สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากถั่วเหลืองหมักชนิดต่างๆ

นางสาว มยุรฉัตร เอกธรรมกิจ
นางสาว สุจิตรา ยนต์สิงห์

เลขหมู่ 67306
เลขทะเบียน
วัน,เดือน,ปี 22 พ.ย. 2549

.b
.i

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The study of Protease extracted from some kind of fermented soybean

Mayurachat Akethammakij

Sujittra Yonsingh

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of

Bachelor of Science

Department of Applied Biology

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การศึกษาเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากถั่วเหลืองหมักชนิดต่างๆ
นักศึกษา	นางสาวมยุรฉัตร เอกธรรมกิจ รหัสประจำตัว 45050763
	นางสาวสุจิตรา ยนต์สิงห์ รหัสประจำตัว 45050786
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์คนึงกานต์ กลั่นบุศย์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง	[signature]
กรรมการ ผศ.ลินจง สุขลำภู	[signature]
กรรมการ อาจารย์คนึงกานต์ กลั่นบุศย์	[signature]

[signature]
....
(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)
หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การศึกษาเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากถั่วเหลืองหมักชนิดต่างๆ
นักศึกษา	นางสาวมยุรฉัตร เอกธรรมกิจ
	นางสาวสุจิตรา ยนต์สิงห์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา	2548
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์คนึงกานต์ กลั่นบุศย์

บทคัดย่อ

การศึกษาเอนไซม์โปรติเอสจากผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักชนิดต่าง ๆ ทำโดยคัดแยกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากถั่วเหลืองหมักที่ได้มาจากแหล่งต่าง ๆ ในกรุงเทพมหานคร, จ. สมุทรปราการ, จ. แพร่ และ จ. ลำปาง นำมาทำการศึกษาแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญในการหมัก คือ *Bacillus* spp. ได้ทั้งหมด 63 ไอโซเลตนำมาทดสอบทางชีวเคมีเพื่อคัดเลือกเฉพาะ *B. subtilis* โดยทดสอบ catalase test, Voges Proskauer test, anaerobic growth และ starch hydrolysis ปรากฏว่าแยก *B. subtilis* ได้ 6 ไอโซเลต จากนั้นนำมาทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอส โดยดูจากการสร้างวงใสในอาหารแข็ง skimmilk agar ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปรากฏว่า *B. subtilis* 2 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด โดยที่กิจกรรมของเอนไซม์แปรผันตามอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ ที่ 8-12 ชั่วโมง เป็นช่วงที่เชื้อเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (log phase) และมีการสร้างเอนไซม์ในช่วงนี้ จึงนำเอา crude enzyme มาศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์โดยวิธีของ Wang และ Hesseltine, 1965 พบว่า *B. subtilis* 2 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดที่ pH 9 โดยใช้ carbonate-bicarbonate buffer อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 65 องศาเซลเซียส แสดงว่า *B. subtilis* 2 นี้น่าจะเป็นชนิด alkaline protease และจากการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีความคงตัวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส หลังจาก 60 องศาเซลเซียสเอนไซม์จะเสียสภาพการทำงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	The study of Protease extracted from some kind of fermented soybean
Name	Miss Mayurachat Akethammakij Miss Sujittra Yonsingh
Department	Applied Biology
Program	Industrial Microbiology
Academic Year	2005
Special Project Advisor	Khanungkan Klanbut

Abstract

The study of enzyme protease from many kind of fermented soybean products by isolated bacteria (*Bacillus* spp.) which played important roles in fermented soybeans from Bangkok, Samuthprakan, Phrae and Nan province. Sixty three isolates were screened for *B.subtilis* by using biochemical tests (catalase test, Voges Proskauer test, anaerobic growth and starch hydrolysis). Six isolates of *B.subtilis* were obtained. Crude enzymes from *B.subtilis* were tested for there proteolytic activity on skimmilk agar at 37°C for 12 hours *B.subtilis* 2 gave the highest proteolytic activity. The proteolytic activity was found to be depending on the bacterial growth rate at 8-12 hours (log phase). According to Wang and Hesselltine method, proteolytic enzyme of *B.subtilis* 2 had optimum pH at 9 with carbonate-bicarbonate buffer and optimum temperature at 65°C therefore *B.subtilis* 2 is mostly should be a kind of alkaline protease. The protease was stable at 60°C after that it will unstable.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำงานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเพราะได้ความอนุเคราะห์จากอาจารย์ คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ ผู้เป็นอาจารย์ซึ่งได้ให้คำปรึกษาแนะนำทุกๆเรื่องกับผู้วิจัยตลอดมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่านและขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง และ ผศ.ลินจง สุขลำภู ที่กรุณาให้คำแนะนำรวมทั้งตรวจแก้ไขข้อผิดพลาดและให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์โดยเฉพาะพี่เอกภพ พี่ประสิทธิ์ และพี่วิทยา ที่ให้ความสะดวกในการทำวิจัยและให้ความสะดวกด้านอุปกรณ์และสารเคมี พี่ๆปริญญาโทโดยเฉพาะพี่เอสที่ให้ทั้งคำปรึกษาและความช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดมา

ขอบคุณ ธนวัฒน์ จูเภา ที่คอยสนับสนุนทุก ๆ ด้าน และ เพื่อนๆทุกคนโดยเฉพาะกิ๊ป ตอย แอม หยก เทอด ที่คอยเป็นกำลังใจให้และช่วยเหลือในทุกเมื่อที่ต้องการความช่วยเหลือ รวมทั้งผู้มีอุปการคุณที่มิอาจกล่าวนามได้ครบถ้วน ณ ที่นี้ ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา พี่สาว พี่ชาย ที่ได้สนับสนุนทุนการศึกษา อุปกรณ์การศึกษา เคียงข้างและเป็นกำลังใจให้ในเวลาที่ต้องการเสมอมา

มยุรฉัตร เอกธรรมกิจ

สุจิตรา ยนต์สิงห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	20
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	26
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	43
เอกสารอ้างอิง	45
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	48
ภาคผนวก ข การทดสอบทางชีวเคมี	50
ภาคผนวก ค การเตรียมสารเคมีและบัฟเฟอร์	53
ภาคผนวก ง Wang และ Hesseltine method	56
ภาคผนวก จ ผลการทดลอง	61
ภาคผนวก ฉ รูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ *B. subtilis* 2	65
ประวัติผู้เขียน	67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

1 ส่วนประกอบโดยประมาณของถั่วเหลืองและส่วนของถั่วเหลือง(โดยน้ำหนักแห้ง) 5
2 แสดงกลุ่มของโปรติโอไลติกเอนไซม์ 15
3 แบคทีเรียที่สร้างสปอร์และแหล่งตัวอย่าง 25
4 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ 30
5 แสดงอัตราส่วนของสารละลายมาตรฐานไทโรซีนและน้ำกลั่น 55
6 แสดงผลการวัดค่า OD ที่ 750 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานไทโรซีน 57
7 แสดงวิธีการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของ Wang และ Hesseltine, 1965 57
8 แสดงค่าขนาดวงใสของเชื้อทุกหมายเลขไอโซเลตที่เป็น *B. subtilis* บน skimmilk agar 58
9 แสดงค่าขนาดของวงใสยกกำลังสองของเชื้อทุกหมายเลขไอโซเลตที่เป็น *B. subtilis* 61
10 แสดงค่าขนาดวงใสของ *B.subtilis* strain 2 ที่ชั่วโมงต่าง ๆ 62
11 แสดงค่าความขุ่น OD ที่ 660 นาโนเมตร ของเซลล์ *B.subtilis* 2 ที่เวลาต่าง ๆ กัน 62
12 แสดงผลการวัดค่า OD ที่ 750 นาโนเมตร เมื่อทำการทดลองที่ pH ต่าง ๆ กัน 63
13 แสดงผลการวัดค่า OD ที่ 750 นาโนเมตร เมื่อทำการทดลองที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน 63
14 แสดงผลการวัดค่า OD ที่ 750 นาโนเมตร เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน 64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่

1 แสดงลักษณะของถั่วเน่าแบบสด และแบบแคป 9

2 แสดงลักษณะของผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวชนิดต่าง ๆ 10

3 แสดงลักษณะของเต้าหู้ยี้ 13

4 แสดงลักษณะของเชื้อ *Bacillus subtilis* 14

5 กราฟแสดงเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสบน skimmilk agar ของ *B. subtilis* แต่ละไอโซเลต 38

6 กราฟแสดงเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสบน skimmilk agar กำลังสองของ *B. subtilis* แต่ละไอโซเลต 38

7 กราฟแสดงการเติบโตและความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ B. subtilis 2 39

8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH ต่าง ๆของบัฟเฟอร์และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส จาก *B. subtilis* 2 40

9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส จาก *B. subtilis* 2 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง 41

10 กราฟแสดงความสำพันธ์ระหว่างเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ที่เวลาต่าง ๆ กัน และกิจกรรมของ เอนไซม์โปรติเอส จาก *B. subtilis* 2 เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง 42

11 แสดงการมี acetyl-methylcarbinol อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 52

12 กราฟมาตรฐานไทโรซีน 58

13 แสดงลักษณะเซลล์ของ *B. subtilis* 2 ที่ชั่วโมงที่ 8 65

14 แสดงลักษณะเซลล์ของ *B. subtilis* 2 ที่ชั่วโมงที่ 16 65

15 แสดงลักษณะสปอร์ของ *B. subtilis* 2 ที่ชั่วโมงที่ 24 66

16 แสดงผลการทดลองที่เป็นบวก และลบ ในการทดสอบ Hydrolysis of starch 66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

proteolytic enzyme เป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่สุดในกลุ่มของเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และยังใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท ได้แก่

1. อุตสาหกรรมเนยแข็ง	4. อุตสาหกรรมธัญพืช
2. อุตสาหกรรมเบียร์	5. อุตสาหกรรมฟอกหนัง
3. อุตสาหกรรมเนื้อ	6. อุตสาหกรรมผงซักฟอก

เอนไซม์โปรติเอส เป็น proteolytic enzyme ชนิดหนึ่งซึ่งจากการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย ทำให้เราได้ทราบว่าเชื้อราและเชื้อแบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส เอนไซม์โปรติเอส แบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท คือ

1. โปรติเอสเป็นกรด
2. โปรติเอสเป็นด่าง
3. โปรติเอสเป็นกลาง

โดยที่โปรติเอสทั้ง 3 ประเภทนี้มีประโยชน์ที่ใช้ในทางอุตสาหกรรมแตกต่างกันไป คือ โปรติเอสเป็นกรดใช้แทนเอนไซม์เรนเนตที่ได้จากลูกวัวในการผลิตเนยแข็ง โปรติเอสเป็นด่างใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอกและอุตสาหกรรมหนังสัตว์ และสุดท้ายโปรติเอสเป็นกลางใช้ในการทำเบียร์

นอกจากประโยชน์ที่ใช้ในด้านอุตสาหกรรมแล้ว ประโยชน์ที่ได้ที่มีความความสำคัญไม่แพ้กันคือทางด้านอาหารและโภชนาการ ดังที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่า เอนไซม์โปรติเอสสามารถสกัดได้จากพืชและโดยเฉพาะธัญพืชประเภทถั่วเหลืองซึ่งมีโปรตีนเป็นสารอาหารหลักที่มีคุณค่าทางด้านโภชนาการสูงและมีราคาถูก สามารถหาได้ง่ายจะเห็นได้จากที่ชาวเอเชียใช้ถั่วเหลืองเป็นอาหารมานับพันๆปี อย่างเช่น เต้าหู้ที่ผลิตโดยชาวจีน นัตโตของชาวญี่ปุ่น เทมเป้ของชาวอินโดนีเซีย และถั่วเน่าทางภาคเหนือของประเทศไทย

ด้วยเหตุนี้อาหารหมักประเภทถั่วเหลืองจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะนำมาศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งอาจสามารถดัดแปลงและพัฒนาถั่วเหลืองให้ใช้ประโยชน์ได้หลากหลายขึ้น อย่างเช่นการเปลี่ยนถั่วเหลืองเป็นอาหารสัตว์แล้วจึงบริโภคเนื้อสัตว์ในรูปผลิตภัณฑ์สัตว์ หรือหากในอนาคตเมื่อต้นทุนการผลิตสัตว์สูงขึ้น เราอาจค้นคว้าวิจัยดัดแปลงผลิตภัณฑ์ประเภทถั่วเหลืองให้อยู่ในรูปที่ยอมรับในการบริโภคได้ดีขึ้นกว่าที่มีอยู่ในปัจจุบัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อคัดแยกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ได้จากอาหารหมักประเภทถั่วเหลืองชนิดต่างๆ

2. เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

3. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากจุลินทรีย์ที่แยกได้จากอาหารหมักประเภท ถั่วเหลืองชนิดต่างๆ

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ทำการคัดแยกเชื้อจากอาหารหมักประเภทถั่วเหลืองชนิดต่างๆ แล้วจึงนำไปตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมีของเชื้อเพื่อคัดเลือกเฉพาะ *Bacillus subtilis* จากนั้นจึงทำการคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงที่สุด โดยตรวจขนาดของวงใสบน skimmilk agar เลือกมาเพียงไอโซเลตเดียว แล้วทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลตนั้นในอาหาร NB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกชั่วโมงที่เชื้อสร้างเอนไซม์ได้สูงที่สุด เพื่อสกัด crude enzyme เพื่อทดลองในขั้นต่อไป ในขณะเดียวกันก็วัดการเจริญเติบโตของเชื้อควบคู่กันไปด้วย และขั้นตอนสุดท้าย คือการหาสภาวะที่เหมาะสมต่างๆต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถคัดแยกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากอาหารหมักประเภทถั่วเหลืองชนิดต่างๆ

2. สามารถคัดเลือกเชื้อที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงที่สุด

3. ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมต่างๆต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 ขั้นตอนในการทำโครงงานพิเศษ

ขั้นที่1 คัดแยกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากอาหารหมักประเภทถั่วเหลืองชนิดต่างๆ โดยคัดเลือกเฉพาะเชื้อในสกุล *Bacillus* spp.

ขั้นที่2 ทำการตรวจสอบเชื้อทางสัณฐานวิทยา และตรวจสอบทางชีวเคมี เพื่อคัดเลือกเฉพาะไอโซเลตที่เป็น *B. subtilis*

ขั้นที่3 ทำการคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้สูงที่สุด โดยตรวจขนาดของวงใสบน skimmilk agar เลือกมาเพียงไอโซเลตเดียว

ขั้นที่4 ทำการเพาะเลี้ยงไอโซเลตนั้นในอาหาร NB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกชั่วโมงที่เชื้อสร้างเอนไซม์ได้สูงที่สุด เพื่อสกัด crude enzyme

ขั้นที่5 หาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสมากที่สุด คือ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงาน, อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน และ ความเสถียรของเอนไซม์

ขั้นที่6 วิเคราะห์ข้อมูล สรุป และจัดทำรายงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

จากนโยบายอาหารและโภชนาการแห่งชาติจัดทำโดยคณะกรรมการวางแผนงานและโภชนาการสำนักงานคณะกรรมการวางแผนพัฒนาเศรษฐกิจสังคมแห่งชาติ ได้ชี้ให้เห็นว่าโรคขาดสารอาหารที่รุนแรง และเป็นปัญหามากที่สุดคือโรคขาดโปรตีน และ แคลอรี่ในทารก เด็กก่อนวัยเรียน เด็กวัยเรียน หญิงมีครรภ์และแม่ลูกอ่อน โดยขาดโปรตีนและแคลอรี่ในเด็กก่อนวัยเรียนมีร้อยละ 40-60 แตกต่างตามภูมิภาคต่าง ๆ แต่พบมากที่สุดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เด็กวัยเรียน 6-14 ปี ก็มีการขาดแคลนโปรตีนและแคลอรี่เป็นอย่างมากเช่นกัน ประมาณร้อยละ 40-50 ของเด็กวัยนี้ในภูมิภาคต่าง ๆ ทำให้เด็กไม่เจริญเติบโต ขนาดตัวเล็ก เด็กจะมีลักษณะหงอยเรียนหนังสือไม่ดีสุขภาพไม่ดีทำให้การลงทุนทางการศึกษาสูญเปล่า

ถั่วเหลืองมีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมอาหารประเภทโปรตีนและแคลอรี่ในประเทศที่กำลังพัฒนา เนื่องจากผลิตภายในประเทศได้เองมีปริมาณโปรตีนและแคลอรี่สูง ราคาต่ำกว่าอาหารโปรตีนประเภทเนื้อสัตว์ นอกจากนี้ยังมีวิตามินหลายชนิด ดังนั้นจึงเหมาะแก่การแก้ปัญหาทุพโภชนาการ

ถั่วเหลืองหมักเป็นที่นิยมเนื่องมาจากการหมักถั่วเหลืองโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์นั้นจะช่วยปรับปรุงส่วนประกอบที่ย่อยยากให้อยู่ในรูปที่ย่อยง่ายและเป็นประโยชน์มากขึ้นอีกทั้งยังช่วยทำลายสารพิษที่มีอยู่ในเมล็ดถั่วเหลือง

การหมักถั่วเหลืองเป็นการแปรรูปถั่วเหลืองเพื่อใช้ในการบริโภคและสามารถเก็บไว้ได้นาน เช่น ญี่ปุ่น จีน เกาหลี นิยมใช้ถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบในการหมักโดยใช้จุลินทรีย์ ผลิตภัณฑ์ที่รู้จักกันดี คือซีอิ๊ว มิโส เต้าเจี้ยว เต้าหู้ยี้ นัตโต และที่เป็นถั่วหมักแบบพื้นบ้านเช่น kinema ในประเทศอินเดีย schidouchi ในประเทศจีน แดดดาวาและ iru ในอัฟริกาตะวันตก ส่วนในประเทศไทย โดยเฉพาะภาคเหนือตอนบนจะนิยมบริโภคอาหารหมักถั่วเหลืองที่เรียกกันว่าถั่วเน่าแต่ยังไม่ค่อยนิยมแพร่หลายนักเนื่องจากการผลิตแบบพื้นบ้านกระบวนการหมักเกิด จากเชื้อผสม ดังนั้นการศึกษาการหมักของถั่วเน่าตลอดจนการคัด เลือกพันธุ์และการพัฒนา กระบวนการหมักจะนำมาซึ่งผลิตภัณฑ์ที่สามารถนำมาเป็นประโยชน์ทางโภชนาการและการเกษตรรวมทั้งเน้นหนักในการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในขบวนการหมัก

ถั่วเหลือง (*Glycine Max (L) Merrill*) ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในตระกูลถั่ว Leguminosae, subfamily Papilonoideae อันเป็นที่รู้จักกันดีโดยเฉพาะเป็นพืชดั้งเดิมในภูมิภาคเอเชีย เช่น จีน เกาหลี ญี่ปุ่น ตลอดจนของไทยเรา โดยได้มีการเพาะปลูกและนำมาใช้บริโภคเป็นอาหารพื้นเมืองนานาชนิด ถั่ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหลืองต้มแล้วหมักโดย *Bacillus* sp. จัดเป็นอาหารหมักชนิด อัลคาไลน์ โปรติโอไลติก ใช้สำหรับเติมเพื่อเพิ่มรสชาติในน้ำซุบหรือแกง อาหารหมักกลุ่มนี้ได้แก่ ถั่วเน่าของไทย ไคนีมาของเนปาล หรือแดดดาวาของไนจีเรีย ถั่วเหลืองของไทยที่มีปลูกกันในภาคต่าง ๆ เช่น ภาคเหนือและภาคกลางตอนบน ส่วนใหญ่เป็นพันธุ์ที่ได้รับการส่งเสริมจากหน่วยงานทดลองของทางราชการแล้วเช่น พันธุ์ ส.จ.1, ส.จ.2, ส.จ.4 และ ส.จ.5 เป็นต้น (ส.จ. ย่อมาจากสถานีกสิกรรมแม่โจ้จังหวัดเชียงใหม่)

