การคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากน้ำเคย

SCREENING OF PROTEASE PRODUCING HALOPHILIC BACTERIA FROM FERMENTED SHRIMP PASTE

นางสาวสิริพร สมณะ รหัสนักศึกษา 60552010

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาพื้นฐานทั่วไป
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ จังหวัดชุมพร
ปีการศึกษา 2563

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT © 2020 BIOTECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
PRINCE OF CHUMPHON CAMPUS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รับที่.....
งานทะเบียนประมวลผล
ฉบับที่.....

ใบรับรองโครงงานพิเศษ

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ จังหวัดชุมพร

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากน้ำเคย
Project Title	Screening of Protease Producing Halophilic Bacteria from Fermented Shrimp Paste
ชื่อนักศึกษา	นางสาวสิริพร สมณะ
รหัสนักศึกษา	60552010
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	อ.ดร.กมลวรรณ ชูชีพ

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.พัชราภรณ์ นาคเทวัญ	
อ.ดร.วลัยพร มัฆพาน	
อ.ดร.กมลวรรณ ชูชีพ	
อ.ดร.สิริฉัตร ขาวอิ่น	

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 30 มิถุนายน 2564

หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ รับรองแล้ว

(ผศ.ดร.พัชราภรณ์ นาคเทวัญ)
ประธานหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากน้ำเคย
นักศึกษา นางสาวสิริพร สมณะ **รหัสนักศึกษา** 60552010
ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2563
อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.กมลวรรณ ชูชีพ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายในการคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส จากตัวอย่างน้ำเคย 2 แหล่ง จากการทดลองพบว่าภายในเวลา 24 ชั่วโมง แบคทีเรียชอบเค็มเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion (BHI) สามารถแยกเชื้อได้ 5 ไอโซเลต ได้แก่ HR1, HP1, HP2, HP3 และ HP4 พบว่ามี 3 ไอโซเลต ได้แก่ HR1, HP1 และ HP3 มีลักษณะโคโลนีกลมนูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว ส่วนที่เหลืออีก 2 ไอโซเลต ได้แก่ HP2 และ HP4 มีลักษณะโคโลนีไม่กลมไม่นูน ขอบหยักเป็นคลื่น ผิวด้านไม่วาว พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลตมีการติดสีแกรมบวก 4 ไอโซเลต มีรูปร่างกลม จัดเรียงตัวเป็นกลุ่ม ได้แก่ HR1, HP1, HP3 และ HP4 และ 1 ไอโซเลต มีรูปร่างท่อน จัดเรียงตัวเดี่ยว ได้แก่ HP2 จากการสังเกตการเกิดวงใสรอบๆ โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Agar ที่เติม NaCl 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และ Skim Milk 0.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าไม่เกิดวงใสรอบๆ โคโลนี แสดงว่าเชื้อไม่สร้างเอนไซม์โปรติเอส

คำสำคัญ: แบคทีเรียชอบเค็ม, โปรติเอส, น้ำเคย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Project Title Screening of Protease Producing Halophilic Bacteria from Fermented Shrimp Paste

Student Miss Siriporn Sommana **Code** 60552010

Degree Bachelor of Science

Major Program Biotechnology

Academic Year 2020

Advisor Dr. Kamonwan Chucheep

ABSTRACT

This research aims to isolate protease producing halophilic bacteria from Fermented Shrimp Paste obtained from two different areas. The results showed that halophilic bacteria growth was the fastest in the Brain Heart Infusion (BHI) medium within 24 hours. The five isolates; HR1, HP1, HP2, HP3 and HP4 were selected and studied. The colonies of three isolates (HR1, HP1 and HP3) had a circular shape, convex, entire edges and glistening. The other colonies of two isolates (HP2 and HP4) had an irregular shape, flat, undulate and rough surface. All isolates were Gram-positive. The four isolates were cocci shape, cluster arrangement (HR1, HP1, HP3 and HP4) but another one was rod shape, single arrangement (HP2). There was no clear zone observed around the colonies on the Brain Heart Infusion Agar with 5% NaCl (w/v) and Skim Milk 0.8% (w/v) implying that the bacteria did not produce protease enzymes.

Keywords: Halophilic Bacteria, Protease, Fermented Shrimp Paste

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีเพราะได้รับความกรุณาชี้แนะ และช่วยเหลือเป็นอย่างดียิ่งจาก ดร. กมลวรรณ ชูชีพ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ปรับปรุงและแนวทางในการดำเนินโครงงานพิเศษ ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ตั้งแต่เริ่มตลอดจนเสร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณด้วยความเคารพอย่างสูง

กราบขอบพระคุณอาจารย์ประจำหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ให้ความรู้ คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการเรียน และคอยเป็นห่วงนักศึกษา มาตลอดระยะเวลา 4 ปี ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของอาจารย์เป็นอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ และนักวิทยาศาสตร์ทุกท่าน ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์จังหวัดชุมพร ที่ช่วยอำนวยความสะดวก และแนะนำการใช้เครื่องมือในห้องปฏิบัติการต่างๆ ให้แก่ผู้วิจัยเสมอมา

ขอขอบคุณเพื่อนๆ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ (รุ่น07) ทุกคน ที่คอยอยู่เป็นเพื่อนในห้องปฏิบัติการตลอดเวลา และให้ความช่วยเหลือตลอดมา

ขอขอบพระคุณบิดามารดา สมาชิกในครอบครัว และญาติผู้ใหญ่ทุกท่าน ที่คอยสนับสนุนเป็นกำลังใจ และให้ความช่วยเหลือในทุกด้านจนโครงงานพิเศษนี้สำเร็จด้วยดี

ท้ายที่สุดคุณประโยชน์ที่ได้จากโครงงานพิเศษฉบับนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน ผู้ที่เป็นเจ้าของแนวคิด และทฤษฎีต่างๆ ของวิทยานิพนธ์ งานวิจัย วารสาร และบทความ ที่ผู้วิจัยนำมาอ้างอิงในโครงงานพิเศษฉบับนี้ไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

สิริพร สมณะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญรูป	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 บทตรวจเอกสาร	3
2.1 เคย (Opossum shrimp)	3
2.2 กะปิ (Shrimp paste)	4
2.3 แบคทีเรียชอบเค็ม (Halophilic bacteria)	4
2.4 เอนไซม์โปรติเอส (Protease)	5
2.5 แหล่งผลิตของเอนไซม์โปรติเอส	6
2.6 การประยุกต์ใช้เอนไซม์โปรติเอสในระดับอุตสาหกรรม	7
2.7 การแยกเชื้อบริสุทธิ์	10
2.8 การถ่ายเชื้อ (Transfer of culture)	11
2.9 รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย	13
2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	13
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	16
3.1 วัสดุอุปกรณ์	16
3.2 วิธีการทดลอง	17
บทที่ 4 ผลและอภิปรายการทดลอง	19
4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากกะปิขัดน้ำ	19
4.2 ข้อเสนอแนะ	20
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	21
5.1 สรุปผลการทดลอง	21
เอกสารอ้างอิง	22
ภาคผนวก ก	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ข	27
ภาคผนวก ค	28
ภาคผนวก ง	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	การใช้เอนไซม์โปรติเอสในอุตสาหกรรม	10
4.1	ลักษณะ และการจัดเรียงตัวของแบคทีเรียต่างๆ ที่แยกได้จากกะปิขัดน้ำ	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	การสลายโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติเอส	6
2.2	เทคนิค streak plate แบบต่างๆ	11
2.3	เทคนิคการถ่ายเชื้อจากอาหารวุ้นผิวหน้าเอียงไปยังอาหารวุ้นผิวหน้าเอียงอันใหม่	12
2.4	เทคนิคการถ่ายเชื้อจากจานเพาะเชื้อไปยังอาหารวุ้นผิวหน้าเอียงอันใหม่	12
2.5	การจัดเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย	13
ข.1	กะปิขัดน้ำจาก ต. ชุมโค	27
ข.2	กะปิขัดน้ำจาก จ. ระนอง	27
ค.1	แสดงลักษณะของ HR1 A, B: ลักษณะบนอาหารแข็งของ HR1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง C, D: การติดสีม่วง แกรมบวก รูปร่างกลม E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโดยใช้กำลังขยายรวมของเลนส์ใกล้ตา และเลนส์ใกล้วัตถุอยู่ที่ 400X	28
ค.2	แสดงลักษณะของ HP1 A, B: ลักษณะบนอาหารแข็งของ HP1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง C, D: การติดสีม่วง แกรมบวก รูปร่างกลม E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโดยใช้กำลังขยายรวมของเลนส์ใกล้ตา และเลนส์ใกล้วัตถุอยู่ที่ 400X	29
ค.3	แสดงลักษณะของ HP2 A, B: ลักษณะบนอาหารแข็งของ HP2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง C, D: การติดสีม่วง แกรมบวก รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโดยใช้กำลังขยายรวมของเลนส์ใกล้ตา และเลนส์ใกล้วัตถุอยู่ที่ 400X	30
ค.4	แสดงลักษณะของ HP3 A, B: ลักษณะบนอาหารแข็งของ HP3 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง C, D: การติดสีม่วง แกรมบวก รูปร่างกลม E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโดยใช้กำลังขยายรวมของเลนส์ใกล้ตา และเลนส์ใกล้วัตถุอยู่ที่ 400X	31
ค.5	แสดงลักษณะของ HP4 A, B: ลักษณะบนอาหารแข็งของ HP4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง C, D: การติดสีม่วง แกรมบวก รูปร่างกลม E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโดยใช้กำลังขยายรวมของเลนส์ใกล้ตา และเลนส์ใกล้วัตถุอยู่ที่ 400X	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

อาหารหมักเป็นวิธีการแปรรูปหรือถนอมอาหารที่เก่าแก่วิธีหนึ่ง ประเทศต่าง ๆ ทั่วโลกจะมีผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับวัตถุดิบของประเทศนั้นๆ อาหารหมักเป็นอาหารที่มีการเปลี่ยนแปลงทางเคมีซึ่งเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์ และได้ผลิตภัณฑ์ใหม่เกิดขึ้น การหมักจะช่วยให้อาหารที่ได้มีคุณค่าทางโภชนาการสูงขึ้นและง่ายต่อการย่อย จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในอาหารหมักมี 3 ชนิดคือ รา ยีสต์ และแบคทีเรียแลกติก ประเทศไทยมีอาหารหมักจากเนื้อสัตว์หลายชนิดขึ้นอยู่กับภูมิประเทศ เช่น ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีการผลิตปลาร้า แหนม ปลาเจ่า ปลาจ่อม ส่วนภาคใต้มีการผลิตน้ำปลา กะปิ ไตปลา บูดู และภาคกลางมีการผลิตกะปิ น้ำปลา ปลาร้า เป็นต้น อาหารหมักจากเนื้อสัตว์ส่วนมากเป็นอาหารหมักพื้นบ้านผลิตเพื่อบริโภคในครัวเรือน จุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักจะเป็นจุลินทรีย์จากธรรมชาติและที่ติดมากับวัตถุดิบ ซึ่งช่วยให้อาหารหมักมีคุณค่าทางโภชนาหารดีขึ้น (จิตต์เรขา, 2544) กะปิเป็นอาหารที่บริโภคอย่างแพร่หลายในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กะปิใช้เป็นทั้งเครื่องปรุงและแปรรูปเป็นอาหารจานหลัก กะปิให้รสชาติเค็มและอร่อยกลมกล่อม สำหรับคนไทยกะปิเป็นผลิตภัณฑ์พื้นเมืองที่รู้จัก และบริโภคมานาน ทำจากเคยหรือปลา แต่กะปิที่นิยมทำกันอย่างแพร่หลายจะทำจากเคย ซึ่งเคยที่ใช้ทำกะปิมีอยู่ 3 สกุล ได้แก่ *Acetes, Lucifer* และ *Mesopodopis* (สมนึก และคณะ, 2520)

