บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรียที่ผลิตโปรตีเอสจากกระบวนการหมักซีอิ๊ว

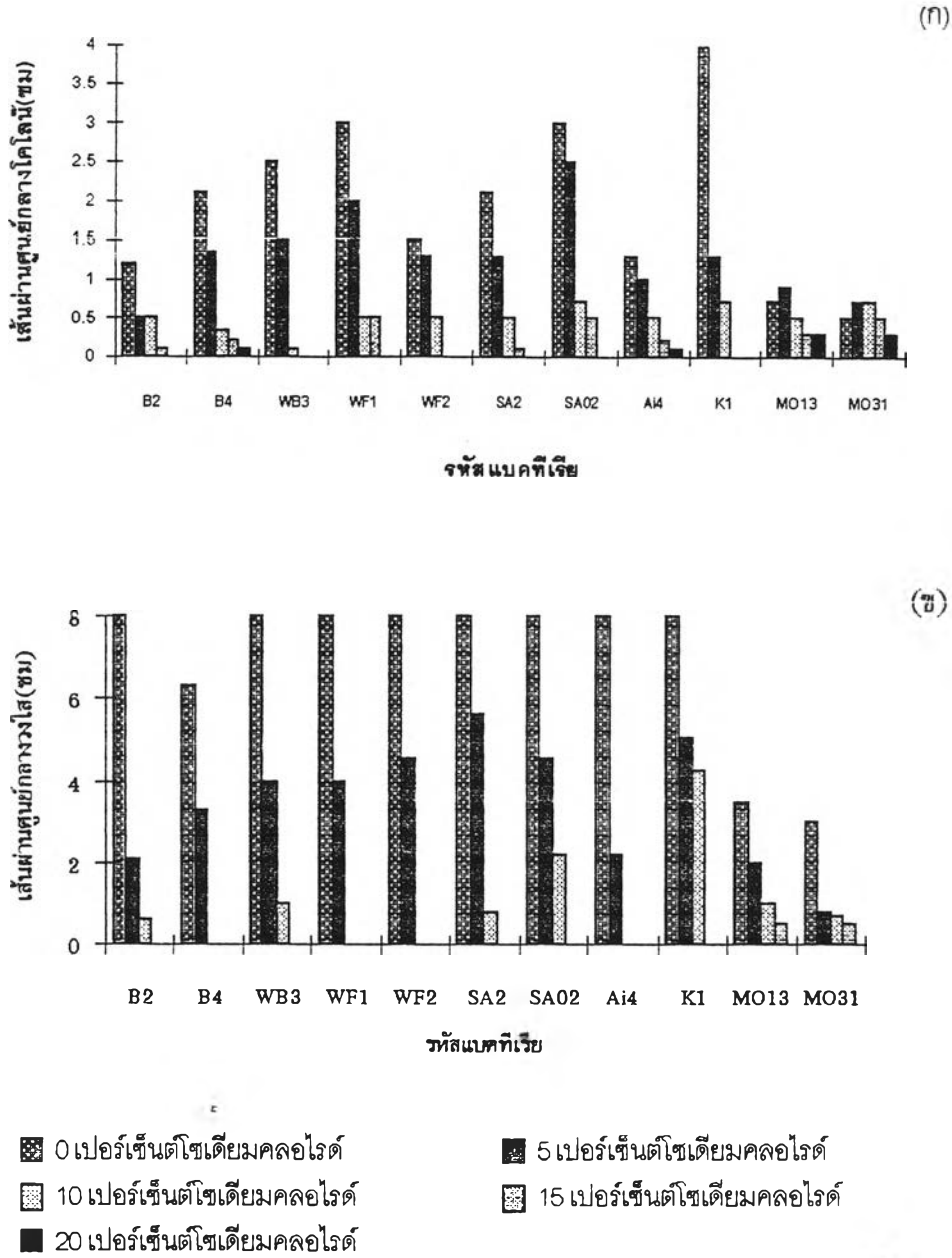
ผลการแยกแบคทีเรียจากน้ำแช่ถั่วเหลือง ถั่วเหลืองต้มสุก แป้งสาลี เกลือสมุทร โคจิ โมโรมิ และอากาศบริเวณที่หมักซีอิ๊วพบแบคทีเรีย 58 ไอโซเลต ซึ่งผลการทดสอบการผลิตโปรตีเอสบนอาหารแข็งสูตรมีเดียม 73 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ปริมาณต่างๆ พบว่าในจำนวนแบคทีเรีย 58 ไอโซเลต มีแบคทีเรียผลิตโปรตีเอส 11 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แบคทีเรียผลิตโปรตีเอสที่แยกจากกระบวนการหมักซีอิ๊วระดับห้องปฏิบัติการ

กระบวนการหมักซีอิ๊ว	แบคทีเรียที่แยกได้	แบคทีเรียที่ผลิตโปรตีเอส
1.ระยะโคจิ		
น้ำแช่ถั่วเหลือง	WB1,WB2,WB3	WB3
ถั่วเหลืองต้มสุก	B1 ถึงB6	B2,B4
แป้งสาลี	WF1,WF2	WF1, WF2
เกลือสมุทร	SA1,SA2,SA01,SA02	SA2,SA02
โคจิ	K1	K1
2.ระยะโมโรมิ		
น้ำหมักซีอิ๊ว 1-30 วัน	MO1 ถึง MO36	MO13,MO31
อากาศบริเวณที่หมัก	A1 ถึง A6	A4

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีการเจริญและโปรตีเอสแอคติวิตีสูงบนอาหารวุ้น

ผลการทดลองในรูปที่ 3 แสดงให้เห็นว่าควรนำไอโซเลต B2, WB3, SA2, SA02, K1,MO13 และ MO31 มาทดลองต่อไป เนื่องจากผลิตโปรตีเอสได้บนอาหารวุ้นสูตรมีเดียม 73 ที่มีโซเดียมคลอไรด์มากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าไอโซเลต K1 มีการเจริญบนอาหารวุ้นที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ได้ดีกว่าไอโซเลตอื่นๆ และผลิตโปรตีเอสแอคติวิตีสูงบนอาหารวุ้นที่มี 10 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์



รูปที่ 3 การเจริญ (ก) และการผลิตโปรติเอส (ข) บนอาหารวุ้นสูตรมีเดียม 73 ที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ต่างๆของแบคทีเรียที่แยกได้จากวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตซีอิ๊วระดับห้องปฏิบัติการ (WB= น้ำแช่เมล็ดถั่วเหลือง ,WF=แป้งสาลี,SA=เกลือ, K= โคจิ, MO=น้ำหมักซีอิ๊วในระยะโมโรมิ)

3. การจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้

จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพและชีวภาพสามารถสันนิษฐานในเบื้องต้นว่าแบคทีเรียทั้ง 7 สายพันธุ์เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* เนื่องจากสามารถติดสีแกรมบวกและมีสปอร์ มีคาตาเลสและไม่เจริญในที่ไร้ออกซิเจน ผลการทดสอบทางชีวเคมีสามารถจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ดังแสดงใน ตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ผลการจำแนกสายพันธุ์ *Bacillus* spp.ที่เจริญและผลิตโปรตีเอสในอาหารวุ้นสูตรมิลค์เคซีน 73 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป

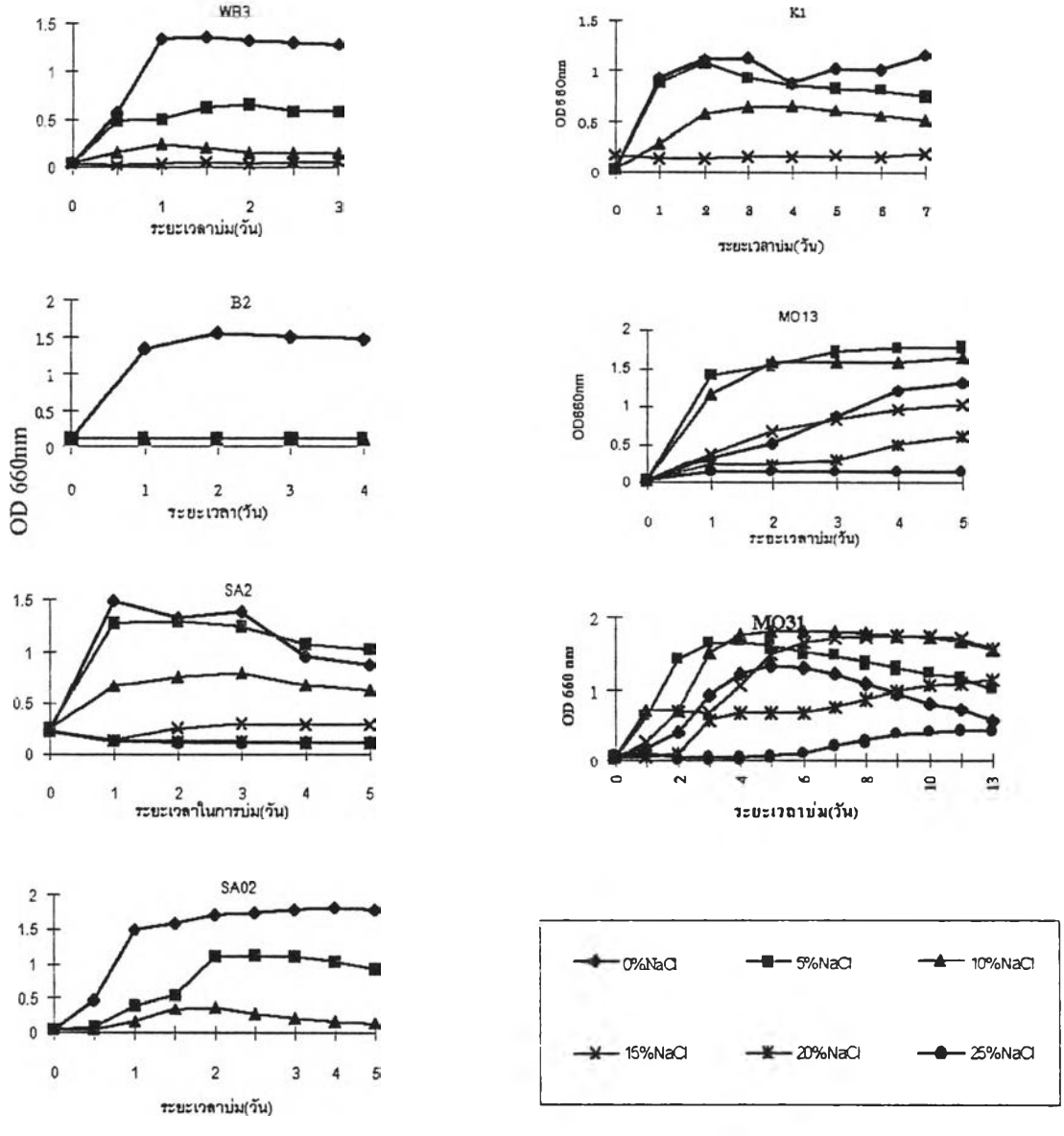
สายพันธุ์		*B.macerans*	*B.megaterium*	*B.megaterium*	*B.subtilis*	*B.megaterium*	*B.laterosporus*	*B.badius*
VP test		-	-	-	+	-	-	-
MR test		-	-	-	-	-	-	-
การใช้น้ำตาล	กาแลคโตส	+	-	-	-	-	+	-
	แลคโตส	-	-	-	-	-	+	+
	แมนโนส	+	+	+	+	+	+	+
	แมนิทอล	+	+	+	+	+	+	+
	ไซโลส	+	+	-	+	-	+	+
	อราบิโนส	+	+	+	+	+	+	+
	กลูโครส	+	+	+	+	+	+	+
รีดิวซ์ไนเตรท		+	+	+	+	+	+	-
การใช้เจลาติน		+	+	+	+	+	+	+
การใช้แป้ง		+	+	+	+	+	-	-
การใช้ซิเตรท		-	+	+	+	+	-	-
คาตาเลส		+	+	+	+	+	+	+
ตำแหน่งสปอร์		C	C	C	C	C	ST	C
ขนาดสปอร์(ไมโครเมต		0.5x0.6	0.8x0.8	0.7x0.7	0.5x0.5	0.7x0.7	0.5x0.6	0.3x0.3
สปอร์		+	+	+	+	+	+	+
ขนาดเซล(ไมโครเมตร)		0.5x2.0	0.8x2.0	0.7x2.0	0.5x1.7	0.7x2.0	0.5x1.8	0.3x1.5
ติดสีแกรม		+	+	+	+	+	+	+
แบคทีเรีย		B2	WB3	SA2	SA02	K1	MO13	MO31