ลักษณะของถั่วเหลือง เมล็ดมีน้ำหนักประมาณ 0.10-0.20 กรัม สีของเปลือกมีอยู่หลายชนิด แต่ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมทั่วไปมีสีเหลือง จมูกของถั่วเหลืองเปลือกเหลืองส่วนใหญ่มีสีน้ำตาล บางพันธุ์จมูกเป็นสีขาว ใบเลี้ยง (*cotyledons*) 2 ใบ อยู่ภายใต้เปลือกมีสีเหลืองและสีเขียว ถั่วเหลืองที่ปลูกจะมีอายุเก็บเกี่ยวในช่วง 90-100 วัน ซึ่งแล้วแต่พันธุ์และสภาพแวดล้อมที่เพาะปลูก

สายพันธุ์ของถั่วเหลืองและคุณค่าทางโภชนาการ

เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าเมล็ดถั่วเหลืองเป็นแหล่งของโปรตีนและไขมันจากพืชที่มีมากที่สุดแหล่งหนึ่ง ปริมาณโดยประมาณของสารอาหารดังแสดงในตาราง 1 พบว่าในเนื้อถั่วเหลืองซึ่งเป็นส่วนของใบเลี้ยงมีปริมาณโปรตีนและไขมันรวมกันอยู่ในราว 60% ของน้ำหนักถั่วทั้งหมด และ 30% เป็นพวกคาร์โบไฮเดรต ซึ่งรวมถึงน้ำตาลที่มีขนาดโมเลกุลต่าง ๆ มีประมาณ 3.8% raffinose มีประมาณ 1.1% และซูโครสมีประมาณ 5.0% ส่วนที่เหลือเป็นคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่น ๆ นอกจากนี้ยังมีสารอาหารประเภท ฟอสฟาทิเดส, สเตอรอลแอช ซึ่งจัดเป็นพวกแร่ธาตุ และวิตามิน เป็นต้น

จากการสุ่มวิเคราะห์ถั่วเหลืองที่ปลูกตามแหล่งต่าง ๆ ของไทยพบว่า ปริมาณโปรตีนและไขมันมีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก ปริมาณของไขมันตามแหล่งปลูกต่าง ๆ พบว่าพันธุ์ ส.จ.2 ให้ปริมาณของไขมัน สูงกว่าพันธุ์ ส.จ.4 ส่วนในด้านของโปรตีนพบว่า พันธุ์ที่ให้โปรตีนสูงของไทยเป็นพันธุ์ ส.จ.4 ให้โปรตีนสูงถึง 44.6-48.7 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งนับว่าเป็นพันธุ์ที่เหมาะสมในการนำไปใช้เป็นอาหาร ส่วนพันธุ์ที่มีไขมันสูงคือ ส.จ.2 ให้ไขมันอยู่ในช่วง 23.3-24.8 เปอร์เซ็นต์ เป็นพันธุ์ที่เหมาะสมในการใช้ในอุตสาหกรรมสกัดน้ำมันพืช (สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร, 2527)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบโดยประมาณของถั่วเหลืองและส่วนของถั่วเหลือง (โดยน้ำหนักแห้ง) (สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร, 2527)

ถั่วเหลืองและส่วนของถั่วเหลือง	โปรตีน	ไขมัน	คาร์โบไฮเดรต	เถ้า
ถั่วเหลืองทั้งหมด	40	21	34	4.9
ใบเลี้ยง	43	23	29	5.0
เปลือกถั่ว	8.8	1	86	4.3
ยอดอ่อน	41	11	43	4.4

โปรตีนจากถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองมีปริมาณโปรตีนเป็นส่วนประกอบในปริมาณสูงเมื่อคิดเปรียบเทียบทางด้านน้ำหนักกับอาหารประเภทอื่น ๆ เช่น เทียบกับเนื้อสัตว์มีปริมาณสูงกว่า 2 เท่า เทียบกับไข่ไก่และข้าวสาลีมีปริมาณสูงกว่า 4 เท่า โปรตีนในถั่วเหลืองมีคุณค่าทางอาหารของกรดอะมิโนสูง โปรตีนในถั่วเหลืองจะถูกสะสมในเซลล์ของเนื้อถั่วเหลืองเรียกว่า proteinbodies หรือ storageproteins

ไขมันจากถั่วเหลือง

ไขมันเป็นส่วนประกอบที่มีปริมาณรองลงมาจากโปรตีน การสะสมปริมาณของไขมันในถั่วเหลือง และปริมาณด้านส่วนประกอบของกรดไขมันในไขมันถั่วเหลือง เป็นผลมาจากคุณสมบัติของพันธุ์ถั่วเหลืองนั้น ๆ สภาพแวดล้อมในช่วงของการสะสมไขมันในเมล็ดโดยเฉลี่ยแล้วถั่วเหลืองของไทยจะมีไขมัน 16-18 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าปีใดฝนแล้งและถั่วเหลืองไม่เจริญงอกงามก็จะมีปริมาณของไขมันลดลงเหลือ 14-15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อเทียบกับถั่วเหลืองของสหรัฐอเมริกามีไขมัน 18-20 เปอร์เซ็นต์

ปริมาณของกรดไขมันที่พบ ถั่วเหลืองจะประกอบด้วยไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว และมักจะมีอัตราส่วนค่อนข้างคงที่ คือประมาณ 15 ต่อ 85 ในกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวนี้พบว่า มีไขมันชนิดที่ดีและมีประโยชน์ต่อการบริโภค (essential fatty acids) มีอยู่ในปริมาณค่อนข้างสูง คือ 30-40 เปอร์เซ็นต์ ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว โดยเฉพาะเป็นพวก linoleic acid และ linolenic acid เป็นต้น ในส่วนของไขมันไม่อิ่มตัวซึ่งมีสูงถึง 85 เปอร์เซ็นต์ โดยประมาณนั้นก็จะประกอบไปด้วยกรดไขมันที่มีคาร์บอนจำนวน 18 ตัวอยู่ และมีจำนวนของ Double bond อยู่มากจึงมีผลต่อการเกิดการออกซิเดชันได้ง่ายอันจะยังให้เกิดผลิตภัณฑ์ในลักษณะที่มีกลิ่นเหม็นหืน หรือ rancid ดังที่เราพบกันอยู่ทั่วไป จากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นนี้จึงนำมาใช้ในการควบคุมเพื่อป้องกันในช่วงของการเก็บถั่วเหลืองในรูปของเมล็ด หรือน้ำมันถั่วเหลือง หรือแม้กระทั่งผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง โดยที่ต้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กำหนดอุณหภูมิในการเก็บ

นอกจากนี้ถั่วเหลืองยังประกอบไปด้วยสารที่เรียกว่า phospholipid หรือ phosphatides ซึ่งเป็นสารไขมันที่มีไนโตรเจนและ ฟอสฟอรัสเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย

คาร์โบไฮเดรตในถั่วเหลือง

สารคาร์โบไฮเดรตที่พบในถั่วเหลืองอาจแบ่งเป็น 2 ประเภทคือ

1. คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ (water soluble carbohydrates) ส่วนใหญ่ก็จะได้แก่น้ำตาลต่าง ๆ เช่น disaccharide ได้แก่ sucrose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) Trisac charide ได้แก่ raffinose ($C_{18}H_{32}O_{16}$) tetrasaccharide ได้แก่ stachyose ($C_{24}H_{42}O_{21}$)

2. คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ละลายน้ำ (water insoluble car bohydrate) คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ละลาย น้ำอยู่ในใบเลี้ยงได้แก่ Arabinan, Arabinogalactan และอาจรวมถึงสารในกลุ่ม pectic

เถ้าและแร่ธาตุในถั่วเหลือง

แร่ธาตุส่วนใหญ่ที่พบเป็นประเภท โปแตสเซียม ฟอสฟอรัส แมกเนเซียม แคลเซียม โซเดียม และซัลเฟอร์ เป็นต้น

ปริมาณของธาตุแต่ละตัวมีโดยประมาณดังนี้

โปแตสเซียม	1.83%
ฟอสฟอรัส	0.78%
แมกเนเซียม	0.31%
แคลเซียม	0.24%
โซเดียม	0.24%
ซัลเฟอร์	0.24%

ส่วนแร่ธาตุอื่น ๆ ที่พบอยู่ในปริมาณที่น้อยมากได้แก่ คลอไรด์ โบรอน แมงกานิส เหล็ก ทองแดง แบเรียม และสังกะสี

วิตามิน

ถั่วเหลืองเป็นแหล่งวิตามินบีรวมค่อนข้างสูง เช่น thiamine, riboflavin, และ nicotinic acid ในส่วนของวิตามินที่ละลายได้ใน ไขมัน พบว่ามีปริมาณ b-carotene ในเมล็ดถั่วเหลืองอยู่ 2-7 ไมโครกรัมต่อกรัม ส่วนวิตามินอีพบว่ามีในน้ำนมถั่วเหลืองในปริมาณ 1.4 ไมโครกรัมต่อกรัม

ส่วนประกอบย่อยของสารอินทรีย์อื่นๆ

- phenolic acid สารนี้พบในพืชทั่วไปและปริมาณไม่มากนัก บทบาทของสารนี้คือ เป็นสารร่วมที่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกลิ่นในแป้งถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองอื่นๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- สารให้กลิ่นอื่น ๆ ส่วนใหญ่แล้วจะเกี่ยวข้องกับสารให้กลิ่นในถั่วเหลือง สารให้กลิ่นเฉพาะถั่วเหลือง คือ 1- ออกทีน-3-ออล

การหมักและการเปลี่ยนแปลงคุณค่าทางโภชนาการของถั่วเหลือง

กรรมวิธีในการหมัก นอกจากจะเป็นประเพณีดั้งเดิมสืบทอดกันมานานหลายชั่วอายุคนแล้ว และยังค้นพบว่า จุลินทรีย์ในการหมักถั่วเหลืองจะช่วยปรับปรุงองค์ประกอบที่ย่อยได้ยากให้อยู่ในรูปที่ย่อยได้ง่ายและเป็นประโยชน์มากขึ้น อีกทั้งยังช่วยทำลายสารพิษที่มีอยู่ในเมล็ดถั่วเหลืองให้สลายไป โดยเฉพาะอย่างยิ่งช่วยกำจัดกลิ่นถั่วซึ่งมักเป็นที่รังเกียจของผู้ที่ไม่คุ้นเคยกับกลิ่นถั่วเหลืองให้หมดไป ซึ่งเมื่อทำการหมักถั่วจะได้สารประกอบจำพวกเอสเตอร์เป็นส่วนมาก เช่น ethyl, isobutyl และ isoamyl ester ของ isobutyric, a-methylbutyric, isovaleric, tiglic acids ซึ่งเกิดจากการสลายตัว และการหมักของโปรตีน กลีเซอร์ไรด์ และกรดไขมันในถั่วเหลือง นอกจากนี้ยังมีสารที่มีส่วนในกลิ่นหอมฉุน เช่น 2-เฮปทาโนน ไพราซีน และเบนซาลดีไฮด์ โดยไพราซีนจะเกิดขึ้นจากการต้มถั่วให้สุกก่อน นำไปหมัก ในขณะที่สาร 1-ออกทีน-3-ออล มีปริมาณลดลง ปริมาณกรดอะมิโนของถั่วเหลืองหรือถั่วเน่าของภาคเหนือของไทยตั้งแต่เริ่มกระบวนการหมักจนสิ้นสุดการหมัก

ถั่วเน่า (สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร, 2527)

ถั่วเน่าเป็นอาหารหมักพื้นบ้านทางภาคเหนือของไทยที่ได้จากการหมักถั่วเหลืองนิยมใช้เป็นเครื่องปรุงรสอาหารและใช้บริโภคโดยตรง โดยชาวบ้านผลิตขึ้นเพื่อใช้เป็นเครื่องปรุงรสอาหาร (seasoning reagent) แทนกะปิ ใช้เติมลงในแกงผักต่างๆ หรือใช้ถั่วเน่าบริโภคโดยตรง ถั่วเน่าเป็นอาหารหมักมีลักษณะคล้ายกับ นัตโต (natto) ซึ่งเป็นถั่วเน่าของชาวญี่ปุ่น ที่ให้คุณค่าทางโภชนาการสูงประเภทหนึ่ง รวมทั้งแบคทีเรียที่พบก็เป็นชนิดเดียวกันคือ *Bacillus subtilis* โดยแบคทีเรียดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมัก กล่าวคือ ผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย (proteolytic enzymes) เพื่อย่อยสลายสารอาหารชนิดต่างๆในถั่วเหลืองให้มีลักษณะที่ดีหลายประการ ได้แก่ 1) เกิดกลิ่นรสที่ดี 2) ย่อยสลายโครงสร้างที่ไม่พึงประสงค์ 3) ช่วยเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ให้นานขึ้น 4) เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ และ 5) เพิ่มความสามารถในการย่อยสลายสารอาหารและการละลายช่วยให้ร่างกายดูดซึมเอาไปใช้ได้ง่ายขึ้น

การเกิดลักษณะที่ดีในถั่วเหลืองที่ผ่านการหมักจะทำให้ผู้บริโภคได้รับประโยชน์จากถั่วเหลืองมากที่สุดโดยเฉพาะประโยชน์ด้านคุณค่าทางโภชนาการทั้งนี้เนื่องจากการหมักจะช่วยทำลายโครงสร้างของสารที่ยับยั้งการทำงานของทริปซิน (trypsin inhibitor) จึงทำให้ร่างกายย่อยสลายโปรตีนในถั่วเหลืองได้มากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหมักถั่วเน่าตามวิธีพื้นบ้านมีขั้นตอนต่างๆดังนี้

1. ล้างถั่วเหลืองด้วยน้ำสะอาดเพื่อกำจัดสิ่งสกปรก

2. ต้มถั่วเหลืองประมาณ 3-4 ชั่วโมง ขณะต้มต้องคอยเติมน้ำให้ระดับน้ำท่วมเมล็ดถั่วเสมอ โดยให้มีอัตราส่วน ถั่ว 1 ลิตรต่อน้ำ 2 ลิตร

3. หลังจากต้มแล้วผึ่งให้แห้ง

4. ทำการหมักโดยการเตรียมตะกร้ารองด้วยใบตองแล้วนำถั่วเหลืองวางบนใบตอง ปิดทับด้วยใบตองอีกชั้นหนึ่ง เพื่อป้องกันการสูญเสียความชื้นและป้องกันการแปดเปื้อนจากเชื้อรา

5. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2-3 วัน จะได้ถั่วเน่า

นำถั่วเน่าไปบดแล้วเติมเกลือ หรือพริกแดง ขิง แล้วห่อด้วยใบตอง นำไปนึ่งหรือย่างก่อนรับประทาน วิธีนี้จะสามารถเก็บรักษาถั่วเน่าได้นาน 2 วันหรือถ้านำถั่วเน่ามาแผ่เป็นแผ่นกลม โดยนำใบตองมาวางอยู่บนฝ่ามือ นำถั่วเน่าที่บดแล้วมาเกลี่ยบนใบตอง นำใบตองอีกใบหนึ่งมาวางทับและกดให้แบนราบเหมือนมะม่วงกวน นำไปตากแดดให้แห้ง จะเก็บไว้ได้นาน ชาวเหนือเรียกถั่วเน่าที่ทำแบบนี้ว่า ถั่วเน่าแคบ

รูปที่ 1 แสดงลักษณะของถั่วเน่าแบบสด และแบบแคบ ตามลำดับ

เต้าเจี้ยว (http://dnfe5.nfe.go.th)

เต้าเจี้ยวเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักชนิดหนึ่งที่ได้จากการหมักถั่วเหลือง ซึ่งมีโปรตีนสูง ในประเทศไทยนิยมนำเต้าเจี้ยวมาใช้เป็นอาหารชนิดต่าง ๆ โดยทำเป็นเครื่องจิ้ม เรียกว่า หลน หรือนำมาทำเป็นเครื่องปรุงรสในการประกอบอาหารตามตำรับจีน เช่น ทำแป๊ะซะ ผัดราดหน้า ตลอดจนผัดผักชนิดต่าง ๆ ซึ่งนอกเหนือจากจะได้รสชาติดีแล้ว ยังเป็นการเพิ่มโปรตีนในอาหารอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อความนิยมในการบริโภคเต้าเจี้ยวมีมากขึ้น จึงก่อให้เกิดการพัฒนากรรมวิธีการผลิต โดยนำเอาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมาใช้ การผลิตในโรงงานผลิตเต้าเจี้ยวในปัจจุบันใช้วิธีการกึ่งวิทยาศาสตร์และกึ่งพื้นบ้าน คือ อาศัยความรู้ทางวิทยาศาสตร์ในการเพาะเลี้ยงเชื้อราที่บริสุทธิ์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อ ป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อราอื่น ๆ และลดระยะเวลาในการผลิต ส่วนวิธีการกึ่งพื้นบ้านจะใช้ในขั้นตอนการหมักกับเกลือ คือหลังจากได้ถั่วเหลืองที่มีเชื้อราเจริญเต็มที่แล้ว จะนำไปหมักในน้ำเกลือในภาชนะเปิด ปล่อยทิ้งไว้จนได้ที่ ในขั้นตอนนี้จะมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ซึ่งสามารถเจริญได้ดีในสภาพที่มีปริมาณเกลือสูง ทำให้คุณภาพ ความสะอาด และความปลอดภัยในการบริโภคลดลง จึงมีแนวโน้มว่าต่อไปจะมีการนำวิธีวิทยาศาสตร์มาใช้ในการผลิตทั้งหมด เช่น การใช้เชื้อบริสุทธิ์ในการหมักและหมักในภาชนะปิด ซึ่งจะช่วยให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพสูง ถูกสุขลักษณะ สะอาดและปลอดภัยต่อผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น

<u>เต้าเจี้ยวแบ่งตามลักษณะของผลิตภัณฑ์ออกเป็น 2 ชนิด</u> คือ

1. เต้าเจี้ยวเม็ด คือ เต้าเจี้ยวที่มีเมล็ดถั่วกับส่วนที่เป็นของเหลวผสมกันดีไม่แยกส่วน
2. เต้าเจี้ยวบด คือ เต้าเจี้ยวที่มีลักษณะข้นสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน

รูปที่ 2 แสดงลักษณะของผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวชนิดต่าง ๆ

เชื้อราที่นิยมใช้ในการหมักเต้าเจี้ยว คือ เอสเปอร์จิลลัส โอไลซา (*Aspergillus oryzae*) ซึ่งใช้ในการเตรียมโคจิ (โคจิ หมายถึง ก้อนถั่วซึ่งยึดติดกันด้วยเส้นใยของรา) เพื่อเป็นแหล่งของเอนไซม์ต่างๆ ซึ่งจะช่วยกันย่อยสลายโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตของวัตถุดิบ ทั้งถั่วเหลืองและแป้งสาลีซึ่งจะต้องใช้เชื้อราในระยะที่มีกิจกรรมสูง จะสังเกตเห็นเชื้อรามีลักษณะเป็นสปอร์สีเขียว จึงนำไปใช้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เต้าเจี้ยวเป็นสารชูรสอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงมีรสชาติคล้ายสารสกัดจากเนื้อสัตว์ จึงใช้เป็นเครื่องปรุงอาหารได้เป็นอย่างดี โดยเฉพาะในการปรุงอาหาร ที่ปราศจากเนื้อสัตว์ เต้าเจี้ยวยังอุดมด้วย กรดอะมิโนที่ร่างกายต้องการถึง 17 ชนิด สารชูรสและกลิ่นหอมของเต้าเจี้ยวเป็นสารที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในระหว่างการหมัก มีประโยชน์ต่อร่างกายและไม่ก่อให้เกิดอันตรายแต่อย่างใด

