชื้อ *B. licheniformis* ที่มีปริมาณเชื้อ 10^9 CFU/ml ในปริมาณ 10% (v/v) แล้วนำไปเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 28, 32, 37 และ 40 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วเก็บน้ำเลี้ยงมาปั่นแยกเซลล์ เพื่อนำไปหาแอกทิวิตีของโพรติเอส ได้ผลดังตาราง 3.23 และรูป 3.16 จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ *B. licheniformis* สามารถผลิตเอนไซม์โพรติเอส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.0 ที่อุณหภูมิ 28 32 37 และ 40 องศาเซลเซียส โดยมี relative activity เป็น 80.27 100.00 84.13 และ 71.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังนั้นเชื้อ *B. licheniformis* ผลิตเอนไซม์โพรติเอสให้แอกทิวิตีสูงสุดที่พีเอช 6.0 และ 32 องศาเซลเซียส

ตาราง 3.23 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. licheniformis*

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	โปรติเอสแอคทีวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	Relative activity (%)
28	373.75	80.27
32	465.60	100.00
37	391.70	84.13
40	330.60	71.00



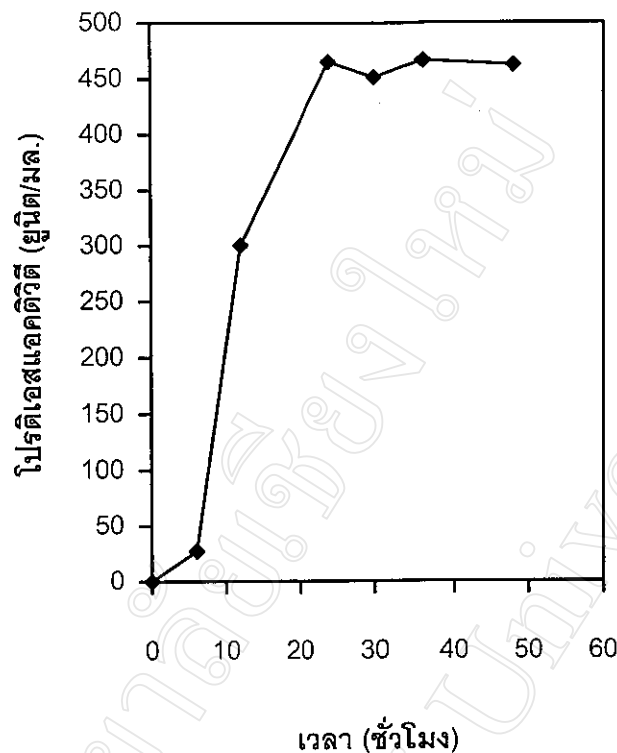
รูป 3.16 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. licheniformis*

3.6.3 ผลของเวลาต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ในการทดลองเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอส ใช้อาหารที่เตรียมจากแป้งมัสตาร์ด M10 ที่ละลายใน 0.10 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้นของอาหาร 3 เปอร์เซ็นต์ สูตร 4 โดยเตรียมให้มีค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็นพีเอช 6 และเติมเชื้อ *B. licheniformis* ที่มีปริมาณเชื้อ 10^8 CFU/ml และถ่ายเชื้อในปริมาณ 10% (v/v) แล้วนำไปเลี้ยงในเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส แล้วเก็บน้ำเลี้ยงมาปั่นแยกเซลล์ทุกๆ 6 ชั่วโมง เพื่อนำไปหาแอกติวิตีของโปรติเอส ได้ผลดังตารางที่ 3.24 และรูป 3.17 จากผลการทดลองพบว่าเชื้อ *B. licheniformis* เริ่มผลิตเอนไซม์โปรติเอสหลังชั่วโมงที่ 6 และให้แอกติวิตีในชั่วโมงที่ 12 มี relative activity เป็น 64.48 ยูนิตต่อมิลลิกรัม และให้แอกติวิตีสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 ได้ 465.60 ยูนิตต่อมิลลิกรัม โดยมี relative activity เป็น 99.80 % และเริ่มคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 48 เมื่อเจริญในอาหารที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.0 และที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

ตาราง 3.24 ผลของเวลาต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. licheniformis*

เวลา (ชั่วโมง)	โปรติเอสแอกติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)	Relative activity (%)
0	0	0
6	27.15	5.82
12	300.25	64.36
24	465.60	99.80
30	451.55	96.79
36	466.50	100.00
48	462.20	99.07



รูป 3.17 ผลของเวลาต่อการผลิตเอนไซม์โปรตีนแอสแอคติวิตีจากเชื้อ *B. licheniformis*

3.7 สมบัติทั่วไปของเอนไซม์โปรตีนแอสแอคติวิตีที่ผลิตได้จากเชื้อ *Bacillus licheniformis*.