แบคทีเรียชอบเค็มเป็นแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะอาหารหมักดองที่มีเกลือสูงหรือมีการเติมเกลือเป็นองค์ประกอบหลัก โดยผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่ได้จากการนำวัตถุดิบมาผสมกับเกลือนั้นส่วนใหญ่เป็นผลมาจากการทำงานของแบคทีเรียกลุ่มนี้ เนื่องจากมีความสามารถในการเจริญได้ดีในสภาวะที่มีเกลือสูงประมาณ 0.5-30 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อีกทั้งยังมีความสามารถในการผลิตสารพอลีเมอร์ชีวภาพ (biopolymers) สารให้ความเสถียรต่อสารชีวโมเลกุล (compatible solutes) และเอนไซม์หลายชนิดที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่ เอนไซม์โปรติเอส (protease) เอนไซม์ไลเปส (lipase) และเอนไซม์อะไมเลส (amylase) เป็นต้น ในปัจจุบันการนำเอนไซม์มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งเอนไซม์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกลุ่มนี้จะมีความเสถียรสามารถทำงานได้ในสภาวะที่รุนแรงได้ดีกว่าการใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จากพืชและสัตว์ (สาวิตรี, 2561) เอนไซม์โปรติเอสผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด โดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียชอบเค็ม (halophilic bacteria) เป็นจุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดี เพราะเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นจากจุลินทรีย์เหล่านี้ไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพียงแต่จะเป็นพวกชอบเค็ม บางชนิดยังเป็นพวกทนต่ออุณหภูมิสูงด้วยเช่นกัน (อำพรรณ และคณะ, 2558)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากน้ำเคยที่มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์โปรติเอส และศึกษาความสามารถในการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเค็มระดับต่างๆ เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ในการเร่งการย่อยสลายโปรตีนจากตัวเคย ลดระยะเวลาในการหมักกะปิ และสามารถนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป แต่เนื่องจากเกิดสถานการณ์โควิด-19 ระบาดระลอกที่ 3 ทำให้ไม่สามารถทำการวิจัยขั้นตอนที่เหลือต่อได้ งานวิจัยนี้จึงมีเพียงขั้นตอนการคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากน้ำเคย

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากน้ำเคย

1.2.2 เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียชอบเค็มที่คัดแยกได้

1.3 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ทราบวิธีการคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากน้ำเคย

1.3.2 ทราบลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
บทตรวจเอกสาร

2.1 เคย (*Opossum shrimp*)

เคย (*Opossum shrimp*) คือ สัตว์ที่มีรูปร่างคล้ายกุ้ง และไม่มีกระดูกสันหลัง บางครั้งเรียกว่า “กุ้งเคย” โดยตัวเคยนี้ดำรงชีวิตอยู่ใกล้ผิวทะเล อาจอยู่ในน้ำลึกประมาณหน้าแข้งจนถึงระดับหน้าอก ขนาดของลำตัวเคยยาวประมาณ 1.5 เซนติเมตร มีเปลือกนิ่มและบาง อาศัยอยู่รวมกันเป็นฝูงแถวชายทะเลและลำคลองบริเวณป่าชายเลน สำหรับคนไทยแล้ว ตัวเคยเป็นสัตว์เศรษฐกิจ ซึ่งพบได้จากธรรมชาติ ให้คุณค่าทางโภชนาการสูง มีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์ โดยใช้ตัวเคยมาทำกะปิหรือกุ้งแห้ง (อุดมศักดิ์, 2554)

ชนิดของกุ้งเคยที่ใช้ทำกะปิ สำหรับตัวกุ้งเคยที่ใช้ทำกะปิ มีอยู่ 5 สกุลคือ

2.1.1 สกุล *Acetes* (Order Decapoda; Family Sergestidae)

เคยในสกุล *Acetes* มีชื่อเรียกต่างกันตามขนาดของลำตัว ตามสีของอวัยวะต่างๆ และตามลักษณะของการอยู่รวมกัน ได้แก่ การเรียกตามขนาดของลำตัว ถ้าลำตัวมีขนาดใหญ่จะเรียกว่า เคยโกร่ง เคยหยาบ เคยใหญ่ การเรียกตามสี ถ้าสีของหนวดจะเรียกว่า เคยสายไหม ซึ่งนิยมเรียกทางภาคใต้ สีของลำตัวเรียกว่า เคยดอกเลา สีของหางเรียกว่า เคยหางแดง ส่วนการเรียกตามลักษณะของการอยู่รวมกันเรียกว่า เคยฝูง เคยประดา เคยในสกุลนี้มีขนาดใหญ่ โดยขนาดที่พบ คือ 7.0-32.9 มิลลิเมตร นอกจากใช้เคยในสกุลนี้ทำกะปียังสามารถใช้ทำเป็นกุ้งแห้งได้

2.1.2 สกุล *Lucifer* (Order Decapoda; Family Sergestidae)

เคยในสกุล *Lucifer* ได้แก่ เคยน้ำข้าว เคยเส้นด้าย เคยสำลี เคยนุ่น ลักษณะของเคยในสกุลนี้ คือ มีลำตัวที่เล็กยาว และแบนออกข้าง ส่วนของหัวมีขนาดที่ยาวมาก จึงเป็นจุดเด่นของเคยในสกุลนี้ โดยขนาดที่พบมีความยาวสูงสุดประมาณ 8.0 มิลลิเมตร โดยทั่วไปไม่นิยมนำเคยสกุลนี้มาทำกะปิ เพราะเนื้อในส่วนของลำตัวมีน้อย เมื่อนำเคยสกุลนี้มาทำกะปิจะได้น้ำปริมาณน้อย

2.1.3 สกุล *Mesopodopis* (Order Mysidacea; Family Mysidae)

เคยในสกุล *Mesopodopis* ได้แก่ เคยตาดำหวาน เคยคายไม้ไผ่ เคยตาดำ เคยละเอียด ลักษณะของเคยในสกุลนี้ คือ ขาตรงบริเวณส่วนอกยาว ขาตรงบริเวณปล้องท้องมองเกือบไม่เห็น เพราะมีขนาดเล็ก ยกเว้นเพศผู้มีขาคู่ที่ 4 ยาว ปล้องบริเวณลำตัวมีขนาดยาวเกือบเท่ากัน บริเวณโคนแพนหางด้านในมีลักษณะคล้ายฟองอากาศ ขนาดของเพศผู้ที่พบมีความยาวประมาณ 6.0-11.9 มิลลิเมตร เพศเมียมีความยาวประมาณ 6.0-12.9 มิลลิเมตร

2.1.4 สกุล *Acanthomysis* (Order Mysidacea; Family Mysidae)

เคยในสกุล *Acanthomysis* ได้แก่ เคยหน้าสนิม เคยขี้เถ้า เคยตาดำเล็ก ลักษณะของเคยในสกุลนี้ คือ แพนหนวดส่วนปลายมีลักษณะมนกลม บริเวณใต้ปล้องท้องมีลักษณะจุดสีดำกลมทุกปล้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หางเรียวยาว มีหนามอยู่บริเวณด้านข้าง 28 คู่ และมีหนามยาวอยู่บริเวณส่วนปลาย 2 คู่ ขนาดที่พบทั้งเพศผู้และเพศเมียมีความยาวอยู่ระหว่าง 5.0-9.9 มิลลิเมตร

2.1.5 สกุล *Rhopalophthalms* (Order Mysidacea; Family Mysidae)

เคยในสกุล *Rhopalophthalms* คือ เคยตาดำขนาดใหญ่ พบอยู่ปะปนกับเคยตาเล็ก ขนาดที่พบเพศผู้มีขนาดประมาณ 9.0-10.9 มิลลิเมตร เพศเมียมีขนาดประมาณ 9.0-14.9 มิลลิเมตร มีลักษณะ คือ ก้านตาและนัยน์ตามีขนาดใหญ่กว่าเคยตาดำชนิดอื่นๆ บริเวณใต้ปล้องท้องไม่มีจุดสี และบริเวณขาที่ปล้องท้องมีขนาดที่ยาวกว่าเคยตาดำอื่นๆ ขาเรียวยาว มีหนามอยู่บริเวณด้านข้าง 14 คู่ มีหนามยาวอยู่บริเวณส่วนปลาย 2 คู่ และมีขนเล็กๆ ล้อมรอบ บริเวณหางมีจุดสีแดง 2 จุด อยู่ตรงใกล้ๆ กับบริเวณส่วนปลายและส่วนบนของหาง ซึ่งมองเห็นได้ชัดเจน (สุจิตรา, 2555)

2.2 กะปิ (Shrimp paste)

กะปิเป็นอาหารหมักพื้นบ้านของประเทศไทยและประเทศในแถบเอเชียใต้ ส่วนมากผลิตไว้บริโภคในครัวเรือน กะปิเป็นอาหารหมักจากเคย กุ้ง หรือปลา สำหรับประเทศไทยนิยมใช้เคยหรือกุ้งน้ำเค็มและอาจใช้กุ้งน้ำจืดด้วยขึ้นอยู่กับภูมิประเทศ กะปิทำได้โดยนำเคยมาล้างให้สะอาดแล้วทิ้งไว้สักพัก จึงนำไปคลุกกับเกลือในอัตราส่วนเคย 5 ส่วนต่อเกลือ 1 ส่วน เก็บไว้หนึ่งคืน จากนั้นนำมาคลุกกับเกลืออีกครั้งหมักต่ออีกหนึ่งคืน แล้วจึงนำไปผึ่งแดดจนแห้งก่อนนำไปบดให้ละเอียด แล้วบรรจุใส่โอ่งหรือไหเก็บไว้อย่างน้อย 4 เดือน

จุลินทรีย์ที่พบในการหมักกะปิเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ได้แก่ *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Micrococcus morrhuae* เป็นต้น เอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรียจะช่วยย่อยสลายโปรตีนในเคยให้เป็นเพปไทด์ และกรดอะมิโน นอกจากนี้ยังได้สารอินทรีย์อื่นๆ ช่วยเพิ่มกลิ่นและรสของกะปิให้ดีขึ้น ส่วนเกลือช่วยป้องกันวัตถุดิบที่ใช้ทำกะปิไม่ให้เกิดการเน่าเสีย กะปิเป็นอาหารหมักที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงโดยมีโปรตีนประมาณร้อยละ 45-65 ต่อน้ำหนักกะปิแห้ง นอกจากนี้ยังมีกรดอะมิโนและวิตามินอีกเล็กน้อย (จิตต์เรขา, 2544)

กะปิขัดน้ำ คือ การนำกะปิมาอัดแน่นในขวดโหล ปิดทับด้วยใบไม้แล้วใช้ไม้ไผ่บางๆ ขัดปิดทับด้านบน หมักทิ้งไว้ประมาณ 3-6 เดือน จะมีน้ำขึ้นมาด้านบน เรียกว่า น้ำเคย มีรสชาติคล้ายน้ำปลา แต่จะหอมและอร่อยกว่า สามารถนำไปปรุงอาหารได้ (กะปิชุมพร, ม.ป.ป.)

2.3 แบคทีเรียชอบเค็ม (Halophilic bacteria)

แบคทีเรียชอบเค็ม หมายถึง แบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง มีค่า water activity (a_w) ต่ำที่สุดที่แบคทีเรียชอบเค็มเจริญได้ คือ 0.75 แบคทีเรียชอบเค็มเป็นสาเหตุของการเสื่อมเสีย (microbial spoilage) ของอาหารที่มีเกลือสูง เช่น ซีอิ๊ว กะปิ น้ำปลา แบคทีเรียชอบเค็ม แบ่งตามความเข้มข้นของเกลือที่ต้องการใช้ในการเจริญเติบโตได้ 4 พวก ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 พวกชอบเกลือเล็กน้อย (slightly halophilic bacteria) เป็นพวกที่เจริญได้ดีในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.5-3 แยกได้จากอาหารทะเล

2.3.2 พวกชอบเค็มปานกลาง (moderate halophilic bacteria) เป็นพวกที่เจริญได้ดีในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นร้อยละ 3-15 แยกได้จากปลาเค็ม

2.3.3 พวกชอบเค็มสูง (extreme halophilic bacteria) เป็นพวกเจริญได้ดีในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นร้อยละ 15-30

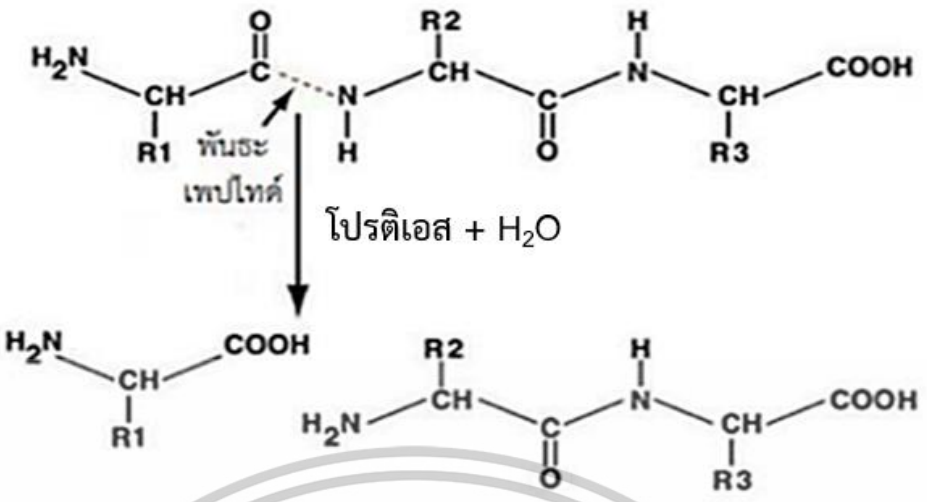
2.3.4 พวกทนเค็ม (halotolerant) เป็นพวกที่สามารถเจริญได้ทั้งสภาพที่มีและไม่มีเกลือ โดยทั่วไปแบคทีเรียพวกนี้สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นร้อยละ 5 หรือมากกว่า

มีงานวิจัยหลายฉบับที่แสดงถึงแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ เช่น *Bacillus cereus, B. licheniformis, Staphylococcus aureus* และ*Pseudomonas alcaligenes* แยกได้จากน้ำปลาในไทย *Halobacterium* sp. แยกได้จากน้ำปลาในไทย *Thrissina thryssa, Bacillus halodurans, Scoliodon* sp. แยกได้จากปลาเค็มในอินเดีย *Salinivibrio* sp. MS-7 (พวกชอบเค็มปานกลาง) แยกได้จากทะเลสาบน้ำเค็มมาฮาลู (Maharlou salt lake) ในอิหร่าน (อำพรรณ และคณะ, 2558)

2.4 เอนไซม์โปรติเอส (Protease)

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่สิ่งมีชีวิตผลิตขึ้นมา (พบได้ทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) ให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ หรือกรดอะมิโนอิสระ โดยการสลายพันธะเปปไทด์ในสภาวะที่มีน้ำอยู่ในสารละลาย ซึ่งมีความจำเพาะต่อพันธะเปปไทด์เป็นอย่างมาก โดยปกติเมื่อสังเคราะห์เอนไซม์โปรติเอสขึ้นมาใหม่จะอยู่ในรูปที่ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ (inactive from) เรียกว่า proenzyme หรือ zymogen เพื่อป้องกันการย่อยสลายโปรตีนภายในเซลล์ และจะอยู่ในรูปที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้เมื่อยู่ในสภาพที่เหมาะสม (ธรรมรัตน์, 2544) เอนไซม์โปรติเอสเร่งการตัดพันธะเปปไทด์ในโปรตีนด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) หรือที่เรียกว่าการแยกสลายด้วยน้ำ ทำให้สายพอลิเพปไทด์ ถูกตัดเป็นเพปไทด์ที่มีขนาดสั้นลงและเกิดเป็นกรดอะมิโนอิสระ ผลิตภัณฑ์จากการแยกสลายโปรตีน นิยมเรียกว่า โปรตีนไฮโดรไลเสต การแยกสลายโปรตีนด้วยวิธีนี้มีข้อดี คือ เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นสูง ดังนั้นจึงไม่ต้องใช้เอนไซม์ในปริมาณมาก และมีสภาวะในการย่อยที่ไม่รุนแรง การใช้เอนไซม์ยังมีระดับการย่อยของโปรตีนค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบการใช้กรดหรือด่าง (Kristinsson และ Rosco, 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 การสลายโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติเอส (ที่มา: Terrence และ Osna, 2000)

2.5 แหล่งผลิตของเอนไซม์โปรติเอส (มยุรฉัตร และสุจิตรา, 2548)

2.5.1 เอนไซม์โปรติเอสจากพืช

การผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากพืชมีข้อจำกัดหลายประการ ได้แก่ ใช้เวลานานและใช้พื้นที่มาก อย่างไรก็ตามมีเอนไซม์โปรติเอสหลายชนิดที่พืชผลิตขึ้นและใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ ปาเปนจากยางมะละกอ ที่ทำงานได้ดีในช่วงค่าพีเอชระหว่าง 5-9 และมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส หรือโบรมิเลนจากสับปะรด ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีสมบัติคล้ายกับซีสเทอีนโปรติเอส และทำงานได้ดีในช่วงค่าพีเอชระหว่าง 5-9 สำหรับเคราติเนส (keratinase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายผมและขนแกะมักนำไปใช้ป้องกันการอุดตันในระบบบำบัดน้ำเสีย

2.5.2 เอนไซม์โปรติเอสจากสัตว์

ส่วนใหญ่มาจากตับอ่อนของสัตว์ ตัวอย่างเอนไซม์โปรติเอสจากสัตว์ ได้แก่ ทริปซิน (trypsin) จากกระเพาะที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและการผลิตยา ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) จากตับที่ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคจึงเป็นเอนไซม์ที่มีราคาแพง ใช้ในอุตสาหกรรมย่อยพันธะเพปไทด์ในอาหารที่มีส่วนประกอบของนม สำหรับผู้ที่มีอาการแพ้โปรตีนจากน้ำนม เพปซิน (pepsin) จากกระเพาะของสัตว์ สามารถทำงานได้ดีในช่วงค่าพีเอชระหว่าง 1-2 และเรนนิน (rennin) จากกระเพาะลูกวัวที่ใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมนม ทำให้ผลิตภัณฑ์นมมีความคงตัว เพิ่มกลิ่นและรสชาติให้ดีขึ้น

2.5.3 เอนไซม์โปรติเอสจากจุลินทรีย์

แม้ว่าเอนไซม์โปรติเอสจะพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ แต่ในปัจจุบันแหล่งผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่จำหน่ายในเชิงการค้าส่วนใหญ่มาจากจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรีย แบคทีเรียสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว ควบคุมการเจริญได้ง่าย และมีต้นทุนในการเลี้ยงต่ำกว่าพืชและสัตว์ อุตสาหกรรมส่วนใหญ่ จึงนิยมนำแบคทีเรียมาเลี้ยงเพื่อผลิตเอนไซม์มาใช้ เพราะแบคทีเรียมีลักษณะ

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทางสัณฐานวิทยาที่ซับซ้อนน้อยกว่าราและไวรัส และสภาวะในการเลี้ยงง่าย เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากพืชและสัตว์ไม่สามารถตอบสนองต่อความต้องการของโลกปัจจุบัน จึงทำให้เกิดความสนใจเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากจุลินทรีย์มากขึ้น และจุลินทรีย์นั้นเป็นแหล่งที่ดีของเอนไซม์โปรติเอส เนื่องจากมีความหลากหลายทางชีวเคมี มีการดัดแปลงพันธุกรรมได้ง่าย และมีคุณลักษณะเฉพาะที่เหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีชีวภาพ (Rao และคณะ, 1998)

จากความรู้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพที่มีการพัฒนาตลอดและความต้องการเอนไซม์ที่มีคุณลักษณะเฉพาะใหม่ ทำให้นักเทคโนโลยีชีวภาพยังคงสนใจค้นหาเอนไซม์โปรติเอสจากแหล่งผลิตใหม่ (Sana และคณะ, 2006) ที่สามารถทนต่อสภาวะที่รุนแรงในกระบวนการอุตสาหกรรม ได้แก่ ในสภาวะที่มีการใช้เกลือ ค่าพีเอชที่สูงหรือต่ำเกินไป และอุณภูมิสูง

2.6 การประยุกต์ใช้เอนไซม์โปรติเอสในระดับอุตสาหกรรม (วทัญญุตา, 2544)

เอนไซม์โปรติเอสถูกจัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลสที่มีบทบาทโดยตรงในอุตสาหกรรม และมีการใช้อย่างกว้างขวางในปัจจุบันถึงร้อยละ 60 ของเอนไซม์ทั้งหมดที่ใช้ (Rao และคณะ, 1998) ได้สรุปตัวอย่างอุตสาหกรรมที่มีการใช้เอนไซม์โปรติเอสเร่งปฏิกิริยาในตารางที่ 2.1

2.6.1 เบเกอรี่

สำหรับการนำเอนไซม์โปรติเอสมาประยุกต์ใช้ในการผลิตเบเกอรี่ มีวัตถุประสงค์สำคัญ 2 ประการ คือ เพื่อปรับปรุงให้มีกลูเตนในโดล์ (dough) สูง (Outtrup และ Boyce, 1990) ในการทำขนมปังกรอบแครกเกอร์ (cracker) และบิสกิต (biscuit) ส่วนมากจะใช้แอซิดโปรติเอสจากเชื้อรา โดยโปรติเอสจะทำให้กลูเตนถูกย่อย จึงทำให้ไม่เกิดการกักเก็บอากาศในโดล์ระหว่างหมักด้วยยีสต์ จึงทำให้โดล์ไม่พอง เมื่อนำไปอบจะได้เนื้อสัมผัส (texture) ที่กรอบมาก โปรติเอสที่ใช้ ได้แก่ นิวทรัลโปรติเอสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* และใช้เพื่อให้ขนมปังมีรสชาติที่ดีขึ้น จากกลิ่นของกรดอะมิโนที่ได้รับจากการสลาย (Poutanen, 1997)

2.6.2 การผลิตเบียร์

ในอุตสาหกรรมการหมักเบียร์ นิยมนำเอนไซม์โปรติเอสมาใช้เพื่อวัตถุประสงค์สำคัญ 2 ประการ คือ เพื่อใช้ในขั้นตอนการผลิต มีการนำนิวทรัลโปรติเอสจากแบคทีเรียมาเติมในการหมักเพื่อเพิ่มปริมาณปริมาณกรดอะมิโนอิสระสำหรับการเจริญของยีสต์ เป็นการปรับปรุงคุณภาพเบียร์ให้ดีขึ้น และใช้เพื่อช่วยให้เบียร์มีความใส เพราะในขั้นตอนการเก็บเบียร์จะเก็บที่อุณหภูมิต่ำ และมักจะเกิดความขุ่นที่เกิดจากสารประกอบโพลีฟีนอล คาร์โบไฮเดรต และโปรตีนในเบียร์ การเติมเอนไซม์โปรติเอสลงไปจะช่วยทำให้เบียร์มีความใสมากขึ้น (Aunstrup, 1979)

2.6.3 การผลิตอาหารสัตว์

วัตถุประสงค์ในการเติมเอนไซม์โปรติเอสลงในอาหารสัตว์นั้น เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบอาหารสัตว์ ในลูกสัตว์ที่เพิ่งหย่านม (weaning animals) เป็นอีกกลุ่มหนึ่งที่ควรเติมเอนไซม์ลงในอาหาร เพราะลูกสัตว์มีทางเดินอาหารที่ยังไม่คุ้นเคยกับสารอาหารชนิดใหม่ ทำให้การ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตเอนไซม์ในการย่อยสารอาหารต่างๆ ยังไม่สมบูรณ์ จึงควรเสริมเอนไซม์จำพวกโปรติเอสลงไป เพื่อช่วยให้การย่อย และการดูดซึมอาหารเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้อาหารสัตว์ที่มีการเติมเอนไซม์โปรติเอสลงไปยังช่วยกำจัดสารต้านโภชนะ (antinutritional factors; ANFs) เนื่องจากในวัตถุดิบของอาหารสัตว์หลายๆ ชนิด นอกจากมีสารอาหารที่ให้ประโยชน์ต่อการดำรงชีวิตของสัตว์ อีกทั้งมีองค์ประกอบที่ก่อให้เกิดโทษต่อสุขภาพสัตว์ เรียกสารเหล่านี้ว่า สารต้านโภชนะ ยกตัวอย่างสารชีวโมเลกุลในกลุ่มโปรตีนซึ่งพบมากในพืชตระกูลถั่ว มีสมบัติไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินในทางเดินอาหารของสัตว์ ทำให้สัตว์เกิดการย่อยและดูดซึมโปรตีนได้น้อยลง จึงต้องมีการเติมเอนไซม์โปรติเอสลงไปช่วยย่อยโปรตีนในพืชตระกูลถั่วนี้

2.6.4 การแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อและปลา

การแปรรูปผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ เนื่องจากผู้บริโภคชอบเนื้อสัตว์ที่มีความนุ่มและไม่เหนียว โดยเฉพาะเนื้อวัว ดังนั้นการทำให้เนื้อนุ่มสามารถทำได้โดยการเก็บรักษาเนื้อที่ได้จากซากสัตว์ภายหลังการฆ่าไว้ในห้องเย็นเป็นเวลาหลายสัปดาห์ เพื่อให้โปรตีนในเนื้อสัตว์เกิดการเร่งสลายตัวเอง (autocatalysis) มีการใช้เอนไซม์โปรติเอสเพื่อไปย่อยโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (fibrous protein) ทำให้เนื้อมีความนุ่มได้ดีมาก วิธีการทำได้โดยฉีดเอนไซม์เข้าไปในซากสัตว์ภายหลังการฆ่าเสร็จแล้ว เพื่อให้เอนไซม์กระจายไปทั่วทั้งตัวสัตว์ อาจทำการปั๊มเข้าทางหลอดเลือด ภายหลังจากเลือดได้ไหลออกจากสัตว์หมดแล้ว เพื่อให้เนื้อสัตว์มีความนุ่ม

2.6.5 การฟอกหนัง

ในการฟอกหนังนิยมนำเอนไซม์โปรติเอสมาใช้เพื่อวัตถุประสงค์ในการกำจัดขนสัตว์ โดยมีการนำเซรีนโปรติเอสจากจุลินทรีย์มาใช้แทนสารเคมี ได้แก่ โปรติเอสชอบเค็มจาก *Bacillus* sp. ข้อดีของการใช้เอนไซม์โปรติเอสในขั้นตอนการกำจัดขนสัตว์ คือ ลดปัญหาการบำบัดของเสียจากโรงงาน เนื่องจากสารเคมีซึ่งมีต้นทุนสูง และทำให้หนังสัตว์มีความนุ่มและยืดหยุ่น โดยมีการนำเซรีนโปรติเอสจากแบคทีเรียมาใช้แทนเอนไซม์จากสัตว์แต่ไม่ได้ผลดีนัก ในปี ค.ศ 1970 จึงมีการนำเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียมาใช้แทนการใช้ทริปซิน และเพนครีเอทิน (pancreatin) ที่รวมทั้งมีการใช้แอลคาไลน์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzea, B. amyloliquefaciens, B. licheniformis* ที่มีขายในปัจจุบันในชท่อการค้า ได้แก่ PIN, Novocor ตามลำดับ (วทัญญุตา, 2544)

2.6.6 การสังเคราะห์เพปไทด์ (จิตติมา, 2552)

ปัจจุบันนิยมนำเพปไทด์มาใช้ในอุตสาหกรมที่หลากหลาย ได้แก่ เครื่องดื่มที่ผสมกรดอะมิโน โปรตีนไฮโดรไลเซต (protein hydrolysate) สารให้ความหวานเทียมในรูปของไดเพปไทด์ ซึ่งในการสังเคราะห์จะใช้เอนไซม์โปรติเอสมาเร่งปฏิกิริยาในทิศทางการผันกลับของปฏิกิริยาการสลาย ที่เกิดปฏิกิริยาในสภาวะที่มีน้ำน้อยหรือในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ และต้องการเอนไซม์โปรติเอสที่มีความเสถียรในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ และช่วงค่าพีเอชกว้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.7 การทำซีอิ๊วและเนยแข็ง

ในการทำซีอิ๊ว (soy sauce) มีการใช้เอนไซม์โปรติเอสย่อยสลายโปรตีนในถั่วเหลือง ได้แก่ การใช้เอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae* และ *A. sojae* หรือมีการใช้เอนไซม์เรนเนตจากกระเพาะลูกวัว ในการทำเนยแข็งที่ทำให้เกิดการตกตะกอนของน้ำนมอย่างรวดเร็วในค่าพีเอชที่เป็นกลาง ซึ่งมีการสลายตัวของโปรตีนในน้ำนมต่ำ แต่จากข้อจำกัดในเรื่องราคาทำให้ในปัจจุบันนิยมนำเอนไซม์โปรติเอสจากจุลินทรีย์ที่มีลักษณะใกล้เคียงมาใช้แทน ได้แก่ เรนนินไลค์เอนไซม์จาก *Mucor miechi, M. pusillus* และ *Endothai parasitica*

2.6.8 การผลิตผงซักฟอก (วทัญญุตา, 2544)

ผงซักฟอกประกอบด้วยส่วนประกอบหลักๆ คือ สารลดแรงตึงผิว (surfactants หรือสารกำจัดคราบสกปรก) สารซักล้าง (detergent) สารที่ใช้รักษาระดับความเป็นด่าง (alkaline builder) เป็นต้น เสื้อผ้าที่สกปรกจะดูดซับสิ่งสกปรกจากสิ่งแวดล้อม หรือจากร่างกายที่มีทั้งคราบโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ซึ่งในสภาวะการซักฟอก ความร้อน ความเป็นด่าง สารลดแรงตึงผิว และสารกำจัดคราบสกปรกจะช่วยขจัดคราบออกได้ แต่โปรตีนไม่สามารถถูกขจัดออกไปได้ และยังคงติดอยู่กับเส้นใยผ้า เพราะโปรตีนจะแข็งตัวเป็นก้อน และไม่ละลายที่ค่าพีเอชเป็นด่าง (pH 9-10) การใช้เอนไซม์โปรติเอสในผงซักฟอกสามารถนำมาใช้แก้ปัญหาได้ เพราะเอนไซม์จะย่อยโปรตีนที่เกาะอยู่บนเสื้อผ้า ทำให้ผงซักฟอกมีประสิทธิภาพในการซักล้างมากขึ้น สำหรับเอนไซม์โปรติเอสที่นำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอก จะต้องสามารถทำงานและมีความเสถียรต่อส่วนประกอบต่างๆ ที่เป็นส่วนผสมของผงซักฟอก ได้แก่ ต้องมีความเสถียรในสารลดแรงตึงผิว สารซักล้าง และสารฟอกขาว ซึ่งสารเหล่านี้เป็นส่วนประกอบหลักๆ ในผงซักฟอก นอกจากนี้เอนไซม์ยังต้องมีสภาวะที่ใช้ในการซัก ได้แก่ มีความเสถียรในช่วงพีเอชที่เป็นด่าง (alkaline protease) และต้องเสถียรต่ออุณหภูมิที่ใช้ในการซัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 การใช้เอนไซม์โปรติเอสในอุตสาหกรรม

ประเภทของอุตสาหกรรม	วัตถุประสงค์ในการใช้	แหล่งผลิตเอนไซม์	ชนิดของเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้
1. เบเกอรี่	การทำขนมปังกรอบ	รา	แอซิดโปรติเอสและนิวทรัลโปรติเอส
2. การผลิตเบียร์	ทำให้เบียร์ใสขึ้น	รา, แบคทีเรีย	โบรมิเลน, ปาเปน และเพปซิน
3. ธัญชาติ	ใช้ในขั้นตอนการแปรรูปเครื่องปรุง	รา, แบคทีเรีย	โบรมิเลน, ปาเปน และเพปซิน
4. ผลิตภัณฑ์จากนม	รักษาสารสชาติของผลิตภัณฑ์ย่อยโปรตีนในนม รักษาคุณภาพและช่วยในการระเหยของนม	รา, แบคทีเรีย	เอนไซม์จากน้ำย่อย, โบรมิเลน, ปาเปน และเพปซิน
5. การผลิตอาหารสัตว์	เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของวัตถุดิบอาหารสัตว์	รา, แบคทีเรีย	เอนไซม์จากน้ำย่อย และเพปซิน
6. การแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อและปลา	ทำให้เนื้อมีความนุ่ม	รา, แบคทีเรีย	โบรมิเลน, ปาเปน
7. อุตสาหกรรมยาและทางการแพทย์	ช่วยในการย่อย	รา, แบคทีเรีย	โบรมิเลน, ปาเปน
8. การฟอกหนัง	ทำให้หนังมีความนุ่มและช่วยกำจัดขน	รา, แบคทีเรีย	เอนไซม์จากน้ำย่อย และปาเปน
9. การผลิตผงซักฟอก	ขจัดคราบโปรตีนและสิ่งสกปรก	รา, แบคทีเรีย	แอลคาไลน์โปรติเอส

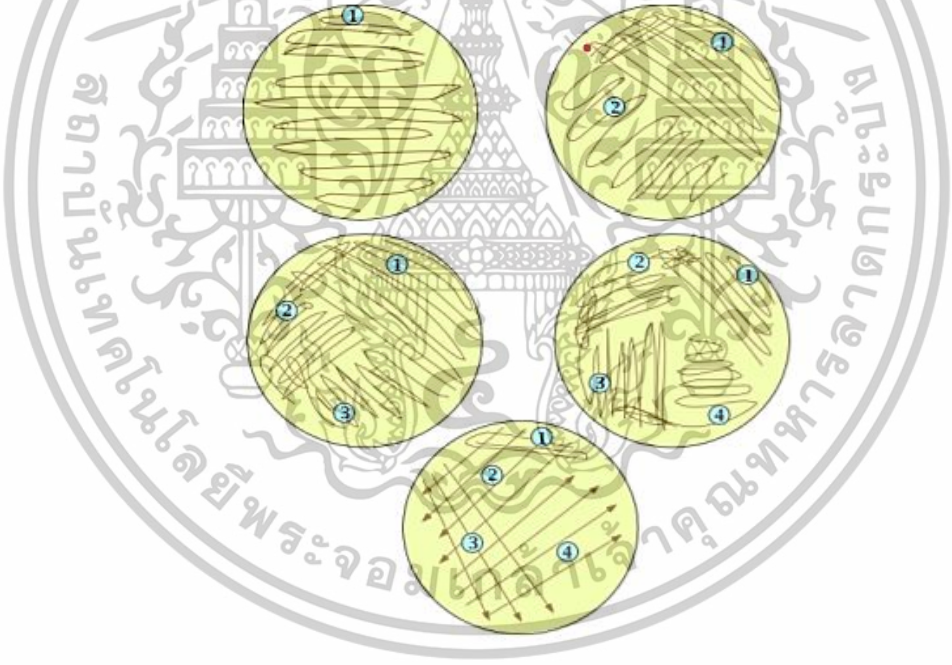
ที่มา: Miller และ Litsky (1976)

2.7 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เป็นเทคนิคพื้นฐานทางจุลชีววิทยาที่มีความสำคัญเป็นอย่างมาก หลักการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture medium) จำเป็นต้องแยกเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ (Single colony) จำนวนมาก จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่คัดแยกได้ไปศึกษาลักษณะรูปร่าง และคุณสมบัติต่างๆ เพื่อให้ทราบว่าเป็นเชื้อชนิดใด เทคนิคทั่วไปที่นิยมใช้ในการแยกเชื้อบริสุทธิ์ คือ วิธี cross streak plate โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) แตะที่ตัวอย่างหรือสิ่งส่งตรวจ จากนั้นขีดหรือลาก (streak) ในแนวระนาบติดต่อกัน 4-5 เส้นลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (agar plate) หลังจากลากในแนวระนาบแรกที่มีเชื้อจุลินทรีย์อยู่หนาแน่นที่สุดเสร็จ ให้นำปลายห่วง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

เขี่ยเชื้อมาลนหรือเผาไฟจนกระทั่งลวดร้อนแดง เพื่อฆ่าเชื้อที่ติดปลายห่วงเขี่ยเชื้อให้หมด จากนั้นจึงขีดเชื้อต่อจากรอยลากของระนาบแรกออกมาเพียงหนึ่งครั้ง และลากเป็นระนาบที่สองต่อกัน 4-5 เส้น โดยรอยลากของเชื้อบนอาหารจะไม่ทับกับระนาบแรกอีก หลังจากนั้นให้แบบเดียวกันกับระนาบที่สองจนรอยลากครบทั่วทั้งจานเพาะเชื้อซึ่งมีประมาณสี่ระนาบ เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์นำเชื้อไปทำการศึกษาต่อในด้านต่างๆ จึงต้องมีการถ่ายเชื้อจากอาหารเดิมไปยังอาหารใหม่ หรือทำการเพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อการทดสอบและการวิเคราะห์ต่างๆ ดังนั้นการเรียนรู้เทคนิคในการถ่ายเชื้อที่ถูกต้องเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้ออื่นที่ทำให้ผลการทดลองเกิดความผิดพลาดได้ จึงต้องอาศัยหลักการของ aseptic technique ที่มีความสำคัญเป็นอย่างมาก อุปกรณ์พื้นฐานที่นำมาใช้ในการถ่ายเชื้อได้แก่ เข็มเขี่ยเชื้อ (needle) ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) และตะเกียงแอลกอฮอล์เพื่อใช้ฆ่าเชื้อโดยการเผา (incineration) การถ่ายเชื้อจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรีย และยีสต์นิยมใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเป็นส่วนใหญ่ บางครั้งอาจมีการใช้เข็มเขี่ยเชื้อตรงส่วนปลายของเชื้อราที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย (filamentous fungi) นิยมใช้เข็มเขี่ยเชื้อปลายงอ (ธีระวัฒน์, 2562)

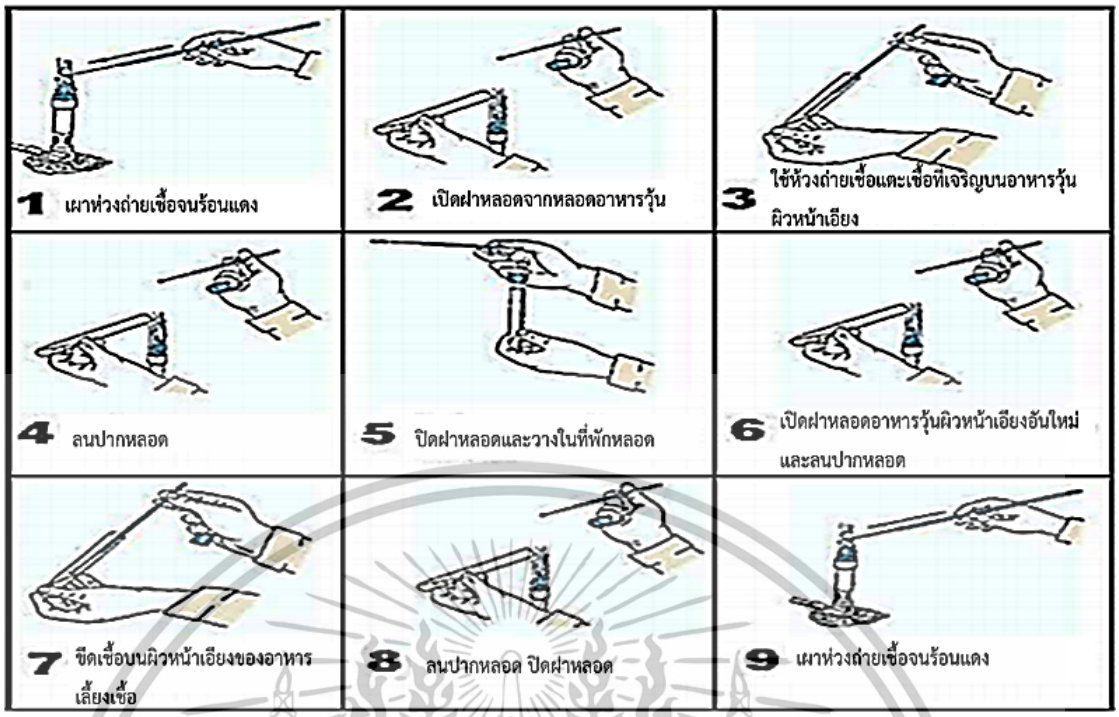


รูปที่ 2.2 เทคนิค streak plate แบบต่างๆ (ที่มา: Microbiology Laboratories, 2011)

2.8 การถ่ายเชื้อ (Transfer of culture)

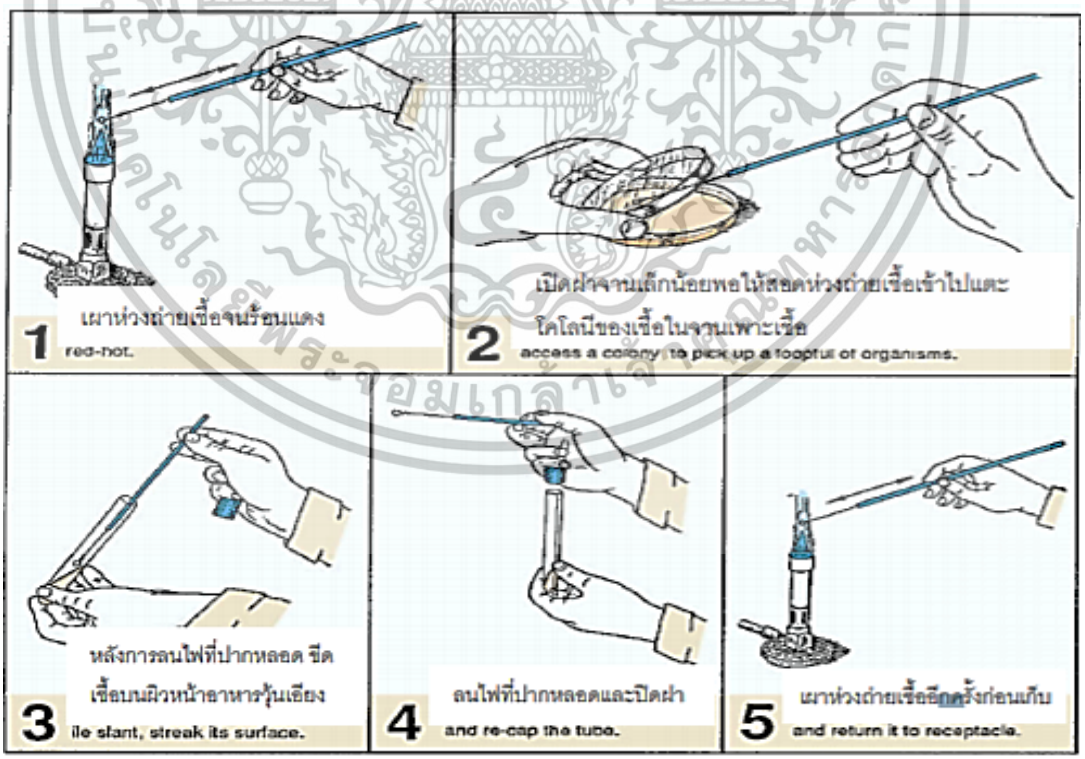
การถ่ายเชื้อเป็นการถ่ายเชื้อจากสิ่งแวดล้อมหนึ่งไปยังสิ่งแวดล้อมหนึ่ง จำเป็นต้องทำในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในอากาศ และบริเวณผิวของสิ่งต่างๆ รอบตัวเรา ได้แก่ การถ่ายเชื้อจากอาหารวุ้นผิวหน้าเอียง (slant) ไปยังอาหารวุ้นผิวหน้าเอียงอันใหม่ และการถ่ายเชื้อจากจานเพาะเชื้อไปยังอาหารวุ้นผิวหน้าเอียง (Arab's Lab, 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 เทคนิคการถ่ายเชื้อจากอาหารวุ้นผิวหน้าเอียงไปยังอาหารวุ้นผิวหน้าเอียงอันใหม่

(ที่มา: Arab's Lab, 2011)



รูปที่ 2.4 เทคนิคการถ่ายเชื้อจากจานเพาะเชื้อไปยังอาหารวุ้นผิวหน้าเอียงอันใหม่

(ที่มา: Arab's Lab, 2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

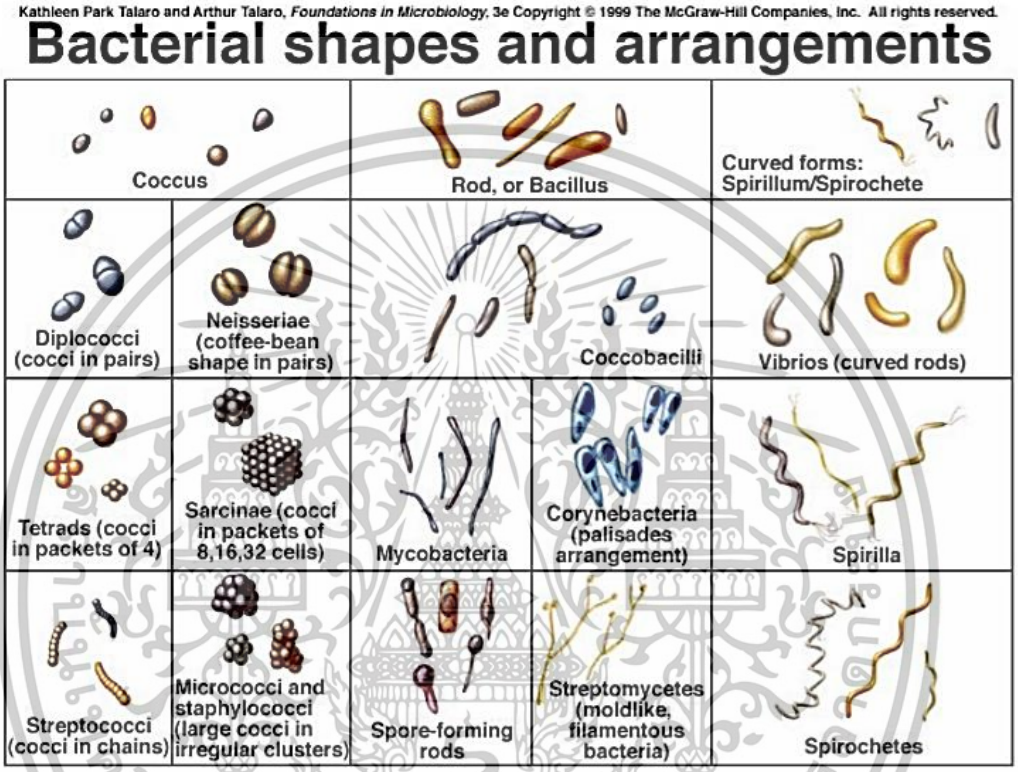
2.9 รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย

รูปร่างของแบคทีเรีย (bacterial shape) โดยทั่วไปมี 3 แบบด้วยกัน คือ

2.7.1 ทรงกลม (sphere) เรียกว่า coccus หรือ cocci

2.7.2 รูปปท่อน (rod) เรียกว่า bacillus หรือ bacilli

2.7.3 รูปเกลียว (spiral) เรียกว่า spirillum หรือ spirilli



รูปที่ 2.5 การจัดเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย (ที่มา: ปิยะนุช, ม.ป.ป.)

2.10 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มีงานวิจัยหลายฉบับที่ทำการศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอส และได้มีการใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน ดังนี้

วัชรา (2545) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียออกจากตัวอย่างน้ำปลาบนอาหาร Brain Heart Infusion Agar ที่เติม NaCl 10% พบว่า S. aureus ผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้อยู่ในช่วง 8.93-24.20 ยูนิตต่อมิลลิลิตร B. cereus และ B. licheniformis ผลิตได้ 0.80-29.20 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ศุภณัฐ และคณะ (2558) ได้ทำการศึกษาการคัดแยกและลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียชอบเค็ม และเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงจากน้ำปลาโซเดียมต่ำ จากการทดลองพบว่าโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียแตกต่างกัน 3 สายพันธุ์ เจริญได้บนจานเพาะเชื้อ PAC ที่เติมเกลือความเข้มข้นร้อยละ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เท่านั้น เมื่อนำมาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาโดยวิธีการย้อมสีแบบแกรม และย้อมสีเอนโดสปอร์ พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ ติดสีแกรมบวก มีลักษณะท่อน และสามารสร้างเอนโดสปอร์ได้

สิริญญา (2554) ได้ทำการศึกษาการคัดเลือกและระบุชนิดของแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่สร้างโปรติเอสและสารระเหยในน้ำปลา จากการคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มสูงจากบ่อหมักน้ำปลาช่วงเดือน 1-12 จำนวน 344 ไอโซเลต ที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในการย่อยสลายโปรตีนในนมและโปรตีนเนื้อปลาในอาหารแข็ง (JCM, Halophilic medium and PCA) ที่เติม NaCl 25% แบคทีเรียชอบเค็มสูง 24 จาก 54 ไอโซเลต ที่แสดงกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนนมสูงสุดถูกคัดเลือกมาศึกษาความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนจากปลากะตัก การระบุชนิดของแบคทีเรียโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยา พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างท่อน ทุกไอโซเลตเจริญในสภาวะที่มี NaCl ในระดับ 15-30% และเจริญได้ดีที่ NaCl เข้มข้น 20-25%

สุวรรณี (2545) ได้ทำการศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสที่แยกได้จากกระบวนการหมักน้ำปลา พบว่าแบคทีเรียไอโซเลตที่ 13 ซึ่งแยกได้จากอาหาร *Halobacterium* medium agar (HMA) ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 15% สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้มากที่สุด คือ 196.52 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่ความเข้มข้นของ NaCl 25% คือ เท่ากับ 397.39 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำมาจัดจำแนก พบว่าเป็นสกุล *Bacillus*

อำพรรณ และคณะ (2558) ได้ทำการศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่สามารผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากตัวอย่างปลาร้า 6 แหล่ง จากการทดลองพบว่าสามารถแยกเชื้อได้ 12 ไอโซเลต พบว่ามี 9 ไอโซเลต มีลักษณะโคโลนีกลม นูน ผิวมันวาว ขอบเรียบ ทั้งหมด ส่วนอีก 3 ไอโซเลต มีลักษณะโคโลนีกลม แบน ผิวด้าน ขอบหยักเป็นคลื่น พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลตติดสีแกรมบวก 9 ไอโซเลต มีรูปร่างกลม และ 3 ไอโซเลต มีรูปร่างท่อน

Chaiyanan และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาลักษณะของแบคทีเรียที่มีความสำคัญในการหมักน้ำปลา พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก โคโลนีสีเหลืองทอง แต่เมื่ออายุมากขึ้นโคโลนีจะเป็นสีขาว รูปร่างแท่งคล้าย *Bacillus* เซลล์อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว คู่ หรือเป็นสายสั้น สามารถสร้างสปอร์ จัดเป็นแบคทีเรียสกุล *Halobacillus* ซึ่งสามารถสร้าง Extra-cellular proteolytic enzyme

Kobayashi และคณะ (2003) ได้ทำการคัดแยกและศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกชอบเกลือจาก terasi ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากการหมักของอินโดนีเซียที่นำกุ้งมาหมักกับเกลือ (Shrimp paste) เชื้อที่พบเป็นแบคทีเรียในกลุ่มของ *Tetetragenococcus* ได้แก่ *Tettragenococcus halophilus* และ *T. muriaticus* ที่เจริญบน MRS agar medium ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 10%

Namwong และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาศักยภาพของการนำแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางมาทำงานร่วมกับเอนไซม์ทางการค้าในระยะเวลาการหมักน้ำปลาในบ่อหมักที่มีอายุ 1 เดือน และมีความสามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ดี หลังจากหมักน้ำปลา 4 เดือน พบว่า ปริมาณกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อะมิโนทั้งหมด (8.5-9.5 g/100 ml) ปริมาณสารประกอบที่ให้กลิ่น [2-methylbutanal (0.13-0.23 ng/ml) 2-propanone (0.9-1.1 ng/ml) n-propanal (0.04-0.07 ng/ml) butanoic acid (0.033-0.15 ng/ml)] และปริมาณกรดอะมิโน [กรดกลูตามิก (1.8-1.9 g/100 ml) กรดแอสปาร์ติก (1 g/100 ml) และไลซีน (0.9-0.96 g/100 ml)] ใกล้เคียงกับองค์ประกอบทางเคมีของน้ำปลาที่หมักนานตามธรรมชาติ (12-18 เดือน)

Tanasupawat และคณะ (2011) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียออกจากตัวอย่างกะปิ พบว่า Virgibacillus TKNR13-3 สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ 0.90 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็นต้น

Yongsawatdigul และคณะ (2007) ได้ทำการคัดแยกและคัดเลือกเชื้อ 3 สายพันธุ์ ที่มีความสารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อในการลดระยะเวลาการหมักน้ำปลา และพบว่า เชื้อ *Tetragennococcus* PB 407 พบว่า สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นเกลือ 4 M หรือ 24% (w/w) และได้ผลิตในรูปเอนไซม์ผง จากนั้นทดลองเติมเอนไซม์โปรติเอสลงในกระบวนการหมักน้ำปลา พบว่า เมื่อเติมเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 1.5% (w/w) จะช่วยลดระยะเวลาในการหมักน้ำปลาจาก 8-12 เดือน เหลือเพียง 6 เดือน นอกจากนี้พบว่า เอนไซม์มีผลทำให้ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจนสูงที่สุด และสีของน้ำปลาดีที่สุด เมื่อเทียบกับการหมักน้ำปลาที่ไม่เติมเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

- ตัวอย่างน้ำกะปิขัดน้ำจาก ต. ชุมโค และ จ. ระนอง

3.1.2 เครื่องมือ

- ตู้ปลอดเชื้อ (Biological Safety Cabinet)
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Visible spectrophotometer)
- เครื่องวัดค่าพีเอช (pH Meter)
- เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)
- ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)
- เครื่องชั่งดิจิตอลทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light Microscope)

3.1.3 อุปกรณ์

- Petri Dish
- Inoculation Loop
- Cuvette
- Slide, Cover Slide
- Immersion oil
- ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)
- บีกเกอร์ (Beaker)
- กระบอกตวง (Cylinder)
- แท่งแก้วคนสาร (Glass Rod)
- ช้อนตักสารเคมี (Spatula)
- ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)

3.1.4 สารเคมี

- Brain Heart Infusion medium
- Skim Milk
- Agar
- Sodium Chloride (NaCl)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Trichloroacetic acid
- Azocasein
- Tris base
- HCl
- Calcium Chloride ($CaCl_2$)
- ไทโรซีน (Tyrosine)
- Production Medium (Glucose, Peptone, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, K_2HPO_4, $NaHCO_3$, Yeast extract, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$)
- สีย้อมแกรม (Crystal violet, iodine, ethyl alcohol 95%, Safranin O)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 ศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากกะปิขัดน้ำ

3.2.1.1 การเพิ่มจำนวนเชื้อแบคทีเรียชอบเค็ม (Enrichment)

นำตัวอย่างน้ำกะปิปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตความขุ่น

3.2.1.2 สังเกตการเกิดวงใส (Clear Zone)

นำเชื้อจุลินทรีย์ จากข้อ 3.2.1.1 ไปแยกเพื่อทำเชื้อบริสุทธิ์โดยทำการ streak plate techniques ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Agar ที่เติม NaCl 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และ Skim Milk 0.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดวงใสรอบๆ โคโลนี (หากเกิดวงใสรอบๆ โคโลนี แสดงว่าเชื้อสร้างเอนไซม์โปรติเอส)

3.2.1.3 การทำเชื้อบริสุทธิ์ (Pure Culture)

เลือกโคโลนีที่ต่างกันในเพลทเดียวกันไปทำการถ่ายเชื้อจากอาหารเดิมไปอาหารใหม่ โดยทำการ streak plate techniques ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Agar ที่เติม NaCl 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และ Skim Milk 0.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อีกครั้งเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นนำโคโลนีที่เลือกไปย้อมแกรม เก็บโคโลนีที่ต่างกันทุกโคโลนีไว้บนอาหาร Brain Heart Infusion Agar slant ที่เติม NaCl 5% เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

3.2.2 ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียชอบเค็ม ดังนี้

3.2.2.1 นำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้เครื่อง UV-Visible spectrophotometer ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 จากนั้นถ่ายเชื้อที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงใน Production Medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.2.2 เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสปริมาตร 75 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, pH 9 ที่เติม $CaCl_2$ ความเข้มข้น 2 mM ปริมาตรโดยรวม 1 มิลลิลิตร และเติม 2% Azocasein ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย Trichloroacetic acid ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.2.2.3 นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าที่ได้มาเทียบกับการฟมาตรฐานไทโรซีน (ความเข้มข้น 0-360 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เพื่อหาความเข้มข้นของไทโรซีนในตัวอย่าง (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

3.2.2.4 นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ หมายถึง เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีน และให้กรดอะมิโนในรูปของไทโรซีน 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที

3.2.3 ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Sodium Chloride ความเข้มข้นต่างๆ

3.2.3.1 นำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้เครื่อง UV-Visible spectrophotometer ในการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของเชื้อให้เท่ากับ 0.5 จากนั้นถ่ายเชื้อที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงใน Production Medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยการแปรความเข้มข้นของ Sodium Chloride ร้อยละ 0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5, 10, 15 และ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.3.2 เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวัดการเจริญของเชื้อโดยวิธี Pour plate technique

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลและอภิปรายการทดลอง

4.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากกะปิขัดน้ำ

จากการนำตัวอย่างกะปิขัดน้ำจาก 2 แหล่ง มาเลี้ยงเชื้อใน Brain Heart Infusion Broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำเชื้อบริสุทธิ์โดยทำการ streak plate techniques ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Agar ที่เติม NaCl 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และ Skim Milk 0.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.1 ดังนี้

ตารางที่ 4.1 ลักษณะ และการจัดเรียงตัวของแบคทีเรียต่างๆ ที่แยกได้จากกะปิขัดน้ำ

Sample sources	Isolate code	Colony characteristics					Cell morphologies		
		Color	Shape	Margin	Elevation	Texture	Shape	Arrangement	Gram's reaction
Pak Chan Subdistrict, Ranong	HR1	White	Circular	Entire	Convex	Shiny	Cocci	Cluster	+
Chum Kho Subdistrict, Chumphon	HP1	White	Circular	Entire	Convex	Shiny	Cocci	Cluster	+
	HP2	White	Irregular	Undulate	Raised	Dull	Rod	Single	+
	HP3	Yellow	Circular	Entire	Convex	Shiny	Cocci	Cluster	+
	HP4	Yellow	Irregular	Undulate	Raised	Dull	Cocci	Cluster	+

จากตารางที่ 4.1 พบว่าแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร Brain Heart Infusion Agar มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันไป มีทั้งสีขาว และสีเหลือง โดยที่โคโลนีส่วนใหญ่มีลักษณะกลมนูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว ทั้งหมด 3 ไอโซเลต ได้แก่ HR1, HP1 และ HP3 ส่วนที่เหลืออีก 2 ไอโซเลต มีลักษณะไม่กลมไม่นูน ขอบหยักเป็นคลื่น ผิวด้านไม่วาว ได้แก่ HP2 และ HP4 เมื่อศึกษารูปร่าง การจัดเรียงตัว และการติดสีแกรม พบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ติดสีแกรมบวก ส่วนใหญ่มีลักษณะรูปร่างกลม จัดเรียงตัวเป็นกลุ่ม 4 ไอโซเลต ได้แก่ HR1, HP1, HP3 และ HP4 ส่วนที่เหลืออีก 1 ไอโซเลต มีลักษณะรูปร่างท่อน จัดเรียงตัวเดี่ยว ได้แก่ HP2 ซึ่งแบคทีเรียที่คัดแยกได้คล้ายกับการทดลองของ อำพรรณ และคณะ (2558) ที่ทำการคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มได้ 12 ไอโซเลต โดยคัดแยกจากตัวอย่างปลาร้า 6 แหล่ง ได้ 9 ไอโซเลต มีลักษณะโคโลนีกลมนูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว ติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม และ 3 ไอโซเลต มีลักษณะโคโลนีกลมแบน ขอบหยักเป็นคลื่น ผิวด้าน ติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อน และคล้ายกับการทดลองของ Rajan และคณะ (2010) ที่ทำการคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มได้ 93 ไอโซเลต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยคัดแยกจากปลาฉลามแห้งได้ 48 ไอโซเลต ติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม 42 ไอโซเลต และติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อน 6 ไอโซเลต และคัดแยกจากปลาแอนโชวี่แห้งได้ 45 ไอโซเลต โดย 43 ไอโซเลต ติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อน และ 2 ไอโซเลต ติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม และเมื่อตรวจสอบชนิดของแบคทีเรีย พบว่าเป็นแบคทีเรีย *Scoliodon* sp., *Thrissina thryssa* และ *Bacillus halodurans*

4.2 ข้อเสนอแนะ

4.2.1 การหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสด้วยเครื่อง UV-Visible spectrophotometer ที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร คือ การหาความเข้มข้นของไทโรซีนในตัวอย่างน้ำเคย โดยจากการทดลองของ สุมนต์ทิพย์ (2535) กล่าวว่า ไทโรซีน คือ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากสารเคมีที่ใช้เป็นซับสเตรตซึ่งมีหลายชนิด ได้แก่ casein และ azocasein เป็นต้น ซึ่ง azocasein คือ โปรตีนมีสี (chromogenic protein) เป็นซับสเตรตอีกพวกหนึ่งที่ใช้กันมากในการวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส วัดโดยใช้วิธี spectrophotometry ที่ความยาวคลื่น 275-280 นาโนเมตร การนำซับสเตรตชนิดนี้มาวิเคราะห์นั้น มีวัตถุประสงค์เพื่อช่วยลดระยะเวลาในขั้นตอนการวิเคราะห์ระหว่างการผลิตเอนไซม์ในทางการค้า

4.2.2 การเก็บโคโลนีที่ต่างกันทุกโคโลนีไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (BHI Agar slant) ที่เติม NaCl 5% เนื่องจากอาหารหมักที่ใช้เกลือในการถนอมอาหาร (เช่น กะปิ) นิยมใช้ NaCl ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2.5-5 (พิมเพ็ญ และนิธิยา, ม.ป.ป.) และแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองเป็นพวกชอบเค็มปานกลาง ซึ่งเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือร้อยละ 3-15 จากการทดลองของ อำพรรณ และคณะ (2558) ที่ทำการคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี NaCl ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้สามารถเจริญได้ในที่มีความเข้มข้นเกลือร้อยละ 0-20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยมี 1 ไอโซเลต ที่เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือร้อยละ 5 คือ SA2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองการคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากน้ำเคย จากตัวอย่างน้ำกะปิขัดน้ำ 2 แหล่ง พบว่าสามารถคัดแยกได้ 5 ไอโซเลต ส่วนใหญ่มีลักษณะโคโลนี กลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว เมื่อนำไปทดสอบการติดสีแกรม พบว่าทั้ง 5 ไอโซเลต ติดสีแกรมบวกทั้งหมด หลังจากสังเกตการเกิดวงใสรอบๆโคโลนีบนอาหารแข็ง พบว่าไม่เกิดวงใสรอบๆโคโลนี แสดงว่าเชื้อไม่สร้างเอนไซม์โปรติเอส ต้องตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อที่คัดแยกได้ทั้ง 5 ไอโซเลตต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กะปิชุมพร. [ม.ป.ป.]. กะปิขัดน้ำ. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก: http://ilongtail.com/shop/20/ สืบค้นวันที่ 15 พฤษภาคม 2564

จิตต์เรขา ทองมณี. 2544. จุลินทรีย์ในอาหารหมัก. วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ. 157: 28-29.

จิตติมา เจริญพานิช. 2552. หลักการและสภาวการณ์ปัจจุบันของการสังเคราะห์เพปไทด์. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 14: 128-137.

