

บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. การตรวจสอบอนุกรมวิธานของแบคทีเรีย

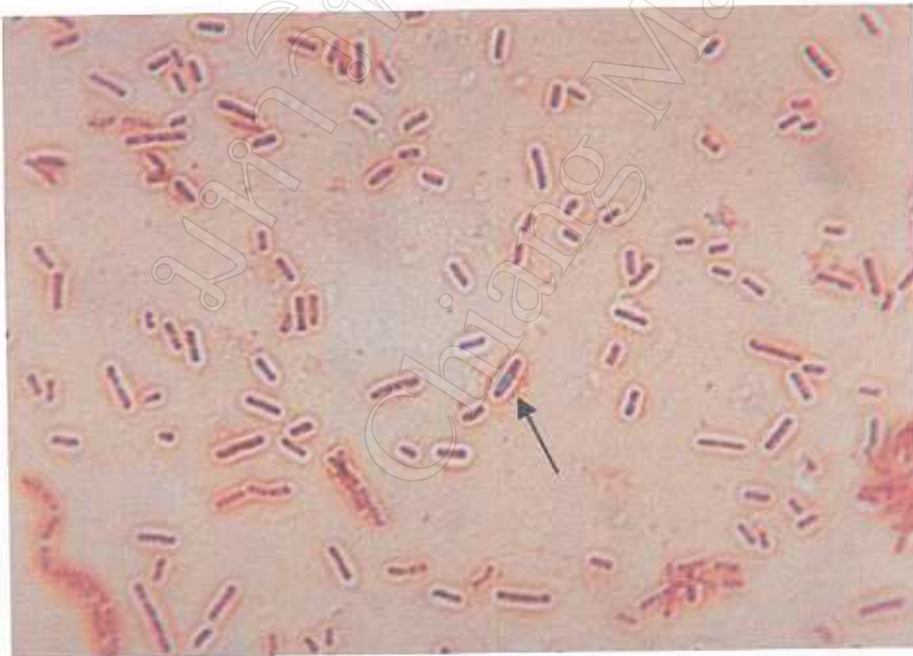
เมื่อนำแบคทีเรียที่เลี้ยงบนอาหาร 2 ไอโซเลท คือ CMU4-4 และ T1-5 ซึ่งทดสอบแล้วว่าสามารถผลิตเซลล์ได้สูงสุด มาตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ พบว่า ไอโซเลท CMU4-4 คือ *Bacillus subtilis* และไอโซเลท T1-5 คือ *Bacillus coagulans* ดังตาราง 7

ตาราง 7 ลักษณะสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของไอโซเลท CMU4-4 และ T1-5

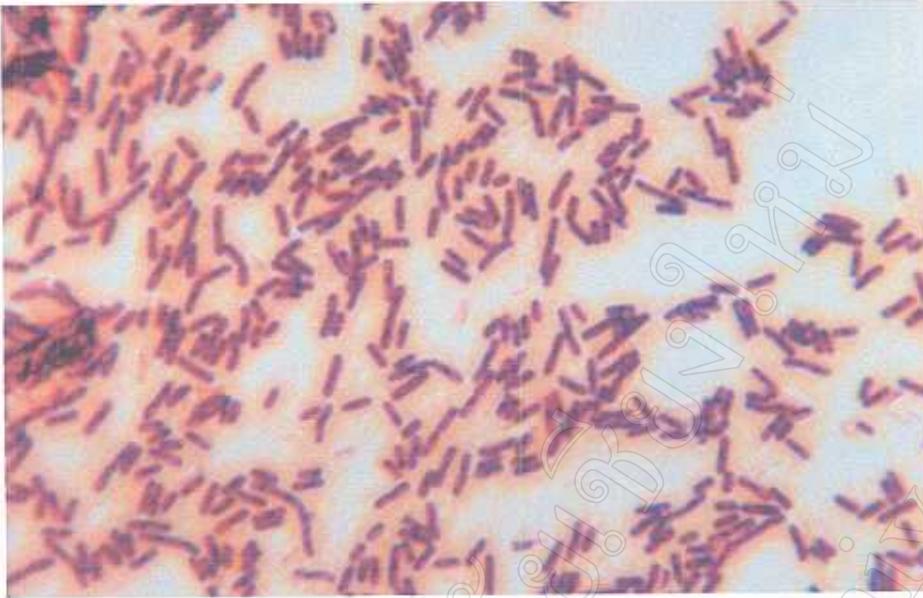
ลักษณะที่ศึกษา	CMU4-4	T1-5	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus coagulans</i>
Shape of cell	Rod	Rod	Rod	Rod
Gram reaction	+	+	+	+
Spore	central	central	central	central
Catalase test	+	+	+	+
V-P reaction	+	+	+	+
Gelatin	+	-	+	-
Motility	+	+	+	+
Nitrate test	+	+	+	d
Oxidation fermentation	+	+/-	+	+
Indole	-	-	-	-
Acid form				
Glucose	+	+	+	+
Xylose	+	-	+	d
Mannitol	+	+	+	d
Arabinose	+	-	+	d