เต้าเจี้ยวมีโปรตีน เนื่องจากในถั่วเหลืองมีโปรตีนมากที่สุด แต่เป็นโปรตีนที่ไม่สมบูรณ์ เนื่องจากขาดกรดอะมิโนที่จำเป็นบางตัว คือ เมทไทออนีน และซีสตีนสูง แต่ไลซีนต่ำ ถ้าคิดเทียบน้ำหนักกับอาหารประเภทอื่น ๆ จะพบว่ามีปริมาณโปรตีนสูง เช่น สูงกว่าเนื้อสัตว์ 2 เท่า สูงกว่าไข่ไก่และข้าวสาลี 4 เท่า สูงกว่าขนมปัง 5-6 เท่า และสูงกว่านมวัว 12 เท่า

สารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรตในถั่วเหลืองไม่มีแป้งจึงทำให้ถั่วเหลืองเป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับคนที่เป็นโรคเบาหวาน ถั่วเหลืองอุดมไปด้วยเกลือแร่ เหล็ก และโพแทสเซียม ซึ่งช่วยในการเจริญเติบโตของกระดูก และที่สำคัญคือ ธาตุเหล็กช่วยในการบำรุงโลหิต ถั่วเหลืองยังอุดมไปด้วยวิตามินเอ บี 1, บี 2, ดี, อี, เค และ ไนอะซีน จะพบวิตามินบี 2 มากกว่าพืชอื่น ๆ นอกจากนี้ยังพบว่าถั่วเหลือง ประกอบด้วย ไบโอติน, โคลิน และ อิโนซิทอล ที่ทำหน้าที่คล้ายวิตามินด้วย

<u>ประโยชน์ของเต้าเจี้ยว</u>

เต้าเจี้ยวเป็นผลิตภัณฑ์ที่ทำจากถั่วเหลืองหมักด้วยเชื้อรา เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต ให้อยู่ในรูปที่ย่อยสลายเพื่อนำไปใช้ในร่างกายได้ง่าย เต้าเจี้ยวจึงมีประโยชน์ทั้งต่อผู้บริโภคและผู้ผลิตได้ใน 2 ลักษณะคือ

<u>ประโยชน์ในด้านการบริโภค</u>

นอกจากจะมีคุณค่าทางโภชนาการดังกล่าวแล้ว เรายังสามารถดัดแปลงเต้าเจี้ยวให้เป็นอาหารชนิดต่าง ๆ ได้ เช่น หลนเต้าเจี้ยว น้ำจิ้มข้าวมันไก่ ผัดผักต่าง ๆ เป็นต้น ทำให้มีอาหารบริโภคได้ หลายชนิด

<u>วิธีการทำเต้าเจี้ยว</u>

1.1 นำถั่วเหลืองไปแช่น้ำเป็นเวลา 10-15 ชั่วโมง หรือแช่น้ำร้อน 2-3 ชั่วโมง ควรใช้น้ำปริมาณมาก และควรเปลี่ยนน้ำ 1-2 ครั้งระหว่างการแช่ โดยเฉพาะเมื่ออากาศร้อนจัด เพราะอาจเกิดการหมักขณะแช่ถั่วเหลืองทำให้มีรสเปรี้ยว และมีกลิ่นเหม็น ควรแช่จนถั่วเหลืองพองตัวเต็มที่

1.2 นึ่งถั่วเหลืองโดยใช้หม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20-25 นาที หรือต้มถั่วทั้งเมล็ด จะใช้เวลาต้ม 3-4 ชั่วโมง ส่วนถั่วที่โม่ผ่าซีกแล้วใช้เวลาต้มเพียง 1-2 ชั่วโมง ก็เพียงพอ ถั่วที่สุกนิ่มได้ที่ ทดสอบได้โดยการใช้หัวแม่มือและนิ้วชี้บี้ ถ้าเนื้อถั่วเหลืองถูกบี้แบนโดยง่ายแต่เปลือกยังดีอยู่ แสดงว่าใช้ได้ แต่ถ้าบี้แล้วเนื้อถั่วแตกเละออกมา แสดงว่านึ่งไม่พอ และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่าต้มหรือ นึ่งถั่วจนเละวัตถุประสงค์ในการนึ่งก็เพื่อทำให้ถั่วเหลืองนิ่ม ทำให้คุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไปจนเหมาะกับการเจริญของเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์ต่างๆได้ง่ายขึ้น

1.3 นำถั่วเหลืองที่นึ่งแล้วมาสะเด็ดน้ำ และผึ่งให้เย็น

1.4 นำแป้งสาลีไปคั่วด้วยไฟอ่อน ๆ จนเป็นสีน้ำตาลอ่อน การคั่วแป้งสาลีจะช่วยปรับความชื้นในถั่วเหลืองไม่ให้สูงมากเกินไป ซึ่งจะทำให้ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์อื่นปนเปื้อนในช่วงการหมักโคจิ ช่วยทำลายจุลินทรีย์ที่ติดอยู่ที่แป้งสาลี และยังทำให้เต้าเจี้ยวมีกลิ่นหอมและมีสีที่เหมาะ แล้วนำเอาเชื้อราคลุกกับแป้งสาลีให้เข้ากัน เอาไปคลุกคล้ากับถั่วเหลืองให้ทั่วกันดี จนแป้งสาลีทั้งหมดเกาะกับเมล็ดถั่วเหลืองแล้วจึงนำไปใส่ในกระด้ง เกลี่ยให้กระจายทั่วกระด้ง หนาประมาณ 1 นิ้ว แล้วคลุมด้วยผ้าขาวบางอีกทีหนึ่งข้อควรระวัง อย่าคลุกเชื้อรากับแป้งสาลีขณะที่แป้งสาลียังร้อนอยู่

1.5 บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 25-30 องศาเซลเซียส ประมาณ 3-4 วัน ในระยะแรกเชื้อราจะสร้างเส้นใยสีขาวพันให้เมล็ดถั่วเหลืองติดกัน และเริ่มมีสปอร์สีเหลืองอ่อนจนถึงสีเขียวอ่อนๆเกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอ ไม่ควรบ่มทิ้งไว้จนสปอร์เปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้ม ระหว่างการบ่มจะมีความร้อนเกิดขึ้นมาก จึงควรกลับถั่วในวันที่ 2 เพื่อช่วยระบายความร้อน มิฉะนั้นการเจริญของราอาจหยุดลง และเกิดการเน่าเสียจากเชื้อแบคทีเรียได้ ขั้นตอนนี้ของกรรมวิธีการผลิตเต้าเจี้ยวก็มีชื่อเรียกว่าขั้นโคจิ

1.6 นำโคจิที่ได้ใส่ลงในขวด ไห โอ่ง หรือบ่อหมัก โดยต้มน้ำ และ ละลายเกลือความเข้มข้น 16-22 % และทิ้งไว้ให้เย็น ใส่น้ำเกลือพอท่วมโคจิในอัตราส่วนน้ำเกลือ 2 ส่วน ต่อโคจิ 1 ส่วน การหมักนาน 3-4 เดือน ส่วนผสมระหว่างโคจิและน้ำเกลือ เรียกว่า โมโรมิ สิ่งสำคัญที่ต้องไม่ลืมปฏิบัติในระหว่างเดือนแรกของการหมัก คือ ต้องทำการคนส่วนผสมวันละครั้งทุกวัน การกวนหรือการคนจะมีผลต่อการหมัก คือ ถ้าหากกวนไม่ตรงเวลา ปล่อยทิ้งไว้หลาย ๆ สัปดาห์ จะทำให้ผิวหน้าเป็นฝ้าสีขาว ซึ่งจะทำให้เกิดกลิ่นที่ผิดปกติ กลิ่นหอมของเต้าเจี้ยวจะหายไป แต่ถ้าหากกวนมากเกินไปจะทำให้เกิดลักษณะเหนียวหนืดซึ่งเป็นผลเสีย

<u>วัตถุประสงค์ของการคนหรือกวน</u> มีดังนี้

1. ทำให้เกลือผสมได้ทั่วถึงป้องกันการสูญเสียขณะหมัก
2. ทำให้เอนไซม์ในหัวเชื้อกระจายตัวได้มากเป็นผลให้การหมักเกิดได้เร็วขึ้น
3. ช่วยระบายคาร์บอนไดออกไซด์และช่วยเพิ่มออกซิเจนทำให้มีจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น
4. ป้องกันไม่ให้เชื้อที่ไม่ต้องการออกซิเจนเจริญเติบโตได้
5. ทำให้อุณหภูมิสม่ำเสมอ
6. ป้องกันบริเวณผิวหน้าสัมผัสกับอากาศและเกิดราขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยแบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ และเอนไซม์ ต้องนำไปผ่านความร้อนเพื่อการฆ่าเชื้อ จะทำให้เต้าเจี้ยวสามารถเก็บไว้ได้นาน การต้มที่อุณหภูมิสูงเกินไปอาจจะทำให้ไหม้หรือติดก้นหม้อได้ การต้มจะทำให้ กลิ่นเต้าเจี้ยวดีขึ้นและสีจะเข้มขึ้น อาจจะใส่ วัตถุกันเสียลงไปได้ 0.01% ในรูปของโซเดียมเบนโซเอต (สารกันบูด) นำเต้าเจี้ยวที่ผ่านการปรุงรสและต้มฆ่าเชื้อแล้วไปบรรจุในภาชนะ หรือขวดที่สะอาด ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (เพื่อสะดวกในการใช้ควรเป็นขวดปากกว้าง) แล้วจึงปิดฝาให้สนิทเก็บไว้รับประทานได้นาน

เต้าหู้ยี้ (http://web.ku.ac.th)

เต้าหู้ยี้เป็นผลิตภัณฑ์หมักดองอีกชนิดหนึ่งที่ทำจากถั่วเหลือง และนิยมบริโภคกันทั่วไป ขั้นตอนการผลิตคือ นำถั่วเหลืองคุณภาพดีมาทำเป็นเต้าหู้แข็งก่อนแล้วตัดเต้าหู้ให้เป็นก้อนขนาดตามต้องการ นำไปแช่ในน้ำเกลือผสมกรดมะนาว 1 คืน รุ่งขึ้นนำไปฆ่าเชื้อโดยอบในตู้อบที่ 100 องศาเซลเซียส นานประมาณ 10-15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเรียงในถาด และใส่เชื้อราที่มีชื่อว่า แอคติโนมิวคอร์ อิลิแกน บ่มให้เชื้อราเจริญเติบโต ประมาณ 3-7 วัน ชิ้นเต้าหู้จะมีเส้นใยของเชื้อราขึ้นโดยรอบ ต่อไปนำไปหมักในน้ำเกลือโดยเรียงเต้าหู้ในถัง หมักเป็นชั้น ๆ ใส่น้ำเกลือไวน์แดง และเครื่องเทศอื่น ๆ เช่น พริกแดง ขิง ผงพะโล้ เต้าเจี้ยวบดและ/หรือเติมข้าวแดงเพื่อทำให้เป็นเต้าหู้ยี้ชนิดสีแดง ปิดฝาหมักไว้เป็นระยะเวลาเดือนครึ่งที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบกำหนดเวลาจะได้เต้าหู้ยี้ตามต้องการ

รูปที่ 3 แสดงลักษณะของเต้าหู้ยี้

แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในการหมัก (http://www.arrowscientific.com.au/usefulbitsmain.html)

เชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในการหมักมีหลายชนิด เชื้อที่รู้จัก กันดีคือ เชื้อแบคทีเรียในจีนัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

B.punilus, B.brevis, B.macerans, B.licheniformis, B.polymyxa และ *B. coagulans*

Bacillus เช่น ในการแยกเชื้อแบคทีเรีย จากแดดดาวา, daddawan-soya, okpihe, ogiri และ ugba ประเทศไนจีเรีย (Nigeria) พบแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* ดังนี้ *B. subtilis, B. laterosporus,*

แบคทีเรียบาซิลลัสเป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างของเซลล์เป็นรูป แท่งตรงขนาด 0.5-2.5 x 1.2-10 mm เรียงตัวกันเป็นคู่หรือเส้นสาย หรือ เป็นวงกลมหรือสี่เหลี่ยม ติดสีแกรมบวกมี endospore รูปไข่ กลม หรือ ทรงกระบอก เป็น aerobic หรือ facultative anaerobic bacteria เป็นพวก chemoorganotrophs สามารถเกิดกระบวนการหมักหรือ กระบวนการหายใจ เคลื่อนที่ได้ด้วย peritrichous flagella ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เลวร้ายได้ เช่น ทนความร้อน pH และทนความเค็มได้ดี ให้ผล catalase test เป็นบวก แบคทีเรียในจีนัสนี้สามารถพบได้ หลาย ๆ แหล่ง บางสายพันธุ์อาจก่อให้เกิดโรคในสัตว์มีกระดูกสันหลัง หรือพวกไม่มีกระดูกสันหลัง *B. subtilis* เป็น aerobic หรือ facultative anaerobic bacteria สร้าง catalase มี endospore ซึ่งทำให้ทนต่อสภาวะ แวดล้อมที่ไม่ดีได้ ไม่ทำให้เกิดโรค ติดสีกรัมบวก รูปแท่งตรง มี flagella แบบ peritrichous เจริญได้ดีที่ pH 5.5-8.5 สร้าง Hydrolytic enzyme ที่สลาย polysaccharide, nucleic acid และ lipid โดยใช้สารดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนและเป็นตัวให้อิเล็กตรอน มีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน บทบาทสำคัญของเชื้อตัวนี้ในการหมัก คือ การปล่อยเอนไซม์ โปรติเอสออกมาย่อยโปรตีน

รูปที่ 4 แสดงลักษณะของเชื้อ *Bacillus subtilis*

เอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์กลุ่มใหญ่ มีหน้าที่ในการย่อย พันธะเปปไตด์ ดังนั้น เอนไซม์นี้จึงมีบทบาทสำคัญอย่างมากในสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในการตัดเปลี่ยนโปรตีนและเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์กลุ่มใหญ่ มีหน้าที่ในการย่อย พันธะเปปไตด์ ดังนั้น เอนไซม์นี้จึงมีบทบาทสำคัญอย่างมากในสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในการตัดเปลี่ยนโปรตีนและเอนไซม์ตัวอื่น ๆ เพื่อทำหน้าที่ต่าง ๆ ในการดำรงอยู่อย่างสมดุล ดังนั้นจึงเป็นเอนไซม์ที่สำคัญชนิดหนึ่งในระบบการย่อยอาหารสู่ร่างกาย เช่น เปปซิน ไคโมทริปซิน เปปติเดส นอกจากนี้ยังมีโปรติเอสในส่วนของการควบคุมการแข็งตัวของเลือด ควบคุมการจับเชื้อโรคโดยการย่อยสลายโปรตีนจากภายนอก เช่น คาเทปซิน ในสมัยแรกเริ่ม เอนไซม์โปรติเอสจะแบ่งออกตามขนาดของโมเลกุลประจุและความจำเพาะเจาะจงกับสับเสตรท (substrate) ปัจจุบันได้มีการจัดระบบที่ใช้หลักการทำงานของเอนไซม์ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) ในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ เอนไซม์ ที่ทำปฏิกิริยาที่ C-terminal หรือ N-terminal ของสายโพลีเปปไทด์ เรียกว่า เอนไซม์เอกโซเปปติเดส (exopeptidase), และเอนไซม์ที่ตัดภายในสายโพลีเปปไทด์ เรียกว่า เอนโดเปปติเดส (endopeptidase) International Union of Biochemistry (IUB) แบ่ง เอนไซม์เป็น 4 กลุ่มตามการทำงานบริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site)

1. Serine protease (EC 3.4.21) โดยที่ active site มีกรดอะมิโน serine และ histidine
2. Cysteine protease of thiol protease (EC 3.4.22) active site มี cysteine และ histidine
3. Aspartic protease (EC 3.4.23) active site มีกรดอะมิโนที่เป็นกรด (acidic amino acids)
4. Metalloprotease (EC 3.4.24) active site มีกรดกลูตามิค และอะตอมโลหะ (metal atom)

เอนไซม์โปรติเอสได้มีการศึกษาและแบ่งกลุ่มมากมายทั้งลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างสามมิติ Serine protease แบ่งออก เป็น 2 family คือ mammalian serine protease และ bacterial serine protease โดย 2 family จะแตกต่างกันในลำดับกรดอะมิโน และโครงสร้างสามมิติ ส่วนในเอนไซม์ matalloprotease ประกอบ ด้วย 2 family คือ mammalian pancreatic carboxypeptidase และ bacterial protease, thermolysin (Neurath, 1984)

<u>การทำงานของเอนไซม์โปรติเอสและตัวยับยั้ง(inhibitor)</u>

กระบวนการเกิดการสลายพันธะเปปไทด์ (peptide bond) คือ polarization ของพันธะเปปไทด์ โดย nucleophillic attack ที่ ตำแหน่งพันธะ carbon-oxygen ทั้งโดยตรงหรือโดยผ่านโมเลกุลของน้ำ ปฏิกิริยาจะมีการให้โปรตอนกับ peptide nitrogen หรือที่เรียกว่า leaving group ในแต่ละกลุ่มหรือ family ของโปรติเอสจะมีชุดของ กรดอะมิโนที่ทำให้เกิดตำแหน่ง active site ต่าง ๆ กัน (James, 1980)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>แหล่งของเอนไซม์โปรติเอส</u>

1. <u>เอนไซม์โปรติเอสจากพืช</u>

เอนไซม์โปรติเอสที่พบในพืชมีหลายชนิด เช่น

1.1. ปาเปน (papain ; E.C. 3.4.22.2) เป็นเอนไซม์โปรติเอสจากพืชซึ่งเป็นที่รู้จักและมีการใช้ประโยชน์มายาวนาน ปาเปนสกัดได้จากยางมะละกอ (*Carica papaya*) จัดอยู่กลุ่มของ ซีสเตอีนโปรติเอส โดยมีน้ำหนักโมเลกุล 21 กิโลดาลตัน มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง 5.5-7 มีค่าพีเอช เท่ากับ 9.6 และจะเสียสภาพธรรมชาติที่พีเอช ต่ำกว่า 4 สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 80 หรือ 90 องศาเซลเซียส ปาเปนจะถูกยับยั้งโดย H_2O_2 , O_2, โลหะหนักบางชนิด เช่น Hg^{2+} , Fe^{3+}, และ Cu^{2+} (Rao et al., 1998; Linsmaier-Bednar, 1998; Wong, 1995)

