

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรียทนความร้อนที่เจริญบน CMC agar

จากการแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณต่างๆ ในจังหวัดเชียงใหม่คือดินภายในมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 4 ตัวอย่าง ดินบริเวณคอกขอินทนนท์ 4 ตัวอย่าง ดินบริเวณน้ำพุร้อนสันกำแพง อ.สันกำแพง 4 ตัวอย่าง ดินบริเวณน้ำพุร้อนเทพพนม อ.แม่แจ่ม 2 ตัวอย่าง และดินบริเวณน้ำพุร้อน อ.ฝาง 6 ตัวอย่าง ได้เชื้อที่มีโคโลนีแตกต่างกันแต่ละตัวอย่างดินทั้งหมด 122 ไอโซเลท (ตาราง 3)

ตาราง 3 จำนวนตัวอย่างดินและแบคทีเรียที่แยกได้บน carboxymethylcellulose agar ที่อุณหภูมิ 45°C

ตัวอย่างดิน	จำนวนไอโซเลท
CMU1	6
CMU2	5
CMU3	8
CMU4	5
I1	5
I2	5
I3	5
I4	9
F1	10
F2	3
F3	3
F4	1
F5	3
F6	1
SK1	13
SK2	5
SK3	6
SK4	5
T1	14
T2	10

2. การทดสอบความสามารถในการย่อยเซลลูโลสบนอาหารแข็ง

2.1 การทดสอบเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดบนอาหารที่มี CMC เป็นสับสเตรต แล้วทดสอบด้วย congo red test ปรากฏผลการเกิดวงใสรอบรอยเจริญของเชื้อทั้งหมด 77 ไอโซเลท วัดขนาดความกว้างของวงใส (d_x) โดยคำนวณจากผลต่างของเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (d_i) และรอบรอยเจริญของเชื้อ (d_o) พบว่าเชื้อทั้งหมดมีความกว้างของวงใสตั้งแต่ 0.00 ถึง 16.5 มิลลิเมตร

(ตาราง 4)

ตาราง 4 ขนาด clear zone ของเชื้อเมื่อเพาะเลี้ยงบน carboxymethylcellulose agar ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

isolate	$d_i - d_o$ (mm)	$d_i - d_o$ (mm)	d_x (mm)
CMU1-3	15.0-1.0	14.0-1.0	13.5
CMU2-1	14.0-10.0	14.0-10.0	4.0
CMU4-4	15.0-4.0	18.0-9.0	10.0
F1-3	18.0-12.0	22.0-16.0	6.0
F2-1	15.0-10.0	16.0-11.0	5.0
F4-1	14.0-7.0	15.0-8.0	7.0
I1-1	-	-	-
SK1-8	16.0-4.0	18.0-7.0	12.0
SK2-5	11.0-3.0	11.0-3.0	8.0
T1-1	13.0-3.0	14.0-5.0	9.5
T1-14	3.0-1.0	3.0-1.0	2.0
T2-9	14.0-10.0	15.0-10.0	4.5

- ไม่ปรากฏวงใสของการย่อยสลาย CMC

2.2 การทดสอบเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

เมื่อเพาะเลี้ยงไอโซเลทที่ให้ผลการเกิด clear zone ทั้ง 77 ไอโซเลท ในอาหาร CMC broth ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน นำมาตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาการย่อยสลายโดยเซลลูเลสด้วย DNS reagent และหาปริมาณโปรตีน เพื่อคำนวณค่า specific activity พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท CMU4-4 ให้ผลของ enzyme activity สูงสุดคือ 0.066 unit/millilitre (U/ml) และ specific activity เท่ากับ 0.110 unit/ milligram protein (U/mg protein) (ตาราง 5) ตาราง 5 ค่า Enzyme activity และ Specific activity ของแบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลท เมื่อเพาะเลี้ยงใน carboxymethylcellulose broth ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน

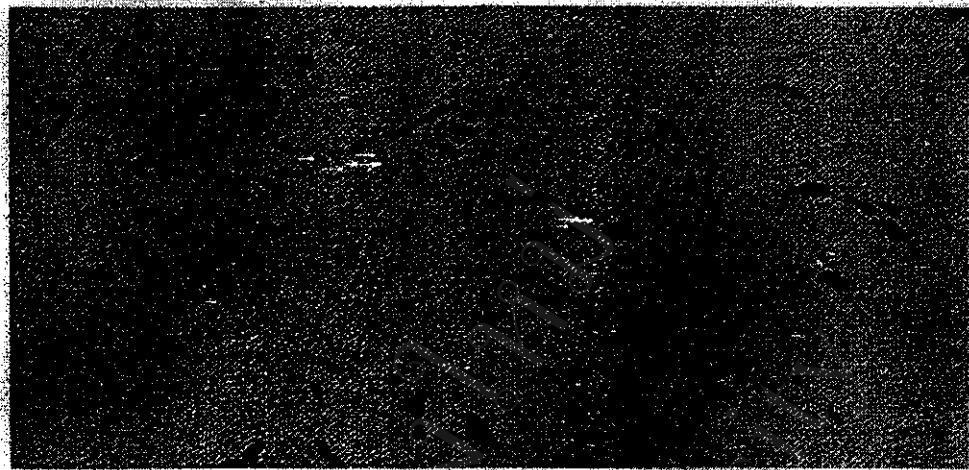
Isolates	Enzyme activity (U/ml)	Specific activity (U/mgprotein)
CMU1-4	0.023	0.045
CMU1-5	0.027	0.047
CMU4-3	0.029	0.039
CMU4-4	0.066	0.110
F1-6	0.013	0.028
F1-9	0.040	0.056
F3-1	0.014	0.028
F3-2	0.004	0.012
T1-2	0.058	0.088
T2-6	0.016	0.010

3. การจัดจำแนกแบคทีเรีย

3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียตามวิธีใน Bergey's Manual of Systematic

Bacteriology

โดยนำไอโซเลท CMU4-4 เพาะเลี้ยงบน NA บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการย้อมสีกรัม ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ใช้กำลังขยาย 100 เท่า ดูรูปร่างเซลล์พบว่าเซลล์ติดสีม่วงของ crystal violet รูปร่างเป็นแท่ง มี spore ตรงกลางเซลล์



ภาพ 2 สัณฐานวิทยาของไอโซเลท CMU4-4 เมื่อเพาะเลี้ยงบน NA

1.1 การศึกษาคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการ

ผลจากการทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีววิทยา พบว่าไอโซเลท CMU4-4 คือ *Bacillus subtilis* (ตาราง 6)

ตาราง 6 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของไอโซเลท CMU4-4

ลักษณะที่ศึกษา	ไอโซเลท CMU4-4	<i>Bacillus subtilis</i>
Shape	Rod	Rod
Gram reaction	+	+
Spore	Central	Ellipsoidal or cylindrical Central or paracentral
Indole	-	-
Motility	+	+
Catalase	+	+
Anaerobic growth	-	-
V-P reaction	+	+
Acid from		
glucose	+	+
arabinose	+	+
xylose	+	+
mannitol	+	+
Use of citrate	+	+
Reduction of NO_3^- to NO_2^-	+	+

4. การศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

4.1 การเตรียมแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ

นำ *Bacillus subtilis* CMU4-4 มาเตรียมเป็นเชื้อตั้งต้นในการทดสอบ โดยเพาะลงบนจานอาหารแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อ 1 loop มาเพาะใน CMC broth บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อตั้งต้นได้ 5.5×10^6 cell/ml

