

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 คุณสมบัติของแป้งและกากมัสตาร์ด

จากการศึกษาคุณสมบัติของแป้งมัสตาร์ดชนิด M1-M10 พบว่าแป้งมัสตาร์ดแต่ละชนิดมีปริมาณโปรตีนทั้งหมด (Total protein) อยู่ในช่วง 32-35 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นแป้งมัสตาร์ด M5 มีปริมาณโปรตีนมากที่สุด 42.53 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำแป้งมัสตาร์ดทั้ง 10 ชนิด มาเตรียมเป็นอาหารเหลว สูตร 1 ก (1% w/v) อาหารมัสตาร์ดชนิด M10 มีโปรตีนที่ละลายอยู่ (soluble protein) มากที่สุด และพบว่าจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรียและเชื้อราสามารถเจริญได้ในอาหารทั้ง 10 ชนิด แป้งมัสตาร์ดชนิด M1 M7 และ M10 ถูกเลือกนำมาศึกษาต่อเพราะคาดว่าจะมีคุณสมบัติของอาหารที่แตกต่างกัน ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของแป้งมัสตาร์ดทั้ง 3 ชนิด และกากมัสตาร์ดที่เตรียมครั้งใหม่พบว่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่วิเคราะห์โดยวิธี Kjehdal ในแป้งมัสตาร์ดทั้ง 3 ชนิด มีมากกว่าในกากมัสตาร์ด โดยมีมากที่สุดในแป้งมัสตาร์ด M10 ที่ 51.22 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ในกากมัสตาร์ดมี 33.16 เปอร์เซ็นต์ ในรายงานของ Yeoman (1992) พบว่ากากเรปซิดที่สกัดไขมันออกแล้วมีปริมาณโปรตีน 36.7 เปอร์เซ็นต์ แต่ในรายงานของ Gangurde (1995) และ Mustafa (1999) ปริมาณโปรตีนในกากมัสตาร์ดสูงถึง 40 และ 45.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในแป้งมัสตาร์ดทั้ง 3 ชนิด พบว่าต่างจากที่เตรียมได้ในครั้งแรก รวมทั้งต่างจากรายงานต่างๆ อาจเกี่ยวข้องกับกรรมวิธีการสกัดน้ำมัน ชนิดของเมล็ดพันธุ์ รวมทั้งการปนเปื้อนของเปลือกหุ้มเมล็ดในแต่ละครั้งมากน้อยต่างกัน⁽²³⁾ สำหรับในแป้งมัสตาร์ดพบว่ามีปริมาณเส้นใยน้อยกว่าในกากมัสตาร์ด 2-4 เท่า โดยที่เส้นใยที่พบมีปริมาณน้อยเนื่องมาจากในส่วนของน้ำมัสตาร์ดมีเปลือกหุ้มเมล็ดปนเปื้อนน้อย สำหรับปริมาณเถ้าที่เป็นตัวบ่งถึงปริมาณเกลือแร่ในอาหารพบว่ามากในแป้งมัสตาร์ดมีมากกว่ากากมัสตาร์ด 0.5-3 เท่า และปริมาณคาร์โบไฮเดรตมีค่าใกล้เคียงกันในแป้งมัสตาร์ดทั้ง 3 ชนิดประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ นอกจากองค์ประกอบทางเคมีที่กล่าวมา ในแป้งมัสตาร์ดยังไม่พบกลูโคซิโนเลต ซึ่งเป็นสารก่อให้เกิดความเป็นพิษในอาหารและสัตว์เลี้ยงถ้าได้รับในปริมาณมาก แต่สามารถพบได้ในกากมัสตาร์ด ดังนั้นแป้งมัสตาร์ดเหมาะที่จะนำมาเตรียมเป็นอาหารเพื่อการเจริญของจุลินทรีย์มากกว่ากากมัสตาร์ด

อาหารเพื่อการเจริญเติบโตและใช้ในกระบวนการหมักของจุลินทรีย์สามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภท คือ อาหารที่สังเคราะห์ขึ้น (synthetic medium) เป็นอาหารที่ทราบส่วนประกอบที่แน่