รูป 3 สัณฐานวิทยาของ *Bacillus subtilis* CMU4-4



รูป 4 ลักษณะ endospore ของ *Bacillus subtilis* CMU4-4



รูป 5 สัณฐานวิทยาของ *Bacillus coagulans* T1-5

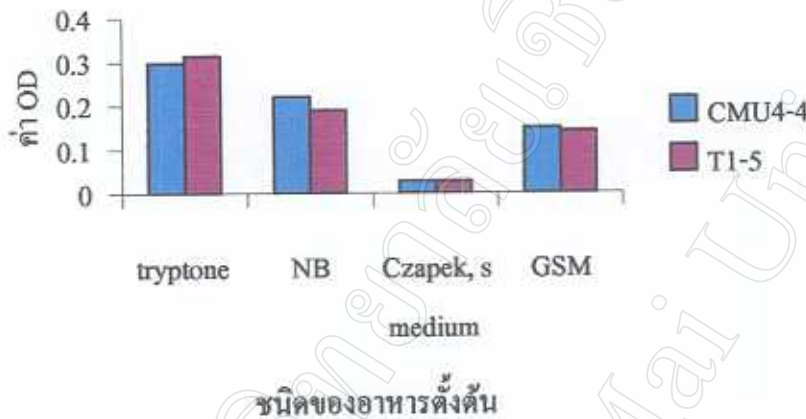


รูป 6 ลักษณะ endospore ของ *Bacillus coagulans* T1-5

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์

2.1 ผลของอาหารตั้งต้นต่อการเจริญของแบคทีเรีย

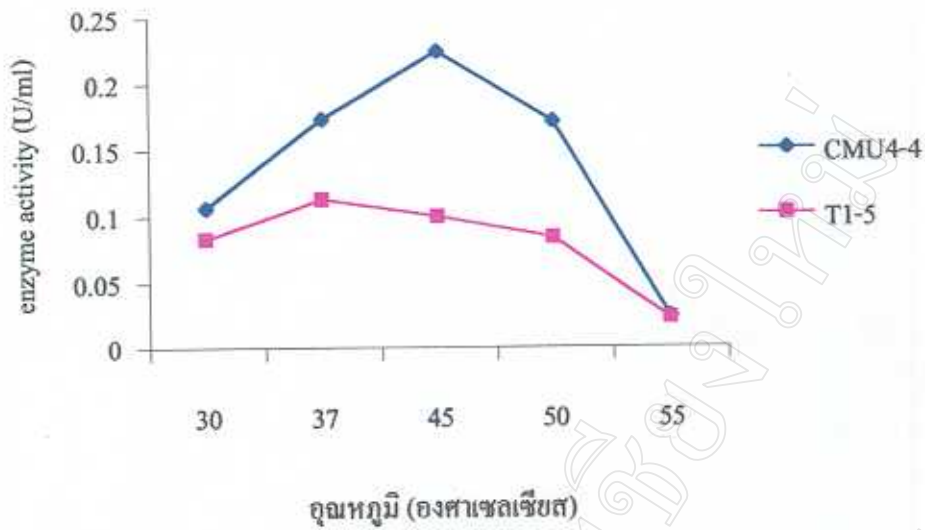
จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5 ในอาหารต่างๆ 4 ชนิด คือ nutrient broth, tryptone yeast extract broth, Czapek's medium และ glucose soybean medium (GSM) พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดเจริญได้ดีที่สุดในอาหาร tryptone yeast extract broth โดยมีความแตกต่างทางสถิติ (ภาคผนวก ง) วัดค่า optical density (OD) ได้เท่ากับ 0.297 และ 0.313 ตามลำดับ (รูป 7)



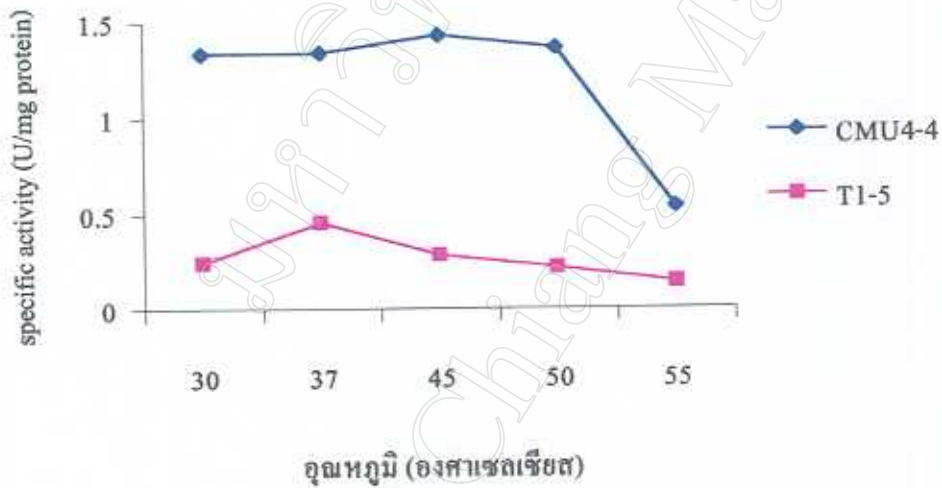
รูป 7 ผลของอาหารตั้งต้นต่อการเจริญของ *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5

2.2 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเซลล์

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5 ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ อุณหภูมิห้อง (+/-28), 37, 45, 50, 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า enzyme activity และ specific activity มีค่าแตกต่างกันทางสถิติ (ภาคผนวก ง) โดย *Bacillus subtilis* CMU4-4 มีค่า enzyme activity และ specific activity สูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เท่ากับ 0.224 uni/ml และ 1.422 unit/mg protein และ *Bacillus coagulans* T1-5 ที่ 37 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 0.107 U/ml และ 0.450 U/mg protein ตามลำดับ (รูป 8 และ 9)



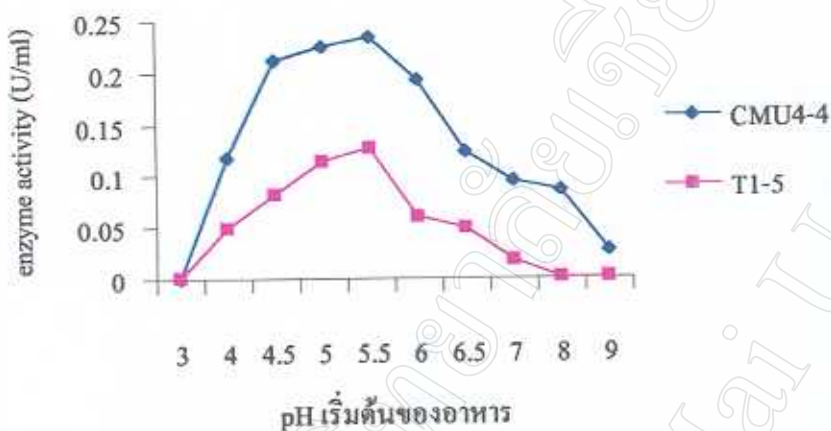
รูป 8 ผลของอุณหภูมิต่อ enzyme activity ของเอนไซม์ จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5



รูป 9 ผลของอุณหภูมิต่อ specific activity ของเอนไซม์ จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5