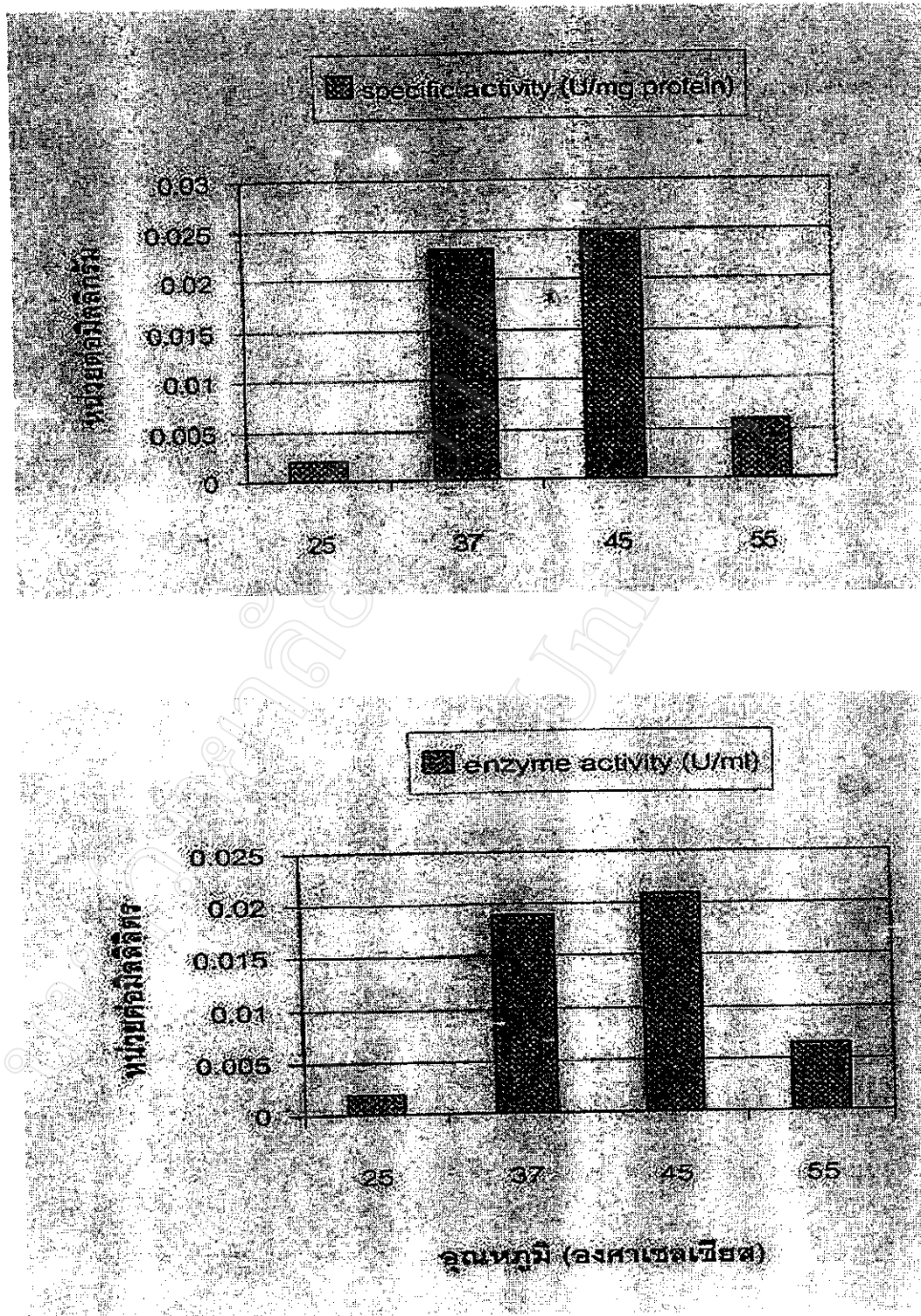
4.2 การทดสอบเพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

จากการนำ *B. subtilis* CMU4-4 มาเพาะเลี้ยงใน CMC broth บ่มที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสคือที่อุณหภูมิ 45°C ซึ่งให้ค่า enzyme activity มากที่สุดคือ 0.021 U/ml และ specific activity เท่ากับ 0.025 U/mg protein แสดงผลดังตาราง 7

ตาราง 7 ค่า Enzyme activity และ Specific activity ของ *Bacillus subtilis* CMU4-4 เมื่อเพาะเลี้ยงใน CMC broth ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

อุณหภูมิ (°C)	Enzyme activity (U/ml)	Specific activity (U/mg protein)
25	0.002	0.002
37	0.019	0.023
45	0.021	0.025
55	0.0065	0.006
65	-	-

- ไม่มีการเจริญของเชื้อ



ภาพ 3 Enzyme activity และ specific activity ของ *Bacillus subtilis* CMU4-4 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน yeast extract และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน pH 7 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน

4.3 การทดสอบเพื่อหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และค่าความเป็นกรดและด่างของอาหาร เลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