ธรรมรัตน์ ก้าวสมบัติ. 2554. การเพิ่มจำนวนยีนของเอนไซม์โปรติเอสนอกเซลล์จากเทอร์โมฟิลิคแบคทีเรียสายพันธุ์ TLS33. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ธีระวัฒน์ สุกใส. 2562. เทคนิคการแยกเชื้อ. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก: http://agro-industry.rmutsv.ac.th/agro/?q=th/Blog/643-687-create-blog-entry สืบค้นวันที่ 15 พฤษภาคม 2564

ปิยะนุช เนียมทรัพย์. [ม.ป.ป.]. สัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก: http://www.biotech.mju.ac.th/Upload/Document/973_BI330_bacterial%20structure_1.61.pdf สืบค้นวันที่ 15 พฤษภาคม 2564

พิมเพ็ญ พรเฉลิมพงษ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. [ม.ป.ป.]. Salt curing/การหมักเกลือ. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1322/salt- curing-การหมักเกลือ?fbclid=IwAR1lYeK2ebFtOXRXwmFRLxP4f93OTL8FXdCM_itScj1LZ_0qMGi1oJrfy3o สืบค้นวันที่ 7 กรกฎาคม 2564

มยุรฉัตร เอกธรรมกิจ และสุจิตรา ยนต์สิงห์. 2548. การศึกษาเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากถั่วเหลืองหมักชนิดต่างๆ. ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วทัญญุตา ภู่โยธิน. 2544. การทำให้บริสุทธิ์บางส่วนของโปรติเอสที่ผลิตโดยแบคทีเรียชอบเค็ม *Halobacillus trueperi* subspecies *thailandensis*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วัชรา นิคมขำ. 2545. การศึกษาแบททีเรียทนเค็มและชอบเค็มที่มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในน้ำปลา. วิทยานิพนธ์ประกาศนียบัตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยนเรศวร.

ศุภณัฐ หวังรุ่งเรืองกิจ, พชรวัฒน์ ดิลกพัฒน์วานิช, อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์ และณัฐมล จินดาพรรณ. 2558. การคัดแยก และลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียชอบเค็ม และเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงจากน้ำปลาโซเดียมต่ำ. การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีระหว่างสถาบัน ครั้งที่ 3. ณ มหาวิทยาลัยสยาม กรุงเทพมหานคร. 28-29 เมษายน. หน้า 472.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมนึก ใช้เทียมวงศ์, พจนา บุณยาเนตร และเธียร บรรณโศภิษฐ์. 2520. การสำรวจชนิด แหล่ง และฤดูทำการประมงเคยในจังหวัดชายทะเลอ่าวไทย และอ่าวไทยฝั่งตะวันออก. รายงานวิชาการฉบับที่ 7/2520. หน่วยงานสัตว์น้ำอื่นๆ กองประมงทะเล, กรมประมง. 32 หน้า

สาวิตรี ดือราแม. 2561. แบคทีเรียชอบเกลือ: แหล่งผลิตเอนไซม์ใหม่สำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2 เมษายน-มิถุนายน 2561. หน้า 17.

สิริญญา ป้องจันลา. 2554. การคัดเลือกและระบุชนิดของแบคทีเรียชอบเค็มสูงที่สร้างโปรติเอส และสารระเหยในน้ำปลา. วิทยานิพนย์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

สุจิตรา จันทร์เมือง. 2555. กุ้งเคย. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก: http://www.nicaonline.com/index.php?option=com_content&view=article&id=536:2012-02-22-02-40-59&catid=42:2012-02-20-03-00-29&Itemid=124 สืบค้นวันที่ 18 พฤษภาคม 2564

สุมนต์ทิพย์ จันทร์ฟัก. 2535. การตรึงเซลล์และสมบัติของโปรติเอสที่ส่งออกนอกเซลล์ของเทอร์มอฟิลิคแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่แยกจากบ่อน้ำร้อนสันกำแพง. วิทยานิพนธ์วิทยาศตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุวรรณี นพรัตน์. 2545. การคัดเลือกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส. ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตร์บัณฑิต มหาวิทยาลัยบูรพา.

อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์, ชนิตา ชูพรม และอายูรีน มานะ. 2558. การคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากปลาร้า. วารสารเทคโนโลยีการอาหาร. 1: 2.

อุดมศักดิ์ ดารุมาศ. 2554. “กะปิเคย” กับภูมิปัญญาพื้นบ้าน. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก: http://www1a.biotec. or.th/BRT/index.php/2010-08-09-09-38-28/155-shrimp-sauce สืบค้นวันที่ 18 พฤษภาคม 2564

Aunstrup, K. 1979. Proteinases. Applied Biochemistry and Bioengineering. 2: 49-114.

Arab’s Lab. 2011. Transfer of bacteria from slant to slant. [Online]. Available: http://www.arabslab.com./vb/showthread.php?t=2728 Retrieved May 22, 2021

Chaiyanan, S., Maugel, T., Haq, A., Robb, F. and Cowell, R. 1999. Polyphasix Taxonomy of Novel *Halobacillus*, *Halobacillus thailanddensis* sp. Isolate from fish Sauce. Symtematic and Applied Microbiology. 22: 360-365.

Kristinsson, H. G. and Rasco, B. A. 2000. “Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties”. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 40: 43-81.

Kobayashi, T., Kajiwra, M., Wahyuni, M., Kitakdo, T., Hamada-sato, N., Imada, C. and Watanabe, E. 2003. Isolation and characterization of halophilic lactic acid bacteria isolate from “terasi” shrimp pats: A traditional fermented seafood product in Indonesia. Journal of Applied Microbiology. 49: 279-286.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Miller, B. M. and Listky, W. 1976. Microbial Enzyme. Industrial Microbiology. Mc Graw-Hill INC.

Microbiology Laboratories. 2011. Streak plate. [Online]. Available: http://inst.bact.wisc.edu/inst/index.php?module=Book&func=displayarticle&art_id=6 Retrieved May 24, 2021

Namwong, S., Tanasupawat, S., Visessanguan, W., Kudo, T. and Itoh, T. 2007. *Halococcus thailanddensis* sp. nov., from fish sauce in Thailand. Int J Syst Evol Microbiol. 57(10): 2199-2203.

Outtrup, H. and Boyce, C. O. L. 1990. Microbial Proteinases and Biotechnology. 2nd edition. Fogarty, M. W. and Kelly, C. T. (eds). Elsevier Applied Science. London.

Poutanen, K. 1997. Enzyme: An important tool in the improvement of the quality of cereal foods. Trends Food Science and Technology. 8: 300-306.

Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S. and Deshpande, V. V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial protease. American Society for Microbiology. 62: 597-635.

Rajan, L. A., Joseph, T. C., Thampuran, N. and James, R. 2010. Studies on the microbial diversity of salted fishes under aerobic conditions. Microbiology Research. 2: 22-25.

Sana, B., Ghosh, D., Saha, M. and Mukherjee, J. 2006. Purification and characterization of a salt, solvent, detergent and bleach tolerant protease from a new gamma-Proteo-bacterium isolated from the marine environment of the Sundarbans. Process Biochemistry. 41: 208-215.

Terrence, D. M. and Osna, N. A. 2003. "Intracellular Proteolytic Systems in Alcohol Induced Tissue Injury". Nebraska Medical Center, Omaha.

Tanasupawat, S., Taprig, T., Akaracharanya, A. and Visessanguan, W. 2011. Characterization of *Virgibacillus* strain TKNR13-3 from fermented shrimp paste (ka-pi) and it's protease production. African Journal of Microbiology Research. 5(26): 4714-4721.

Yongsawatdigul, J., Rodtong, S. and Raksakulthai, N. 2007. Acceleration of Thai fish sauce fermentation using proteinases and bacterial starter cultures. J Food Sci. 72(9): 382-390.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion (BHI)

HM infusion powder	12.5	กรัม
BHI powder	5.0	กรัม
Proteose peptone	10.0	กรัม
Dextrose (Glucose)	2.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Disodium phosphate	2.5	กรัม

วิธีเตรียม Brain Heart Infusion Broth

ชั่ง Brain Heart Infusion (BHI) 37 กรัม ทำการละลายสารด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้ละลายหรือจะนำไปต้มให้ละลาย นำไปวัด pH 7.4 ใส่ใส่ขวดรูปชมพู่ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นตั้งอาหารทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่ออาหารเย็นลงนำไปเลี้ยงเชื้อต่อไป

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Agar

HM infusion powder	12.5	กรัม
BHI powder	5.0	กรัม
Proteose peptone	10.0	กรัม
Dextrose (Glucose)	2.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Disodium phosphate	2.5	กรัม
Agar	1.5	%

วิธีเตรียม Brain Heart Infusion Agar ที่เติม NaCl 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และ Skim Milk 0.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ชั่ง Brain Heart Infusion (BHI) 37 กรัม, Agar 15 กรัม, NaCl 50 กรัม และ Skim Milk 8 กรัม ทำการละลายสารด้วยน้ำกลั่น (เตรียม Skim Milk แยกกับ Brain Heart Infusion Agar) ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้ละลายหรือจะนำไปต้มให้ละลาย นำไปวัด pH 7.4 ใส่ขวดรูปชมพู่ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (โดยนึ่งฆ่าเชื้อ Skim Milk แยกกับ Brain Heart Infusion Agar) จากนั้นตั้งอาหารทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่ออาหารมีอุณหภูมิอยู่ที่ 40-50 องศาเซลเซียส (เติม Skim Milk ลงใน Brain Heart Infusion Agar เขย่าให้เข้ากัน) นำอาหารเทลงในเพลท ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อเพลท และนำไปเลี้ยงเชื้อต่อไป

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆ ... ไปใช้

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Production Medium (วัชรา, 2545)

Glucose	10.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.2	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.25	กรัม
K_2HPO_4	5.0	กรัม
$NaHCO_3$	10.0	กรัม

วิธีเตรียม Production Medium

ชั่ง Production Medium 35.45 กรัม ทำการละลายสารด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้ละลายหรือจะนำไปต้มให้ละลาย นำไปวัด pH 9.5 ใส่ขวดรูปชมพู่ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายใต้ความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 จากนั้นตั้งอาหารทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่ออาหารมีอุณหภูมิอยู่ที่ 40-50 องศาเซลเซียส นำไปเลี้ยงเชื้อต่อไป

4. Tris-HCl buffer (pH 9) (วัชรา, 2545)

Tris base	6.06	กรัม

วิธีเตรียม Tris-HCl buffer

ชั่ง Tris base 6.06 กรัม ทำการละลายสารด้วยน้ำ นำไปวัด pH 9 (ปรับ pH ด้วยกรดไฮโดรคลอริก) ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดสีชา และนำไปแช่ตู้เย็น

5. Trichloroacetic acid solution (วัชรา, 2545)

Trichloroacetic acid	18.0	กรัม
Sodium acetate trihydrate	19.0	กรัม

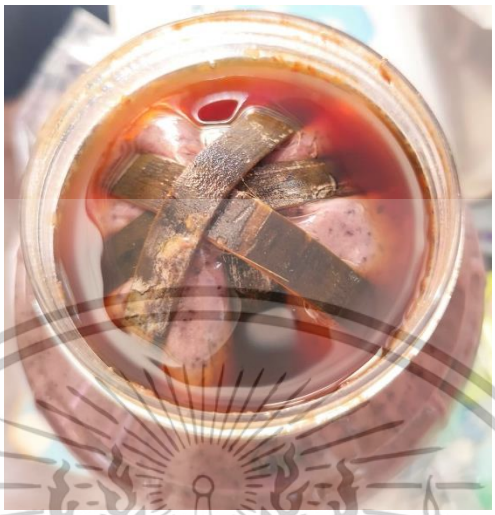
วิธีเตรียม Trichloroacetic acid solution

ชั่ง TCA 18 กรัม และ Sodium acetate trihydrate 19 กรัม ทำการละลายสารด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติม acetic acid ปริมาตรเป็น 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ภาพตัวอย่างกะปิขัดน้ำจาก ต. ชุมโค และ จ. ระนอง



รูปที่ ข.1 กะปิขัดน้ำจาก ต. ชุมโค

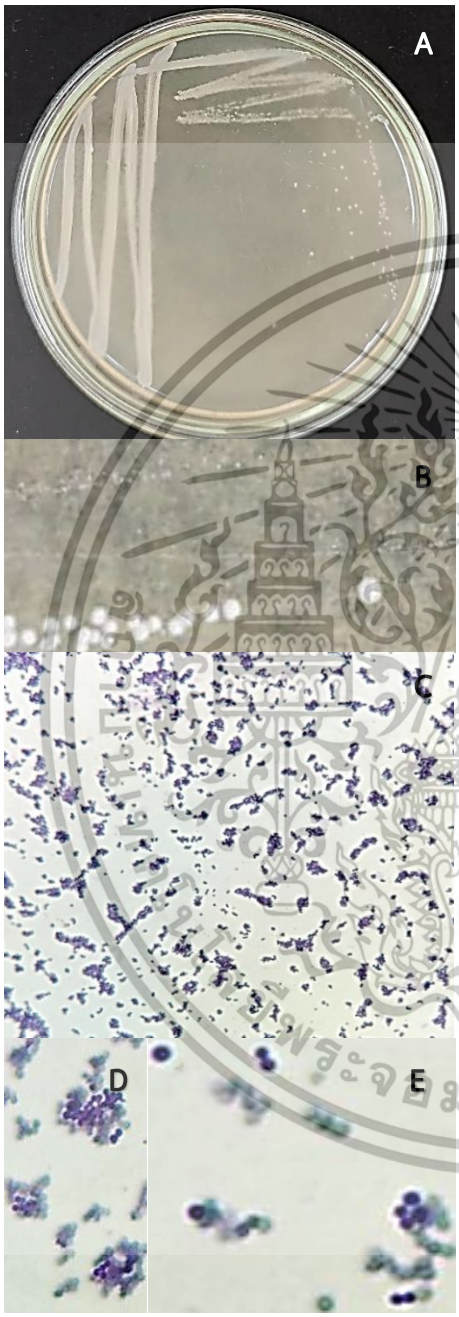
รูปที่ ข.2 กะปิขัดน้ำจาก จ. ระนอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ

HR1



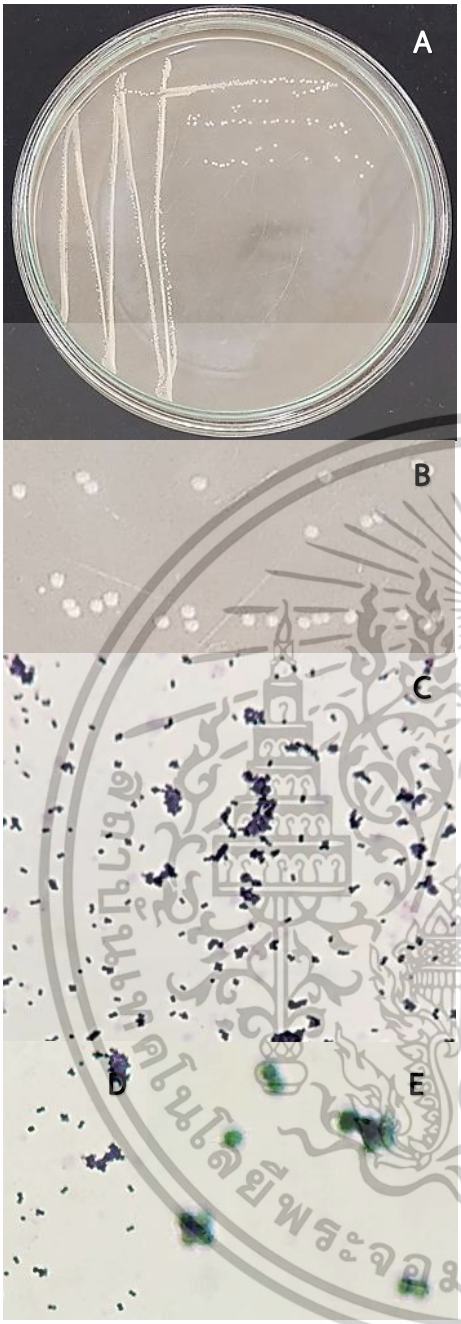
Taxonomy

Original code	HR1
Type	Bacteria
Growth Temp	37 °C
Medium	BHI
Note	น้ำกะปิขัดน้ำ ตำบลปากจั่น อำเภอกระบุรี จังหวัดระนอง
Gram strain	Positive
Shape	Cocci
Margin	Entire
Color	White

รูปที่ ค.1 แสดงลักษณะของ HR1 A, B: ลักษณะบนอาหารแข็งของ HR1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง C, D: การติดสีม่วง แกรมบวก รูปร่างกลม E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโดยใช้กำลังขยายรวมของเลนส์ใกล้ตา และเลนส์ใกล้วัตถุ อยู่ที่ 400X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

HP1



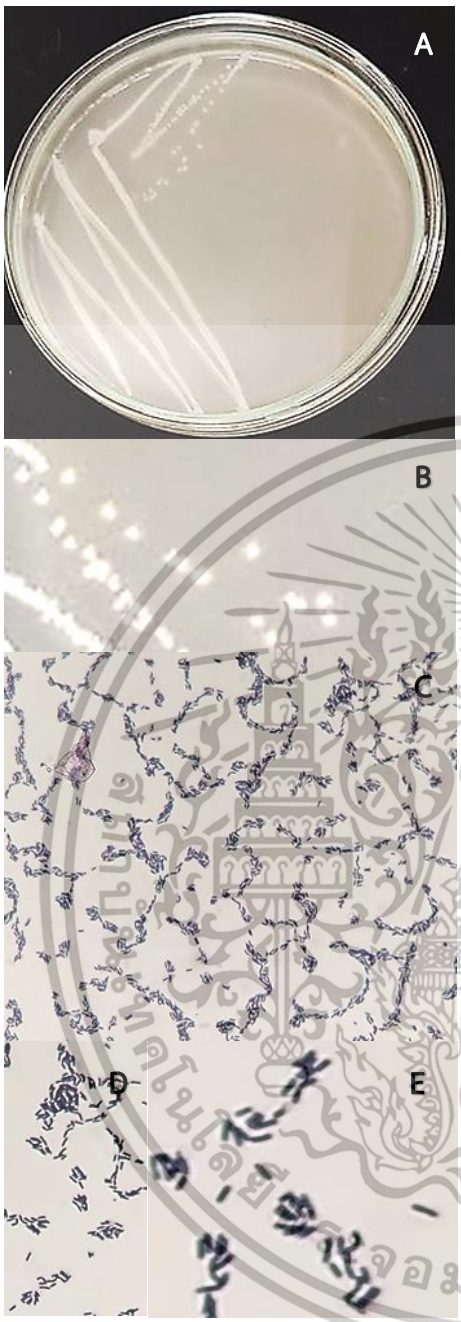
Taxonomy

Original code	HP1
Type	Bacteria
Growth Temp	37 °C
Medium	BHI
Note	น้ำกะปิขัดน้ำ ตำบลชุมโค อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร
Gram strain	Positive
Shape	Cocci
Margin	Entire
Color	White

รูปที่ ค.2 แสดงลักษณะของ HP1 A, B: ลักษณะบนอาหารแข็งของ HP1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง C, D: การติดสีม่วง แกรมบวก รูปร่างกลม E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโดยใช้กำลังขยายรวมของเลนส์ใกล้ตา และเลนส์ใกล้วัตถุอยู่ที่ 400X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

HP2



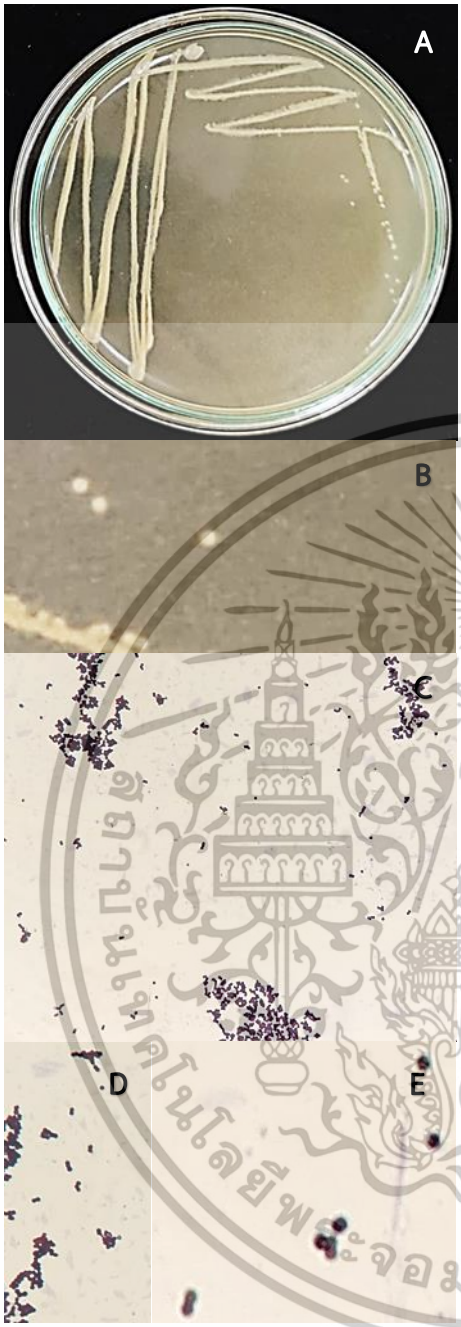
Taxonomy

Original code	HP2
Type	Bacteria
Growth Temp	37 °C
Medium	BHI
Note	น้ำกะปิขัดน้ำ ตำบลชุมโค อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร
Gram strain	Positive
Shape	Rod
Margin	Undulate
Color	White

รูปที่ ค.3 แสดงลักษณะของ HP2 A, B: ลักษณะบนอาหารแข็งของ HP2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง C, D: การติดสีม่วง แกรมบวก รูปร่างท่อน E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโดยใช้กำลังขยายรวมของเลนส์ใกล้ตา และเลนส์ใกล้วัตถุอยู่ที่ 400X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

HP3



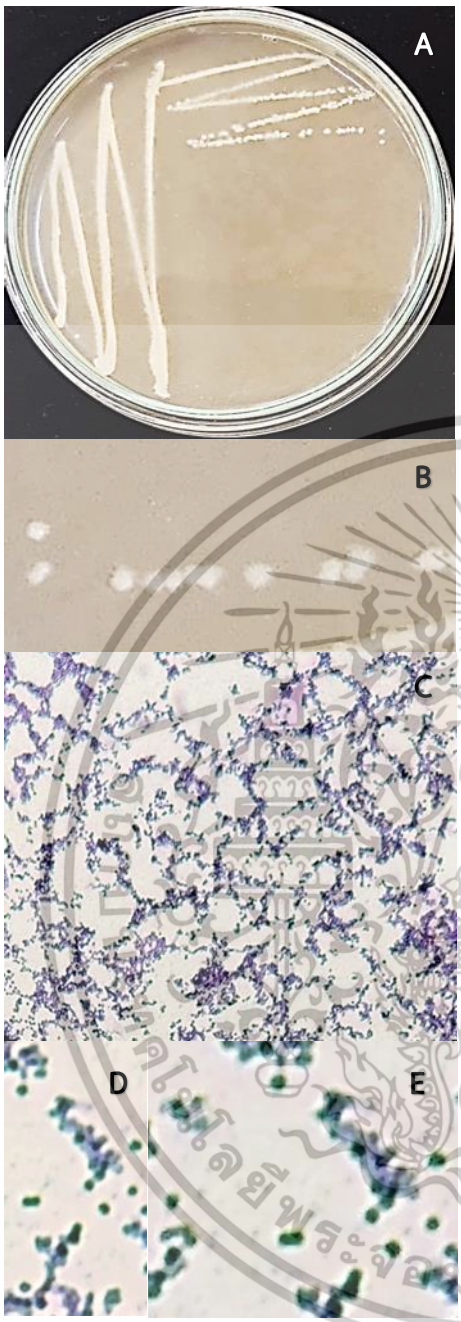
Taxonomy

Original code	HP3
Type	Bacteria
Growth Temp	37 °C
Medium	BHI
Note	น้ำกะปิขัดน้ำ ตำบลชุมโค อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร
Gram strain	Positive
Shape	Cocci
Margin	Entire
Color	Yellow

รูปที่ ค.4 แสดงลักษณะของ HP3 A, B: ลักษณะบนอาหารแข็งของ HP3 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง C, D: การติดสีม่วง แกรมบวก รูปร่างกลม E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโดยใช้กำลังขยายรวมของเลนส์ใกล้ตา และเลนส์ใกล้วัตถุอยู่ที่ 400X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

HP4



Taxonomy

Original code	HP4
Type	Bacteria
Growth Temp	37 °C
Medium	BHI
Note	น้ำกะปิขัดน้ำ ตำบลชุมโค อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร
Gram strain	Positive
Shape	Cocci
Margin	Undulate
Color	Yellow

รูปที่ ค.5 แสดงลักษณะของ HP4 A, B: ลักษณะบนอาหารแข็งของ HP4 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง C, D: การติดสีม่วง แกรมบวก รูปร่างกลม E: รูปร่างของเซลล์ที่ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงโดยใช้กำลังขยายรวมของเลนส์ใกล้ตา และเลนส์ใกล้วัตถุอยู่ที่ 400X

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

วิธีคำนวณหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (วัชรา, 2545)

สูตร $EA = \frac{A \times 1000}{15}$

EA คือ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (U/ml)

A คือ ความเข้มข้นของไทโรซีน เมื่อเทียบกับการฟมาตรฐานของไทโรซีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติการศึกษา

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวสิริพร สมณะ
วัน เดือน ปีเกิด	22 มีนาคม 2542
ที่อยู่	35 หมู่ 10 ตำบลบ้านควน อำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร 86110
ประวัติการศึกษา	ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสวนศรีวิทยา สายวิทย์-คณิต ปีการศึกษา 2559
E-mail	lovesiripornlove@gmil.com 60552010@kmitl.ac.th

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้