C = central spore

ST = subterminal spore

4. การหาระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนถึงระยะมิดลอคของแบคทีเรีย 7 สายพันธุ์ใน อาหารเหลว

รูปที่ 4 แสดงการเพิ่มจำนวนถึงระยะมิดลอคของแบคทีเรีย 7 สายพันธุ์ในอาหารเหลวสูตรมีเดียม 73 ที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ



รูปที่ 4 การเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย 7 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมีเดียม73ที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 0-20 เปอร์เซ็นต์บนเครื่องเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 7 จำนวนชั่วโมงที่แบคทีเรียใช้ในการเพิ่มจำนวนเข้าสู่ระยะมิดลอค

สายพันธุ์	ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ (เปอร์เซ็นต์)				
Bacillus spp.	0	5	10	15	20
WB3	12	24	24	-	-
B2	12	-	-	-	-
SA2	12	12	24	-	-
SA02	12	12	24	-	-
K1	12	12	24	-	-
MO13	24	12	12	48	72
MO31	36	12	12	24	96

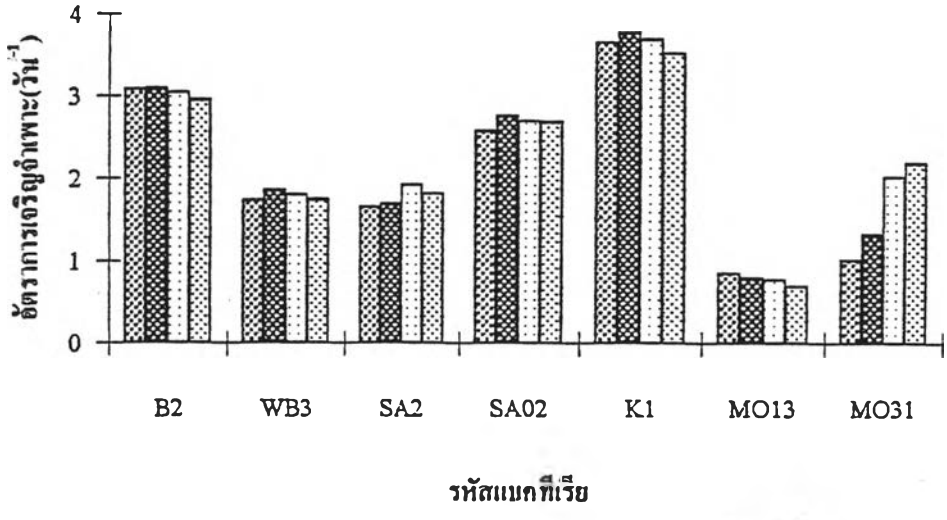
ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4 และตารางที่ 7 ยืนยันผลการทดลองที่ได้ในการทดลองหาการเจริญและการผลิตโปรติเอสในอาหารวุ้นว่าแบคทีเรีย 5 สายพันธุ์ที่แยกได้จากวัตถุดิบและระยะโคจิ คือ B2 ,SA2, SA02,WB3, K1 เป็นแบคทีเรียทนโซเดียมคลอไรด์ที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 10 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ คือ MO13 และ MO31ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากระยะโมโรมิเป็นแบคทีเรียชอบโซเดียมคลอไรด์ เนื่องจากสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์เมื่อเทียบกับการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ โดยเจริญได้ดีที่ 5-10 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์

ระยะเวลาที่แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ใช้ในการเพิ่มจำนวนถึงระยะมิดลอค(mid log phase) จะนำไปใช้ในการเลี้ยงกล้าเชื้อของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ ในการทดลองเพื่อหาผลของปริมาณโซเดียมคลอไรด์และพีเอชต่อการเพิ่มจำนวนและโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียทั้ง 7 สายพันธุ์

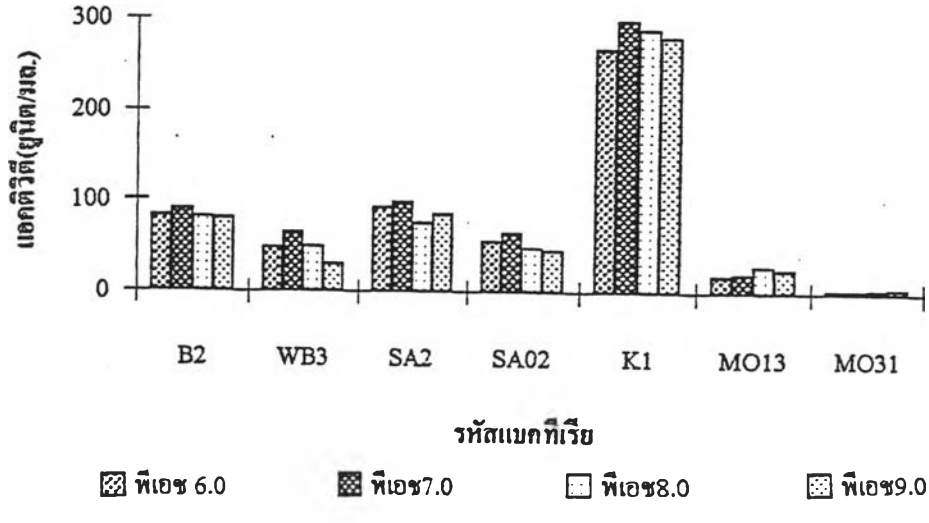
5. การหาผลของโซเดียมคลอไรด์และพีเอชต่อการเพิ่มจำนวนและโปรติเอสแอคติวิตี

รูปที่ ภ2-ภ23 (ภาคผนวก ค) แสดงกราฟการเพิ่มจำนวนและโปรติเอสแอคติวิตีของ ***Bacillus*** spp. 7 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรมีเดียม 73 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0-20 เปอร์เซ็นต์ และพีเอช 6.0-9.0 ใช้ข้อมูลจากกราฟข้างต้นคำนวนค่าอัตราการเจริญจำเพาะและโปรติเอสดังแอคติวิตีแสดงใน รูปที่ 5-13 ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ไม่เจริญ

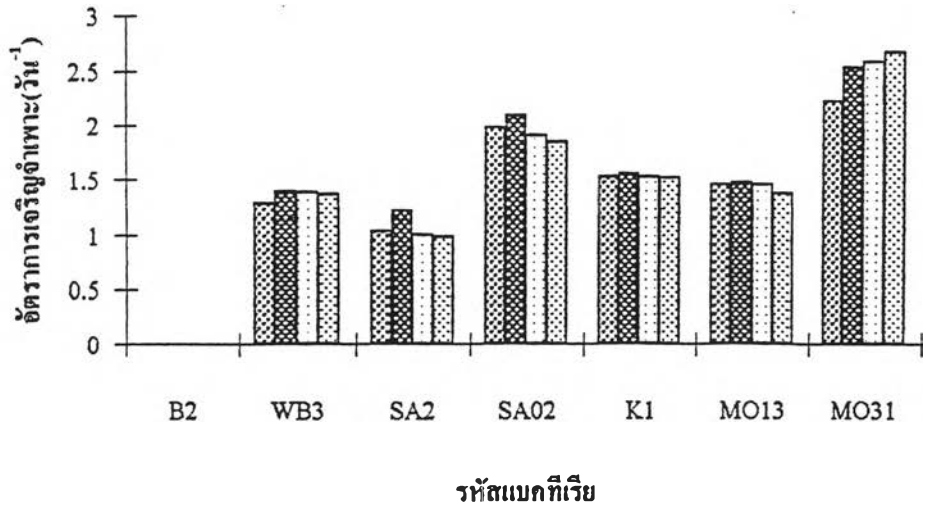
และไม่มีโปรตีเอสแอคติวิตีที่ พีเอช 5.0 ผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า สายพันธุ์ K1 มีแอคติวิตีสูงสุดและมีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 3.78 ต่อวัน และโปรตีเอสที่ขับออกมาจากเซลของ ***B. megaterium*** K1 เป็นโปรตีเอสที่มีแอคติวิตีสูงในพีเอชที่มีค่าเป็นกลางและพีเอชที่มีค่าเป็นด่าง (neutral-alkaline protease) ซึ่งมีแอคติวิตีลดลงเมื่อปริมาณโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น