นอน วัตถุประสงค์เพื่อใช้ศึกษาด้านพันธุกรรมของเชื้อ สำหรับอาหารอีกประเภทคือ อาหารที่ไม่ทราบส่วนประกอบที่แน่นอน (Nonsynthetic medium หรือ crude medium) ใช้อย่างกว้างขวางในการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียทางการแพทย์ เช่น peptone, beef extract และเมื่อใช้ในระบบการหมักพบว่าอาหารที่เป็น crude medium เช่น soybean meal, molasses และ corn streep liquor พบว่าอาหารเหล่านี้มักจะให้ผลผลิตในระบบการหมักมากกว่าใช้อาหารที่สังเคราะห์ขึ้น⁽⁴³⁾ แป้งมัลต์อาร์ดจัดเป็นอาหารในกลุ่ม crude medium เหมาะที่จะนำมาเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อหรือประยุกต์เพื่อเตรียมเป็นอาหารสำเร็จรูปเพื่อใช้ในงานด้านจุลชีววิทยารวมทั้งใช้เป็นแหล่งอาหารในระบบการหมักเพื่อผลิตเอนไซม์ต่อไป

4.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งและกากมัลต์อาร์ด

จากการเตรียมอาหารมัลต์อาร์ด M1 M7 และ M10 สูตร 1ก แล้วนำไปทดสอบการเจริญของแบคทีเรีย *B.subtilis* พบว่าเชื้อเจริญได้ดีในอาหารมัลต์อาร์ด M1 ขณะที่แบคทีเรีย *E.coli* เจริญได้ดีในอาหารมัลต์อาร์ด M10 รองจากอาหาร Luria broth แสดงว่าอาหารแต่ละชนิดน่าจะมีคุณสมบัติเหมาะสมกับจุลินทรีย์ไม่เหมือนกัน เมื่อนำแป้งมัลต์อาร์ด ทั้ง 3 ชนิด มาเตรียมเป็นอาหารสูตร 1ข โดยเพิ่มปริมาณแป้งมัลต์อาร์ดที่นำมาเตรียมเป็น 4 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ลักษณะของอาหารเหลวและอาหารแข็งที่เตรียมได้มีสีเหลือง ชุ่ม ยกเว้นอาหารมัลต์อาร์ด M10 ได้อาหารที่ใส และสีใกล้เคียงกับอาหารสำเร็จรูป Nutrient agar (NA) และ Nutrient broth (NB) เมื่อนำมาศึกษาผลการเจริญของ *B. subtilis* ในอาหารเหล่านี้ เปรียบเทียบกับอาหารที่เพิ่ม 0.5 % (w/v) เปปไทน์ เพราะเปปไทน์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไป หรือ 1.0% (w/v) แอมโมเนียมคลอไรด์ (สูตร 2) พบว่าเชื้อเจริญได้ดีบนอาหารที่เพิ่มเปปไทน์ให้โคโลนีที่มีขนาดใหญ่กว่าเดิมถึง 2 เท่าเมื่อเทียบกับเมื่อเจริญบนอาหาร NA และมีขนาดโคโลนีรองลงมาเมื่อเจริญบนอาหารมัลต์อาร์ด (สูตร 1ข) แสดงว่าสารอาหารที่มีอยู่ในอาหารมัลต์อาร์ดสูตร 1ข มีคุณสมบัติเพียงพอต่อการเจริญของแบคทีเรีย แต่แอมโมเนียมคลอไรด์นอกจากเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารยังช่วยในการละลายของโปรตีนด้วย จึงพบว่าอาหารที่ได้มีความชุ่มน้อยลง แต่ทำให้อาหารมีสีเข้มขึ้น และการเจริญของเชื้อก็ให้ขนาดโคโลนีเล็กกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่เจริญบน NA สำหรับการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนขึ้นอยู่กับความสามารถของเชื้อว่าสามารถใช้สารประกอบไนโตรเจนในรูปแบบไหนได้ดีแต่ในแบคทีเรียจะใช้กรดอะมิโนได้ดีกว่าเกลือแอมโมเนียม แต่ในการทดลองของ Yeoman (1992) พบว่าเมื่อเพิ่ม 0.1 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมคลอไรด์ ในอาหารที่ได้จากการ