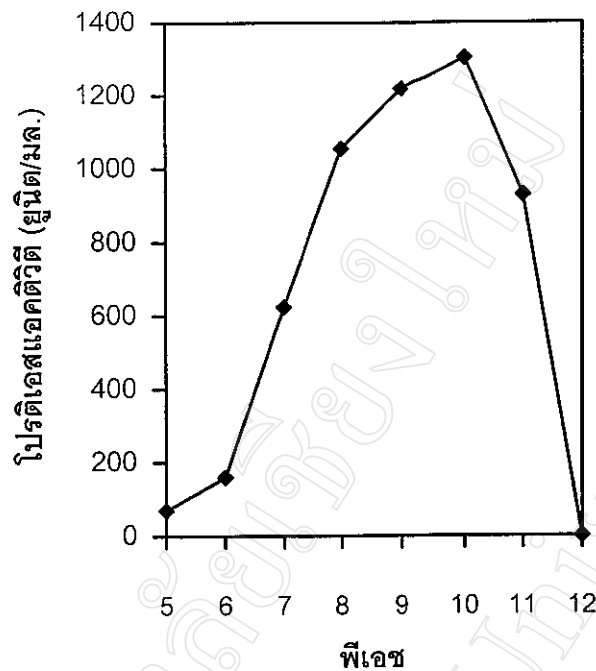
3.7.1 ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีนแอสแอคติวิตี

ในการทดลองได้ศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ เป็นการแสดงความสามารถในการทำงานของเอนไซม์โปรตีนแอสแอคติวิตี โดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรทและใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างกัน โดยที่พีเอช 4-5 ใช้สารละลายกรดซิตริกโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.05 โมลาร์ (0.05 M Citric acid-Sodium citrate buffer) ที่พีเอช 6-8 ใช้สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.05 โมลาร์ (0.05 M Sodium phosphate buffer) ที่พีเอช 9-10 ใช้สารละลายไกลซีนโซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.05 โมลาร์ (0.05 M Glycine-NaOH buffer) และที่พีเอช 11-12 ใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.05 โมลาร์ (0.05 M Phosphate buffer) โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และหยุดปฏิกิริยาโดยใช้ 10 เปอร์เซ็นต์ TCA หลังจากนั้นนำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นแยกไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตรแล้วเทียบหาปริมาณไทโรซีนจากกราฟมาตรฐาน จากนั้นคำนวณหาแอกติวิตีของโปรตีนแอสแอคติวิตี โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์โปรตีนแอสแอคติวิตี คือปริมาณเอนไซม์โปรตีนแอสแอคติวิตีที่สามารถย่อยเคซีนให้ได้กรดอะมิโนไทโรซีน 1 ไมโครกรัมในเวลา 1 นาทีภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง ได้แอกติวิตีของเอนไซม์โปรตีนแอสแอคติวิตีแสดงใน

ตาราง 3.25 และรูป 3.18 จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B.licheniformis* ทำปฏิกิริยาที่พีเอช 5 และ 6 มี relative activity เป็น 5.29 และ 12.18 % ตามลำดับ ขณะที่พีเอชที่เป็นกลางที่มี relative activity เป็น 47.85 % และเมื่อทำปฏิกิริยาที่พีเอช 8 9 10 และ 11 ได้ relative activity เป็น 80.89 93.52 100.00 และ 71.30 % ตามลำดับ และพบว่าเอนไซม์ที่ได้ไม่สามารถทำงานได้ที่พีเอช 12 ดังนั้น เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้ทำงานได้ดีที่สุดที่พีเอช 10.0

ตาราง 3.25 ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. licheniformis*

พีเอช	โปรติเอสแอกติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	Relative activity (%)
5	69.00	5.29
6	158.75	12.18
7	623.50	47.85
8	1054.05	80.89
9	1218.60	93.52
10	1303.00	100.00
11	929.05	71.30
12	0	0



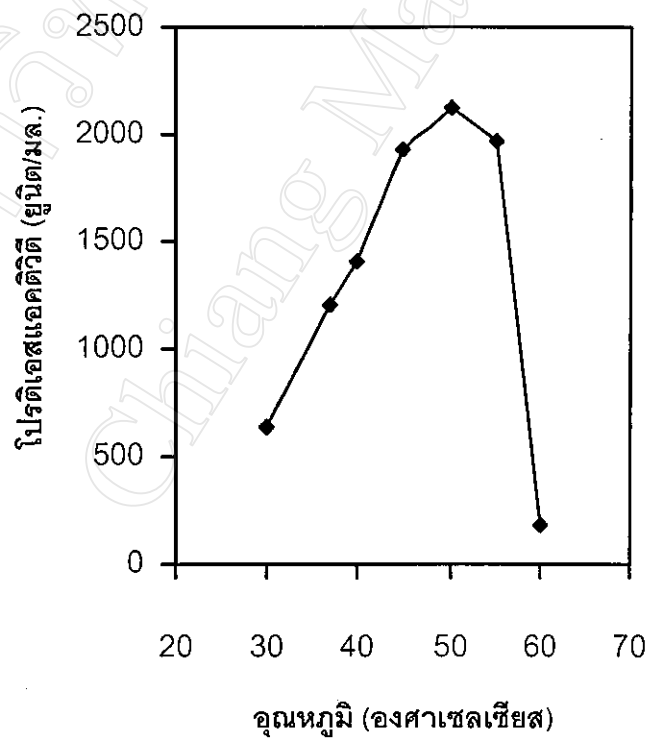
รูป 3.18 ผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีนจากเชื้อ *B. licheniformis*

3.7.2 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีน

ในการทดลองได้ตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีน โดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรท และใช้สารละลายไกลซีนไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 10.0 และให้ทำปฏิกิริยาโดยควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30, 37, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส และหยุดปฏิกิริยาโดยใช้ 10 เปอร์เซ็นต์ TCA หลังจากนั้นนำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นแยกไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตรแล้วเทียบหาปริมาณไทโรซีนจากกราฟมาตรฐาน จากนั้นคำนวณหาแอคติวิตีของโปรตีน โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์โปรตีนคือ ปริมาณเอนไซม์โปรตีนที่สามารถย่อยเคซีนให้ได้กรดอะมิโนไทโรซีน 1 ไมโครกรัมในเวลา 1 นาทีภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง ได้แอคติวิตีของเอนไซม์โปรตีนแสดงในตาราง 3.26 และรูป 3.19 จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์โปรตีนที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. licheniformis* ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส มี relative activity เป็น 30.11 และ 56.74 % เมื่ออุณหภูมิที่สูงขึ้นเป็น 40 45 50 และ 55 องศาเซลเซียส มี relative activity เพิ่มขึ้นเป็น 66.31 90.89 100.00 และ 92.76 % ตามลำดับ และแอคติวิตีเริ่มลดลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

ตาราง 3.26 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. licheniformis*

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	โปรติเอสแอคติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	Relative activity (%)
30	639.75	30.11
37	1204.70	56.71
40	1408.75	66.31
45	1930.95	90.89
50	2124.35	100.00
55	1970.50	92.76
60	185.25	8.22



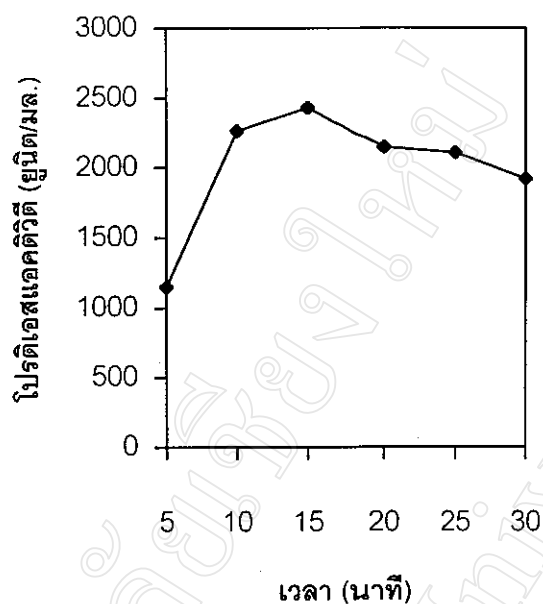
รูป 3.19 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. licheniformis*

3.7.3 ผลของเวลาต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

ในการทดลองได้ตรวจหาแอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอส โดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรท และใช้สารละลายไกลซีนไฮโดรอกไซด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 10.0 และให้ทำปฏิกิริยาโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส และหยุดปฏิกิริยาโดยใช้ 10 เปอร์เซ็นต์ TCA หลังจากทำปฏิกิริยาครบทุกๆ 5 นาทีพอดี และนำสารละลายส่วนโสดที่ได้จากการปั่นแยกไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตรแล้วเทียบหาปริมาณไทโรซีนจากกราฟมาตรฐาน จากนั้นคำนวณหาแอกติวิตีของโปรติเอส โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์โปรติเอสคือ ปริมาณเอนไซม์โปรติเอสที่สามารถย่อยเคซีนให้ได้กรดอะมิโนไทโรซีน 1 ไมโครกรัมในเวลา 1 นาทีภายใต้สภาวะที่ทำให้การทดลอง ได้แอกติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสแสดงในตาราง 3.27 และรูป 3.20 จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตได้จากเชื้อ *B. licheniformis* ทำปฏิกิริยาครบ 5 และ 10 นาที ได้ relative activity เป็น 47.36 และ 93.17 % และพบว่าให้แอกติวิตีสูงสุดในเวลา 15 นาที (relative activity 100.00 %) และเริ่มลดลงหลัง 20 นาที

ตาราง 3.27 ผลของเวลาต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. licheniformis*

เวลา (นาที)	โปรติเอสแอกติวิตี (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	Relative activity (%)
5	1151.25	47.36
10	2264.70	93.17
15	2430.75	100.00
20	2146.75	88.32
25	2107.15	86.69
30	1920.50	79.00



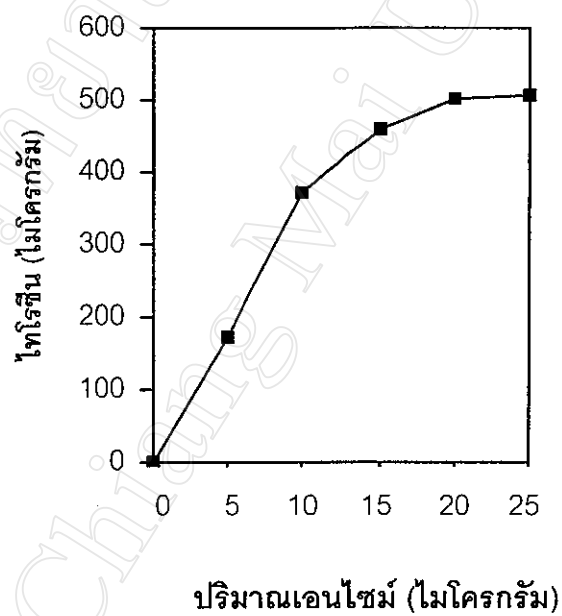
รูป 3.20 ผลของเวลาต่อการทำงานของเอนไซม์โพรตีนเอสจากเชื้อ *B. licheniformis*

3.7.4 ผลของปริมาณเอนไซม์ต่อการทำงานของเอนไซม์โพรตีนเอส

ในการทดลองได้ตรวจหาปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้น โดยใช้เอนไซม์โพรตีนเอสปริมาณ 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร ให้ทำปฏิกิริยากับเคซีน ที่ละลายในไกลซีนไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 10.0 และให้ทำปฏิกิริยาโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส และหยุดปฏิกิริยาโดยใช้ 10 เปอร์เซ็นต์ TCA หลังจากทำปฏิกิริยาครบ 15 นาทีพอดี และนำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นแยกไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตรแล้วเทียบหาปริมาณไทโรซีนจากกราฟมาตรฐาน ได้ปริมาณไทโรซีนเป็นไมโครกรัม เมื่อใช้เอนไซม์ปริมาณต่างๆแสดงในตาราง 3.28 และรูป 3.21 จากผลการทดลองเอนไซม์โพรตีนเอสที่ปริมาณ 10 ไมโครลิตรสามารถเปลี่ยนสับสเตรทเคซีนเป็นไทโรซีนได้สูงสุดเมื่อเทียบกับปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เพราะเมื่อใช้ปริมาณเพิ่มขึ้นปริมาณไทโรซีนที่ได้เริ่มคงที่ เมื่อทำปฏิกิริยาที่พีเอช 10.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเวลา 15 นาที

ตาราง 3.28 ผลของปริมาณเอนไซม์ต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. licheniformis*

ปริมาณเอนไซม์ (ไมโครลิตร)	ไทโรซีน (ไมโครกรัม)
5	172.30
10	371.67
15	456.48
20	501.48
25	506.58



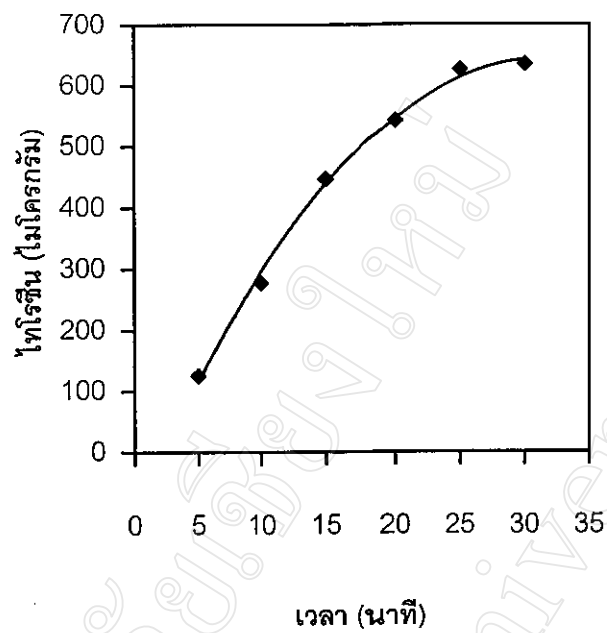
รูป 3.21 ผลของปริมาณเอนไซม์ต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *B. licheniformis*

3.7.5 ผลของความเข้มข้นยับยั้งสเตรตต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

การหาความเร็วเริ่มต้น (Initial velocity) ที่ยับยั้งสเตรตเป็นเคซีนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์จากการทดลอง หาได้จากค่าความชัน (slope) ของกราฟ ที่เป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มขึ้นของปริมาณสารผลิตภัณฑ์คือ ปริมาณของไทโรซีน (ไมโครกรัม) กับเวลาที่เพิ่มขึ้น ได้ผลดังตาราง 3.29 และรูป 3.22 จากรูป 3.22 ได้ค่าความชัน 6.993 เพราะฉะนั้นในการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์โปรติเอสกับเคซีนที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วในการเกิดเอนไซม์-ยับยั้งสเตรต (Enzyme-Substrate complex) เป็น 6.993 ไมโครกรัมต่อนาที และจากการทดลองใช้เคซีนที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 และ 1.6 เปอร์เซ็นต์ ได้ผลดังตาราง 3.30 แสดงความเข้มข้นของเคซีนกับความเร็วเริ่มต้น และนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ ได้ดังรูป 3.23 ความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาเริ่มคงที่ที่ความเข้มข้นของเคซีนเป็น 0.8 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ และเริ่มลดลงที่เคซีนเข้มข้น 1.6 เปอร์เซ็นต์ สามารถนำมาหาค่า Michaelis-Menten constant (K_m) และ ความเร็วสูงสุด (V_{max}) โดยสร้างเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $1/[S]$ กับ $1/V$ หรือเรียกว่า Lineweaver-burk Plot ดังรูป 3.24 ค่าที่จุดตัดแกน Y เป็น $1/V_{max}$ เพราะฉะนั้นความเร็วสูงสุด V_{max} เท่ากับ 39.06 ไมโครกรัมต่อนาที และค่าที่จุดตัดแกน X เป็น $-1/K_m$ เพราะฉะนั้นได้ค่า K_m เท่ากับ 0.144 เปอร์เซ็นต์ (การคำนวณแสดงในภาคผนวก)

ตาราง 3.29 ผลของเวลาต่อปริมาณไทโรซีนที่เพิ่มขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

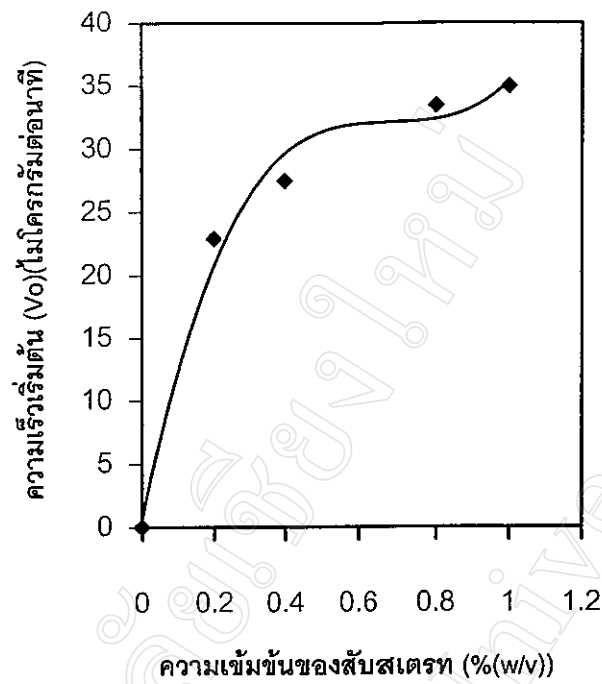
เวลา (นาที)	ไทโรซีน (ไมโครกรัม)
5	125.50
10	276.80
15	446.65
20	542.15
25	625.50
30	634.45



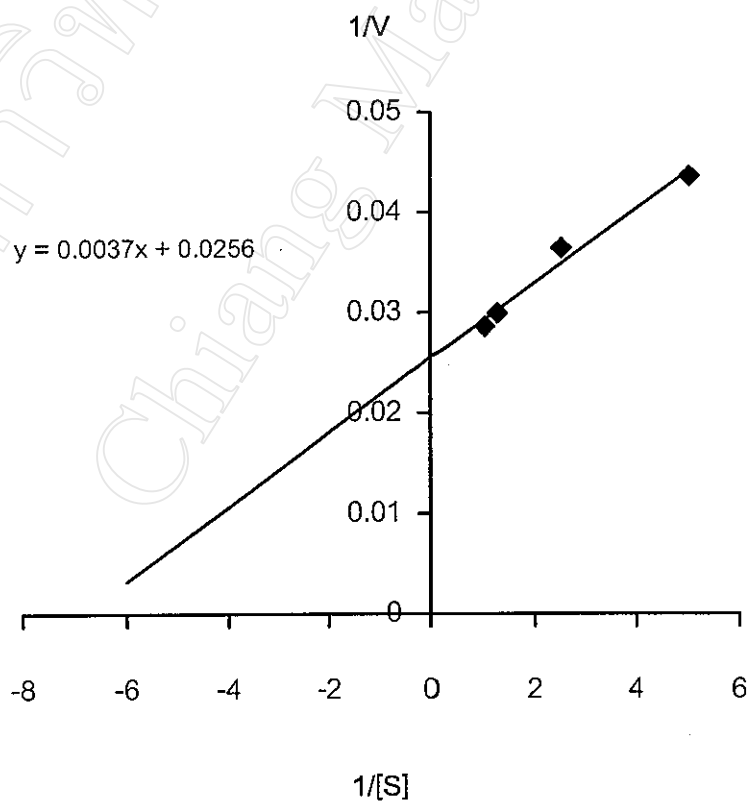
รูป 3.22 ผลของเวลาต่อปริมาณไทโรซีนที่เพิ่มขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

ตาราง 3.30 ผลของความเข้มข้นเคซีนต่อความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา

ความเข้มข้นของเคซีน ([S]) (% (w/v))	ความเร็วเริ่มต้น (Vo) (ไมโครกรัมต่อนาที)
0.2	22.89
0.4	27.47
0.8	33.44
1.0	34.96
1.6	32.05



รูป 3.23 ผลของความเข้มข้นเคซีนต่อความเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา



รูป 3.24 Lineweaver-Burk plot