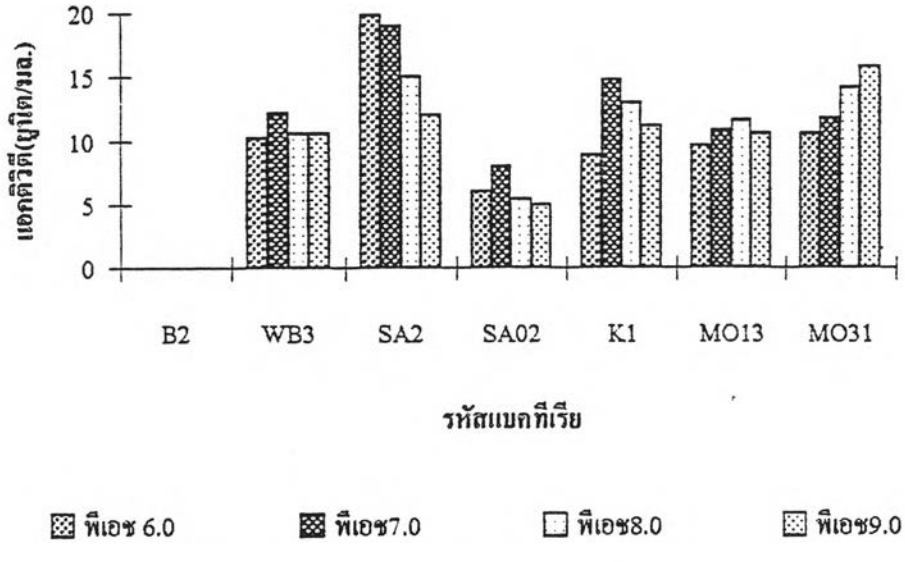
รูปที่ 5 อัตราการเจริญจำเพาะของ Bacillus spp. 7 สายพันธุ์เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวมีเดียม 73 ที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ และมีค่าพีเอชตั้งแต่ 6.0-9.0 เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน



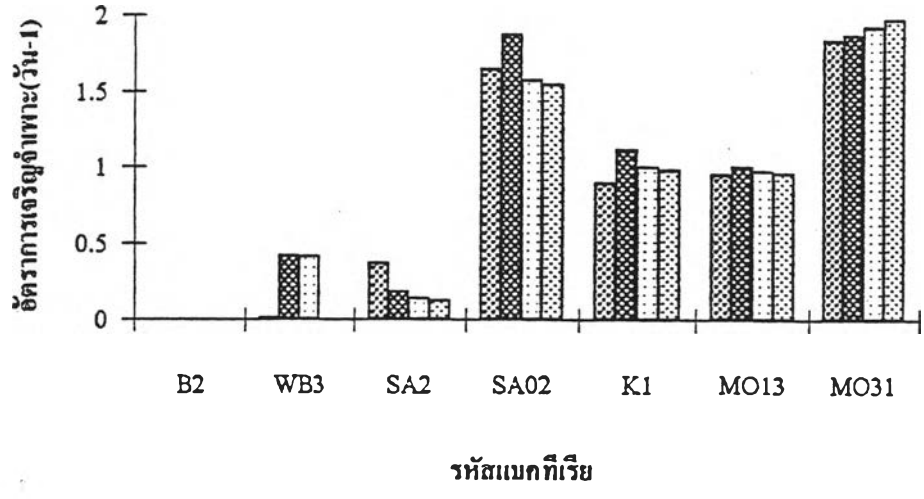
รูปที่ 6 โปรตีเอสแอคติวิตีของ Bacillus spp. 7 สายพันธุ์เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวมีเดียม 73 ที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ และมีค่าพีเอชตั้งแต่ 6.0-9.0 เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน



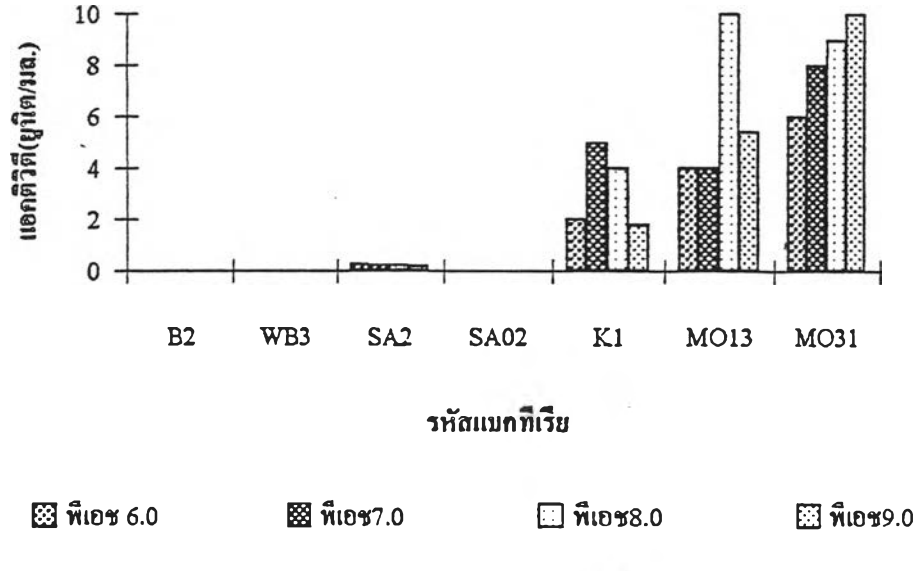
รูปที่ 7 อัตราการเจริญจำเพาะของ Bacillus spp. 7 สายพันธุ์เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวมีเดียม 73 ที่ 5 % โซเดียมคลอไรด์ และมีค่าพีเอชตั้งแต่ 6.0-9.0 เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน ผลการทดลองไม่พบการเจริญของสายพันธุ์ B2



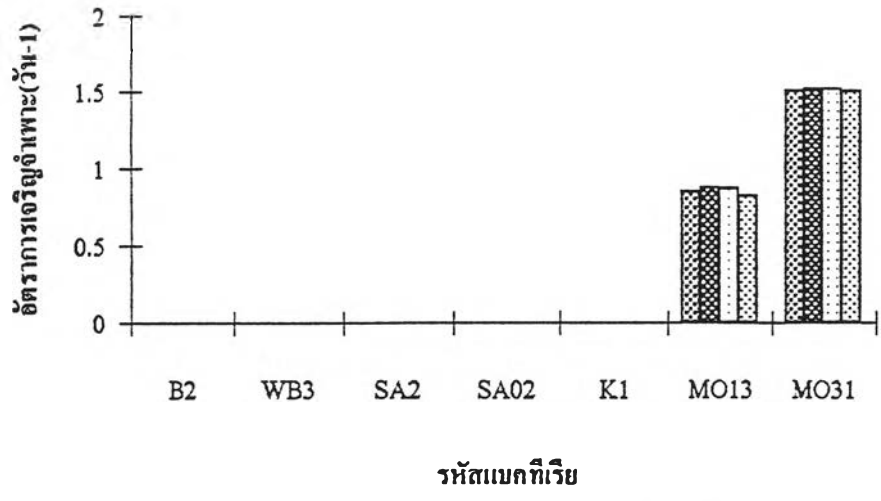
รูปที่ 8 โปรติเอสแอคติวิตีของ Bacillus spp. 7 สายพันธุ์เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวมีเดียม 73 ที่ 5 % โซเดียมคลอไรด์ และมีค่าพีเอชตั้งแต่ 6.0-9.0 เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน



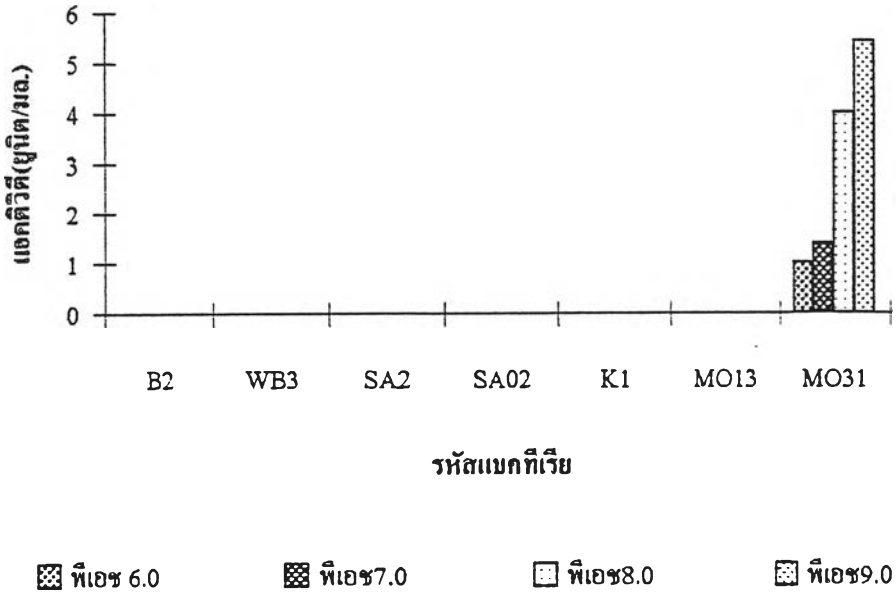
รูปที่ 9 อัตราการเจริญจำเพาะของ Bacillus spp. 7 สายพันธุ์เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวมีเดียม 73 ที่ 10 % โซเดียมคลอไรด์ และมีค่าพีเอชตั้งแต่ 6.0-9.0 เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วันผลการทดลองไม่พบการเจริญของสายพันธุ์ B2