ตารางที่ 2 แสดงกลุ่มของโปรติโอไลติกเอนไซม์

ตระกูล	ตัวอย่างของโปรติโอไลติกเอนไซม์	ลักษณะของอนุมูลของบริเวณเร่ง
ซีรีนโปรติเอส I	ไคโมทริปซิน ทริปซิน อีลาสเตส แพนครีติก แคลลิคเรียน	Asp^{102}, Ser^{195}, His^{57}
ซีรีนโปรติเอส II	ซับติลิซิน	Asp^{32}, Ser^{221}, His^{64}
ซีสเตอีนโปรติเอส	ปาเปน แอกตินิดิน แรท ลิเวอร์ คาเทปซินบี และเอช	Cys^{25}, His^{159}, Asp^{158}
แอสปาร์ติกโปรติเอส	เพนนิซิลโลเปปซิน Rhizopus chineses และ Endothia parasiticus แอซิดโปรติเอส เรนนิน	Asp^{33}, Asp^{213}
เมทิลโลโปรติเอส I		Zn, Glu^{270} , Try^{248}
เมทิลโลโปรติเอส II	โบไวน์คาร์บอกซีเปปติเดส เอ เทอร์โมไลซีน	Zn, Glu^{143}, His^{231}

ที่มา: Neurath (1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 โบรมิเลน (bromilane ; 3.4.22.4) จัดเป็นซีสเตอีนโปรติเอสสามารถเตรียมจากต้นและน้ำของสัปปะรด โดยมีน้ำหนักโมเลกุล 33 กิโลดาลตัน มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน ในช่วง 5-9 และ 50-55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และกิจกรรมของเอนไซม์จะหยุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (Rao et al., 1998 ; Linsmarir - bednar , 1998)

1.3 ผลมะเดื่อมีน้ำหนักโมเลกุล 26 กิโลดาลดตัน มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 6.7 สามารถทนต่อพีเอช 3.5-9 ได้สูง จะเสียสภาพธรรมชาติที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ฟีซินถูกยับยั้งการทำงานได้โดยโลหะหนักและกรดซอบิกที่ความเข้มข้น 10^{-4} โมลาร์ (Linsmarir - bednar , 1998)

1.4 คาราติเนส (keretinase) เป็นเอนไซม์โปรติเอส ที่ได้จากพืชบางกลุ่มที่สามารถย่อยเส้นผมได้ ซึ่งการย่อยเส้นผมและเส้นขนนั้นจะมีความสำคัญต่อการผลิตกรดอะมิโนที่จำเป็น เช่น ไลซีน และสามารถช่วยป้องกันระบบการบำบัดน้ำเสีย (Rao et al., 1998)

นอกจากนี้ยังพบเอนไซม์โปรติเอสจากพืชต่างๆ เช่น แอคติเนส จากผลกีวี (Wong , 1995) ไคโมปาเปน (kymopapane) จากมะละกอ (Linsmarir - bednar , 1998)

2. <u>เอนไซม์โปรติเอสจากสัตว์</u>

เอนไซม์โปรติเอสบางชนิดสามารถพบได้จากสัตว์

2.1 ทริปซิน (tripsin; EC.3.4.21.4) เป็นเอนไซม์หลักในระบบการย่อยอาหารที่เป็นโปรตีน ทริปซิน จัดเป็นซีรินโปรติเอส ซึ่งย่อยพันธะเปปไทด์ด้วยน้ำ มีหมู่คาร์บอกซิลิกเป็นตัวช่วย ทริปซินจะถูกสร้างโดยตับอ่อนในรูปของทริปซิโนเจนที่อยู่ในรูปของทริปซิน ที่สามารถมีกิจกรรมได้โดยมิวคัสเนกเซลล์เมมเบรน (mucus membrane) ทริปซินมีน้ำหนักโมเลกุล 23.3 กิโลดาลตัน มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานระหว่าง 7-9 และจะเสถียรที่พีเอช 3 เอนไซม์จะถูกยับยั้งด้วยอัลคาไลติงรีเอเจนท์ เช่น DFP หรือ PMSF (Rao et al., 1998 ; Linsmarir - bednar , 1998)

2.2 ไคโมทริปซิน (chymotrypsin; E.C. 3.4.21.1) จัดเป็นซีรีนโปรติเอส และคล้ายกับทริปซิน ไคโมทริปซินจะสร้างโดยตับอ่อนในรูปของโปรเอนไซม์ไคโมทริปซิโนเจน ซึ่งไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้แล้วถูกเปลี่ยนให้เป็นไคโมทริปซินที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้โดยทริปซิน ไคโมทริปซินนี้มีน้ำหนักโมเลกุล 23.8 กิโลดาลตัน เสถียรที่พีเอชช่วง 2.5-6 ที่ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง และที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งกิจกรรมโดยโลหะหนัก ไอโซโพรพิลฟลูออโรฟอสเฟต (DFP) ฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (PMSF) ไคโมทริปซินบริสุทธิ์จะถูกนำมาใช้สำหรับการวินิจฉัยโรคและใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์ต่างๆ (Rao et al., 1998 ; linsmarir - bednar , 1998)

2.3 เปปซิน (pepsin; E.C. 3.4.23.1-3) จัดเป็นแอซิดโปรติเอส พบในกระเพาะอาหารของสัตว์มีกระดูกสันหลังทุกชนิดโดยครั้งแรกจะถูกสร้างขึ้นมาในรูปโปรเอนไซม์เปปซิโนเจน แล้วเกิดการเร่งปฏิกิริยาโดยตัวของมันเองในสภาพที่มีกรดไฮโดรคลอริก เปปซินเป็นแอสปาติกโปรติเอส ซึ่งจะมีลักษณะเหมือนกับโปรติเอสที่สร้างจากไวรัส ชนิด1 (type 1) ซึ่งทำให้เกิดภูมิคุ้มกันบกพร่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
67306

ในคนโดยโปรติเอส เอชไอวี 1 จะมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการเจริญและแบ่งตัวของไวรัส เปปซิน มีน้ำหนักโมเลกุล 34.5 กิโลดาลตัน มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานระหว่าง 1 และ 2 เสถียรที่พีเอช 2.5 และปฏิกิริยาจะหยุดที่พีเอช 6 (ปราณี 2535; Pao et al., 1998)

2.4. เรนนิน หรือ เรนเน็ต(rennin, rennet,chymosin; EC. 3.4.23.4) เป็นเอนไซม์ที่คล้ายกับเปปซิน สามารถพบได้ในกระเพาะของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มี 4 กระเพาะ โดยจะถูกสร้างจากตัวตั้งต้นที่ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา ซึ่งได้แก่ โปรเรนนิน โปรเรนนินจะถูกเปลี่ยนเป็นเรนนิน โดยการกระตุ้นของเปปซิน หรืดเกิดจากการกระตุ้นภายในตัวของมันเอง เรนนิน มีน้ำหนักโมเลกุล 30.7 กิโลดาลตัน มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 3.5 และจะเกิดการสลายตัวที่พีเอชต่ำกว่า 3.5 ที่พีเอชสูงกว่า 6 จะเริ่มเสียสภาพ เอนไซม์นี้จะเสถียรที่พีเอช 5 และจะเสถียรยิ่งขึ้น เมื่ออยู่ในกลีเซอรอล มีความจำเพาะต่อการสลายพันธะเปปไทด์ระหว่าง phe105-Met106 ของโปรตีนนม (เคซีน) เรนนินจะถูกนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมนมสำหรับผลิตเนยแข็ง (ปราณี 2535; Pao et al., 1998; Wong, 1995)

3. <u>เอนไซม์โปรติเอสจากจุลินทรีย์</u>

3.1. เอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรีย แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้มีมากมายหลายชนิดดังที่ได้เคยมีรายงานไว้ เช่น

Cowan et al. (1987) รายงานผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก Desulfurococcus mucosus ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ใน 88 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้จัดเป็นซีรีนโปรติเอส ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 52 กิโลดาลตัน มีค่าพีเอช 8.7 และถูกยับยั้งด้วย ไดไอโซโพรพิลฟอสโฟโรฟลูออรีเดส (Di-isopropyl phosphorofluoridate) ฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (PMSF) และไคโมสตาติน (chymostatin) เอนไซม์นี้สามารถทนต่อความร้อนได้สูงกว่าเอนไซม์โปรติเอสอื่นๆที่เคยมีการรายงานไว้ คือมีค่า $T_{1/2}$ ที่ 95 องศาเซลเซียส 70-90 นาที และที่ $T_{1/2}$ 105 องศาเซลเซียส 8-9 นาที

Lu and chang (1996) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก Psudomonas aeruginosa CCRC 15541 โดยพบว่าเอนไซม์ที่ผลิตนั้นเป็นชนิดที่ทนต่อความร้อนได้สูง 60 องศาเซลเซียส มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 7 และถูกยับยั้งกิจกรรมได้ด้วยเอทิลลีนไดอะมีนเตตระอะซีติกแอซิด (EDTA)

Santinanalert et al. (1998) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ PS 719 ซึ่งแยกได้จากดินบริเวณน้ำพุร้อน ปรากฏว่าแบคทีเรียนี้สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ดีที่พีเอช 9-11.5 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์นี้จะมีความจำเพาะต่อ เคซีนมากที่สุด และถูกยับยั้งด้วย 3,4 ไดคลอโรไอโซคูมาริน (3, 4-DDI) ฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (PMSF) ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Patke and Dey (1998) รายงานผลการศึกษาการผลิตโปรติโอไลติกเอนไซม์จากแอคติโนมายเซทที่ทนความร้อนได้สูง Streptomyces megasporus SDF 4 ซึ่งสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้จะมีกิจกรรมในช่วงพีเอชและอุณหภูมิที่กว้าง คือที่พีเอช 6-12 และ 25-85 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แต่จะมีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานที่พีเอช 8 และ 10 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งขึ้นอยู่กับอิออนของแคลเซียมโดยเอนไซม์จะสามารถทนต่อความร้อนเพิ่มขึ้นเมื่อมีอิออนของแคลเซียส 0.01 โมล/ลิตร เอนไซม์นี้จะถูกยับยั้งโดยเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติกแอซิด (EDTA) ฟีนิลเมทิลซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (PMSF) จึงสามารถสรุปได้ว่าเป็นเอนไซม์โปรติเอสชนิด ซีรีนโปรติเอสที่ต้องการอิออนของโลหะ

<u>ประโยชน์ของเอนไซม์โปรติเอส</u> (Rao et al., 1998)

เอนไซม์โปรติเอสสามารถใช้ประโยชน์ได้หลายประการที่สำคัญได้แก่ การใช้ในอุตสาหกรรมสารทำความสะอาด เช่นการผลิตผงซักฟอก อุตสาหกรรมอาหาร เช่น อุตสาหกรรมนม อุตสาหกรรมการผลิตขนมปัง การผลิตผลิตภัณฑ์ถั่วเหลือง ใช้เป็นสารป้องกันการเปลี่ยนรสของสารสกัดโปรตีน และเนื่องจากแนวโน้มการพัฒนาเทคโนโลยีที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมจึงได้มีการส่งเสริมให้มีการใช้ โปรติเอสในอุตสาหกรรมเครื่องหนังและในกระบวนการการผลิตทางชีวภาพอื่นๆอย่างกว้างขวาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

Anaerobic jar

Dropper

Micropipette ขนาด 10 μl และ 1 ml

Rack

Slide

Spreader

Tip

loops

กระดาษฟอยล์

กระบอกตวงขนาด 100 และ 1000 ml

ขวดเตรียมอาหาร

ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 ml

จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

ช้อนตักสาร

แท่งแก้วคนสาร

บีกเกอร์แก้ว ขนาด 250, 500 และ 1000 ml

ปิเปต ขนาด 1 และ 10 ml

หลอดทดลอง

ตะกร้า

ถั่วเหลือง

ถาด

ตะเกียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 เครื่องมือ

Autoclave (HIRAYAMA HA-300 M IV)

Centrifuge (HERMLE Z 383 K)

Hot air oven (WIT binder)

pH meter (EUTECT instruments)

Shaking incubater (GALL enkamp)

Spectrophotometer (SHIMADZU UV -1607)

Vortex mixer (JULABO)

Waterbath (CLIFTON unstirred bath)

กล้องจุลทรรศน์ (OLYMPUS)

เครื่องชั่งละเอียด (SARTORIUS analytic)

เครื่องชั่ง (SHIMADZU)

ตู้บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส (MEMMERT)

3.3 สารเคมี

Agar

Alcohol 95%

Gram staining solution kit (Crystal violet, Safranin, Iodine solution, Alcohol 95%)

Potato Starch

Skim milk

Sodium azide

40% potassium hydroxide-creatine solution

5% α-naptol

Anarobic indicator

Folin-ciocalteu reagent

Beef extract

Hydrogen peroxide 95%

Peptone

Sodium chloride

Sodium hydroxide

Trichloroacetic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 แผนการทดลอง

3.4.1 การเก็บตัวอย่างและการคัดเลือกแบคทีเรีย

ในการทดลองนี้ได้มีการเก็บตัวอย่างถั่วหมักชนิดต่าง ๆ ดังนี้

ทำการเก็บตัวอย่าง เต้าเจี้ยว จากตลาดดังต่อไปนี้ ตลาดเอี่ยมสมบัติ, ตลาดพร้อมมิตร, ตลาดบุญศิริ, ตลาดปากน้ำ, ตลาดหนามแดง, ตลาดหัวตะเข้, ตลาดพระโขนง, ตลาดอ่อนนุช, ตลาดบางนา และตลาดสำโรง ซึ่งเต้าเจี้ยวที่นำมาแยกเชื้อมีทั้งเต้าเจี้ยวเม็ด และ เต้าเจี้ยวบด

ทำการเก็บตัวอย่าง เต้าหู้ยี้ จากตลาดดังต่อไปนี้ ตลาดสำโรง, ตลาดปากน้ำ, ตลาดอุดมเดช, ตลาดพร้อมมิตร, ตลาดหนามแดง, ตลาดบุญศิริ, ตลาดหัวตะเข้, ตลาดเอี่ยมสมบัติ, ตลาดพระโขนง และตลาดอ่อนนุช

ทำการเก็บตัวอย่าง ถั่วเน่า จากตลาดดังต่อไปนี้ตลาดทุ่งโฮ้ง, ตลาดป่าแดง, ตลาดอรทัย, ตลาดเทศบาลเมืองแพร่, ตลาดเทศบาลลำปาง ซึ่งถั่วเน่าที่นำมาแยกเชื้อจะใช้ถั่วเน่าที่มีลักษณะสด

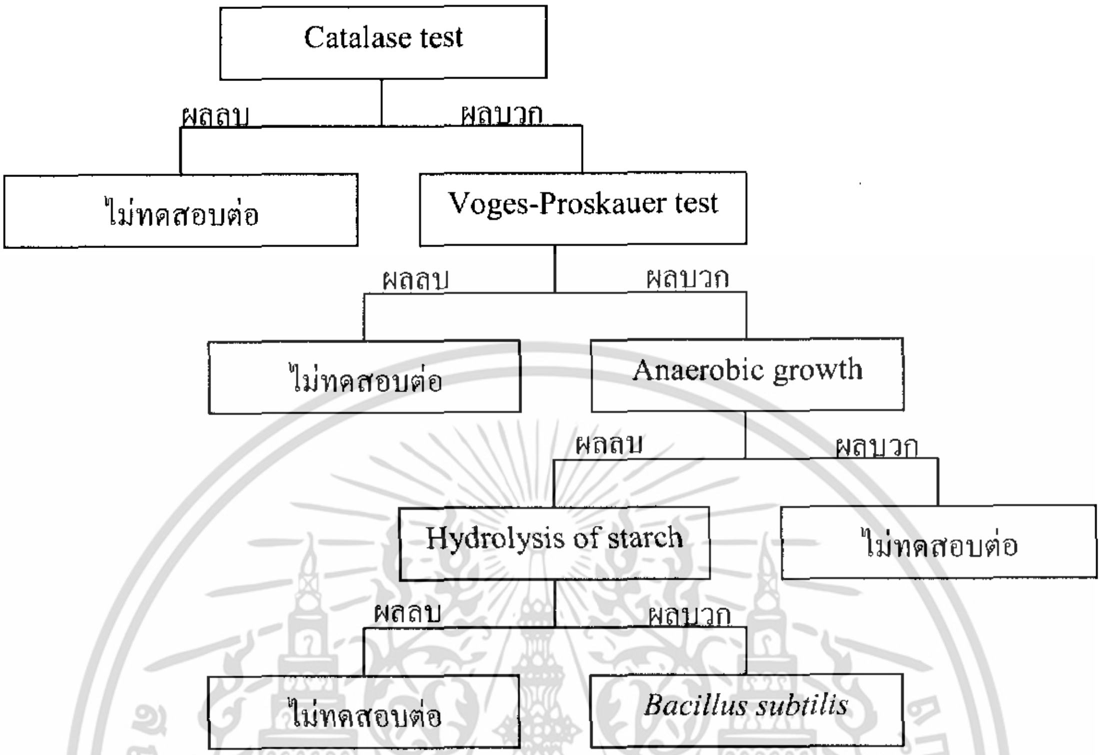
โดยมีวิธีการดังต่อไปนี้

1. เตรียมน้ำกลั่นปริมาตร 9 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
2. ใส่ตัวอย่าง ปริมาตรประมาณ 1 กรัม ในน้ำกลั่นที่เตรียมไว้นำไปแช่ใน Waterbath ที่ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (เพื่อเป็นการกำจัด vegetative cells ให้เหลือแต่สปอร์ของแบคทีเรีย)
3. นำสารละลายที่ได้มา Spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร NA (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจผล
4. นำโคโลนีเดี่ยวมา streak plate เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธ์ แล้วนำไปทำ stock culture บนอาหารวุ้นเอียง NA (ภาคผนวก ก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2 การบ่งชี้ชนิดของเชื้อโดยวิธีทางชีวเคมี

ทำตามแผนภาพดังต่อไปนี้



หมายเหตุ วิธีการดูภาคผนวก ข

3.5 การคัดเลือกเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด

1. นำเชื้อที่เป็น *B. subtilis* (ที่แยกได้จากข้อ 3.4.1 และผ่านการทดสอบทางชีวเคมีในข้อ 3.4.2) มาเพาะลงบนอาหาร NB (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บส่วนที่เป็นสารละลาย ซึ่งเป็น crude enzyme ไว้ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป

3. หยดสารละลาย crude enzyme ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบน skimmilk agar โดย แต่ละไอโซเลตทำ 3 ซ้ำ

4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตรวจผล

5. วัดขนาดวงใสของเชื้อแต่ละไอโซเลต บันทึกผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6 การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ การวัดความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ชั่วโมงต่าง ๆ และการสกัดเอนไซม์ ของเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5

นำเชื้อ *B. subtilis* ที่ให้ขนาดของวงใสกว้างที่สุดจากข้อ 3.5 มาเพาะลงในอาหารเหลวสูตร NB (ภาคผนวก ก) ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร150 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง ครั้งละ 15 มิลลิลิตร นำมาตรวจดูเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้ววัดค่าความขุ่นด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ 660 นาโนเมตร 24 ชั่วโมง จากนั้นนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟ พร้อมกันนี้นำอาหารเลี้ยงเชื้อทุก ๆ 4 ชั่วโมงที่เหลือ มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บเฉพาะส่วนใส หรือ crude enzyme ของเชื้อทุก 4 ชั่วโมง ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาหยดลงบน skimmilk agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตรวจผลเช่นเดียวกับข้อ 3.5 ทุกขั้นตอนต้องทำโดย aseptic technique ส่วน crude enzyme ที่เหลือเก็บไว้

3.7 การทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ได้จาก *B. subtilis* ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6

3.7.1 การหา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำ crude enzyme ที่ได้จากข้อ 3.6 มาหา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โดยวิเคราะห์ตามวิธีของ Wang และ Hesseltine, 1965 (ภาคผนวก ง)โดยใช้บัฟเฟอร์ที่มี pH ที่ต่างกันคือ

Citrate-Phosphate Buffer	ที่ pH 5.0, 6.0 และ7.0
Phosphate Buffer	ที่ pH 7.0, 7.5 และ 8.0
TRIS Buffer	ที่ pH 8.0 และ 9.0
Carbonate-Bicarbonate Buffer	ที่ pH 9.0 และ 10.0 วิธีการเตรียมดังภาคผนวก ค

แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

3.7.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

นำ crude enzyme ที่ได้จากข้อ 3.6 มาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โดยวิเคราะห์ตามวิธีของ Wang และ Hesseltine, 1965 (ภาคผนวก ง) โดยใช้ buffer pH ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.7.1 แต่บ่มที่อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาต่าง ๆ กัน ดังนี้ 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.3 การหาความเสถียรของเอนไซม์

นำ crude enzyme ที่ได้จากข้อ 3.6 มาหาความเสถียรของเอนไซม์ โดยนำเอนไซม์ดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ก่อนทำปฏิกิริยา แล้วเก็บเอนไซม์ทุก ๆ 10 นาที เป็นเวลา 60 นาทีแล้วนำเอนไซม์ที่เก็บได้ไปทดสอบโดยวิเคราะห์ตามวิธีของ Wang และ Hesseltine, 1965 (ภาคผนวก ง) โดยใช้ buffer pH ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.7.1 และบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.7.2 แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm ด้วยเครื่อง Spectrophotometer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 การเก็บตัวอย่าง (Sampling) และการคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ (Isolation of spore forming bacteria)

จากการเก็บตัวอย่างเต้าเจี้ยว, เต้าหู้ยี้ และถั่วเน่าจากแหล่งต่าง ๆ ในเขตกรุงเทพมหานคร, จังหวัดสมุทรปราการ และถั่วเน่าจากแหล่งต่าง ๆ ในภาคเหนือ แล้วนำมาคัดเลือกตามวิธีการในข้อ 3.4.1 และให้หมายเลขไอโซเลตแต่ละโคโลนี ได้ผลดังแสดงตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่แยกได้จากแหล่งตัวอย่างต่าง ๆ

Isolate number	ตลาด	จังหวัด	ชนิดของถั่วเหลืองหมัก
B1	ปากน้ำ	สมุทรปราการ	เต้าหู้ยี้
B2	หนามแดง	สมุทรปราการ	เต้าหู้ยี้
B3	หนามแดง	สมุทรปราการ	เต้าหู้ยี้
B4	สำโรง	สมุทรปราการ	เต้าหู้ยี้
B5	หัวตะเข้	กรุงเทพมหานคร	เต้าหู้ยี้
B6	หัวตะเข้	กรุงเทพมหานคร	เต้าหู้ยี้
B7	หัวตะเข้	กรุงเทพมหานคร	เต้าหู้ยี้
B8	เอี่ยมสมบัติ	กรุงเทพมหานคร	เต้าหู้ยี้
B9	เอี่ยมสมบัติ	กรุงเทพมหานคร	เต้าหู้ยี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 3 ต่อ....