2.3 ผลของ pH เริ่มต้นของอาหารต่อการผลิตเซลล์

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5 ใน cellulose broth ที่ pH เริ่มต้นต่างๆ คือ 3.0, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 8.0 และ 9.0 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท มี enzyme activity และ specific activity แตกต่างทางสถิติ (ภาคผนวก ง) โดยมี enzyme activity และ specific activity สูงสุดที่ pH 5.5 ซึ่ง *Bacillus subtilis* CMU4-4 จะเท่ากับ 0.234 U/ml และ 1.498 U/mg protein และ *Bacillus coagulans* T1-5 เท่ากับ 0.127 U/ml และ 0.468 U/mg protein ตามลำดับ (รูป 10 และ 11)



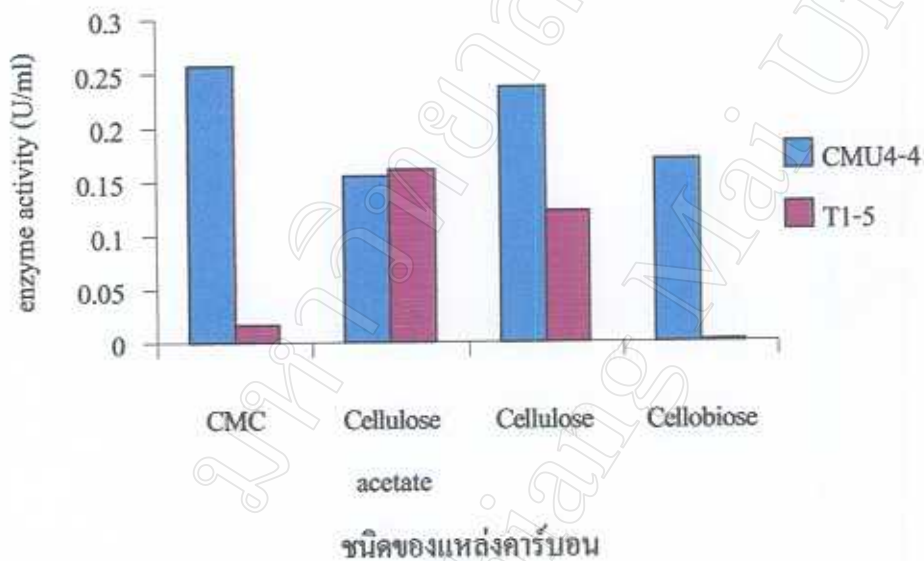
รูป 10 ผลของ pH ต่อ enzyme activity ของเอนไซม์ จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5



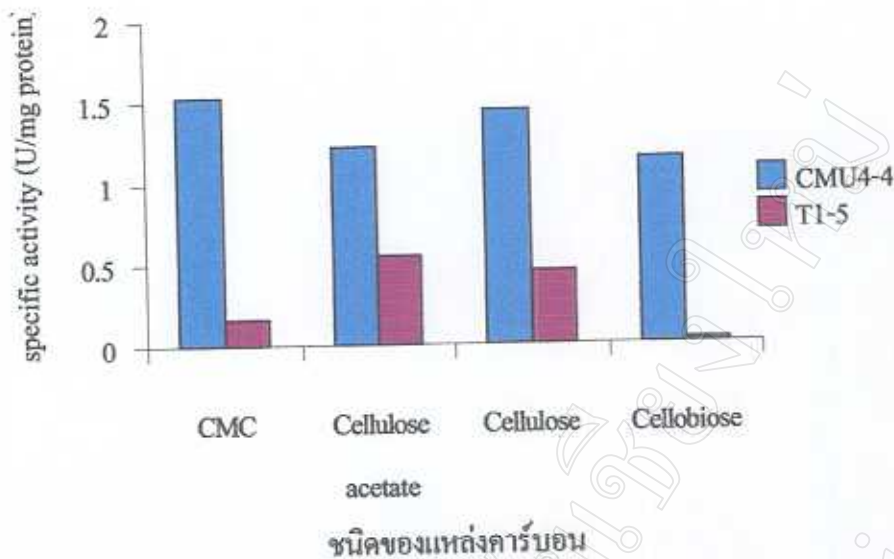
รูป 11 ผลของ pH ต่อ specific activity ของเอนไซม์ จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5

2.4 ผลของชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเซลลูเลส

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5 ใน cellulose broth ที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ คือ carboxymethyl cellulose (CMC), cellulose acetate, cellulose และ cellobiose ที่ความเข้มข้น 0.2% พบว่า enzyme activity และ specific activity แตกต่างทางสถิติ (ภาคผนวก ง) โดยที่ enzyme activity และ specific activity สูงสุด เมื่อ *Bacillus subtilis* CMU4-4 มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอน เท่ากับ 0.258 U/ml และ 1.524 U/mg protein ส่วน *Bacillus coagulans* T1-5 มี cellulose acetate เป็นแหล่งคาร์บอน มีค่าเท่ากับ 0.161 U/ml และ 0.545 U/mg protein ตามลำดับ (รูป 12 และ 13)



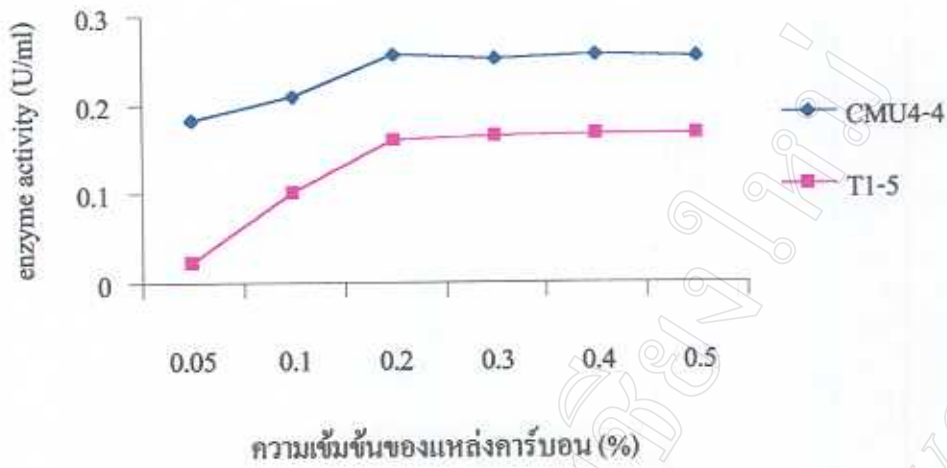
รูป 12 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อ enzyme activity ของเอนไซม์ จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5



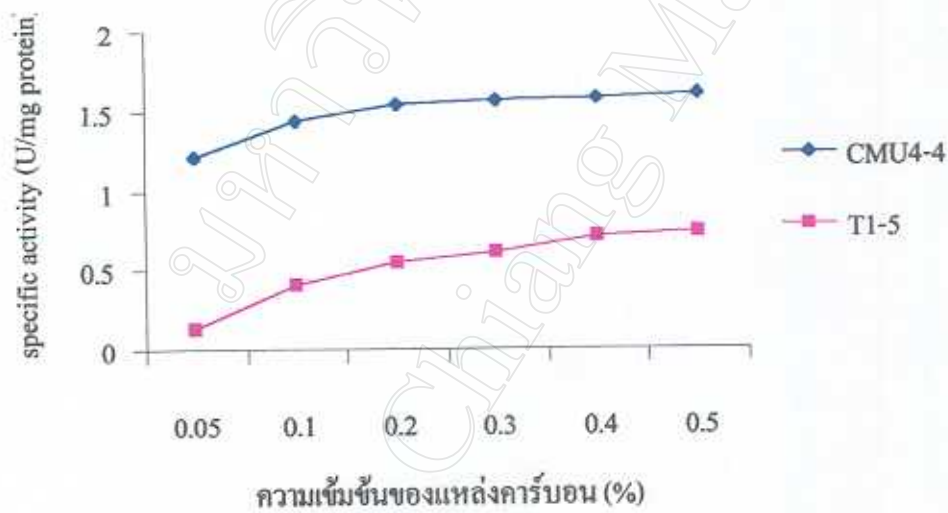
รูป 13 ผลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อ specific activity ของเอนไซม์ จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5

2.5 ผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเซลลูเลส

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5 ใน cellulose broth โดย *Bacillus subtilis* CMU4-4 มี CMC และ *Bacillus coagulans* T1-5 มี cellulose acetate เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.05%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4% และ 0.5% พบว่าทั้ง 2 ไส้เลท มี enzyme activity และ specific activity แตกต่างทางสถิติ (ภาคผนวก ง) โดยมี enzyme activity และ specific activity สูงสุด เมื่อมี 0.2% CMC และ 0.2% cellulose acetate เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่ง enzyme activity เท่ากับ 0.255 U/ml และ 0.154 U/ml ส่วน specific activity เท่ากับ 1.465 U/mg protein และ 0.543 U/mg protein ตามลำดับ (รูป 14 และ 15)



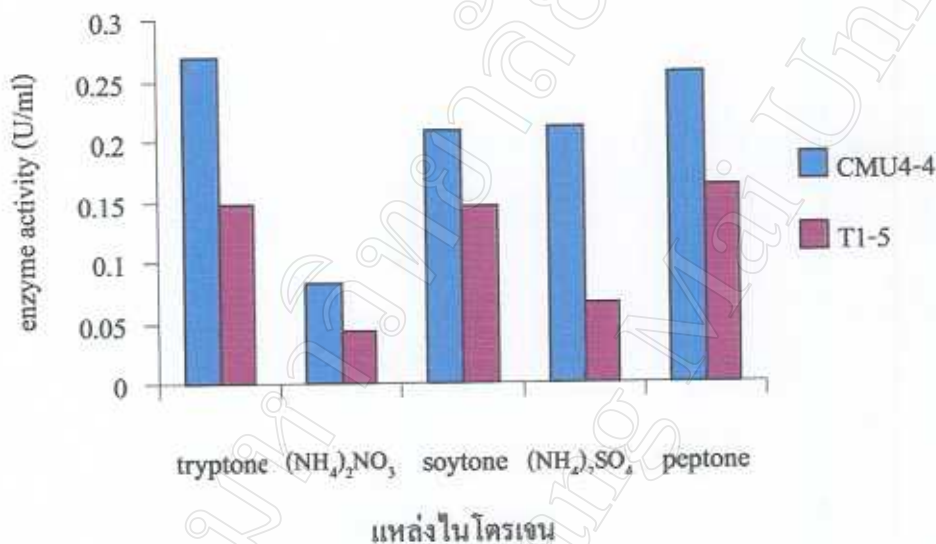
รูป 14 ผลความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนชนิด ต่อ enzyme activity ของเอนไซม์ จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5



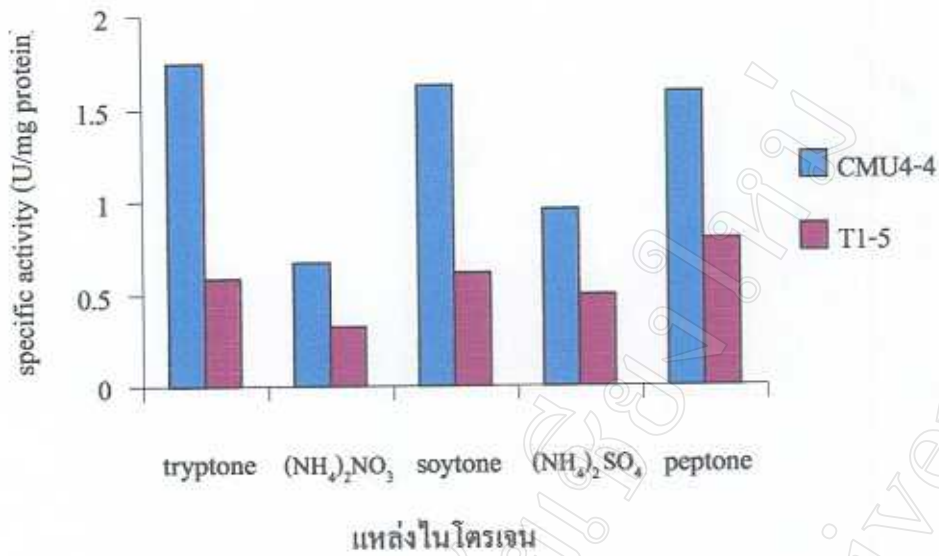
ภาพ 15 ผลความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนชนิด ต่อ specific activity จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5