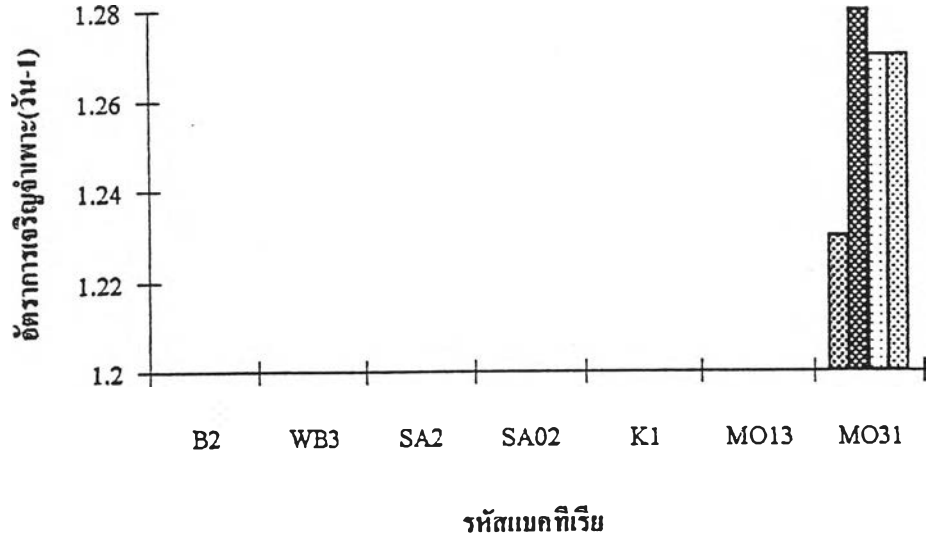
รูปที่ 10 โปรตีเอสแอคติวิตีของ Bacillus spp. 7 สายพันธุ์เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวมีเดียม 73 ที่10 % โซเดียมคลอไรด์ และมีค่าพีเอชตั้งแต่ 6.0-9.0 เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน ผลการทดลองไม่พบแอคติวิตีของสายพันธุ์ B2 , WB3, SA02



รูปที่ 11 อัตราการเจริญจำเพาะของ Bacillus spp. 7 สายพันธุ์เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวมีเดียม 73 ที่ 15 % โซเดียมคลอไรด์ และมีค่าพีเอชตั้งแต่ 6.0-9.0 เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน ผลการทดลองไม่พบการเจริญของสายพันธุ์ B2 , WB3, SA2, SA02, K1



รูปที่ 12 โปรติเอสแอคติวิตีของ Bacillus spp. 7 สายพันธุ์เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวมีเดียม 73 ที่ 15 % โซเดียมคลอไรด์ และมีค่าพีเอชตั้งแต่ 6.0-9.0 เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน ผลการทดลองไม่พบแอคติวิตีของสายพันธุ์ B2 , WB3,SA2, SA02, K1, และ MO13



รูปที่ 13 อัตราการเจริญจำเพาะของ Bacillus spp. 7 สายพันธุ์เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวมีเดียม 73 ที่ 20 % โซเดียมคลอไรด์ และมีค่าพีเอชตั้งแต่ 6.0-9.0 เขย่าที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน ผลการทดลองไม่พบการเจริญของสายพันธุ์ B2 , WB3,SA2, SA02, K1, และ MO13

ผลการทดลองในรูปที่ 5, 7, 9, 11 และ 13 แสดงให้เห็นว่าพีเอชไม่มีผลต่อการเจริญของ *Bacillus* spp. 6 สายพันธุ์ยกเว้นสายพันธุ์ MO31 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมีเดียม 73 ที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ หรือมี 20 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ นอกจากนี้ *Bacillus* sp.สายพันธุ์ MO31 เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวที่เพิ่มจำนวนได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมีเดียม 73 ที่มี 20 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์

ผลการทดลองในรูปที่ 6,8,10 และ12 แสดงให้เห็นว่าพีเอชไม่มีผลต่อโปรติเอสแอคติวิตีที่ขับออกนอกเซลของ *Bacillus* spp.ทั้ง 7 สายพันธุ์เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมีเดียม 73 ที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์ อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโปรติเอสของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ SA2 มีแอคติวิตีสูงที่พีเอช 6.0-7.0 แต่ไม่มีแอคติวิตีที่ 10 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ ส่วนโปรติเอสของ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ K1 , MO13 และ MO31 มีแอคติวิตีสูงในช่วงพีเอช 7.0 ,8.0และ9.0 ตามลำดับ *Bacillus* spp.สายพันธุ์ MO31 เป็นสายพันธุ์เดียวที่มีโปรติเอสแอคติวิตีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 15 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ เมื่อเปรียบเทียบระดับของโปรติเอสแอคติวิตีที่ขับออกมานอกเซลของ *Bacillus* spp.ทั้ง 7 สายพันธ์ที่แยกได้

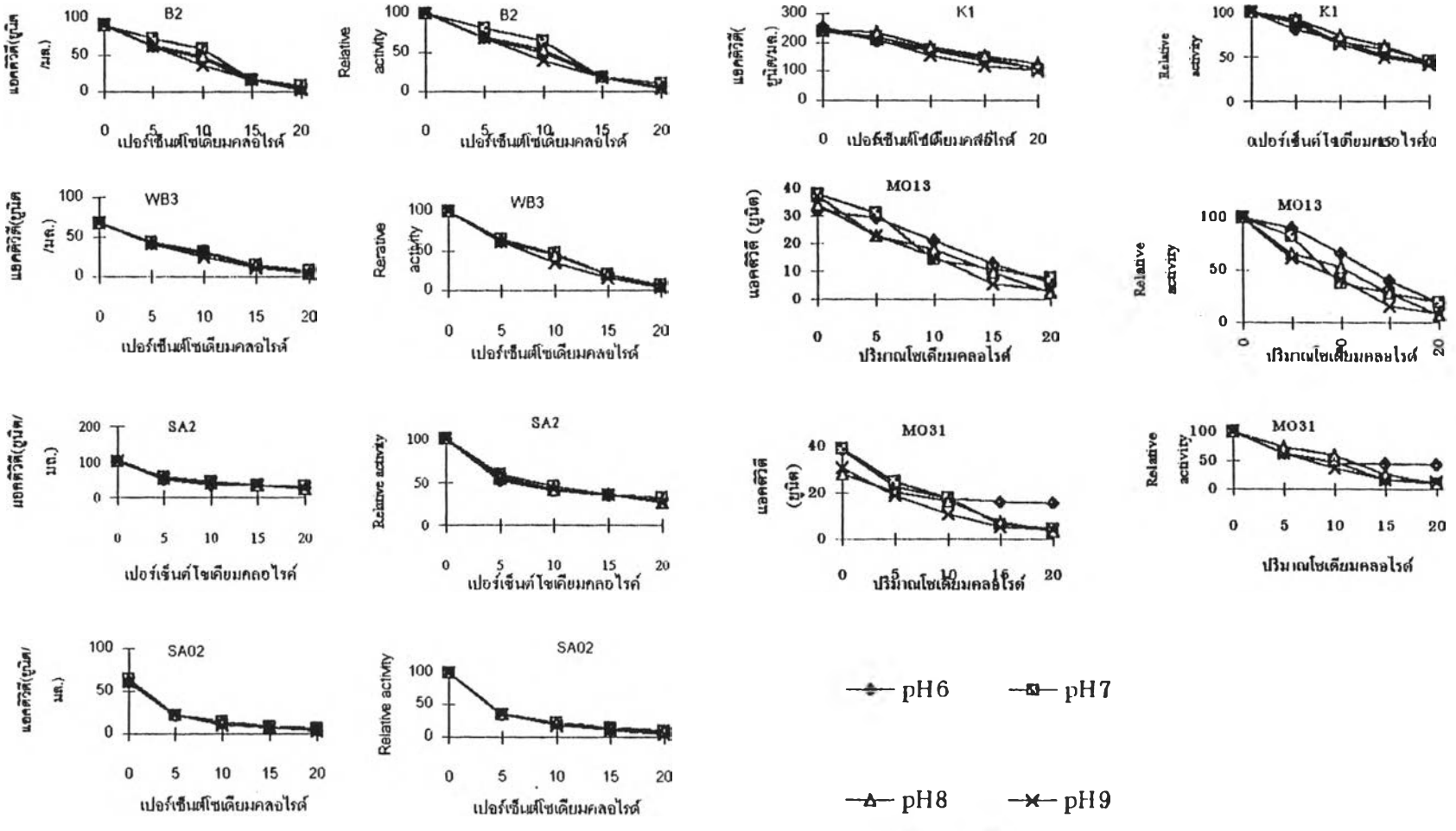
ผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์ K1 , MO13 และ MO31 ซึ่งเป็นสายพันธุ์แบคทีเรียที่น่าสนใจ เพราะแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์นี้ยังมีโปรติเอสแอคติวิตีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 10 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ สิ่งที่น่าสังเกตุจากผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 6 และ 10 คือโปรติเอสแอคติวิตีของสายพันธุ์ K1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีโซเดียมคลอไรด์มีค่าสูงสุดเท่ากับ 298.2 ยูนิต.มล$^{-1}$ ในขณะที่สายพันธุ์ MO13 และ MO31 มีโปรติเอสแอคติวิตีประมาณ 10 ยูนิต.มล$^{-1}$ แต่เมื่อเพิ่มเปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 10 เปอร์เซ็นต์โซฒเดียมคลอไรด์ ผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์ K1 ขับโปรติเอสแอคติวิตีออกนอกเซลน้อยกว่าสายพันธุ์ MO13 และ MO31มาก ดังนั้นจึงเกิดแนวความคิดว่าในการคัดเลือกโปรติเอสเพื่อเติมลงในระยะโมโรมิ บรรทัดฐานในการคัดเลือกควรเป็นโปรติเอสแอคติวิตีสูงที่ 20 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์และพีเอช 6.0 ซึ่งเป็นภาวะเริ่มต้นของการหมักระยะโมโรมิ (Leethochavalit and Chansa-ngavej,1997)

6. การหาผลของโซเดียมคลอไรด์และพีเอชต่อโปรติเอสแอคติวิตี

รูปที่ 14 แสดงให้เห็นว่าเมื่อความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นโปรติเอสแอคติวิตีของแบคทีเรียทั้ง 7 สายพันธุ์ที่แยกได้ลดลงทุกค่าพีเอช ยกเว้นไอโซเลต MO31 ที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 20 เปอร์เซ็นต์ แอคติวิตีที่พีเอช 6.0 มากกว่าที่พีเอชอื่นๆ ผลการทดลองดังสรุปในตารางที่ 8 แสดงให้เห็นว่าโปรติเอสแอคติวิตีของไอโซเลต K1 ที่ 20 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์และพีเอช 6.0 ยังสูงกว่าทุกสายพันธุ์ที่แยกได้ ดังนั้นจึงคัดเลือกโปรติเอสที่ผลิตของสายพันธุ์ K1 เพื่อนำไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและทำไดอะลิซีส ก่อนที่จะเติมลงในระยะโดมโรมิของการผลิตซีอิ๊วระดับห้องปฏิบัติการ