Isolate number	ตลาด	จังหวัด	ชนิดของถั่วเหลืองหมัก
B10	เอี่ยมสมบัติ	กรุงเทพมหานคร	เต้าหู้ยี้
B11	ปากน้ำ	สมุทรปราการ	เต้าเจี้ยว
B12	ปากน้ำ	สมุทรปราการ	เต้าเจี้ยว
B13	ปากน้ำ	สมุทรปราการ	เต้าเจี้ยว
B14	หนามแดง	สมุทรปราการ	เต้าเจี้ยว
B15	หนามแดง	สมุทรปราการ	เต้าเจี้ยว
B16	หนามแดง	สมุทรปราการ	เต้าเจี้ยว
B17	สำโรง	สมุทรปราการ	เต้าเจี้ยว
B18	สำโรง	สมุทรปราการ	เต้าเจี้ยว
B19	หัวตะเข้	กรุงเทพมหานคร	เต้าเจี้ยว
B20	หัวตะเข้	กรุงเทพมหานคร	เต้าเจี้ยว
B21	หัวตะเข้	กรุงเทพมหานคร	เต้าเจี้ยว
B22	เอี่ยมสมบัติ	กรุงเทพมหานคร	เต้าเจี้ยว
B23	เอี่ยมสมบัติ	กรุงเทพมหานคร	เต้าเจี้ยว
B24	เอี่ยมสมบัติ	กรุงเทพมหานคร	เต้าเจี้ยว
B25	แพร่	แพร่	ถั่วเน่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 3 ต่อ....

Isolate number	ตลาด	จังหวัด	ชนิดของถั่วเหลืองหมัก
B26	แพร่	แพร่	ถั่วเน่า
B27	แพร่	แพร่	ถั่วเน่า
B28	แพร่	แพร่	ถั่วเน่า
B29	แพร่	แพร่	ถั่วเน่า
B30	แพร่	แพร่	ถั่วเน่า
B31	แพร่	แพร่	ถั่วเน่า
B32	บุญศิริ	สมุทรปราการ	เต้าหู้ยี้
B33	บุญศิริ	สมุทรปราการ	เต้าหู้ยี้
B34	พระโขนง	กรุงเทพมหานคร	เต้าหู้ยี้
B35	พระโขนง	กรุงเทพมหานคร	เต้าหู้ยี้
B36	พร้อมมิตร	สมุทรปราการ	เต้าหู้ยี้
B37	พร้อมมิตร	สมุทรปราการ	เต้าหู้ยี้
B38	อุดมเดช	สมุทรปราการ	เต้าหู้ยี้
B39	อุดมเดช	สมุทรปราการ	เต้าหู้ยี้
B40	อ่อนนุช	กรุงเทพมหานคร	เต้าหู้ยี้
B41	อ่อนนุช	กรุงเทพมหานคร	เต้าหู้ยี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 3 ต่อ....

Isolate number	ตลาด	จังหวัด	ชนิดของถั่วเหลืองหมัก
B42	อ่อนนุช	กรุงเทพมหานคร	เต้าหู้ยี้
B43	อ่อนนุช	กรุงเทพมหานคร	เต้าหู้ยี้
B44	บุญศิริ	สมุทรปราการ	เต้าเจี้ยว
B45	บุญศิริ	สมุทรปราการ	เต้าเจี้ยว
B46	พระโขนง	กรุงเทพมหานคร	เต้าเจี้ยว
B47	พระโขนง	กรุงเทพมหานคร	เต้าเจี้ยว
B48	อ่อนนุช	กรุงเทพมหานคร	เต้าเจี้ยว
B49	อ่อนนุช	กรุงเทพมหานคร	เต้าเจี้ยว
B50	พร้อมมิตร	สมุทรปราการ	เต้าเจี้ยว
B51	พร้อมมิตร	สมุทรปราการ	เต้าเจี้ยว
B52	บางนา	กรุงเทพมหานคร	เต้าเจี้ยว
B53	บางนา	กรุงเทพมหานคร	เต้าเจี้ยว
B54	ทุ่งโฮ้ง	แพร่	ถั่วเน่า
B55	ทุ่งโฮ้ง	แพร่	ถั่วเน่า
B56	ป่าแดง	แพร่	ถั่วเน่า
B57	ป่าแดง	แพร่	ถั่วเน่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 3 ต่อ....

Isolate number	ตลาด	จังหวัด	ชนิดของถั่วเหลืองหมัก
B58	อรทัย	แพร่	ถั่วเน่า
B59	อรทัย	แพร่	ถั่วเน่า
B60	เทศบาลเมืองแพร่	แพร่	ถั่วเน่า
B61	เทศบาลเมืองแพร่	แพร่	ถั่วเน่า
B62	ลำปาง	ลำปาง	ถั่วเน่า
B63	ลำปาง	ลำปาง	ถั่วเน่า

4.2 การบ่งชี้ชนิดของเชื้อโดยวิธีทางชีวเคมี

จากผลการทดสอบทางชีวเคมี ดังแสดงผลตามตารางที่ 4 มีเชื้อทั้งหมด 6 ไอโซเลต ที่บ่งชี้ชนิดแล้วว่าเป็น *B. subtilis* ได้แก่ หมายเลขไอโซเลต B2, B18, B21, B22, B23 และ B29 (ตามวิธีทดสอบของ Norris, et al., 1973 (ภาคผนวก ข)) โดยเชื้อดังกล่าวให้ผลบวกกับ catalase test, Voges Proskauer test, ความสามารถในการย่อยแป้ง และไม่เจริญในสภาพไม่มีอากาศ โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ คนึงกานต์ และ อัญชลี (2543) พบว่าหลังจากทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญในการหมัก คือ *Bacillus spp.* จากถั่วเน่าทางภาคเหนือได้เชื้อทั้งหมด 82 ไอโซเลต และเมื่อนำมาทดสอบทางชีวเคมีเพื่อคัดเลือกเฉพาะ *B. subtilis* ได้ 39 ไอโซเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างสปอร์

Isolate number	Catalase	Voges Proskauer	Growth in anerobic	Hydrolysis of starch
B1	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B2	+	+	-	+
B3	-	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B4	+	-	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B5	+	-	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B6	+	-	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B7	+	-	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B8	+	-	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B9	+	-	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B10	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B11	+	-	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B12	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B13	-	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B14	-	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B15	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B16	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B17	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B18	+	+	-	+
B19	-	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B20	+	-	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B21	+	+	-	+
B22	+	+	-	+
B23	+	+	-	+
B24	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B25	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B26	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 4 ต่อ...

Isolate number	Catalase	Voges Proskauer	Growth in anerobic	Hydrolysis of starch
B27	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B28	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B29	+	+	-	+
B30	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B31	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B32	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B33	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B34	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B35	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B36	+	-	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B37	+	-	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B38	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B39	+	-	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B40	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B41	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B42	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B43	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B44	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B45	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B46	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B47	+	-	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B48	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B49	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B50	-	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B51	+	-	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B52	+	-	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 4 ต่อ...

Isolate number	Catalase	Voges Proskauer	Growth in anerobic	Hydrolysis of starch
B53	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B54	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B55	+	-	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B56	-	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B57	-	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B58	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B59	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B60	+	+	+	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B61	+	-	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B62	+	-	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ
B63	+	-	ไม่ได้ทดสอบต่อ	ไม่ได้ทดสอบต่อ

Catalase ผล + หมายถึง เกิดฟองก๊าซ

ผล - หมายถึง ไม่เกิดฟองก๊าซ

Voges Proskauer ผล + หมายถึง เกิดสีแดง

ผล - หมายถึง ไม่เปลี่ยนแปลง

Growth in anerobic ผล + หมายถึง เจริญในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

ผล - หมายถึง ไม่เจริญในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

Hydrolysis of starch ผล + หมายถึง สามารถย่อยแป้งได้

ผล - หมายถึง ไม่สามารถย่อยแป้งได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การคัดเลือกเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสมากที่สุด

นำไอโซเลตที่ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีแล้วว่าเป็น *B. subtilis* เลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 15 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 6000 รอบต่อนาที แล้วแยกเอาส่วนใสเก็บเป็น crude enzyme หลังจากนั้นหยด crude enzyme ของเชื้อแต่ละหมายเลขไอโซเลตลงบน skimmilk agar แล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยแต่ละไอโซเลตทำการทดลองละ 3 ซ้ำ แล้วนำมาวัดขนาดวงใสได้ผลดังรูปที่ 5 และรูปที่ 6 และตารางที่ 8 และตารางที่ 9 (ภาคผนวก จ) จากรูปที่ 5 จะเห็นว่าไอโซเลต B2 ให้ขนาดวงใสกว้างที่สุด เพราะฉะนั้นเชื้อ *B. subtilis* 2 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสสูงที่สุด จึงเลือกไอโซเลตนี้เพียงไอโซเลตเดียว เพื่อทำการทดลองในขั้นต่อไป

4.4 การวัดการเจริญเติบโตและความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *Bacillus subtilis*

เมื่อนำ *B. subtilis* 2 มาเลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที มาวัดความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ทุก ๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์จากการวัดขนาดวงใสของเอนไซม์โปรติเอสบน skimmilk agar พบว่า การเจริญของเชื้อในอาหาร NB มีค่าเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงชั่วโมงที่ 12 ค่าที่ได้จึงเริ่มคงที่หลังจากนั้นการเจริญจึงค่อย ๆ ลดลง ดังรูปที่ 7 ตารางที่ 11 (ภาคผนวก จ) และเมื่อวัดขนาดวงใสของเอนไซม์พบว่าที่ชั่วโมงที่ 12 ให้ขนาดของวงใสมากที่สุด ดังรูปที่ 7 และตารางที่ 10 (ภาคผนวก จ) จึงนำเอา Crude enzyme ในชั่วโมงที่ 12 นี้ไปทดสอบในขั้นต่อไป

เมื่อนำมาดูเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ภาคผนวก ฉ) ใน 12 ชั่วโมงแรกนั้นเป็นเซลล์ปกติ ในช่วง 16-24 ชั่วโมงพบ sporangium และสปอร์เป็นส่วนมาก ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบจากการเติบโตและการสร้างเอนไซม์โปรติเอส พบว่าปริมาณเอนไซม์ขึ้นอยู่ กับการเติบโตของแบคทีเรีย คือ เมื่อเชื้อเริ่มเจริญ (log phase) ก็จะสร้างเอนไซม์ออกมาด้วย แต่เมื่อถึงช่วงที่เชื้อสร้างสปอร์(stationary phase) ปริมาณการสร้างเอนไซม์ก็จะลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ คนึงกานต์ และอัญชลี (2543) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะแปรผันตามลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ คือมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในช่วงระยะเวลา 24 ชั่วโมงแรกสูงที่สุด โดยสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 การทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จาก *B. subtilis* ไอโซเลต 2 และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

4.5.1 การหา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

ในการทดสอบการหา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ได้ผลดังรูปที่ 8 ตาราง 12 (ภาคผนวก จ) พบว่าในบัฟเฟอร์ Carbonate-bicarbonate buffer pH 9 เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุด โดยเมื่อตรวจกิจกรรมเอนไซม์โดยวิธีของ Wang and Hesseltine, 1965 มีค่าเท่ากับ 24.024 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อใช้บัฟเฟอร์ชนิดอื่นคือ Citrate-Phosphate Buffer ที่ pH 5.0, 6.0 และ7.0, Phosphate Buffer ที่ pH 7.0, 7.5 และ 8.0, TRIS Buffer ที่pH 8.0 และ 9.0 และ Carbonate-Bicarbonate Buffer ที่ 10.0 ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสมีค่าเท่ากับ 1.276, 8.14, 1.0648, 1.3332, 13.772, 11.792, 1.32, 17.424, 13.464 และ 9.944 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้น จึงเลือก Carbonate-bicarbonate buffer pH 9 เป็นบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์ต่อไป

Horikoshi (1999) ได้รายงานว่า alkaline microorganism ส่วนใหญ่นั้นมี pH ที่เหมาะสมแก่การเจริญเติบโตอยู่ราวๆ pH 10 ซึ่ง pH จะเป็นสิ่งที่ทำให้แยก alkalophilic microorganism ออกจากกันได้เป็นอย่างดีจาก neutrophilic microorganism Horikoshi ยังได้รายงานถึง extracellular alkaline protease พบว่าผลิตได้จาก *B. subtilis* ซึ่งแยกให้บริสุทธิ์ได้จากห้องทดลอง และ alkaline protease สูงเป็นสารที่มีคุณค่าเป็นอันดับต้นๆ ซึ่งใช้เป็นสารทางด้านทำความสะอาดประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ในตลาดโลก และยังแยกได้จาก *Bacillus* เป็นส่วนใหญ่ ในโรงงานอุตสาหกรรมนิยมใช้ *Bacillus* เนื่องจากให้ผลิตภัณฑ์ที่สูงและให้กิจกรรมที่ดี (Joo and Chang, 2004)

ถั่วเหลืองต้มแล้วหมักโดย *Bacillus* sp. จัดเป็นอาหารหมักชนิด อัลคาไลน์ โปรติโอไลติก อาหารหมักกลุ่มนี้ได้แก่ ถั่วเน่าของไทย ไคนีมาของเนปาล หรือแดดดาวาของไนจีเรีย (สถาบันค้นคว้าและผลิตภัณฑ์อาหารมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2527) โดยแบคทีเรียดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมัก กล่าวคือ ผลิตเอนไซม์ย่อยสลาย (proteolytic enzymes) เพื่อย่อยสลายสารอาหารชนิดต่างๆในถั่วเหลืองให้มีลักษณะที่ดีหลายประการ (Hesseltine and Wang, 1980) เอนไซม์โปรติเอสแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท คือ alkaline protease, serine protease และ neutral protease และจากผลการทดลองหาความสัมพันธ์ระหว่าง pH ต่าง ๆ และอุณหภูมิต่าง ๆ เพื่อผลิตเอนไซม์โปรติเอสให้ได้ค่ากิจกรรมสูงที่สุดนั้นพบว่า *B. subtilis* 2 นั้นผลิตเอนไซม์โปรติเอสแบบ alkaline protease

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nora และคณะ (2005) ได้มีการรายงานว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสของ *Bacillus subtilis* 72BP30 ที่สกัดได้มาจากถั่วเหลืองได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ 0 ชั่วโมงมีค่ากิจกรรมประมาณ 25 ยูนิตต่อมิลลิลิตรที่ 25 ชั่วโมงได้ค่ากิจกรรมประมาณ 40 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนที่ 50 ชั่วโมงได้ค่ากิจกรรม 60 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และจะได้ค่าสูงสุดเมื่อเวลาผ่านไป 70 ชั่วโมง ได้ 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

Joo and Chang (2004) ได้รายงานว่า pH ที่ทำการทดลองนั้นอยู่ประมาณ pH 11 และกิจกรรมของเอนไซม์นั้นลดลงที่ pH 12 ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรดด่างที่สูงที่สุดของความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมของ alkaline protease และจะเสถียรครอบคลุมระหว่างช่วง pH 4.5-12 ภายใต้การบ่มไปแล้ว 72 ชั่วโมง

คนึงกานต์ และ อัญชลี (2543) ได้รายงานว่า pH ที่เหมาะสมที่สุดต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ที่ pH 6.5 ซึ่งเมื่อเทียบกับการวิจัยนี้แล้วพบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ของการวิจัยนี้ อยู่ที่ pH 9 แสดงว่าเอนไซม์ที่ได้จากการวิจัยนี้มีคุณสมบัติทนด่างได้ดีกว่า

4.5.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

ในการทดสอบที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้คือ 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส (3.7.2) ได้ผลดังแสดงในรูป 9 ตารางที่ 13 (ภาคผนวก จ) พบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นการทำงานของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุด โดยตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธีของ Wang and Hesseltine, 1965 มีค่าเท่ากับ 11.66 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิอื่น คือที่ 30, 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสมีค่าเท่ากับ 5.456, 6.732, 7.436, 6.512, 7.788, 9.988 และ 8.14 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และพบว่าที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสความสามารถในการทำงานของเอนไซม์จะลดลงต่ำสุด คือ 5.192 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่ใช้ในการวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์ต่อไป

Joo and Chang (2004) ได้มีการรายงานเรื่องของอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์โปรติเอสว่า มีค่าอยู่ระหว่าง 60-65 องศาเซลเซียส และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ได้ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คนึงกานต์ และ อัญชลี (2543) ได้รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส มีค่าอยู่ที่ 46 องศาเซลเซียส เป็นภาวะที่เอนไซม์มีกิจกรรมสูงที่สุด ด้วยอุณหภูมิที่เหมาะสมสูง ๆ นั้นทำให้เอนไซม์นั้นมีข้อได้เปรียบคือในอุตสาหกรรมฟอกหนังนั้น หนังสัตว์จะทนที่อุณหภูมิสูง ๆ ได้โดยไม่เสียสภาพ และในอุตสาหกรรมทำความสะอาดอุณหภูมิสูง ๆ จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีนที่อยู่ในหนังสัตว์ได้

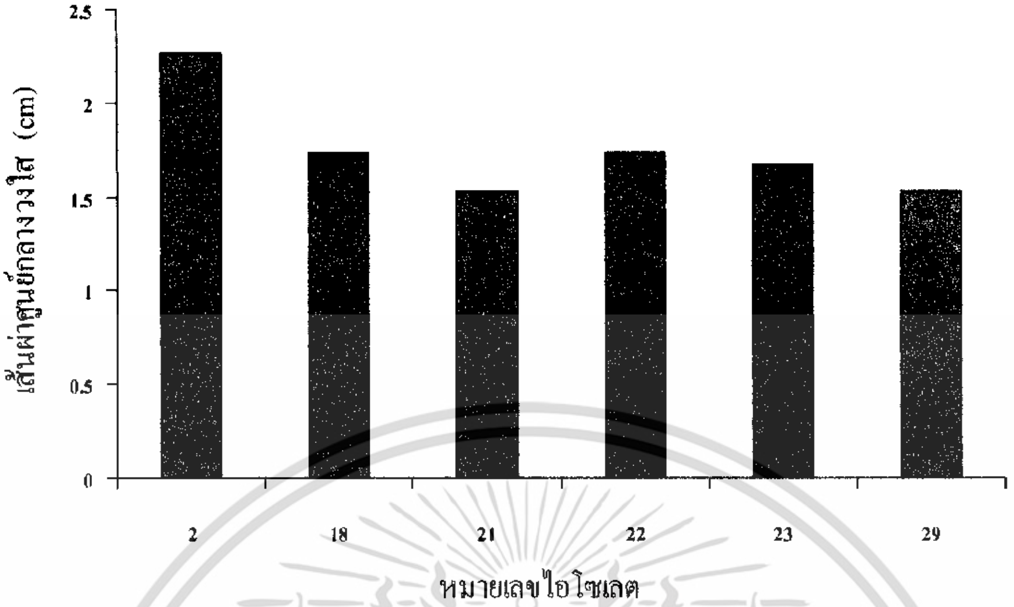
4.5.3 การหาความเสถียรของเอนไซม์

การหาความเสถียรของเอนไซม์โดยการนำเอา Crude enzyme มาบ่มที่อุณหภูมิ 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส (3.7.3) ก่อนตรวจหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธีของ Wang and Hesseltine, 1965 แล้วเก็บเอนไซม์ทุก 10 นาที มาตรวจค่ากิจกรรมของเอนไซม์ดังรูปที่ 10 ตารางที่ 14 (ภาคผนวก จ) พบว่าเมื่อบ่ม Crude enzyme ที่ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความสามารถในการทำงานลดลงเหลือ 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที การทำงานลดลงเหลือ 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 40 นาที เมื่อเอนไซม์อยู่ที่ 40 องศาเซลเซียส การทำงานลดลงเหลือ 40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 50 นาที เมื่อเอนไซม์อยู่ที่ 50 องศาเซลเซียส และ การทำงานลดลงเหลือ 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที เมื่อเอนไซม์อยู่ที่ 70 องศาเซลเซียส

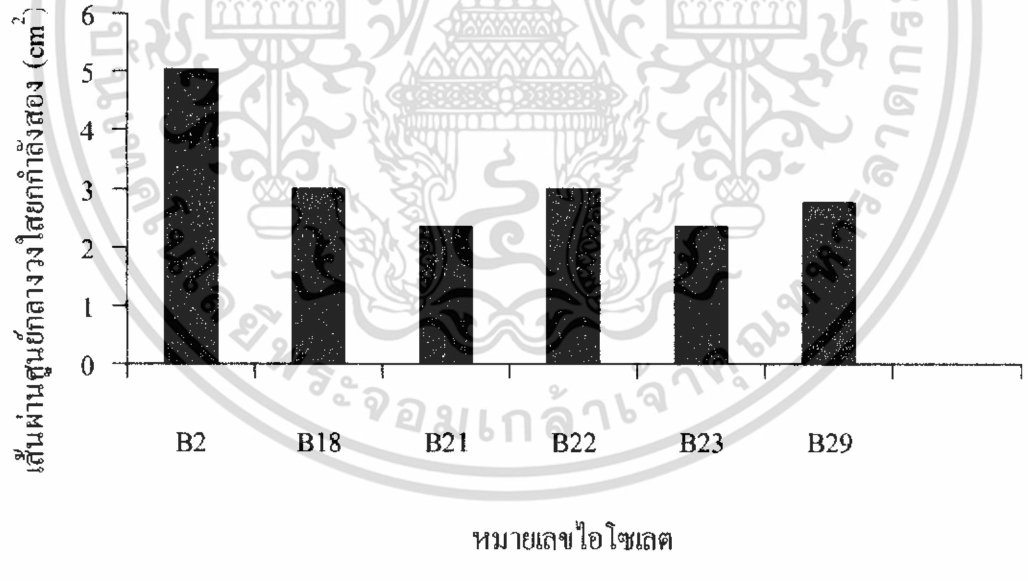
คนึงกานต์ และ อัญชลี (2543) ได้รายงานว่าด้านความเสถียรพบว่า ที่ 40 องศาเซลเซียส เอนไซม์ยังคงมีความสามารถในการทำงาน ที่ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะมีความสามารถในการทำงานลดลงครึ่งหนึ่ง และที่ 60 องศาเซลเซียสนั้น เอนไซม์จะเสียสภาพในการทำงาน

Joo and Chang (2004) ได้รายงานเกี่ยวกับเรื่องของอุณหภูมิที่เสถียรคือเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาทีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะมีค่ากิจกรรมที่มากที่สุดและจะเริ่มลดลงเมื่ออุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยนี้แล้ว ที่เวลาเท่ากันคือ 30 นาที เอนไซม์ในงานวิจัยนี้สามารถทนอุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส ในขณะที่ความสามารถในการทำงานลดลงเหลือเพียง 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถ้าจะนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรมที่ต้องใช้อุณหภูมิสูง จะมีประโยชน์อย่างยิ่ง เพราะเอนไซม์สามารถทนอุณหภูมิสูงได้นานโดยที่ยังไม่เสียสภาพเลย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

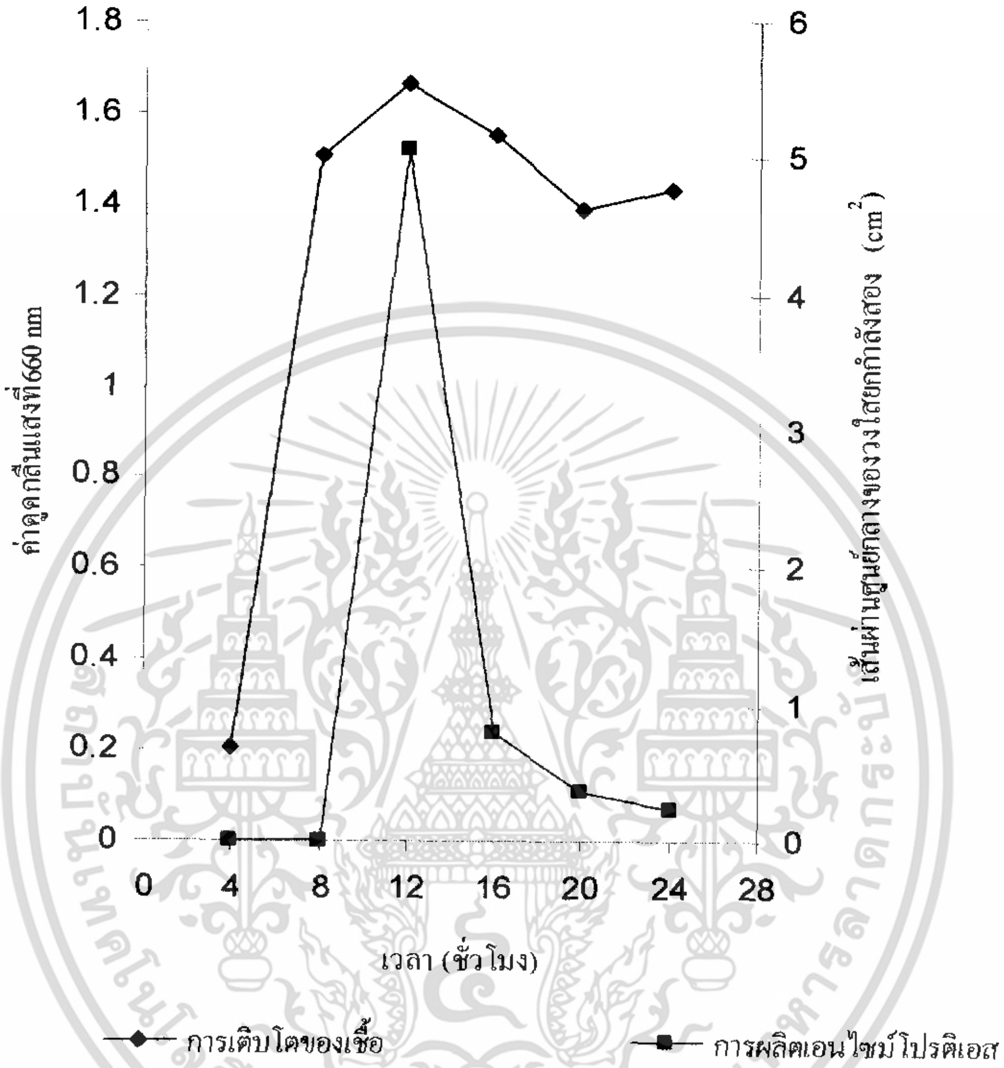


รูปที่ 5 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสบน skimmilk agar ของ *B. subtilis* แต่ละไอโซเลต



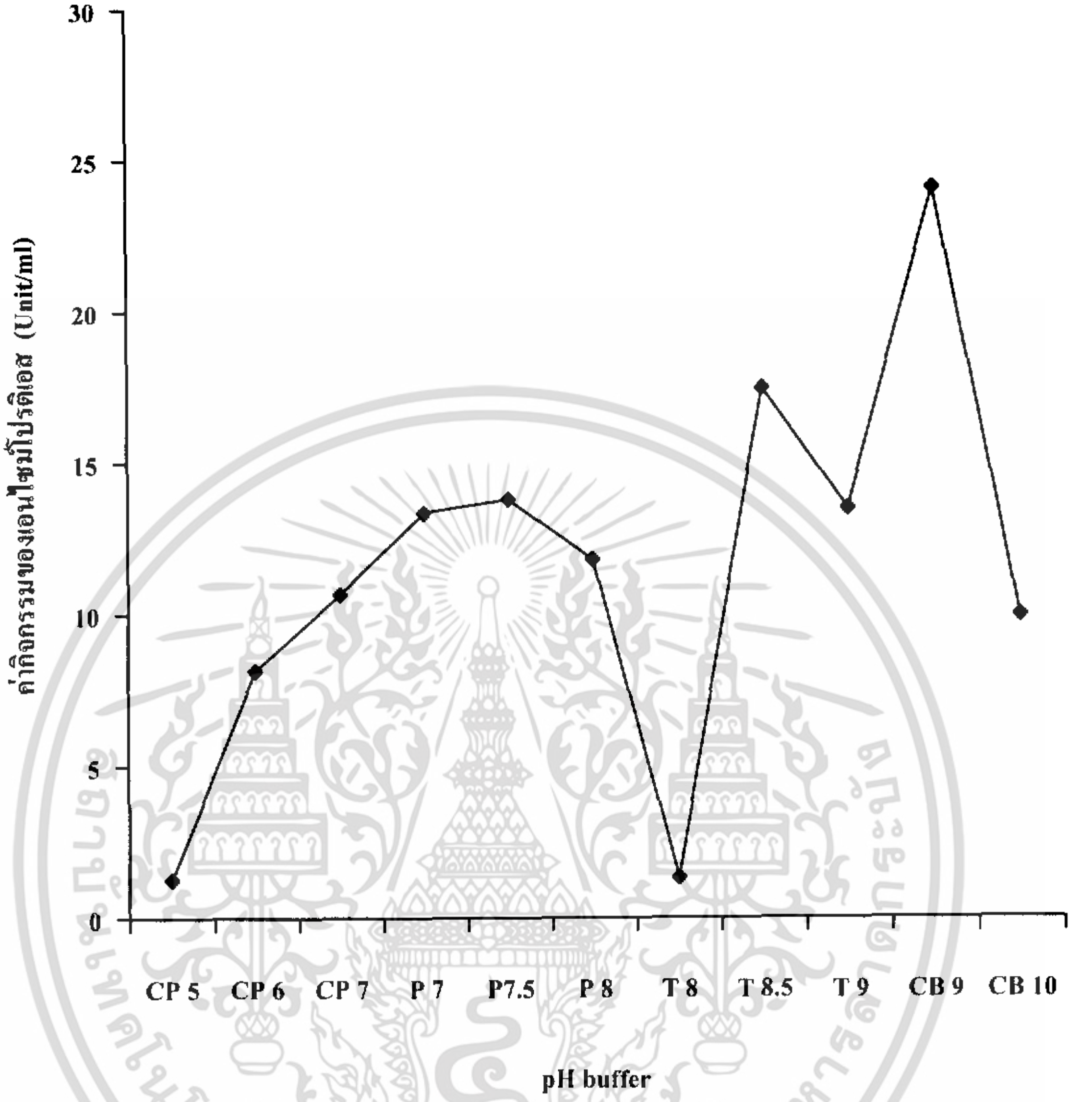
รูปที่ 6 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสบน skimmilk agar กำลังสองของ *B. subtilis* แต่ละไอโซเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



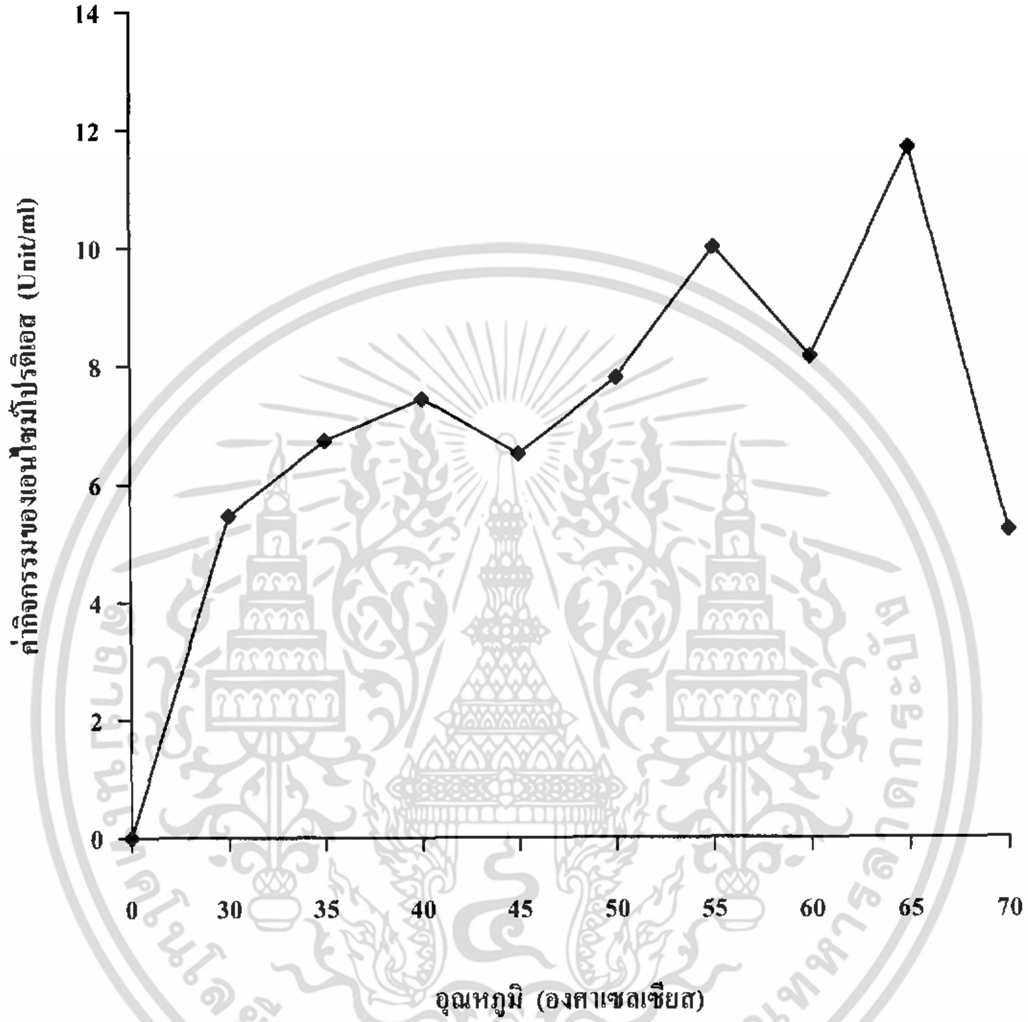
รูปที่ 7 แสดงการเติบโตและความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของเชื้อ *B. subtilis* 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



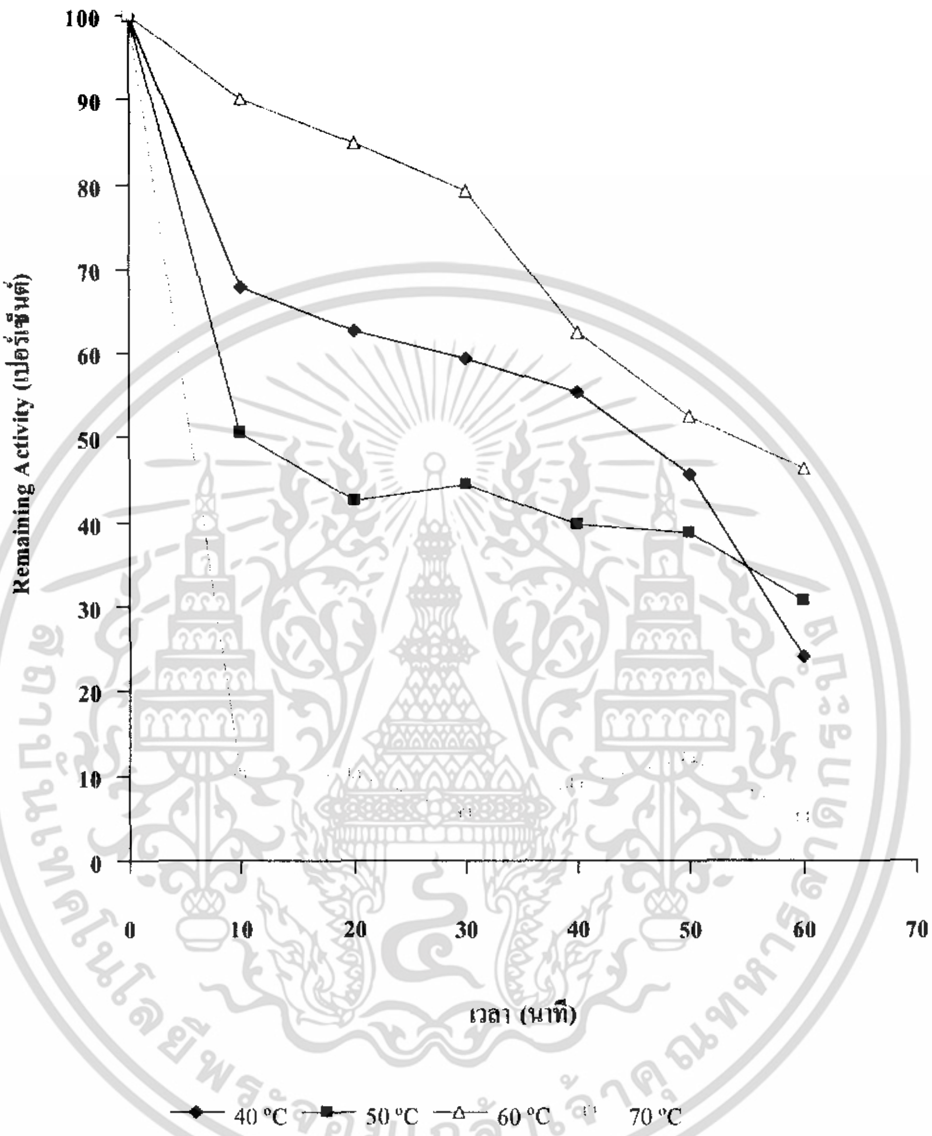
รูปที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH ต่าง ๆของบัฟเฟอร์ และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส จาก *B. subtilis* 2 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (CP 5 : Citrate-Phosphate Buffer pH 5.0, CP 6 : Citrate-Phosphate Buffer pH 6.0, CP 7 : Citrate-Phosphate Buffer pH 7.0, P 7 : Phosphate Buffer pH 7.0, P 7.5 : Phosphate Buffer pH 7.5, P 8 : Phosphate Buffer pH 8.0, T 8 : TRIS buffer pH 8.0, T 8.5 : TRIS buffer pH 8.5, T 9 : TRIS buffer pH 9.0, CB 9 Carbonate-Bicarbonate Buffer pH 9.0 และ CB 10 Carbonate-Bicarbonate Buffer pH 10.0)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 9 แสดงความสัมพันธ์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส จาก *B. subtilis* 2 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ที่เวลาต่าง ๆ กัน และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส จาก *B. subtilis* 2 เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการทำการทดลองเมื่อนำ crude enzyme ที่สกัดได้จาก *Bacillus subtilis* 2 มาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของกิจกรรมของเอนไซม์ และจากการทำการทดลองพบว่า