2.6 ผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเซลลูเลส

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5 ใน cellulose broth ที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ คือ tryptone, ammonium nitrate, soytone, ammonium sulphate และ peptone ที่ความเข้มข้น 0.5% พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลท มี enzyme activity และ specific activity แตกต่างทางสถิติ (ภาคผนวก ง) และมี enzyme activity และ specific activity สูงสุด เมื่อ *Bacillus subtilis* CMU4-4 มี tryptone และ *Bacillus coagulans* T1-5 มี peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน โดย enzyme activity เท่ากับ 0.269 U/ml และ 0.163 U/ml ส่วน specific activity เท่ากับ 1.742 U/mg protein และ 0.800 U/mg protein ตามลำดับ (รูป 16 และ 17)



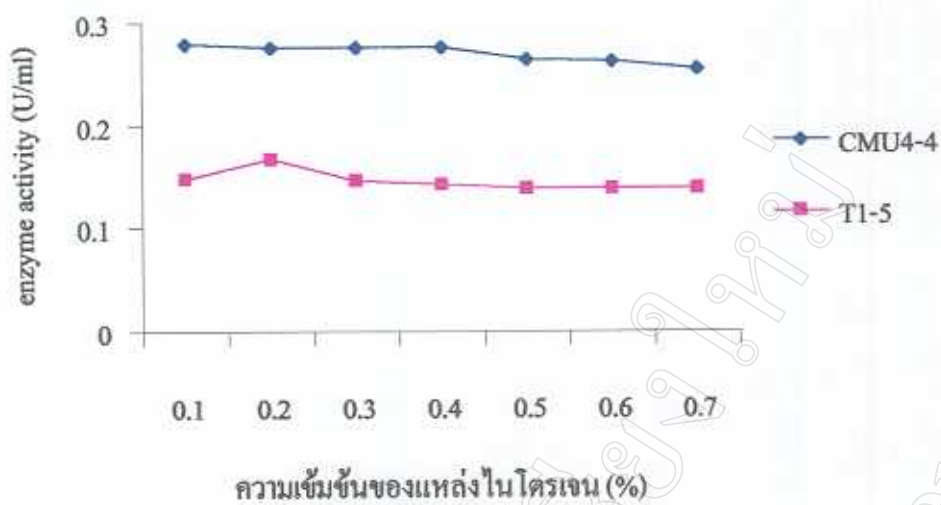
รูป 16 ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อ enzyme activity ของเอนไซม์ จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5



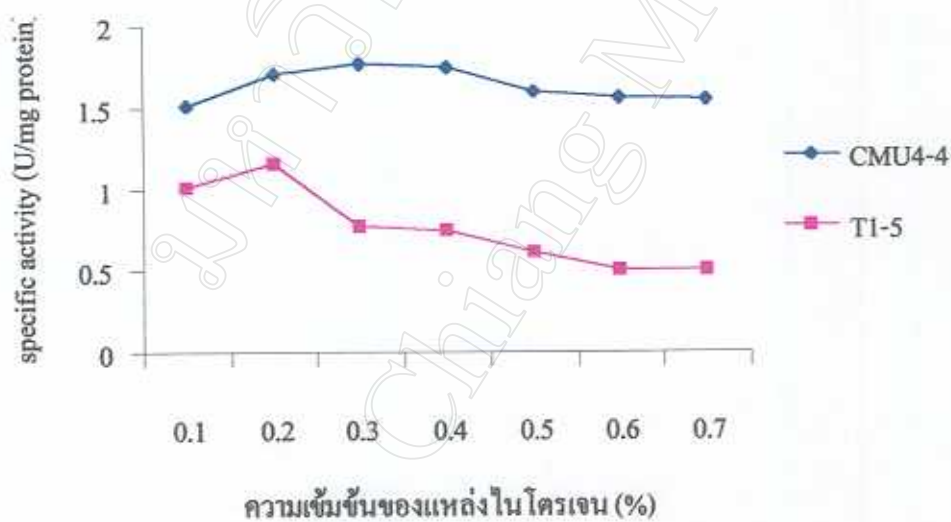
รูป 17 ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ต่อ enzyme activity ของเอนไซม์ จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5

2.7 ผลความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเซลล์

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ T1-5 ใน cellulose broth โดย *Bacillus subtilis* CMU4-4 มี tryptone และ *Bacillus coagulans* T1-5 มี peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6% และ 0.7% พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลต มี enzyme activity และ specific activity แตกต่างทางสถิติ (ภาคผนวก ง) มี enzyme activity และ specific activity สูงสุด เมื่อ *Bacillus subtilis* CMU4-4 มี 0.3% tryptone และ *Bacillus coagulans* T1-5 มี 0.2% peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน โดย enzyme activity เท่ากับ 0.275 U/ml และ 0.166 U/ml ส่วน specific activity เท่ากับ 1.706 U/mg protein และ 1.159 U/mg protein ตามลำดับ (รูป 18 และ 19)



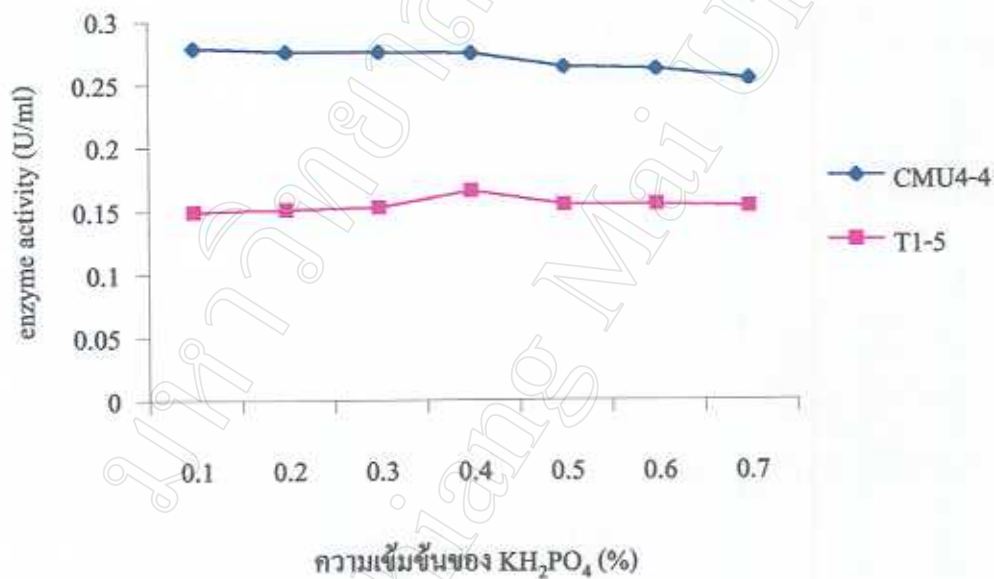
รูป 18 ผลความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อ enzyme activity ของเอนไซม์ จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5



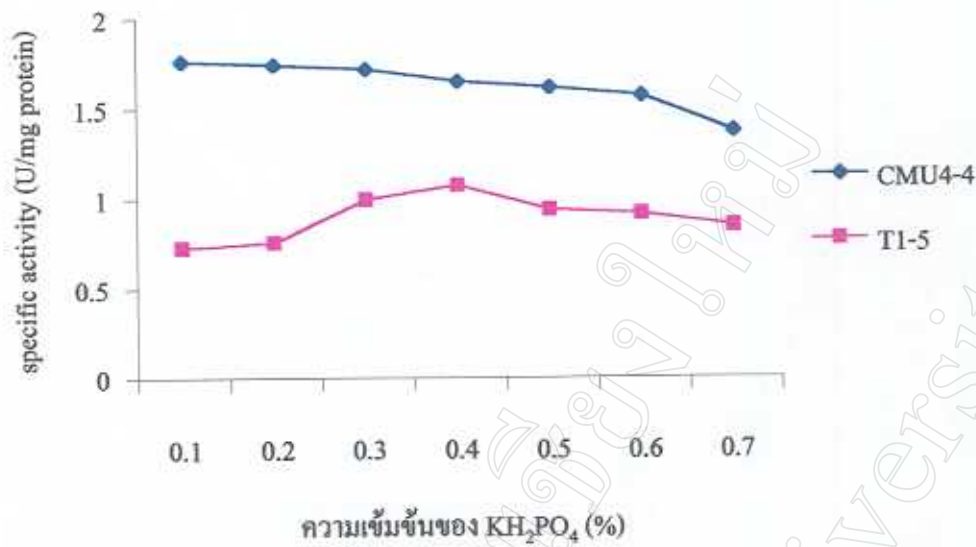
รูป 19 ผลความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อ specific activity ของเอนไซม์ จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5

2.8 ผลความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ต่อการผลิตเซลลูเลส

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5 ใน cellulose broth ที่มี KH_2PO_4 ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6% และ 0.7% พบว่า *Bacillus subtilis* CMU4-4 มี enzyme activity และ specific activity แตกต่างทางสถิติ (ภาคผนวก ง) มี enzyme activity และ specific activity สูงสุด เมื่อมี 0.1% KH_2PO_4 enzyme activity เท่ากับ 0.278 U/ml และ specific activity เท่ากับ 1.761 U/mg protein ส่วน *Bacillus coagulans* T1-5 มี enzyme activity ไม่แตกต่างทางสถิติ ซึ่งสูงสุด เมื่อมี 0.4% KH_2PO_4 เท่ากับ 0.165 U/ml ส่วน specific activity มีความแตกต่างทางสถิติ เท่ากับ 1.076 U/mg protein (รูป 20 และ 21)



รูป 20 ผลความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ต่อ enzyme activity ของเอนไซม์ จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5

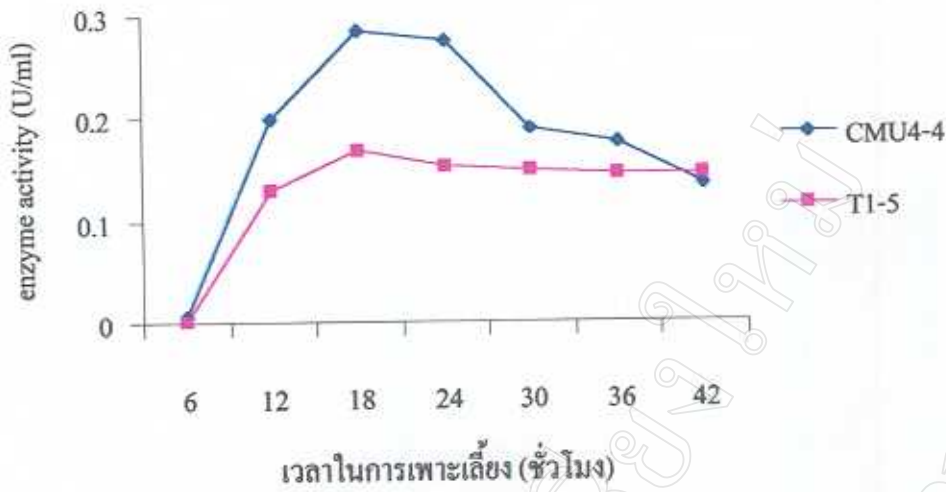


รูป 21 ผลความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ต่อ specific activity ของเอนไซม์ จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5

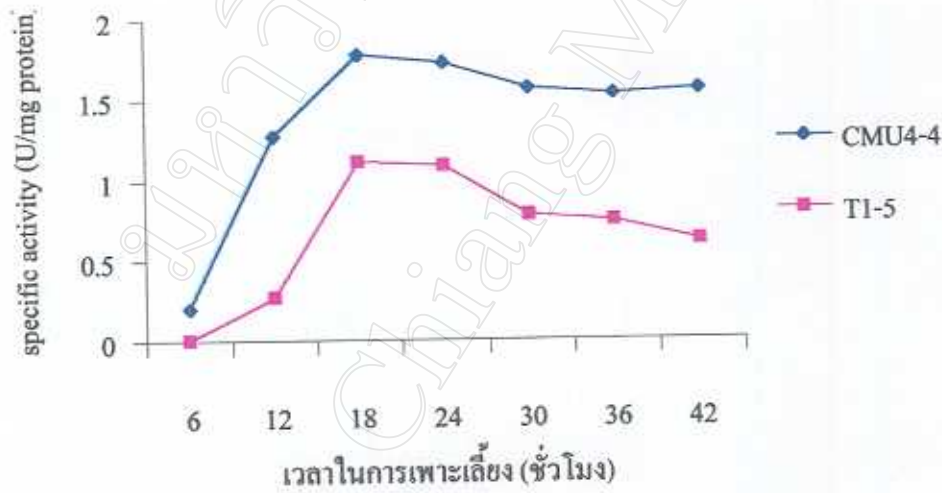
2.9 ผลของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์

จากการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5 ใน cellulose broth บ่มเป็นเวลาต่างๆ คือ 6, 12, 18, 24, 30, 36 และ 42 ชั่วโมง พบว่า enzyme activity และ specific activity แตกต่างทางสถิติ (ภาคผนวก ง) และมี enzyme activity และ specific activity สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่เวลา 18 ชั่วโมง ทั้ง 2 ไอโซเลต โดย enzyme activity เท่ากับ 0.281 U/ml และ 0.168 U/ml ส่วน specific activity เท่ากับ 1.778 U/mg protein และ 1.108 U/mg protein ตามลำดับ (รูป 22 และ 23)

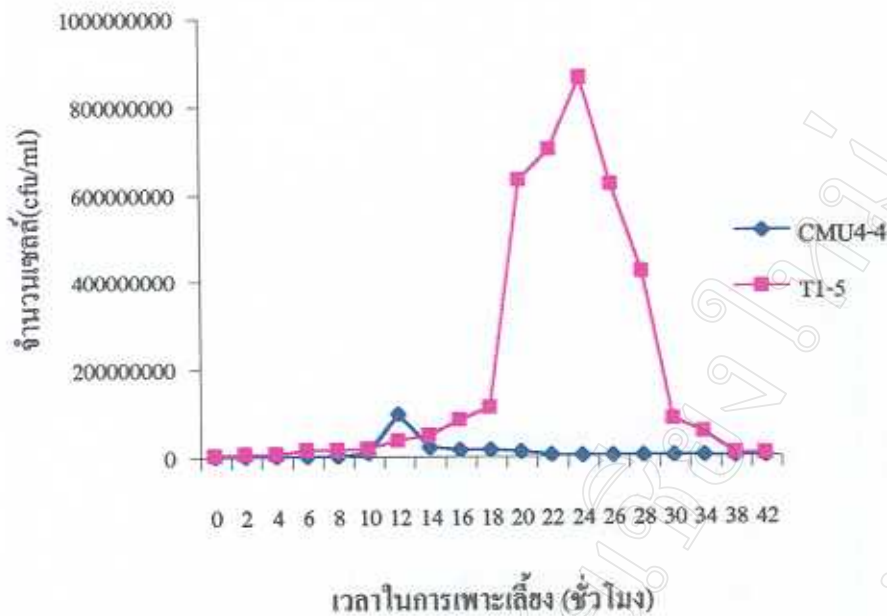
ส่วนอัตราการเจริญของแบคทีเรีย พบว่า *Bacillus subtilis* CMU4-4 มีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมง มีความเข้มข้นของเซลล์ เท่ากับ 9.65×10^7 cfu/ml และ *Bacillus coagulans* T1-5 มีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 26 ชั่วโมง มีความเข้มข้นของเซลล์ เท่ากับ 8.6×10^7 cfu/ml (รูป 24)



รูป 22 ผลของเวลาต่อ enzyme activity ของเอนไซม์ จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5



รูป 23 ผลของเวลาต่อ specific activity ของเอนไซม์ จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5

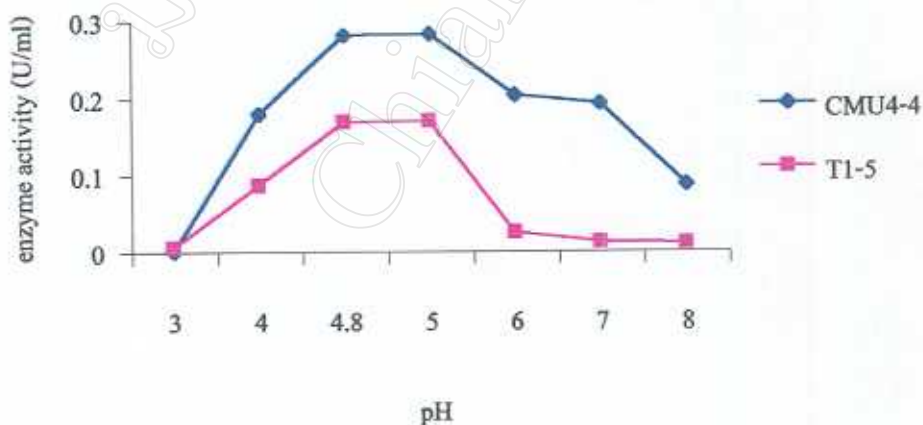


รูป 24 ผลของเวลาต่อการเจริญของ *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5

3. การศึกษาหาคุณสมบัติบางประการของเซลล์

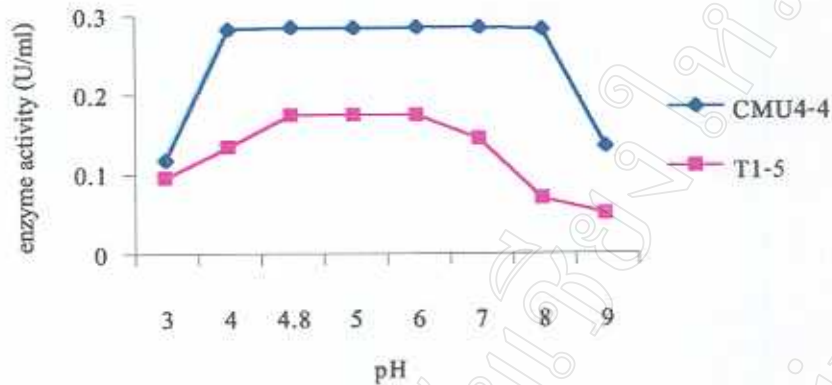
3.1 ผลของ pH ต่อการทำงานของเซลล์

3.1.1 ผลของ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5 มี optimum pH คือ 5.0 โดยมี enzyme activity เท่ากับ 0.281 U/ml และ 0.174 U/ml ตามลำดับ (รูป 25)



รูป 25 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์

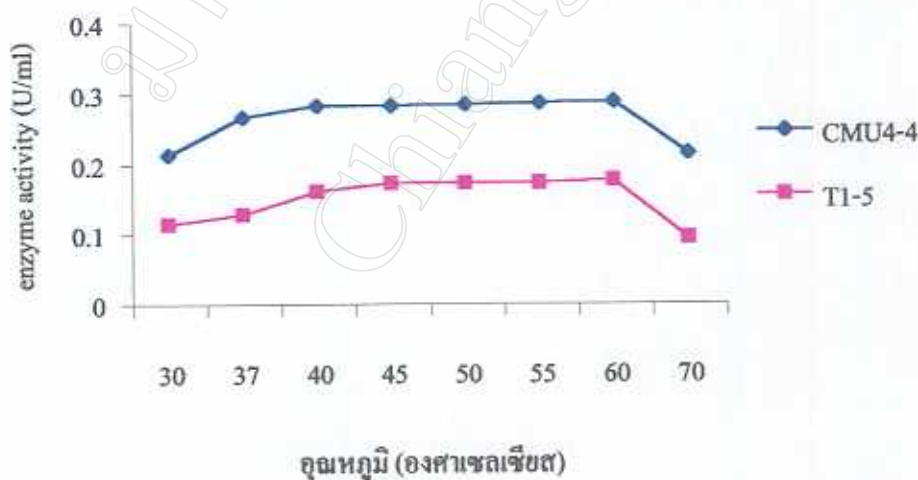
3.1.2 ผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 มีความเสถียรที่ pH ในช่วง 4.0-8.0 และ *Bacillus coagulans* T1-5 มีความเสถียรต่อ pH อยู่ในช่วง 4.8-6.0 (รูป 26)



รูป 26 ผลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์

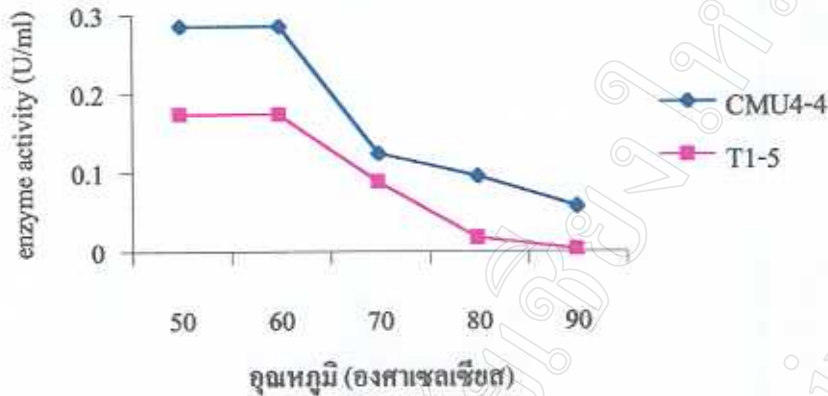
3.2 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเซลล์

3.2.1 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5 มี optimum temperature คือ 60 องศาเซลเซียส โดยมี enzyme activity เท่ากับ 0.296 U/ml และ 0.182 U/ml ตามลำดับ (รูป 27)



รูป 27 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

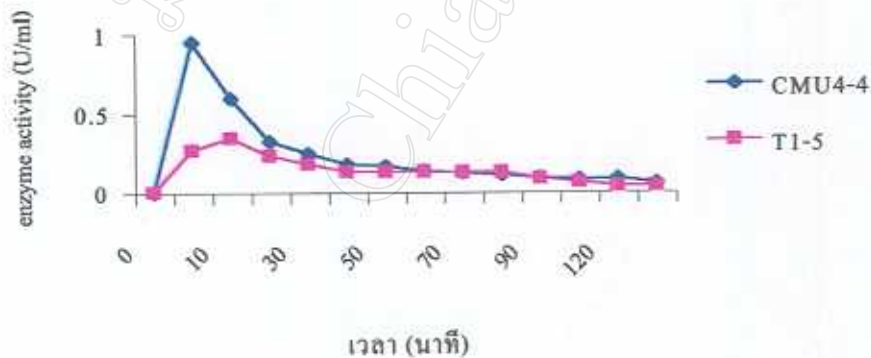
3.2.1 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5 มีความเสถียรต่ออุณหภูมิในช่วงไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส (รูป 28)



รูป 28 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์

3.3 ผลของเวลาต่อการทำงานของเอนไซม์

จากการบ่มเอนไซม์ที่ได้จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5 ที่เวลาต่างๆ พบว่า *Bacillus subtilis* CMU4-4 มี enzyme activity สูงสุดที่เวลา 5 นาที และเริ่มคงที่เมื่อเวลา 60 นาที ส่วน *Bacillus coagulans* T1-5 มี enzyme activity สูงสุดที่เวลา 15 นาที และเริ่มคงที่เมื่อเวลา 50 นาที (รูป 29)



รูป 29 ผลของเวลาต่อการทำงานของเอนไซม์

3.4 การศึกษาความจำเพาะต่อซับสเตรท

3.4 การศึกษาความจำเพาะต่อซับสเตรท

นำ crude enzyme จากข้อ 2 มาทำปฏิกิริยากับซับสเตรทชนิดต่างๆ เพื่อทดสอบความจำเพาะต่อซับสเตรท พบว่าเอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 สามารถทำปฏิกิริยากับซับสเตรททุกตัวที่ใช้ทดสอบ และ *Bacillus coagulans* T1-5 ทำปฏิกิริยากับ CMC, LBG และ xylose แต่ไม่ทำปฏิกิริยากับ Arabic gum

3.4 การศึกษาผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเซลล์

เมื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเซลล์จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5 ด้วยวิธี Thin layer chromatography ที่มี glucose และ cellobiose เป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ไอโซเลท มี glucose และ cellobiose เป็นองค์ประกอบ (รูป 30)



รูป 30 ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์กับซับสเตรท ทดสอบด้วยวิธี TLC

A : Glucose B : Cellobiose C : *Bacillus subtilis* CMU4-4 D : *Bacillus coagulans* T1-5