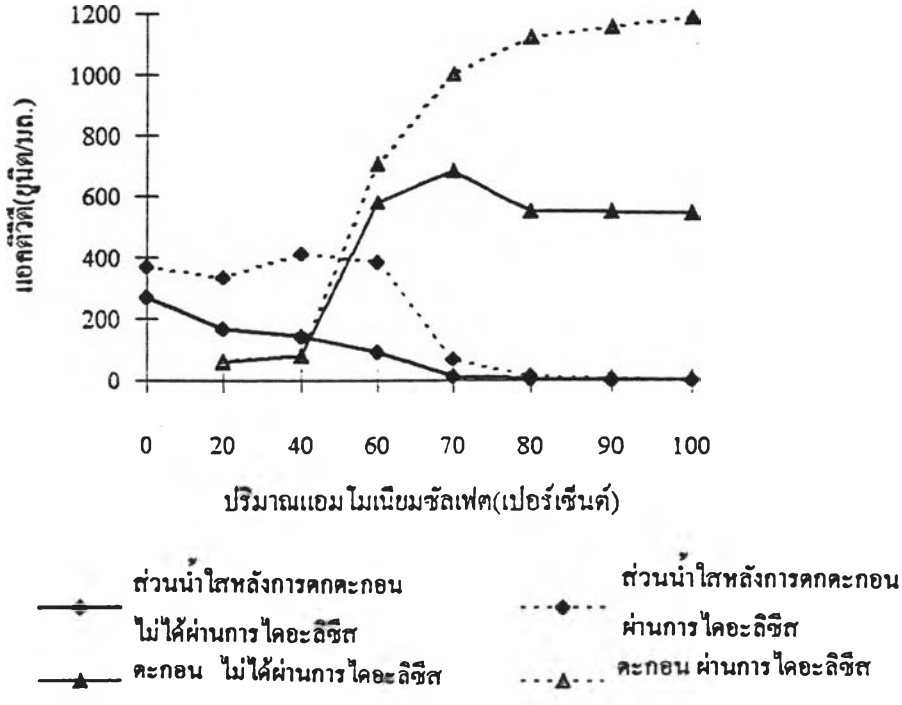
ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์โปรติเอสแอคติวิตีที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 20 เปอร์เซ็นต์ และพีเอช 6.0 กำหนดให้แอคติวิตีสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

ไอโซเลต	เปอร์เซ็นต์โปรติเอสแอคติวิตี
B2	5.5
WB3	7.0
SA2	12.5
SA02	6.6
K1	38.0
MO13	19.0
MO31	42.0



รูปที่ 14 ผลของโซเดียมคลอไรด์และพีเอชต่อโปรตีเอสแอกติวิตีของ *Bacillus* spp. 7 สายพันธุ์ที่แยกได้ เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารสูตร มีเดียม 73 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ และพีเอชต่างๆ ที่ให้โปรตีเอสแอกติวิตีสูงสุดที่ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ปั่นเหวี่ยงแยกเซลแล้วนำส่วนใสมาหาโปรตีเอสแอกติวิตีโดยเปรียบเทียบให้โปรตีเอสแอกติวิตีสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

7. การหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนโปรติเอสจาก *B. megaterium* K1



รูปที่ 15 การตกตะกอนโปรติเอสที่ได้จาก *B. megaterium* K1 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต

ผลการทดลองรูปที่ 15 แสดงให้เห็นว่า 70 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการตกตะกอนโปรติเอสของ *B. megaterium* K1 นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าแอมโมเนียมซัลเฟตยับยั้งโปรติเอสแอคติวิตี ทั้งนี้เนื่องจากผลการทดลองพบว่า ถ้าไม่กำจัดแอมโมเนียมซัลเฟตออกโดยวิธีไดอะไลซิส แอคติวิตีของโปรติเอสจะน้อยลง ดังนั้นจึงใช้สารละลาย 70 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอนโปรติเอสและทำไดอะลิซิสก่อนนำไปเติมระยะโมโรมิ

8.การเติมโปรติเอสของ *B.megaterium* K1 ณระยะโมโรมิในการหมักซีอิ๊วระดับห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 9 และรูปที่ 16 (ก)(ข) แสดงผลการเติมในวันแรกของการหมักระยะโมโรมิ โปรติเอสของ *B.megaterium* K1 100 ยูนิตต่อลิตรในรูปสารละลายหลังการทำไดอะลิซิส และในรูปผงที่ได้จากการไลโอฟิไลซ์สารละลายหลังจากการไดอะลิซิส

ตารางที่ 9 อัตราการเพิ่มปริมาณโปรตีนและปริมาณโปรตีนในซีอิ๊วที่ผลิตในระดับห้องปฏิบัติการหลังจากเติมโปรติเอสที่แยกจาก *B.megaterium* K1 ในเวลาต่างๆของการหมักระยะโมโรมิ

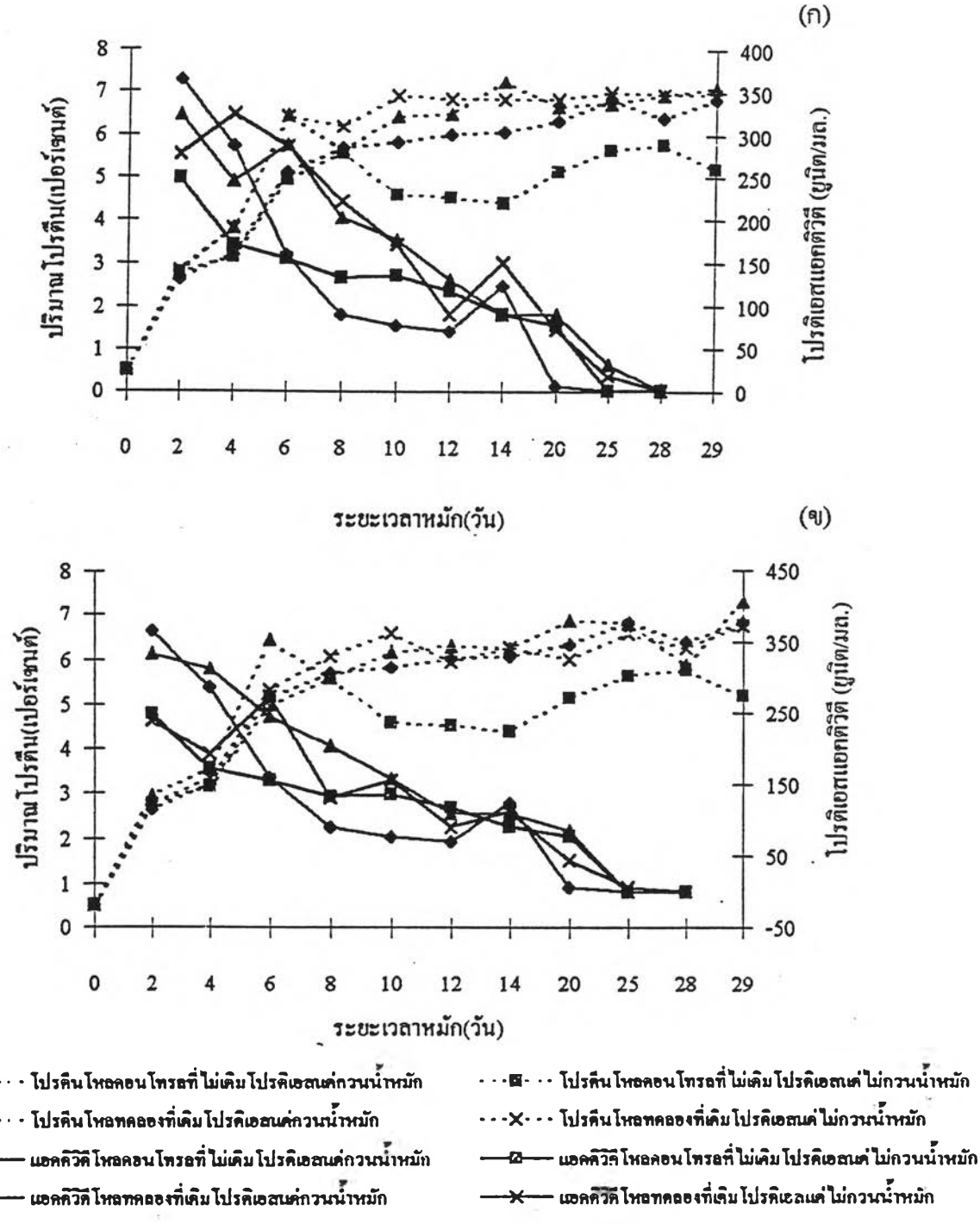
การทดลองครั้งที่	สภาวะการเติมโปรติเอสในระยะโมโรมิ	อัตราการเพิ่มปริมาณโปรตีน (เปอร์เซนต์/วัน)				ปริมาณโปรตีนหลังพาสเจอร์ไรส์ (เปอร์เซนต์)			
		ไม่เติมโปรติเอส		เติมโปรติเอส		ไม่เติมโปรติเอส		เติมโปรติเอส	
		กวนน้ำหมัก	ไม่กวน	กวนน้ำหมัก	ไม่กวน	กวนน้ำหมัก	ไม่กวน	กวนน้ำหมัก	ไม่กวน
1	เติมสารละลายโปรติเอส 100ยูนิตต่อลิตร เติมในวันแรก	1.2	1.1	1.7	1.8	6.8	5.2	7.1	7.0
2	เติมผงโปรติเอส 100 ยูนิต ต่อลิตร เติมในวันแรก	1.2	1.1	1.8	1.8	6.8	5.2	7.3	6.8
3	เติมผงโปรติเอส 250 ยูนิต ต่อลิตร ในวันที่แปด								
	-ช่วงที่1แปดวันแรก	1.9	1.6	1.8	1.5	-	-	-	-
	-ช่วงที่2หลังแปดวัน	0.6	0.5	1.7	1.5	7.8	7.4	9.9	9.5

ผลการทดลองในตารางที่ 9 แสดงให้เห็นว่าในโหลดคอนโทรลที่ไม่เติมโปรติเอส ทั้งโหลที่มีการกวนและไม่มีการกวนน้ำหมักมีอัตราการเพิ่มปริมาณโปรตีนในซีอิ๊วเท่ากันคือ 1.1-1.2 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน อย่างไรก็ตามปริมาณโปรตีนในโหลดคอนโทรลที่มีการกวนน้ำหมักเท่ากับ 6.8 เปอร์เซ็นต์ซึ่งสูงกว่าปริมาณโปรตีนในซีอิ๊วโหลดคอนโทลที่ไม่มีการกวนน้ำหมักเล็กน้อย นอกจากนี้ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเติมโปรติเอส 100 ยูนิตต่อลิตรในวันแรกของระยะโมโรมิทั้งในรูปสารละลายและในรูปผงมีผลต่ออัตราการเพิ่มปริมาณโปรตีนและปริมาณโปรตีนหลังการพาสเตอร์ไรส์เช่นเดียวกัน กล่าวคือในโหลทดลองที่มีการกวนและไม่มีการกวนน้ำหมักจะมีอัตราการเพิ่มปริมาณโปรตีนในอัตราเดียวกันและ