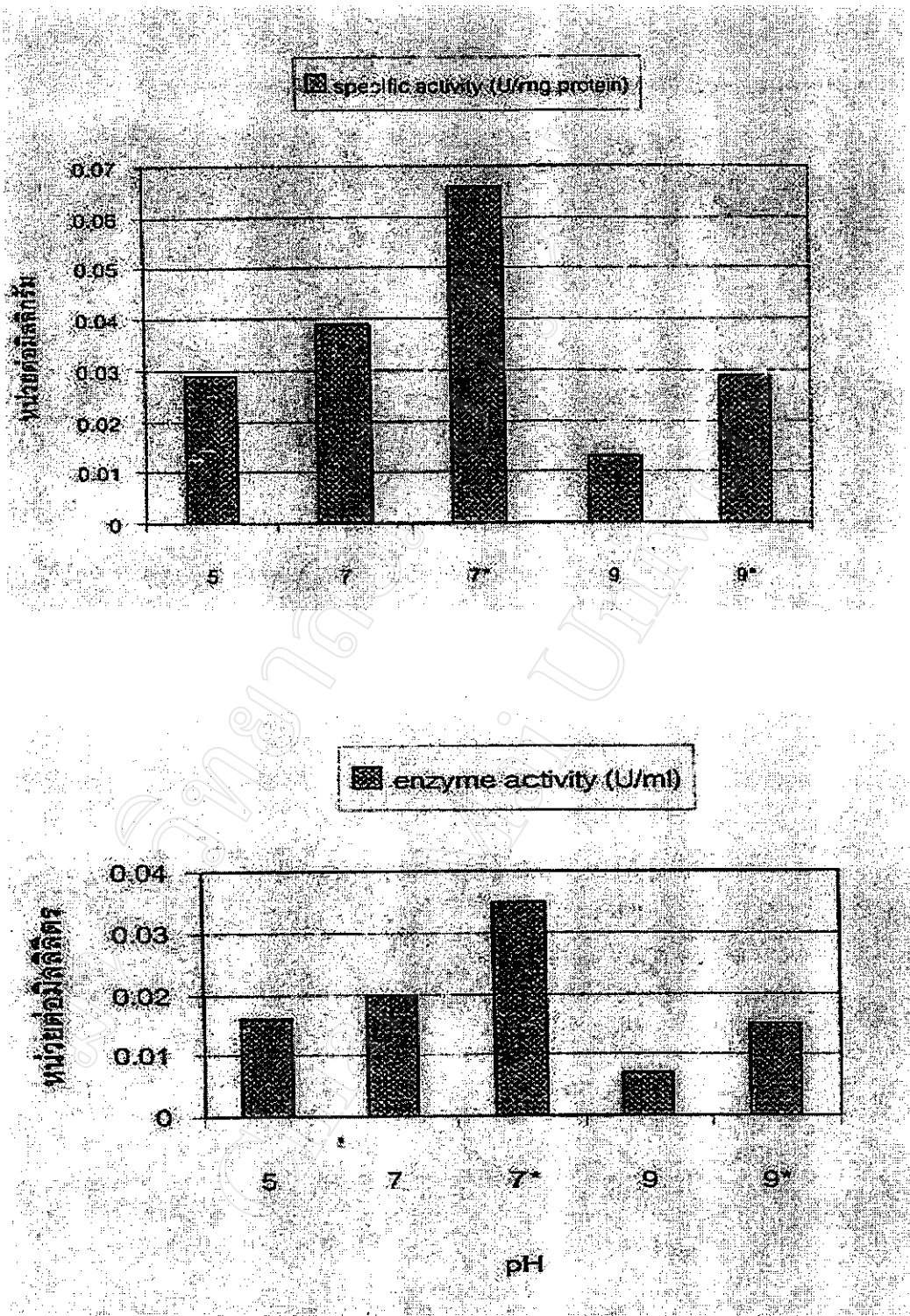
จากการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* CMU4-4 ในอาหารเหลว ที่มีปริมาณ CMC ความเข้มข้น 0.05% และ 0.1% เป็นแหล่งคาร์บอน และมี pH ที่แตกต่างกัน พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณแหล่งคาร์บอนเป็น 2 เท่า (CMC 0.1%) ในอาหารเหลวที่มี pH 7 เชื้อให้ค่า enzyme activity สูงสุดคือ 0.035 U/ml และ specific activity เท่ากับ 0.066 U/mg protein (ตาราง 8)

ตาราง 8 ค่า Enzyme activity และ specific activity ของ *Bacillus subtilis* CMU4-4 เมื่อเพาะเลี้ยงใน CMC broth ที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และ pH แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

pH	Enzyme activity (U/ml)	Specific activity (U/mg protein)
3	-	-
3*	-	-
5	0.016	0.029
7	0.020	0.039
7*	0.035	0.066
9	0.007	0.013
9*	0.015	0.029
11	-	-
11*	-	-

- ไม่มีการเจริญของเชื้อ

* มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเพิ่มเป็น 2 เท่า



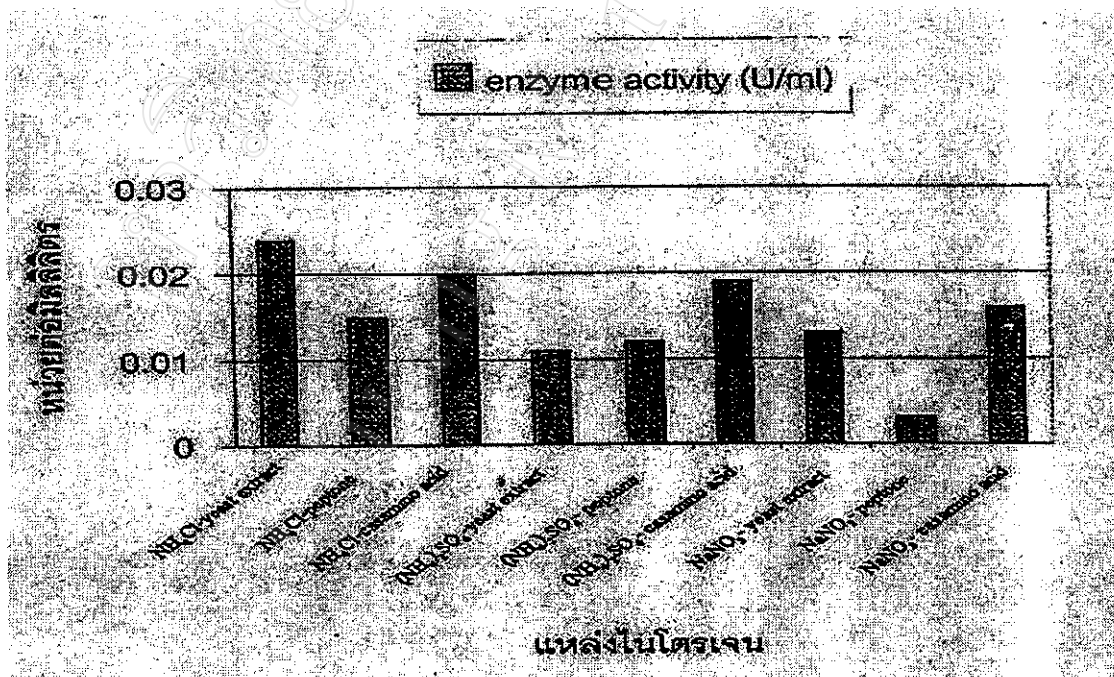
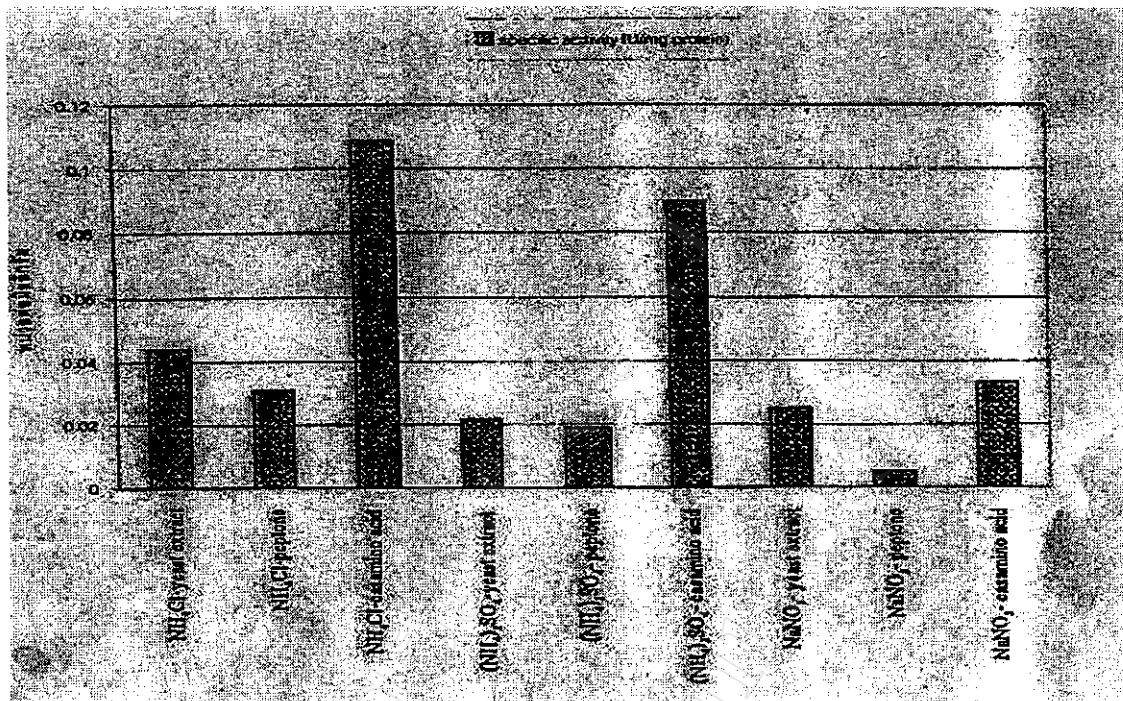
ภาพ 4 Enzyme activity และ specific activity ของ *Bacillus subtilis* CMU4-4 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 0.05 และ 0.1% และมี pH แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

4.4 การทดสอบเพื่อหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

จากการนำ *B. subtilis* CMU4-4 มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน ด้วยความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 2 เท่า (0.1% CMC) และมีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ที่ pH 7 อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าเชื้อให้ค่า enzyme activity สูงสุดคือ 0.024 U/ml เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี NH_4Cl และ yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน และ specific activity เท่ากับ 0.044 U/mg protein (ตาราง 9)

ตาราง 9 ค่า Enzyme activity และ Specific activity ของ *Bacillus subtilis* CMU4-4 เมื่อเพาะเลี้ยงใน CMC broth ที่มี CMC 1% เป็นแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ pH 7 ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

แหล่งไนโตรเจน	Enzyme activity (U/ml)	Specific activity (U/mg protein)
NH_4Cl – yeast extract	0.024	0.044
NH_4Cl – peptone	0.015	0.031
NH_4Cl – casamino acid	0.020	0.109
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – yeast extract	0.011	0.022
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – peptone	0.012	0.019
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – casamino acid	0.019	0.090
NaNO_3 – yeast extract	0.013	0.025
NaNO_3 – peptone	0.003	0.005
NaNO_3 – casamino acid	0.016	0.033



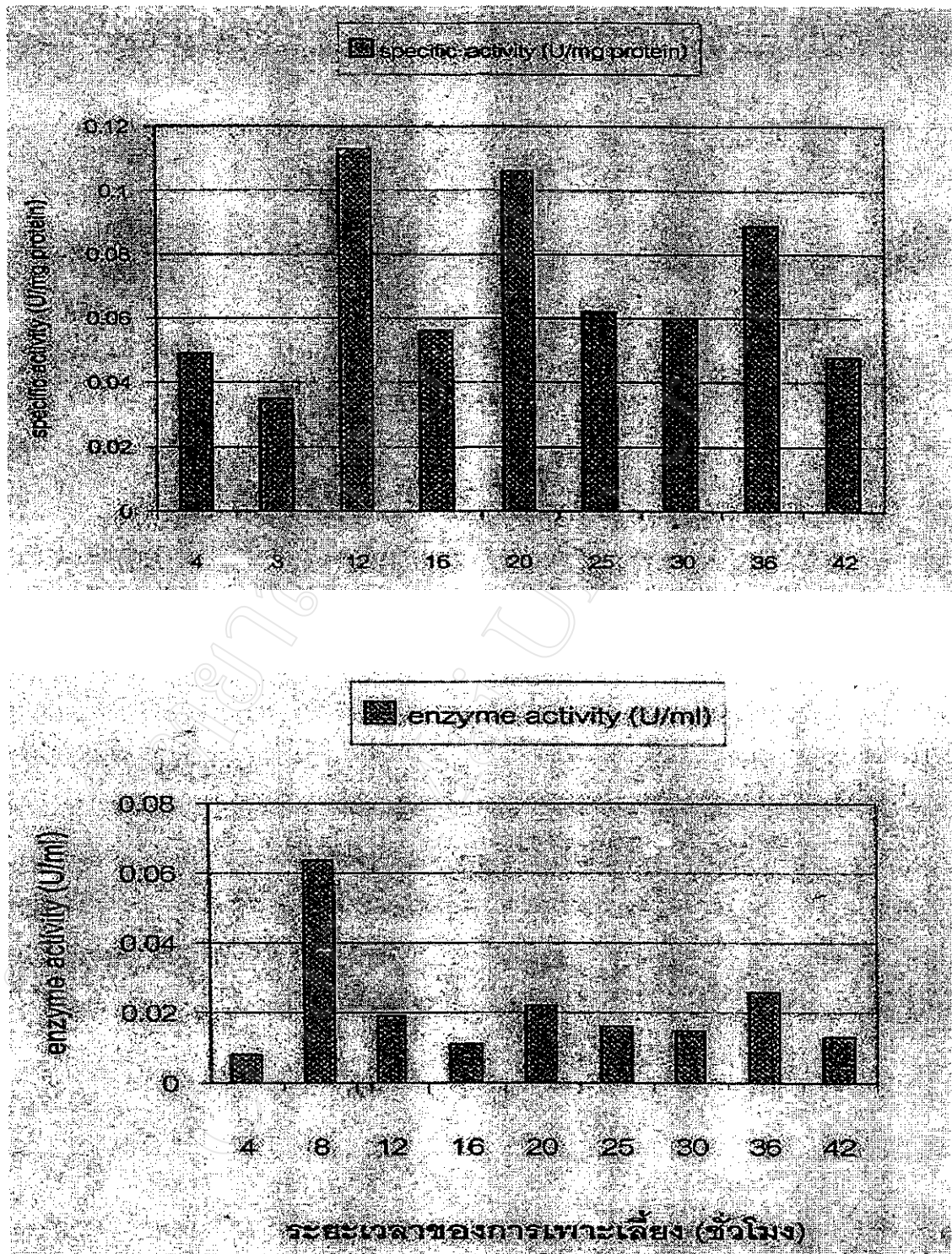
ภาพ 5 Enzyme activity และ specific activity ของ *Bacillus subtilis* CMU4-4 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ที่มี CMC 0.1% pH 7 และมีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

4.5 การทดสอบหาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

จากการทดลองเพาะเลี้ยง *B. subtilis* CMU4-4 ในอาหารเหลวที่มี CMC ความเข้มข้น 0.1 % เป็นแหล่งคาร์บอน และมี NH_4Cl ร่วมกับ casamino acid เป็นแหล่งไนโตรเจน pH 7 ที่อุณหภูมิ 45°C นำมาวัดค่า enzyme activity ในช่วงเวลาต่างๆ ของการเพาะเลี้ยงพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ให้ค่า enzyme activity สูงสุดเท่ากับ 0.035 U/ml และมีค่า specific activity เท่ากับ 0.064 U/mg protein

ตาราง 10 Enzyme activity และ specific activity ของเชื้อ *Bacillus subtilis* CMU4-4 เมื่อเพาะเลี้ยงใน CMC broth โดยมี CMC 0.1% เป็นแหล่งคาร์บอนและมี NH_4Cl ร่วมกับ casamino acid เป็นแหล่งไนโตรเจน pH 7 ที่อุณหภูมิ 45°C ในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	enzyme activity (U/ml)	specific activity (U/mg protein)
0	-	-
4	0.008	0.049
8	0.035	0.064
12	0.019	0.113
16	0.011	0.056
20	0.022	0.106
25	0.016	0.062
30	0.015	0.060
36	0.026	0.089
42	0.013	0.048



ภาพ 6 Enzyme activity และ specific activity ของ *B. subtilis* CMU4-4 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี CMC 0.1% และมี NH_4Cl ร่วมกับ casamino acid เป็นแหล่งไนโตรเจน pH 7 ที่อุณหภูมิ 45°C ในช่วงระยะเวลาต่างๆ