1.ในการทดสอบการหา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าในบัฟเฟอร์ Carbonate-bicarbonate buffer pH 9 เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุด โดยเมื่อตรวจกิจกรรมเอนไซม์โดยวิธีของ Wang and Hesseltine, 1965 มีค่าเท่ากับ 24.024 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

2. ในการทดสอบที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้คือ 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นการทำงานของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุด โดยตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธีของ Wang and Hesseltine, 1965 มีค่าเท่ากับ 11.66 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และพบว่าที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสความสามารถในการทำงานของเอนไซม์จะลดลงต่ำสุด คือ 5.192 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 65 องศาเซลเซียส

3. การหาความเสถียรของเอนไซม์โดยการนำเอา Crude enzyme มาบ่มที่อุณหภูมิ 40, 50,60 และ 70 องศาเซลเซียส ก่อนตรวจหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โดยวิธีของ Wang and Hesseltine, 1965 แล้วเก็บเอนไซม์ทุก 10 นาที มาตรวจค่ากิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าความเสถียรของเอนไซม์นั้นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจะมีความสมารถในการทำงานอยู่และการทำงานจะลดลงเมื่อถึงอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองนี้อาจจะนำไปใช้ให้เป็นประโยชน์ในด้านต่างๆเช่น

1. ด้านการตัดต่อพันธุกรรม เนื่องจากเอนไซม์ที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถทนอุณหภูมิสูงได้ถึง 60 องศาเซลเซียส และสามารถทน pH ที่เป็นด่างได้ดี แต่กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้ยังน้อยอยู่ ดังนั้นจึงอาจเป็นแนวทางในการทำวิจัยต่อไป โดยอาจนำพันธุกรรมจาก *B. subtilis* 2 นี้ซึ่งสามารถทนอุณหภูมิได้สูง และทนด่างได้ดี นำมาตัดต่อพันธุกรรมเข้ากับพันธุกรรมของเชื้ออื่น ที่สามารถให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่สูงกว่า เพื่อให้ได้เชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ โปรติเอสที่มีประสิทธิภาพสูง และเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมที่ต้องใช้ความร้อน และด่างในกระบวนการผลิตต่อไป

2. เนื่องจากเอนไซม์ที่ได้จากการวิจัยนี้เป็นเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียซึ่งแยกได้จากอาหาร จึงไม่มี Toxin และไม่เป็นอันตรายแก่ผู้บริโภค ดังนั้นจึงเหมาะที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมทางด้านอาหารต่าง ๆ เช่น ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เป็นต้น เนื่องจากคุณสมบัติของเอนไซม์ที่สามารถทนความร้อนได้ดีนั้นอาจเป็นประโยชน์ในขั้นตอนกระบวนการผลิตที่ต้องใช้ความร้อนซึ่งเอนไซม์ที่ทนร้อนนั้นจะไม่เสียสภาพไปก่อนที่กระบวนการผลิตจะเสร็จสิ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

เกรียงศักดิ์ ไชโรจน์, 2531. การวิเคราะห์สารให้กลิ่นของถั่วเน่า. เชียงใหม่ : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ และ อัญชลี อ่อนเจริญ. 2543. การศึกษาเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสในการหมักถั่วเหลืองแบบพื้นบ้านในภาคเหนือ. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2546. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่3. กรุงเทพฯ: เท็กซ์ แอนด์เจอร์นัล พับลิเคชั่น.

ปรานี อ่านเปรื่อง. 2533. เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่3. กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร. 2543. การศึกษาถั่วหมักอาหารพื้นบ้านในภาคเหนือ. วิทยาสาร. (36): 1-8.

สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร. 2527. ถั่วเหลืองและการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นวพร ล้ำเลิศกุล และ สุพจน์ บุญแรง. 2544. การ ปรับปรุงกรรมวิธีการผลิตถั่วเน่า : อาหารหมักพื้นบ้านภาคเหนือ. รายงานปัญหาพิเศษ วิทยาศาสตรบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อรุณศรี ลีจีรจำเนียร และ J.D. OWENS. 2544. การพัฒนาระบบบัฟเฟอร์ของคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อควบคุมค่าพีเอชในถั่วเหลืองหมัก. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม.

อารี ฤทธิบูรณ์. 2548. ปฏิบัติการเทคโนโลยีของเอนไซม์. กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Bidochka, M.J. and Khachatourian, G.G. 1987. Purification and properties of an extracellular protease produced by the entompathogenic fungus Beauvria bassiana. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1679-1684.

Chantawannakul P., Oncharoen A., Klanbut K., Chukeatirote E. and Lumyong S. 2002. Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally Fermented soybean in Northern Thailand. *Science Asia*. 28 : 241-245.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cowan D.A., Smolenski K.A., Deniel R.M. and Morgan H.W. 1987. An extremely thermostable extracellular proteinase from a strain of the archaebacterium *Desulfurucoccus* growing of 88°C. *Biochem.* 247: 121-133.

Horikoshi, K. 1999. Alkaliphiles : Some Applications of their products for Biotechnology. Microbiol. *Mol. Biol. Rev.* 63: 735-750

Joo, H.S. and Chang, C.S. 2004. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 growth on soybean meal : optimization and some properties. *Process Biochemistry* .40: 1263-1270.

Bendnar, E.M. 1998. Industrial enzyme and their application. New York : John Wiley and sons, Inc.

Lu, S.F. and Chang, P.P. 1996. A thermostable neutral protease from *Pseudomonas aeruginosa* CCRC 15541. *Lett. Appl. Microbiol.* 22: 5-9.

Omafuvbe B.O., Abiose, S.H. and Shonukan, O. O. 2002. Fermentation of a soybean (*Glycine max*) for soy-daddawa production by starter cultures of *Bacillus*. *Food Microbiol.* 19 : 561-566.

Patel P., Dodia M. and Singh S.P. 2005. Extracellular alkaline protease from a newly isolates haloalkaliphilic *Bacillus* sp. *Process Biochemistry.* 40: 3569-3575

Patke, D. and Dey, S. 1998. Proteolytic activity from a thermophillic *Streotomyces megasporus*strain SDP4. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 171-174.

Prakasham R.S., Rao CH.S. and Sarma P.N. 2005. Green gram husk an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. In solid state fermentation. *Bioresource technology.* 1-6.

Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S. and Deshp V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspect of microbial protease. *Microbiol. Mol. Biol.* Rev. 62: 597-635.

Santinanalert P., Pattanayaiying S. and Towatana N. 1998. Production of protease from thermophilic and alkalophilic *Bacillus* sp. PS719. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 20(30): 333-345.

Terlabie N.N., Dawson E.S. and Amoaawua W.K. 2006. The comparative ability of four isolates of *Bacillus subtilis* to ferment soybeans into daddawa. *Intt. J. food microbiol.* 106: 145-152.

Wang R., Law R.C.S., and Webb C. 2003. Protease production and Conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. *Process Biochemistry* 40 : 217-227.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

http://web.arrowscientific.com.au/usefulbitsmain.html

http://web.dnfe5.nfe.go.th/ilp/occupation/45302/45302_1.html#

http://web.ku.ac.th

http://web.ku.ac.th/nk40/nk/data/34/nk34k1g2.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. **Nutrient Broth**

peptone	10 g
sodium chloride	5 g
beef extract	5 g
distilled water	1,000 ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2. **Nutrient Agar**

peptone	10 g
sodium chloride	5 g
beef extract	5 g
agar	15 g
distilled water	1,000 ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3. **Skimmilk Agar**

สารละลายที่ 1

Agar	1.3	g
distilled water	70	ml

นำไปต้มจนวุ้นละลาย

สารละลายที่ 2

Skimmilk	10	g
distilled water	30	ml

ผสมสารละลายที่ 1 และ 2 อย่างรวดเร็ว และเติม sodium azide 1 ml (0.02%)
จากนั้นเทใส่จานเพาะเชื้อ โดยใส่จานละ 25 ml
จะได้ความหนาของ skimmilk ager ที่เท่ากันทุกจาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Starch Agar

Potato starch	1	g
ใส่น้ำกลั่นที่เย็น	10	ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

ทำให้เย็นถึง 45 องศาเซลเซียส แล้วเท plate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การทดสอบทางชีวเคมี

Simplified key for the tentative identification of typical strains of *Bacillus* species (Norris, et al., 1973)

1. Catalase : positive 2
2. Voges-Proskauer : positive 3
   Negative 10
3. Growth in anaerobic agar : positive 4
   Negative 9
4. Growth at 50 °C : positive 5
   Negative 6
5. Growth in 7% Nacl : positive .... *B. licheniformis*
   Negative .... *B. coagulans*
6. Acid and gas from glucose (inorganic N) : positive ....*B. polymyxa*
   Negative 7
7. Reduction of nitrate (NO_3) to NO_2 : positive 8
   Negative ....*B. alvei*
8. Parasporal body in sporangium : positive ....*B. thuringensis*
   Negative ....*B. cereus*
9. Hydrolysis of starch : positive ....*B.subtiliss*
   Negative ....*B. pumilus*
10. Growth at 65 °C : positive ....*B. stearothermophilus*
    Negative 11
11. Hydrolysis of starch : positive 12
    Negative 15
12. Acid and gas from glucose (inorganic N) : positive ....*B. macerans*
    Negative 13
13. Width of rod 1.0 µm or greater : psitive ....*B. megaterium*
    Negative 14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14. pH in V-P broth < 6.0 : positive ....*B. circulans*

Negative ....*B. firmus*

15. Growth in anaerobic agar : positive .... *B. laterosporus*

Negative ....… 16

16. Acid from glucose (inorganic N) : positive ....*B. brevis*

Negative ....*B. sphaericus*

17. Growth at 65 °C : positive ....*B. tearothermophilus*

Negative 18

18. Decomposition of casein : positive ....*B. larvae*

Negative 19

19. Parasporal body in sporangium : positive ....*B.popilliae*

Negative .... *B. lentimorbus*

การทดสอบทางชีวเคมีเพื่อบ่งชี้ว่าเป็น *B.subtilis* ใช้การทดสอบดังต่อไปนี้

1. Catalase : positive
2. Voges-Proskauer : positive
3. Growth in anaerobic agar : Negative
4. Hydrolysis of starch : positive

โดยมีวิธีทดสอบคือ

1. Catalase test

ใช้ 10% hydrogen peroxide 0.5 ml

1.1 เชื้อที่เจริญบน NA slant 1-2 วัน มาทดสอบโดยใส่ 10% H_2O_2 ปริมาตร 0.5 ml ลงไป

1.2 สังเกตการเกิดก๊าซ ถ้าไม่มีฟองก๊าซ ควรทดสอบซ้ำด้วยการใส่เชื้อจาก chocolate agar

2. Voges-Proskauer Reaction

เป็นการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการใช้น้ำตาลกลูโคส แล้วให้ผลเป็น acetyl-methylcarbinol

2.1 ใช้ VP-medium ใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 ml มาเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

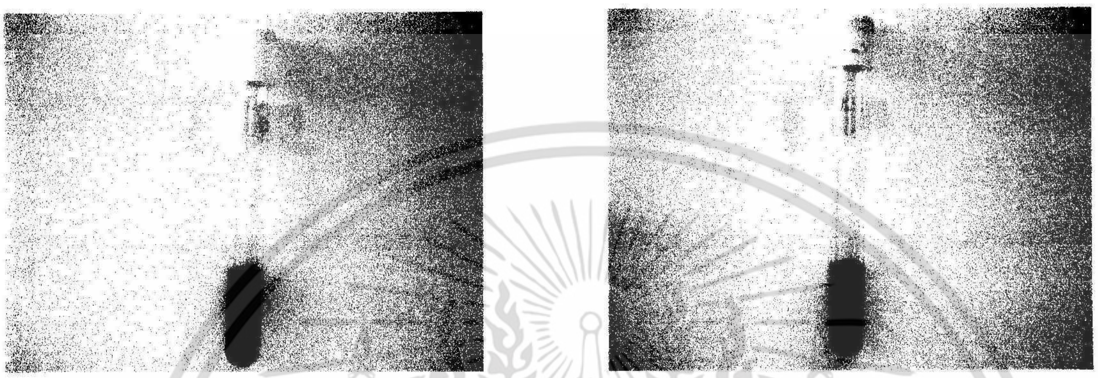
2.2 ทดสอบ acetylmethylcarbinol production โดยใช้ปิเปตดูดเชื้อจาก VP-medium มาใส่หลอดทดลองปริมาณ 1 มิลลิลิตร

2.3 เติม 5% alpha-naphthol ใน absolute alcohol ลงในหลอด 0.6 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 เติม 40% potassium hydroxide-creatine solution 0.2 มิลลิลิตร

2.5 เขย่าหลอดแรง ๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ 10-20 นาที ถ้ามี acetyl-methylcarbinol อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะปรากฏสีแดงส้มสดขึ้นที่บริเวณผิวหน้าของอาหารก่อน และที่สุดจะแดงไปทั่วทั้งหลอด



รูปที่ 11 แสดงการมี acetyl-methylcarbinol อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วจะปรากฏสีแดงส้มสดขึ้นที่บริเวณผิวหน้าของอาหารก่อน และที่สุดจะแดงไปทั่วทั้งหลอด

3. Growth in anaerobic agar

3.1 Inoculate เชื้อลงบนอาหาร NA 1 ชุด และนำไปบ่มใน anaerobic jar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อีกชุดหนึ่งเป็นชุดการทดลองควบคุมโดยบ่มในสภาพที่มีอากาศ

3.2 สังเกตว่าเป็นสภาพที่ไร้ออกซิเจนแล้วโดยใช้ Redox indicator คือ Resazlin เป็นตัวบ่งชี้สภาพไร้ออกซิเจน โดยถ้ามีออกซิเจนจะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีชมพู ถ้าไม่มีออกซิเจนจะเป็นสีขาว

3.3 หลังจากบ่มเชื้อใน anaerobic jar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจดูการเจริญ โดยเปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม

4. Hydrolysis of starch

2.6 เพาะเชื้อลงจานเพาะเชื้อที่มี starch agar (ภาคผนวก ก) ทำ 2 ซ้ำ

2.7 นำไปบมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาหยดสารละลายไอโอดีน

2.8 ตรวจผลโดยสังเกตการเกิดวงใสรอบบริเวณที่เพาะเชื้อ แสดงว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์มาย่อยแป้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
การเตรียมสารเคมีและบัฟเฟอร์

1. สารละลายเคซีน ความเข้มข้นร้อยละ 1 ละลายในบัฟเฟอร์ แต่ละพีเอช

    ละลายเคซีน 1 กรัม ในน้ำกลั่น 99 มิลลิลิตร

2. สารละลายไตรคลอโรแอซิติก (trichloroacetic acid) ความเข้มข้นร้อยละ 5

    ละลาย trichloroacetic acid 5 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 95 มิลลิลิตร

3. บัฟเฟอร์

3.1 Citrate-Phosphate Buffer

ทำการเตรียมสารละลาย ก และ ข โดยการทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการและนำมาผสมกันให้ได้พีเอชที่ต้องการใช้ ดังนี้

pH 5.0 สารละลาย ก 24.3 มิลลิลิตร
สารละลาย ข 25.7 มิลลิลิตร
pH 6.0 สารละลาย ก 17.9 มิลลิลิตร
สารละลาย ข 32.1 มิลลิลิตร
pH 7.0 สารละลาย ก 6.5 มิลลิลิตร
สารละลาย ข 43.6 มิลลิลิตร

จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

สารละลาย ก : ทำการละลาย Citric acid ปริมาณ 19.21 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

สารละลาย ข : Dibasic sodium phosphate (ทำการละลาย $Na_2.HPO_4.7H_2O$ ปริมาณ 53.65 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

3.2 Phosphate Buffer

ทำการเตรียมสารละลาย ก และ ข โดยการทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการและนำมาผสมกันให้ได้พีเอชที่ต้องการใช้ ดังนี้

pH 7.0 สารละลาย ก 39.0 มิลลิลิตร
สารละลาย ข 61.0 มิลลิลิตร
pH 7.5 สารละลาย ก 16.0 มิลลิลิตร
สารละลาย ข 84.0 มิลลิลิตร
pH 8.0 สารละลาย ก 5.3 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลาย ข 94.7 มิลลิลิตร

จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตร

สารละลาย ก : สารละลายของโมโนเบสิก โซเดียมฟอสเฟต (ทำการละลาย NaH_2PO_4 ปริมาณ 27.8 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย ข : สารละลายของไดเบสิก โซเดียมฟอสเฟต ทำการละลาย $Na_2HPO_4.7H_2O$ ปริมาณ 53.65 กรัม หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ ปริมาณ 71.7 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

3.3 TRIS Buffer

ทำการเตรียมสารละลาย ก และ ข โดยการทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ และนำมาผสมกันให้ได้พีเอชที่ต้องการใช้ ดังนี้

pH 8.0 สารละลาย ก 50.0 มิลลิลิตร

สารละลาย ข 26.8 มิลลิลิตร

pH 9.0 สารละลาย ก 50.0 มิลลิลิตร

สารละลาย ข 5.0 มิลลิลิตร

จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตร

สารละลาย ก : ทำการละลาย tris(hydroxyl methyl)aminomethane ปริมาณ 24.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