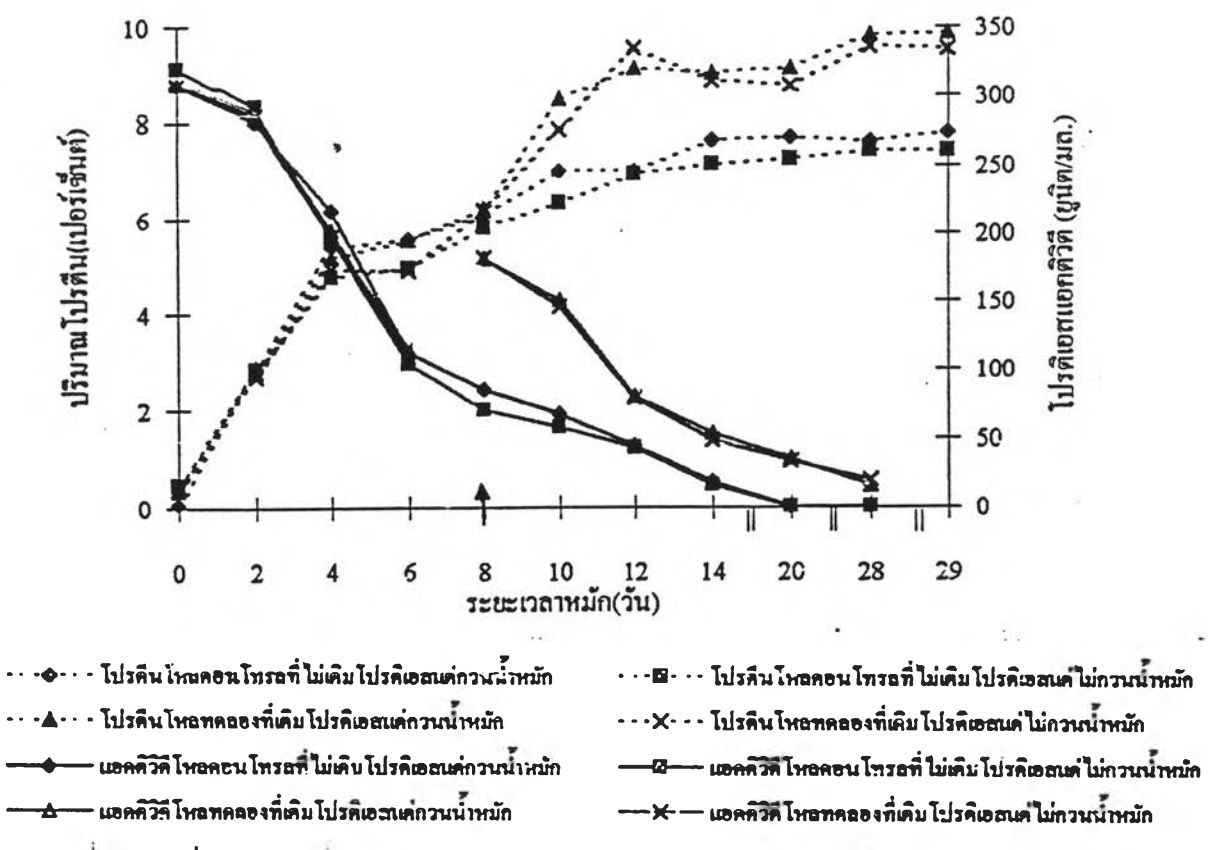
โหลทดลองที่มีการกวนน้ำหมักมีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (7.1-7.3%)ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปจึงเติมโปรติเอส 250 ยูนิตต่อลิตร

ผลการทดลองในรูปที่ 16 (ก)และ(ข) แสดงให้เห็นว่าเมื่อปริมาณโปรตีนในน้ำซีอิ๊วหลังการพาสเตอร์ไรส์มีค่าคงที่ประมาณวันที่ 8 ของระยะโมโรมิ โปรติเอสแอคติวิตีในน้ำหมักซีอิ๊วลดลง ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงเติมผงโปรติเอส 250 ยูนิต.มล$^{-1}$ลงในน้ำหมักระยะโมโรมิในวันที่ 8 หลังการหมัก ผลการทดลองในรูปที่ 17 และ ตารางที่ 9 แสดงให้เห็นว่าการเติมผงโปรติเอสเพิ่มโปรติเอสแอคติวิตีในโหลหมักซึ่งมีผลให้ปริมาณโปรตีนเพิ่มจากเดิม 7.4-7.8 เปอร์เซ็นต์ เป็น 9.5-9.9 เปอร์เซ็นต์ ในโหลทดลองที่มีการกวนและไม่มีการกวนน้ำหมัก คิดเป็นการเพิ่มปริมาณโปรตีนประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ อนึ่งในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้นอันเนื่องมาจากการเติมโปรติเอสในระยะโมโรมิจำเป็นต้องเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนหลังการพาสเตอร์ไรส์ในโหลควบคุมและในโหลทดลอง ซึ่งทำการผลิตซีอิ๊วในระยะเวลาเดียวกัน ทั้งนี้เพราะอุณหภูมิกลางแจ้งในเดือนต่างๆ แตกต่างกัน และอุณหภูมิมีผลต่อกิจกรรมของโปรติเอสในการย่อยถั่วเหลือง ดังจะเห็นได้จากปริมาณโปรตีนในโหลควบคุมของการทดลองครั้งที่ 1 และ 2 เมื่อเดือน พฤศจิกายน-ธันวาคม พ.ศ. 2540 จะมีปริมาณโปรตีนในซีอิ๊วอยู่ระดับต่ำกว่าปริมาณโปรตีนในโหลควบคุมของการทดลองครั้งที่ 3 ซึ่งทำการทดลองเมื่อเดือน มกราคม-กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2541 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิหลายช่วงในเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม พ.ศ. 2540 เมื่อเทียบกับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วงเดือนมกราคม-กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2541 ดังแสดงในรูปที่ 18

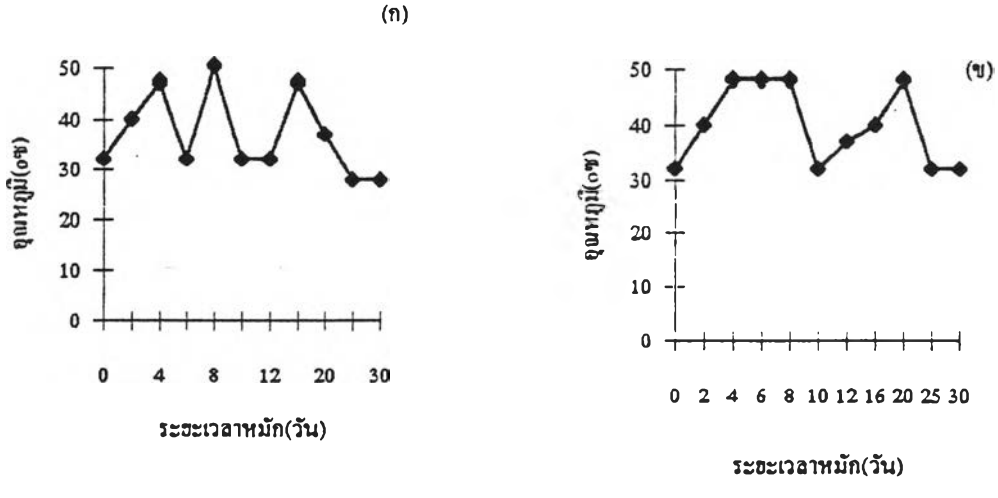
ผลการทดลองในรูปที่ 17 แสดงให้เห็นว่าโปรติเอสแอคติวิตีในโหลหมักเริ่มลดลงหลังจากเติมผงโปรติเอส 250 ยูนิตต่อลิตร ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความไม่เสถียรต่อความเค็มและพีเอชในภาวะการหมักระยะโมโรมิ ดังนั้นจึงทำการทดลองหาความเสถียรของโปรติเอสที่แยกจาก ***B. megaterium*** K1 ที่ 20 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์และพีเอช 5.0



รูปที่ 16 ปริมาณโปรตีนและโปรติเอสแอคติวิตีใน โหลหมักซีอิ๊วระดับห้องปฏิบัติการหลังจากเติม (ก) สารละลายโปรติเอส 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร(ข) ผงโปรติเอส 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในวันแรกของการหมักระยะ โมโรมิ

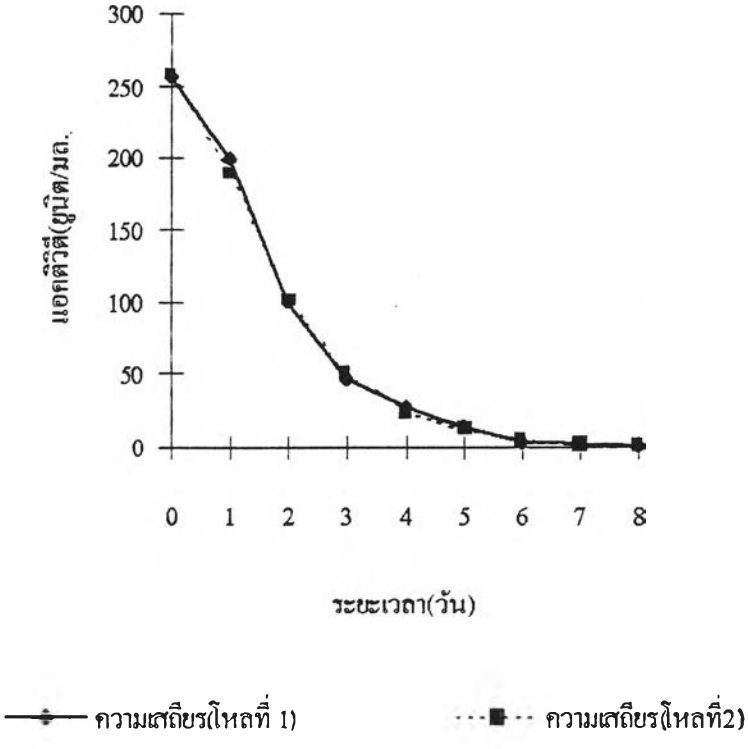


รูปที่ 17 ปริมาณโปรตีนและโปรติเอสแอคติวิตีในโหลหมักระดับห้องปฏิบัติการหลังจากเติมผงโปรติเอส 250 ยูนิต ต่อมิลลิลิตรในวันที่แปดของการหมักระยะโมโรมิ