ละลายและต้มกากเรปซิดในน้ำกลั่นทำให้เชื้อเจริญได้ดี ดังนั้นอาหารมัสตาร์ด สูตร 1x (4% (w/v) ในน้ำกลั่น) น่าจะมีสารอาหารที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

จากการทดลองของ Yeoman (1992) และ Gangurde (1995) พบว่าโปรตีนในกากเรปซิด และกากมัสตาร์ดละลายได้ดีขึ้นในสภาวะที่เป็นเบส เมื่อละลายใน 0.1 มิลลิโมลาร์ไฮดรอกไซด์ และ 0.15 โมลาร์ ไฮดรอกไซด์ ตามลำดับ ดังนั้นในการทดลองหาความเข้มข้นของไฮดรอกไซด์ที่เหมาะสมในการละลายของโปรตีนในแป้งมัสตาร์ดและกากมัสตาร์ด พบว่าเมื่อใช้สารละลายไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ แทนน้ำกลั่นในการเตรียมอาหารมัสตาร์ด (สูตร 3) ทำให้มีปริมาณโปรตีนในอาหารเพิ่มขึ้นจากเดิม 4-15 เท่า แต่สีของอาหารที่ได้มีสีเข้มขึ้นจนเป็นสีน้ำตาล สีของอาหารอาจเนื่องมาจากสารประกอบฟีนอลิกในมัสตาร์ด⁽⁴⁶⁾ เมื่อนำอาหารมัสตาร์ด (สูตร 3) มาใช้ทดสอบการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆ พบว่าปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลทำให้เชื้อเจริญได้มากขึ้นตามไปด้วย แต่มีผลทำให้การผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ปริมาณมากขึ้น

ดังนั้นอาหารมัสตาร์ด M10 สูตร 1x เหมาะสมที่จะนำมาเตรียมเป็นอาหารแข็งเพื่อการเพาะเชื้อและใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย เพราะอาหารที่ได้มีลักษณะคล้ายอาหารแข็งที่เตรียมได้จากอาหารสำเร็จรูป NA รวมทั้งลักษณะโคโลนีของเชื้อที่เหมือนกันด้วยแต่ในอาหารมัสตาร์ดชนิด M1 M7 และ M10 พบว่าการเจริญของแบคทีเรียทำให้เกิดวงใสรอบโคโลนี (clear zone) เนื่องจากความชุ่มชื้นของอาหารแข็งที่เตรียมได้ ซึ่งจะไปรบกวนการอ่านลักษณะโคโลนีในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย สำหรับอาหารมัสตาร์ด สูตร 3 ให้อาหารที่มีปริมาณโปรตีนสูงเหมาะสำหรับนำไปเตรียมเป็นอาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส แต่ไม่เหมาะนำมาใช้ตามวัตถุประสงค์ข้างต้น เพราะอาหารที่ได้มีสีเข้มและชุ่ม

4.3 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส

จากตัวอย่างกากมัสตาร์ดทั้งหมด 49 ตัวอย่าง รอบจังหวัดลำพูนนำมาคัดเลือกเชื้อเบื้องต้น (primary screening) หาเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยรอบของโคโลนีของเชื้อจะเกิดเป็นวงใสล้อมรอบ (clear zone) เมื่อเจริญบนอาหารแข็งสกิมมิลค์ พบว่ามีทั้งหมด 44 isolates แต่เมื่อนำมาศึกษาลักษณะการย้อมติดสีแกรม การเรียงตัวเมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และลักษณะโคโลนีที่เหมือนกัน สามารถนำมาจัดเรียงใหม่ได้ทั้งหมด 20 isolates นำมาคัดเลือกต่อในขั้นที่สอง (secondary screening) โดยนำเชื้อทั้งหมดไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่ประกอบไปด้วย กลูโคส เปปโตน yeast extract แคลเซียมคลอไรด์และแมกนีเซียมซัลเฟต รวมทั้ง stab เชื้อลง