สารละลาย ข : 0.2 M HCl

3.4 Carbonate-Bicarbonate Buffer

ทำการเตรียมสารละลาย ก และ ข โดยการทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ และนำมาผสมกันให้ได้พีเอชที่ต้องการใช้ ดังนี้

pH 9.0 สารละลาย ก 2.0 มิลลิลิตร

สารละลาย ข 48.0 มิลลิลิตร

pH 10.0 สารละลาย ก 27.5 มิลลิลิตร

สารละลาย ข 22.5 มิลลิลิตร

จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตร

สารละลาย ก : ทำการละลาย anhydrous sodium carbonate ปริมาณ 21.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

สารละลาย ข : ทำการละลาย sodium bicarbonate ปริมาณ 16.8 กรัมในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. โซเดียมคาร์บอเนต 0.4 โมลาร์

เตรียมโดยใช้สูตร mole = g / M.W.

g คือ โซเดียมคาร์บอเนตชั่งในหน่วยกรัม

M.W คือ มวลโมเลกุลของโซเดียมคาร์บอเนต 105.99

นำมาแทนค่าตามสูตร mole = g / M.W.

$$g = mole \times M.W.$$

$$g = 0.4 \times 105.99$$

$$= 42.39$$

ดังนั้นชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 42.39 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

5. สารละลาย Folin – Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 2 นอร์มัล นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1 (ควรเตรียมเมื่อต้องการใช้สาร)

6. สารละลาย NaOH 0.2 M และ สารละลาย HCl 0.2 M เพื่อปรับ pH

7. สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโนไทโรซีน

ทำการละลายกรดอะมิโนไทโรซีนปริมาณ 0.1 กรัม ด้วย NaOH เข้มข้น 0.3 นอร์มัล ปริมาณเล็กน้อยจากนี้ ละลายด้วยน้ำและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในฟลาสก์ปรับปริมาตร จะได้สารละลายความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

Wang และ Hesseltine method

1. pH Optimum

1) นำสารละลายเคซีนที่ละลายในบัฟเฟอร์ 11 ชนิด ซึ่งได้แก่

Citrate-phosphate buffer	pH 5.0, 6.0, และ 7.0
Phosphate buffer	pH 7.0, 7.5, และ 8.0
TRIS buffer	pH 8.0, 8.5, และ 9.0
Carbonate-bicarbonate buffer	pH 9.0, และ 10

ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง และเติมสารเอนไซม์ที่เจือจางในความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

2) เติมสารละลายกรดไตรคลอโรแอซิติก ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้น นำไปกรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1

3) นำส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองที่มีโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร

4) เติมสารละลาย Folin – Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมสารให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

5) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐาน

6) ทำหลอดคุมโดยการเติมสารละลายกรดไตรคลอโรแอซิติก ปริมาตร 3 มิลลิลิตรก่อน จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร และสารละลายเคซีน 1 มิลลิลิตร สำหรับแบลงค์ให้ใช้น้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร แทนสารละลายเอนไซม์

7) ทำกราฟมาตรฐานของกรดอะมิโนไทโรซีนโดยนำสารละลายมาตรฐานที่เตรียมไว้ (ภาคผนวก ค) ที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำกรดอะมิโนไทโรซีนที่ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ได้ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0, 20, 40 ,60 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณหากิจกรรมของกราฟมาตรฐานของกรดอะมิโนไทโรซีน

$$C_1V_1 = C_2 V_2$$

$$100 \times V_1 = 100 \times 10$$

$$V_1 = 10 \text{ ml}$$

หมายเหตุ : C_1 คือ ความเข้มข้นของไทโรซีน, V_1 คือ ปริมาตรที่ต้องการหา, C_2 คือ ความเข้มข้นของไทโรซีนที่ต้องการหา, V_2 คือ ปริมาตรรวม

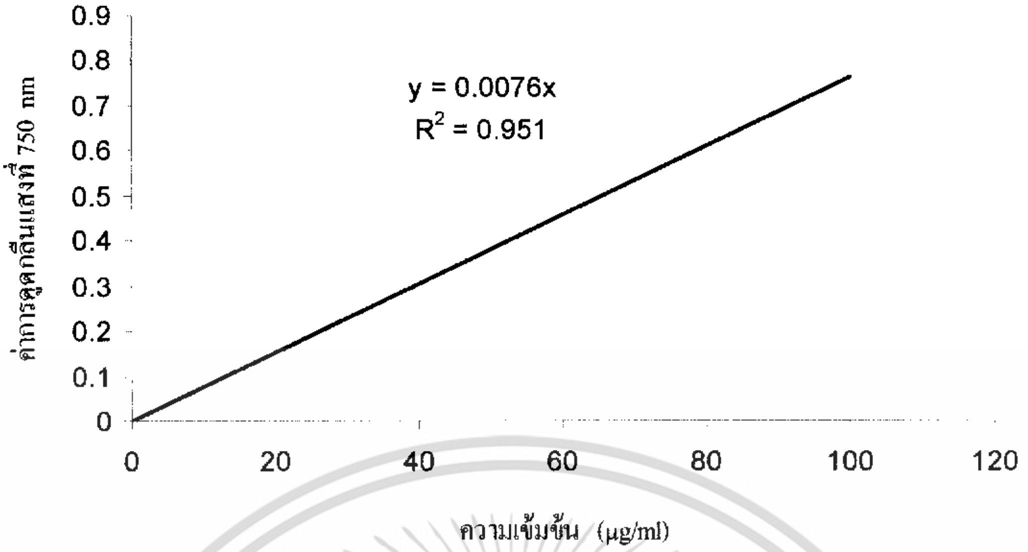
ตารางที่ 5 แสดงอัตราส่วนของสารละลายมาตรฐานไทโรซีนและน้ำกลั่นในการทำกราฟมาตรฐานของกรดอะมิโนไทโรซีน

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไทโรซีน (μg/ml)	ไทโรซีน (ml)	น้ำกลั่น (ml)
100	10	0
80	8	2
60	6	4
40	4	6
20	2	8
0	0	10

ตารางที่ 6 แสดงผลการวัดค่า OD ที่ 750 นาโนเมตร ของสารละลายมาตรฐานไทโรซีน ในการทำกราฟมาตรฐานของกรดอะมิโนไทโรซีน

ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานไทโรซีน (μg/ml)	A_{750}
0	0
20	0.253
40	0.340
60	0.434
80	0.599
100	0.744

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 12 กราฟมาตรฐานปริมาณไทโรซีนที่ 50 องศาเซลเซียส

การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

ที่มาของสูตรที่ใช้ในการคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

จากกราฟมาตรฐานปริมาณไทโรซีนที่ 50 องศาเซลเซียส มีความชัน เท่ากับ 0.0076 ดังนั้น ปริมาณกรดอะมิโนไทโรซีน หาได้จาก

$$y = mx \qquad y : 0.0076\,x$$

$$\text{ปริมาณกรดอะมิโน} = \frac{A_{750}}{0.0076} \ \mu g$$

มวลโมเลกุลของไทโรซีนเท่ากับ 197 ปริมาณกรดอะมิโนที่เกิดขึ้น

$$\frac{A_{750}}{0.0076 \times 197}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่เป็นปริมาณกรดอะมิโนไทโรซีนที่มาจากตัวอย่างเพียง 1 มิลลิลิตร ดังนั้นปริมาณกรดอะมิโนที่เกิดขึ้น คือ

$$\frac{A_{750} \times 1000}{0.0076 \times 197} \quad \mu \text{ mol/ml} \quad \text{หรือ} \quad 668 \times A_{750} \quad \mu \text{ mole/ml}$$

แต่เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาคือ 15 นาที ดังนั้นในเวลา 1 นาทีเกิดกรดอะมิโนขึ้นเท่ากับ

$$\frac{668 \times A_{750}}{15} = 44 \times A_{750} \quad \mu \text{ mol/ml/นาที}$$

1 ยูนิตต่อนาที หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายซับสเทรตให้ได้กรดอะมิโน 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่ทดสอบ

ดังนั้นปริมาณกรดอะมิโนไทโรซีน หาได้จาก

$44 \times A_{750}$ Unit/ml

2. การหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

ทำการทดลองเช่นเดียวกับ pH Optimum แต่จะทำการเปลี่ยนอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม ที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, และ 70 องศาเซลเซียส โดยใช้ buffer ที่เหมาะสมที่ได้จากกราฟระหว่าง pH buffer กับ Absorbance ที่ 750 nm คือ Carbonate-bicarbonate buffer pH 9.0 เพียงชนิดเดียว

3. การหาความเสถียรของเอนไซม์

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการหาอุณหภูมิที่เหมาะสม แต่จะนำเอนไซม์ไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 40, 50, 60, และ 70 องศาเซลเซียสก่อนเพื่อศึกษาการเสียสภาพของเอนไซม์ จากนั้นเก็บเอนไซม์ทุก 10 นาทีเป็นเวลา 60 นาทีแล้วจึงนำเอนไซม์ที่เก็บได้มาหาความเสถียรของเอนไซม์โดยใช้ Carbonate-bicarbonate buffer pH 9.0 เพียงชนิดเดียวและบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ชุดการทดลองควบคุมจะนำเอนไซม์ที่ยังไม่ได้บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังที่กล่าวมาแล้ว โดยจะทำเป็นชุดควบคุมการทดลองของทุกอุณหภูมิที่เวลา 0 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงวิธีการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของ Wang และ Hesseltine, 1965

pH	Substrate casein ใน buffer แต่ละ pH (ml)	Enz ชม.ที่ 12 (ml)	น้ำกลั่น (ml)	บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที	TCA (ml)	เขย่า, ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที, กรองด้วย whatman เบอร์ 1 เก็บแต่ส่วนใส (ml)	$NaCO_3$ 0.4 M (ml)	Folin 1 N (ml)	ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 nm	Total
Enzyme substrate	1	1	-		3		5	0.5		10.5
Control	1	1	-		3		5	0.5		10.5
Blank	1	-	1		3		5	0.5		10.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ
ผลการทดลอง

ตารางที่ 8 แสดงค่าขนาดวงใสของเชื้อทุกหมายเลขไอโซเลตที่เป็น *B. subtilis* บน skimmilk agar

Isolate number	ความกว้างวงใสเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (เซนติเมตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย
B2	2	2	2.8	2.26
B18	1.7	1.7	1.8	1.73
B21	1.5	1.5	1.6	1.53
B22	1.8	1.7	1.7	1.73
B23	1.6	1.4	1.6	1.53
B29	1.7	1.8	1.5	1.66

ตารางที่ 9 แสดงค่าขนาดของวงใสยกกำลังสองของเชื้อทุกหมายเลขไอโซเลตที่เป็น *B. subtilis* บน skimmilk agar

Isolate number	ความกว้างวงใสยกกำลังสองเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (เซนติเมตร)
B2	5.1076
B18	2.9929
B21	2.3409
B22	2.9929
B23	2.3409
B29	2.7556

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 แสดงค่าขนาดวงใสของ *B.subtilis* strain 2 ที่ชั่วโมงต่าง ๆ

ชั่วโมงที่	ขนาดวงใส			
	1	2	3	เฉลี่ย
4	-	-	-	-
8	-	-	-	-
12	2.25	2.2	2.3	2.25
16	0.85	0.85	0.95	0.896
20	0.55	0.7	0.65	0.608
24	0.45	0.45	0.5	0.49

หมายเหตุ เครื่องหมาย- หมายถึง ย่อยได้น้อยมากจนไม่สามารถวัดค่าได้

ตารางที่ 11 แสดงค่าความขุ่น OD ที่ 660 นาโนเมตร ของเซลล์ *B.subtilis* 2 ที่เวลาต่าง ๆ กัน (growth curve)

ชั่วโมงที่	ความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร			
	1	2	3	เฉลี่ย
4	0.225	0.179	0.214	0.206
8	1.585	1.514	1.420	1.506
12	2.135	1.507	1.344	1.662
16	2.114	1.297	1.247	1.552
20	2.011	1.077	1.075	1.388
24	1.904	1.203	1.194	1.434

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 12 แสดงผลการวัดค่า OD ที่ 750 นาโนเมตร เมื่อทำการทดลองที่ pH ต่าง ๆ กัน

Bufffer	Enzyme substrate		control	
	1	2	1	2
Citrate-Phosphate Buffer pH 5	0.388	0.414	0.378	0.367
Citrate-Phosphate Buffer pH 6	0.504	0.511	0.257	0.388
Citrate-Phosphate Buffer pH 7	0.639	0.635	0.396	0.394
Phosphate Buffer pH 7	0.681	0.728	0.432	0.370
Phosphate Buffer pH 7.5	0.673	0.673	0.352	0.369
Phosphate Buffer pH 8	0.690	0.627	0.392	0.388
TRIS Buffer pH 8	0.836	0.402	0.773	0.405
TRIS Buffer pH 8.5	0.808	0.803	0.404	0.415
TRIS Buffer pH 9	0.730	0.732	0.427	0.423
Carbonate-Bicarbonate Buffer pH 9	1.132	1.124	0.584	0.581
Carbonate-Bicarbonate Buffer pH 10	0.649	0.641	0.419	0.419

ตารางที่ 13 แสดงผลการวัดค่า OD ที่ 750 นาโนเมตร เมื่อทำการทดลองที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน

อุณหภูมิ (°C)	Enzyme substrate		control	
	1	2	1	2
30	0.529	0.530	0.405	0.406
35	0.534	0.522	0.366	0.384
40	0.550	0.578	0.349	0.330
45	0.516	0.518	0.385	0.392
50	0.584	0.580	0.357	0.358
55	0.587	0.620	0.330	0.347
60	0.521	0.541	0.338	0.354
65	0.627	0.658	0.359	0.370
70	0.314	0.312	0.230	0.235

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 14 แสดงผลการวัดค่า OD ที่ 750 นาโนเมตร เมื่อบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน (ความเสถียรของเอนไซม์)

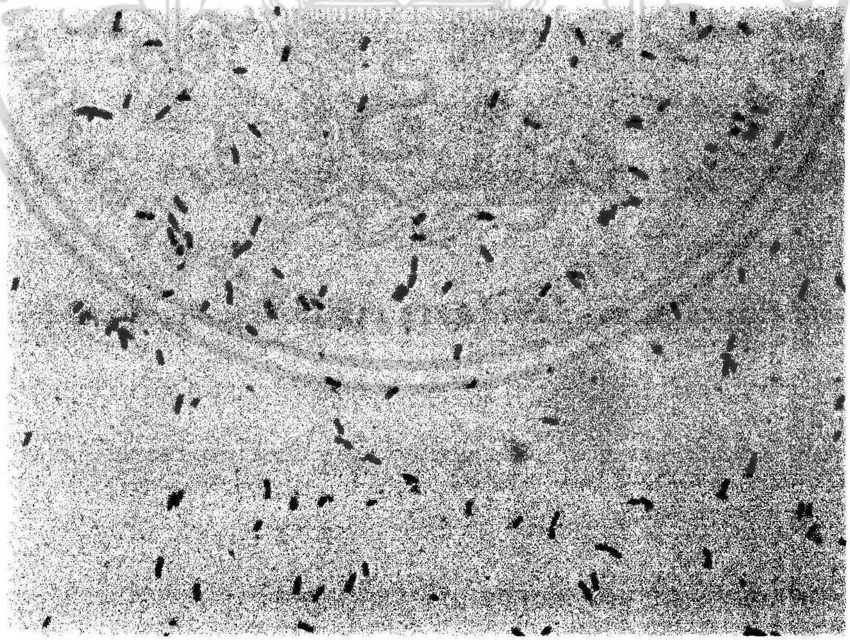
กิจกรรมของเอนไซม์	Enzyme substrate		control	
อุณหภูมิ (°C)-นาที	1	2	1	2
0	0.465	0.480	0.304	0.316
40-10	0.508	0.489	0.347	0.356
40-20	0.526	0.551	0.360	0.340
40-30	0.587	0.567	0.359	0.364
40-40	0.542	0.573	0.344	0.369
40-50	0.494	0.494	0.328	0.329
40-60	0.378	0.386	0.313	0.276
50-10	0.532	0.572	0.372	0.364
50-20	0.526	0.605	0.437	0.384
50-30	0.558	0.553	0.389	0.397
50-40	0.661	0.660	0.517	0.518
50-50	0.456	0.454	0.315	0.311
50-60	0.810	0.808	0.326	0.324
60-10	0.749	0.700	0.375	0.360
60-20	0.649	0.651	0.384	0.394
60-30	0.588	0.607	0.410	0.418
60-40	0.545	0.575	0.420	0.440
60-50	0.425	0.489	0.412	0.384
60-60	0.392	0.407	0.376	0.368
70-10	0.345	0.386	0.405	0.373
70-20	0.309	0.334	0.353	0.363
70-30	0.341	0.389	0.385	0.385
70-40	0.297	0.363	0.382	0.344
70-50	0.298	0.341	0.351	0.375
70-60	0.313	0.337	0.341	0.346

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

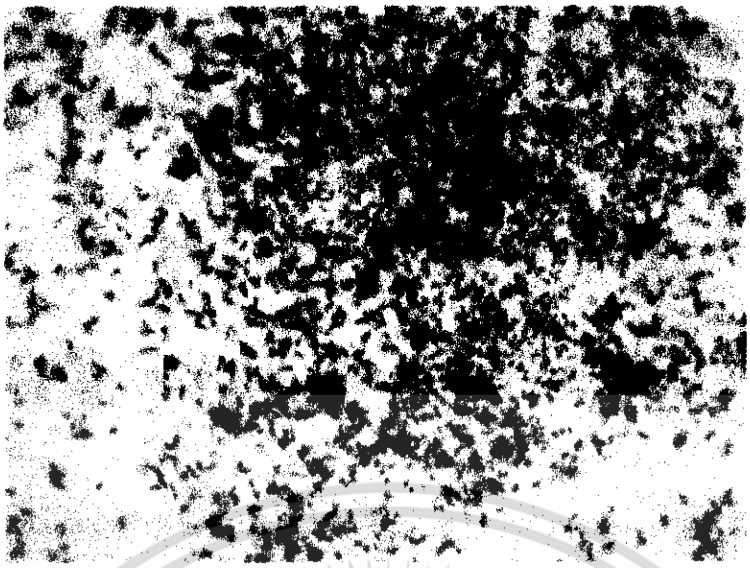
รูปภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ *Bacillus subtilis* 2

รูปที่ 13 แสดงลักษณะเซลล์ของ *B. subtilis* 2 ที่ชั่วโมงที่ 8



รูปที่ 14 แสดงลักษณะเซลล์ของ *B. subtilis* 2 ที่ชั่วโมงที่ 16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 15 แสดงลักษณะสปอร์ของ *B. subtilis* 2 ที่ชั่วโมงที่ 24

รูปที่ 16 แสดงผลการทดลองที่เป็นบวก และ ลบ ตามลำดับ ในการทดสอบ Hydrolysis of starch (บวก : เกิดวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อหยดไอโอดีน, ลบ : ไม่เกิดวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ *Bacillus subtilis* เมื่อหยดไอโอดีน)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวมยุรฉัตร เอกธรรมกิจ
วันเกิด 1 มิถุนายน 2526
จบมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนเทพศิรินทร์ร่มเกล้า
จบปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ที่อยู่ 658 ถ. อ่อนนุช แขวงสวนหลวง เขตสวนหลวง กรุงเทพฯ 10250
เบอร์โทรศัพท์ 04-083-9973

ชื่อ นางสาวสุจิตรา ยนต์สิงห์
วันเกิด 15 พฤษภาคม 2527
จบมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนบางเมืองเขียนผ่องอนุสรณ์
จบปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ที่อยู่ 63/6 ถ. เทพารักษ์ ต.บางเมืองใหม่ อ.เมือง จ.สมุทรปราการ 10270
เบอร์โทรศัพท์ 09-172-2557

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้