รูปที่ 18 แสดงการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิบริเวณหมักซีอิ๊วในระหว่างเดือน พฤศจิกายน-ธันวาคม พ.ศ. 2540 (ก) และ มกราคม-กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2541 (ข)

9. การทดสอบความเสถียรของโปรติเอสที่ได้จาก *B.megaterium* K1



รูปที่ 19 ความเสถียรของโปรติเอสที่ได้จาก *B.megaterium* K1 เมื่อใส่ในโหลหมักซีอิ๊วระดับห้องปฏิบัติการซึ่งบรรจุอะซิเตต บัฟเฟอร์พีเอช 5.0 และ 20 เปอร์เซ็นต์เกลือสมุทร ตั้งโหลไว้กลางแจ้งในบริเวณที่หมักซีอิ้ว

การทดสอบความเสถียรของโปรติเอสจาก *B.megaterium* K1 เมื่ออยู่ในอะซิเตต บัฟเฟอร์พีเอช 5.0 และ 20 เปอร์เซ็นต์เกลือสมุทรและตั้งไว้กลางแจ้งบริเวณหมักซีอิ๊ว ซึ่งเป็นภาวะที่ใกล้เคียงกับภาวะในโหลหมักซีอิ๊ว พบว่าแอคติวิตีของโปรติเอสจะค่อยๆลดลงจนกระทั่งวันที่ 6 แอคติวิตีจะลดลงจนถึงศูนย์ ดังแสดงในรูปที่ 19

10. การหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการพาสเตอร์ไรส์

ตารางที่ 10 การหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการฆ่าจุลินทรีย์โดยวิธีพาสเตอร์ไรส์

จุลินทรีย์ที่ทดสอบ	อุณหภูมิที่ทดสอบ(°ซ)								
	65			70			75		
	10 นาที	20 นาที	30 นาที	10 นาที	20 นาที	30 นาที	10 นาที	20 นาที	30 นาที
ยีสต์และรา	+	+	-	-	-	-	-	-	-
โคลิฟอร์มแบคทีเรีย	+	-	-	-	-	-	-	-	-
สตาฟิโลคอกคัส	+	-	-	-	-	-	-	-	-

ผลการทดลองในตารางที่ 10 แสดงให้เห็นว่าการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 20, 30 นาที และ 75 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10,20,30 นาที สามารถกำจัดจุลินทรีย์ที่ตรวจสอบได้ นอกจากนี้ผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียสจะทำให้เกิดตะกอนซีอิ๊ว ทำให้ซีอิ๊วขุ่นไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค ดังนั้นจึงเลือกทำการพาสเตอร์ไรส์ซีอิ๊วที่ผลิตในระดับห้องปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

11.การหาปริมาณตะกั่ว ทองแดงในซีอิ๊วที่ผลิตในระดับห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ ภ1-ภ2 และรูปที่ ภ24-ภ25(ภาคผนวก ค) แสดงปริมาณตะกั่ว ทองแดงและอาร์ซินิคที่วิเคราะห์โดยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometer

ตารางที่ 11 ปริมาณสารปนเปื้อนที่ระบุในมาตรฐานอุตสาหกรรมเปรียบเทียบกับปริมาณที่ตรวจพบในซีอิ๊วที่ผลิตในระดับห้องปฏิบัติการ

สารปนเปื้อน	ซีอิ๊วขาว มอก.252-2521	ซีอิ๊วขาวที่ผลิตในระดับห้องปฏิบัติการ
ตะกั่ว	ไม่เกิน1.0 ppm	<0.3 ppm
ทองแดง	ไม่เกิน 5.0 ppm	< 0.1 ppm

ผลการวิเคราะห์ในตารางที่ 11 แสดงให้เห็นว่าซีอิ๊วที่ผลิตได้ในระดับห้องปฏิบัติการมีปริมาณตะกั่ว และทองแดง ต่ำกว่าปริมาณที่กำหนดไว้สำหรับมาตรฐานอุตสาหกรรม

12. สมบัติทางเคมีของซีอิ๊วที่ผลิตในระดับห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 12 สมบัติทางเคมีของซีอิ๊วที่ผลิตในระดับห้องปฏิบัติการ โดยเติมผงโปรติเอสจาก *B. megaterium* K1 250 ยูนิตต่อลิตรในวันที่ 8 ของการหมักระยะโมโรมิ

คุณลักษณะ	ชนิด				
	ซีอิ๊วขาว มอก.252-2521	ซีอิ๊วขาวที่ผลิตในระดับห้องปฏิบัติการ			
		ไม่เติมโปรติเอส		เติมโปรติเอส	
		กวน	ไม่กวน	กวน	ไม่กวน
โปรตีน(%Nx6.25)ไม่น้อยกว่าร้อยละของน้ำหนัก	5.5	7.8	7.4	9.9	9.5
ปริมาณของแข็งที่ระเหยไม่ได้ไม่น้อยกว่าร้อยละของน้ำหนัก	32	32.8	32.6	32.5	32.7
เกลือ(คิดเป็นโซเดียมคลอไรด์)ร้อยละของน้ำหนัก	17ถึง23	~21.0	~21.0	~21.0	~21.0
พีเอช	4.5ถึง5.3	5.1	5.2	5.0	5.0
ความถ่วงจำเพาะที่ 27± 3 องศาเซลเซียส ไม่น้อยกว่า	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
สารปนเปื้อน	ตะกั่ว ทองแดง ไม่เกิน 1.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ				

ผลการทดลองในตารางที่ 12 แสดงให้เห็นว่าน้ำซีอิ๊วที่ผลิตในระดับห้องปฏิบัติการหลังจากที่ตรวจคุณภาพตามมาตรฐานอุตสาหกรรมแล้วพบว่าซีอิ๊วโปรตีนสูงที่ได้มีคุณภาพอยู่ในขั้นที่ขอตรามาตรฐานอุตสาหกรรมได้

13.การทดสอบผลิตภัณฑ์ซีอิ๊วทางประสาทสัมผัส

จากการทดสอบผลิตภัณฑ์ซีอิ๊วทางประสาทสัมผัสโดยเปรียบเทียบความชอบหรือไม่ชอบในผลิตภัณฑ์ซีอิ๊วที่ผลิตในระดับห้องปฏิบัติการกับซีอิ๊วที่จำหน่ายในท้องตลาดโดยเปรียบเทียบด้านสี กลิ่น รสชาติ ความใส และความชอบรวม ของตัวอย่างซีอิ๊ว 7 ตัวอย่าง และผู้ทดสอบจำนวน 20 คน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ ภ3-ภ7 (ภาคผนวก ค)

ตารางที่ 13 แสดงค่าเฉลี่ยระดับคะแนนจากการทดสอบทางประสาทสัมผัสของซีอิ๊วทั้ง 7 ตัวอย่างผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีการแปรปรวนของค่าเฉลี่ยระดับคะแนนความชอบผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 13 ค่าเฉลี่ยระดับคะแนนความชอบจากการทดสอบทางประสาทสัมผัสของซีอิ๊ว 7 ตัวอย่างโดยใช้ Hedonic 7 scale teast (7= ชอบมาก;1= ไม่ชอบเลย)

	ตัวอย่างซีอิ๊ว						
ลักษณะที่ทดสอบ	280	405	569	627	691	728	758
สี	4.7	4.3	5.2	4.4	4.1	4.5	4.8
กลิ่น	4.1	4.3	5.3	4.4	4.3	4.5	4.7
รสชาติ	4.0	3.9	4.6	5.2	4.3	4.3	5.0
ความใส	4.7	4.9	4.7	5.5	5.2	4.9	5.0
ความชอบรวม	4.4	4.5	4.9	5.2	4.7	4.4	4.7

280 แทนซีอิ๊วที่ได้รับตรามาตรฐานอุตสาหกรรม

405 แทนซีอิ๊วที่ไม่ได้รับตรามาตรฐานอุตสาหกรรม

569 แทนซีอิ๊วที่นำเข้าจากประเทศญี่ปุ่น

627 แทนซีอิ๊วที่ได้จากการหมักระดับห้องปฏิบัติการ ไม่เติมเอนไซม์ กวนน้ำหมักทุก 2 วัน

691 แทนซีอิ๊วที่ได้จากการหมักระดับห้องปฏิบัติการ ไม่เติมเอนไซม์ไม่กวนน้ำหมัก

728 แทนซีอิ๊วที่ได้จากการหมักระดับห้องปฏิบัติการ เติมเอนไซม์ กวนน้ำหมักทุก 2 วัน

758 แทนซีอิ๊วที่ได้จากการหมักระดับห้องปฏิบัติการ เติมเอนไซม์ไม่กวนน้ำหมัก

สี จากการทดสอบพบว่าสีของซีอิ๊วที่นำเข้าจากต่างประเทศมีสีเข้มผู้ชิมชอบได้ระดับคะแนนเฉลี่ย 5.2 การเติมโปรตีเอสโดยไม่กวนน้ำหมักซีอิ๊วทำให้ซีอิ๊วที่ได้มีสีเป็นที่ชอบของผู้ชิมในระดับใกล้เคียงกับซีอิ๊วที่ได้รับตรามาตรฐานอุตสาหกรรม ส่วนซีอิ๊วอื่นๆได้คะแนนเฉลี่ยอยู่ในช่วง 4.1-4.5 ทั้งนี้เพราะผู้ชิมรู้สึกเฉยๆ สีของซีอิ๊วชนิดอื่นๆไม่ค่อยเข้ม แสดงว่าผู้ชิมชอบซีอิ๊วที่มีสีเข้ม

กลิ่น จากการทดสอบพบว่ากลิ่นที่ได้จากซีอิ๊วจากต่างประเทศเป็นที่ชอบของผู้ชิมเนื่องจากมีกลิ่นหอมน่ารับประทานได้คะแนนเฉลี่ย 5.3 ซีอิ๊วอื่นๆรวมทั้งซีอิ๊วที่ผลิตในระดับห้องปฏิบัติการผู้ชิมรู้สึกเฉยๆเหมือนซีอิ๊วปกติทั่วๆไปได้คะแนนอยู่ในช่วง 4.1-4.7