บนอาหารแข็งสกีมมิลค์และวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone รอบโคโลนีหลัง 24 ชั่วโมง พบว่า ความกว้างของ clear zone ที่วัดได้ไม่สัมพันธ์กับปริมาณโปรติเอสแอคติวิตีที่ผลิตได้จากการเลี้ยง ในอาหารเหลว ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ ขจีนาฏ (2542) และเชื้อที่สามารถ ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุดในอาหารเหลว (137.65 ยูนิต/มล.) คือ *Bacillus licheniformis* ใน อุตสาหกรรมการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพื่อนำไปใช้เป็นสารชักล้างใช้แบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* ⁽²⁾ และจากการทดลองของ Krishnan (1982) ใช้ *Bacillus licheniformis* เพื่อการ ผลิต alpha-amylase ในอาหารมัสตาร์ดเค้ก (mustard cake)

4.4 การผลิตเอนไซม์โปรติเอสในอาหารมัสตาร์ด

อาหารมัสตาร์ด สูตร 3 ให้ปริมาณโปรตีนมากกว่าอาหารมัสตาร์ด สูตร 1x 4-15 เท่า แต่ ปริมาณกลูโคสในอาหารทั้ง 2 ชนิด มีปริมาณใกล้เคียงกัน โดยที่ผลการเจริญของเชื้อ *B.licheniformis* ในอาหารทั้ง 2 ชนิด ให้ผลไม่แตกต่างกัน เนื่องจากการเจริญของแบคทีเรียใน อาหารที่มีทั้งกลูโคสและโปรตีน แบคทีเรียจะเลือกใช้อาหารที่อยู่ในรูปที่สามารถใช้ได้ทันที ในที่นี้ แบคทีเรียเลือกใช้กลูโคสก่อน ดังนั้นผลการเจริญของแบคทีเรียจึงขึ้นกับปริมาณกลูโคสในอาหาร ด้วย และเมื่อวิเคราะห์หาแอคติวิตีของเอนไซม์โปรติเอสในน้ำเลี้ยง พบว่าเชื้อ *B.licheniformis* สามารถผลิตโปรติเอสได้มากในอาหารที่มีปริมาณโปรตีนมาก คืออาหารมัสตาร์ด สูตร 3 ดังนั้น การเตรียมอาหารที่เหมาะสมจะนำไปใช้เป็นอาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส เป็นอาหารที่ได้จาก การละลายและต้มแป้งมัสตาร์ดในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในการ ทดลองของ Yeoman (1994) ได้ทำการเตรียมอาหารเพื่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากกากเรปซิด โดยไม่ปั่นแยกส่วนที่ไม่ละลายออก โดยให้เชื้อในกลุ่ม Actinomyces พบว่าปริมาณโปรติเอสที่ ผลิตได้ไม่แตกต่างกัน เมื่อเทียบกับอาหารที่เตรียมแบบไม่ปั่นแยกตะกอนออก แต่ในการทดลอง ครั้งนี้พบว่า *B.licheniformis* สามารถผลิตโปรติเอสได้มากในอาหารที่ไม่ได้ปั่นแยกส่วนที่มีตะกอน ออก ซึ่งโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำในอาหารบางส่วนอาจจะถูกย่อยได้โดยเอนไซม์ ในการทดลองของ Yeoman (1992 และ 1994) พบว่าการเจริญของ *Bacillus spp.* และ *S.thermovagalis* ใน อาหารที่เตรียมจากกากเรปซิด มีการเจริญแบบ Biphasic โดยเฟสแรกเป็นการใช้น้ำตาลกลูโคส และกรดอะมิโนเพื่อการเจริญเติบโต และในเฟสที่สองเป็นการย่อย (break down) บางส่วนของ โปรตีนจากเอนไซม์โปรติเอสที่หลั่งออกมา

จากผลการทดลองที่ 3.5.2 เชื้อ *B.licheniformis* สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส ได้มากที่สุด คือ 410.75 ยูนิต/มล. ในอาหารมัสตาร์ด M1 เมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 2%(w/v) รองลงมาคือ

อาหารมัสตาร์ด M10 ที่ความเข้มข้น 3%(w/v) ให้ 399.90 ยูนิต/มล. ในสภาวะที่ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 เมื่อพิจารณาควบคู่กับร้อยละของแป้งมัสตาร์ดที่เตรียมได้ จากน้ำมัสตาร์ด 100 มล. เตรียมเป็นแป้งมัสตาร์ด M1 ได้ 2.606 กรัม และเตรียมเป็นแป้งมัสตาร์ด M10 ได้ 5.075 กรัม ดังนั้นแป้งมัสตาร์ดที่เหมาะสมจะนำไปเตรียมเป็นอาหารเพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ปริมาณมาก คือ อาหารที่เตรียมจากแป้งมัสตาร์ด M10 เมื่อนำมาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสพบว่าในสภาวะที่พีเอชเริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้โปรติเอสแอกติวิตีสูงสุดเป็น 357.05 ยูนิต/มล. โปรติเอสแอกติวิตีจะลดลงเมื่อพีเอชที่เป็นเบส เช่น ที่พีเอช 10.0 มี relative activity เป็น 16.59 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองของ Razak (1994) พบว่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำให้การผลิตโปรติเอสได้สูงสุดสำหรับเชื้อ *B.stearothermophilus* คือ พีเอช 5.0 ให้แอกติวิตี 221 ยูนิต/มล.และจะลดลงเมื่อใช้พีเอชที่เป็นเบส รวมทั้งในการทดลองของ Sider และ Zuber (1977) ใช้พีเอชเริ่มต้นที่ 6.8 แต่การทดลองส่วนใหญ่พบว่าพีเอชที่เป็นเบสจะทำให้เชื้อ *Bacillus sp.* ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ปริมาณมากดังเช่น การทดลองของ Mehrotra (1999) ที่พีเอช 10.5 Fujiwara (1997) ที่พีเอช 10.2 และการทดลองของ Singh (2001) ที่พีเอช 10.0 สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตโปรติเอสคือที่ 32 องศาเซลเซียส ในการทดลองของ Fujiwara (1997) ใช้อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ในการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus sp.* เพื่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส แต่ในการทดลองของ Ferrero (1997) พบว่า *B.licheniformis* สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสที่พีเอช 9.0

4.5 สมบัติทั่วไปและสมบัติทางจุลนาสตร์ของเอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตโดยใช้อาหารมัสตาร์ด M10 ที่ความเข้มข้น 3%(w/v)ในสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์และไม้ปั่นแยกตะกอนออก (สูตร 4) ที่อาหารมีพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.0 และควบคุมอุณหภูมิที่ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้เอนไซม์โปรติเอสที่มีแอกติวิตี 465.60 ยูนิต/มล. เมื่อให้ทำปฏิกิริยาที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ดังนั้นนำมาทดสอบหาสภาวะที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุด พบว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ได้เมื่อทำงานที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสพีเอช 10.0 ให้แอกติวิตีเพิ่มขึ้นเป็น 1303.00 ยูนิต/มล. โดยที่พีเอช 11.0 แอกติวิตีของเอนไซม์ลดลงเหลือ 929.05 ยูนิต/มล.และเมื่อให้ทำงานที่พีเอช 10.0 และเพิ่มอุณหภูมิเป็น 50 องศาเซลเซียส ให้แอกติวิตีสูงขึ้นเป็น 2124.35 ยูนิต/มล. แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 60 องศาเซลเซียสแอกติวิตีของเอนไซม์ลดลงเหลือ 185.25 ยูนิต/มล. และทำงานให้แอกติวิตีได้ดีที่สุดภายใต้

ในเวลา 15 นาทีที่ปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยให้แอคติวิตีประมาณ 2400 ยูนิต/มล. เมื่อใช้สับสเตรทเป็น 1 เปอร์เซ็นต์ เคซีน

เมื่อศึกษาสมบัติทางจลนศาสตร์พบว่าความเร็วเริ่มต้น (V_0) ในการไฮโดรไลซ์เคซีนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ไปเป็นไทโรซีน ความเร็วในการเกิดเอนไซม์-สับสเตรท (Enzyme-Substrate complex) คือ 34.96 ไมโครกรัม/นาที โดยค่าความเร็วสูงสุด (V_{max}) เป็น 39.06 ไมโครกรัม/นาที สำหรับค่า Michaelis Menten constant (K_m) มีค่าเท่ากับ 0.144 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเมื่อให้สับสเตรทเคซีนที่ความเข้มข้น 0.144 เปอร์เซ็นต์ จะให้ค่าความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาเป็น $V_{max}/2$ คือ 19.53 ไมโครกรัม/นาที ถ้าเอนไซม์จับกับสารตั้งต้นได้ดี K_m จะมีค่าต่ำ ปฏิกิริยาก็จะเกิดได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่มีค่า K_m สูง เนื่องจากค่า K_m สูง Enzyme-Substrate complex (ES) ก็จะทำให้เกิดการสลายตัวไปเป็น เอนไซม์ และ สับสเตรท ได้มาก จึงทำให้เกิดผลิตภัณฑ์น้อย ในการทดลองของ Xiubao (1994) ศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสที่ทำให้บริสุทธิ์แล้ว จากเชื้อ *Bacillus pumilis* พบว่ามีค่า K_m เป็น 0.62 เปอร์เซ็นต์ และ V_{max} เป็น 50 ไมโครกรัม/นาที โดยใช้สับสเตรทเป็นเคซีน และในการทดลองของ Byun (1998) พบว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่ทำบริสุทธิ์แล้วมีค่า K_m เป็น 1.28 มิลลิกรัม/มล. โดยใช้สับสเตรทที่เป็นโปรตีนจากถั่วเหลือง (soy protein isolate substrate)

ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในอาหารมัสตาร์ดจากแบคทีเรียที่แยกได้ พบว่าทั้งส่วนที่เป็นกากมัสตาร์ดและแบ่งมัสตาร์ดสามารถนำมาเตรียมเป็นอาหารเพื่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้ แต่อาหารที่ให้ลักษณะทางกายภาพเหมือนอาหารสำเร็จรูป NA มากที่สุดคืออาหารมัสตาร์ดที่เตรียมได้จากแบ่งมัสตาร์ด M10 ละลายในน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (สูตร 2ข) เมื่อปรับปรุงวิธีการเตรียมอาหารมัสตาร์ดเพื่อให้มีปริมาณโปรตีนในอาหารสูงขึ้นเพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส พบว่าแบ่งมัสตาร์ดจะละลายได้ดีขึ้นเมื่อทำการเตรียมในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (สูตร 3) สำหรับแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่แยกได้ คือ *Bacillus licheniformis* เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารมัสตาร์ด M1 M7 M10 และกากมัสตาร์ด สูตร 3 และสูตร 4 (เหมือนสูตร 3 แต่ไม่แยกตะกอนออก) พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกมาได้ *B.licheniformis* เจริญและผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุดในอาหารมัสตาร์ด M10 สูตร 4 ที่ความเข้มข้น 3%(w/v) ในสภาวะที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และทำงานได้ดีที่พีเอช 10.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีสมบัติทางจลนศาสตร์ ให้ค่า K_m และ V_{max} เป็น 0.144 เปอร์เซ็นต์และ 39.06 ไมโครกรัม/นาที ตามลำดับ เมื่อใช้ 1 เปอร์เซ็นต์ เคซีนเป็นสับสเตรท