รสชาติ ผลการทดสอบพบว่าซีอิ๊วที่ได้จากการหมักโดยไม่เติมผงโปรตีเอส กวนทุก 2 วันและ ซีอิ๊วที่ได้จากการหมักโดยเติมผงเอนไซม์แต่ไม่กวนน้ำหมักเป็นที่ชอบของผู้ชิมซึ่งรู้สึกเฉยๆกับรสชาติของซีอิ๊วนำเข้าและซีอิ๊วอื่นๆ ผู้ชิมไม่ค่อยชอบซีอิ๊วที่ไม่ได้ตรามาตรฐานอุตสาหกรรม เนื่องจากชี้แจงว่ามีรสเค็มเกินไปไม่มีรสชาติอื่นและมีรสชาติคล้ายกับน้ำเกลือ

ความใส ผลการทดสอบการชอบความใสพบว่าซีอิ๊วที่ได้จากการหมักระดับห้องปฏิบัติการมีความใสเป็นที่ยอมรับของผู้ชิม ทั้ง 4 ตัวอย่าง ซีอิ๊วนำเข้ามีความข้นและหนืดมากทำให้สังเกตความใสยากและผู้ชิมรู้สึกเฉยๆเหมือนกับตัวอย่างซีอิ๊วอื่นๆ

ความชอบรวม เป็นความชอบโดยรวมที่มีต่อซีอิ๊วตัวอย่างที่นำมาให้ชิม ผลการทดสอบพบว่าซีอิ๊วที่ได้จากการหมักระดับห้องปฏิบัติการโดยไม่เติมเอนไซม์แต่มีการกวนน้ำหมักเป็นที่ชอบของผู้ชิมโดยได้ระดับคะแนนเฉลี่ย 5.2 ส่วนซีอิ๊วที่ได้จากการเติมผงโปรตีเอสแต่ไม่กวนน้ำหมักได้รับความชอบเป็นระดับรองลงมาจากซีอิ๊วนำเข้าจากประเทศญี่ปุ่น

ตารางที่14-18 แสดงผลการวิเคราะห์สาเหตุของความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยคะแนนความชอบผลิตภัณฑ์โดยวิธี Analysis of Variance ผลการทดลองพบว่า ค่า F-ratio ที่คำนวนได้สำหรับการวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับการชอบความใสและความชอบรวมของผลิตภัณฑ์ อันเนื่องมาจากความแตกต่างของผลิตภัณฑ์ (ตารางที่ 17.18) มีค่าสูงกว่าค่า F-ratio จากตาราง F distribution (ตาราง ภ8 ภาคผนวก ค) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าคะแนนเฉลี่ยของการชอบความใสและความชอบรวมของผลิตภัณฑ์ซีอิ๊วชนิดต่างๆมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ดังนั้นการชอบความใสและความชอบรวมขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์

นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนแสดงของค่าเฉลี่ยคะแนนความชอบผลิตภัณฑ์ แสดงให้เห็นว่าค่า F-ratio ในตารางที่ 14-16 ที่คำนวณได้สำหรับการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล อันเนื่องมาจากความแตกต่างของอุปนิสัย ความชอบ ฯลฯ ของผู้ชิมในกลุ่มผู้ชิมมีค่าสูงกว่าค่า F-ratio ในตาราง F Distribution แสดงว่าค่าเฉลี่ยคะแนนความชอบเฉลี่ยของผู้ชิมในด้านสี กลิ่น และรสชาติ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)ทั้งนี้ความชอบสีกลิ่นและรสชาติซีอิ๊วขึ้นอยู่กับความชอบส่วนบุคคลของผู้ชิม

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของคะแนนเฉลี่ยแสดงความชอบไม่ชอบต่อผลิตภัณฑ์แสดงให้เห็นว่าชนิดของผลิตภัณฑ์มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อ การชอบความใส และความชอบผลิตภัณฑ์โดยรวม ส่วนความชอบสี กลิ่น และรสชาติของซีอิ๊วเป็นความชอบส่วนบุคคล ขึ้นอยู่กับความชอบของผู้ชิมไม่ขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยระดับความชอบสีของซีอิ๊วชนิดต่างๆ

Source of Variation	Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Squares	F-ratio (calculated)	F-ratio (tabulated,5%)
Treatments	23.5643	19	1.2402	1.0835	1.6875
Panelists	18.9429	6	3.1571	2.7583	2.1750
Error	130.4875	114	1.1446		
Total	172.9929	139			

ตารางที่ 15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยระดับความชอบกลิ่นของซีอิ๊วชนิดต่างๆ

Source of Variation	Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Squares	F-ratio (calculated)	F-ratio (tabulated,5%)
Treatments	24.9929	19	1.3154	1.2713	1.6587
Panelists	17.1875	6	2.8643	2.7682	2.1750
Error	117.9571	114	1.0347		
Total	160.1357	139			

ตารางที่ 16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยระดับความชอบรสชาติของซีอิ๊วชนิดต่างๆ

Source of Variation	Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Squares	F-ratio (calculated)	F-ratio (tabulated,5%)
Treatments	33.650	19	1.8237	1.6091	1.6587
Panelists	29.0857	6	4.8476	4.2773	2.1750
Error	129.2000	114	1.1333		
Total	192.9357	139			

ตารางที่ 17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยระดับความชอบความใสของซีอิ๊วชนิดต่างๆ

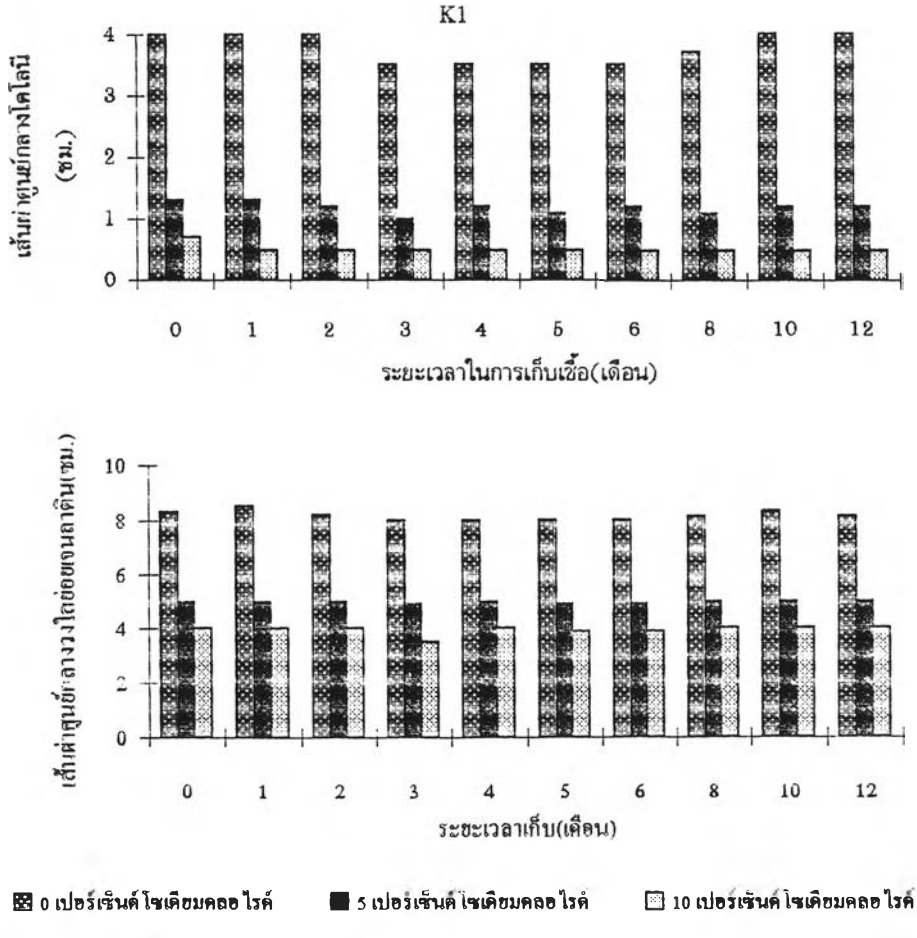
Source of Variation	Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Squares	F-ratio (calculated)	F-ratio (tabulated,5%)
Treatments	110.7071	19	5.8267	5.3593	1.6587
Panelists	10.3429	6	1.7238	1.5855	2.1750
Error	123.9429	114	1.0872		
Total	244.9929	139			

ตารางที่ 18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยระดับความชอบรวมของซีอิ๊วชนิดต่างๆ

Source of Variation	Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Squares	F-ratio (calculated)	F-ratio (tabulated,5%)
Treatments	43.6789	19	2.2989	1.9260	1.6587
Panelists	10.7857	6	1.7976	1.5060	2.1750
Error	136.0714	114	1.1936		
Total	109.5357	139			

14. การเก็บรักษา *B. megaterium* สายพันธุ์ K1 ในหลอดเก็บเชื้อแบบระเหิดแห้ง

การทดสอบการเจริญและโปรติเอสแอคติวิตีบนอาหารแข็งพบว่าแบคทีเรีย *B. megaterium* K1 หลังจากเก็บเชื้อในหลอดเก็บเชื้อแบบระเหิดแห้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 เดือนพบว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของโคโลนียังใกล้เคียงกับก่อนทำการระเหิดแห้งและเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่เกิดจากการย่อยเจลาตินยังคงใกล้เคียงกับผลการทดลองจาก *B. megaterium* K1 ที่เก็บในหลอดที่ทำการตรวจก่อนทำการระเหิดแห้งภายใต้สูญญากาศ ดังนั้นผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สามารถเก็บเชื้อ *B. megaterium* K1 โดยวิธีการระเหิดแห้งภายใต้สูญญากาศได้โดยที่การเจริญและแอคติวิตีของโปรติเอสไม่ลดลงดังแสดงในผลการทดลองรูปที่ 20



รูปที่ 20 การเจริญ (ก) และแอคติวิตี (ข)ของ *Bacillus megaterium* สายพันธุ์ K1ก่อนและหลังการเก็บรักษาเชื้อโดยวิธีระเหิดแห้งเลี้ยงบนอาหารวุ้นสูตรมีเดียม 73 ที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน