

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

จากการตรวจสอบลักษณะพื้นฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท คัดเลือกแบบกว่ รูปแท่ง เมื่อเปรียบเทียบกับคู่มือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 8th ed. พบว่าไอโซเลท CMU4-4 คือ *Bacillus subtilis* และไอโซเลท T1-5 คือ *Bacillus coagulans*

จากการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส พบว่าอาหารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของทั้ง 2 เชื้อ คือ อาหาร tryptone yeast extract broth วัดค่า OD ได้เท่ากับ 0.297 และ 0.313 ตามลำดับ ในอาหาร Czapek's medium เชื้อมีอัตราการเจริญต่ำมากเมื่อเทียบกับอาหารชนิดอื่นๆ เนื่องจากส่วนใหญ่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา จึงอาจไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และเมื่อทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส พบว่า *Bacillus subtilis* CMU4-4 มีอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียส มี enzyme activity และ specific activity เท่ากับ 0.224 U/ml และ 1.422 U/mg protein ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติ และที่อุณหภูมิสูงหรือต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์ได้แค่ผลิตได้น้อย โดยเฉพาะอุณหภูมิที่สูงกว่า 45 องศาเซลเซียส ค่า enzyme activity จะลดลง และลดลงมากเมื่ออุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อ *Bacillus coagulans* T1-5 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส ที่ 37 องศาเซลเซียส มี enzyme activity และ specific activity เท่ากับ 0.099 U/ml และ 0.450 U/mg protein และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มี enzyme activity ใกล้เคียงกับ 37 องศาเซลเซียส และเมื่อทดสอบทางสถิติ พบว่าไม่แตกต่างกัน แต่เลือกใช้อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เนื่องจากที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีค่า specific activity ที่สูงกว่า การที่เชื้อมีการผลิตเซลลูเลสได้ต่ำที่ 55 องศาเซลเซียส อาจเกิดจากอุณหภูมิที่สูงเกินไปทำให้เอนไซม์เกิดการเสียสภาพได้ และพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลสจะแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ เช่น รายงานของ Oikawa *et al.* (1994) พบว่า *Acetobacter xylinum* KU-1 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ 50 องศาเซลเซียส และสมภพ (2529) ได้ศึกษาเชื้อรา 3 ชนิด ได้แก่ *Aspergillus fumigatus*, *Myceliophthora thermophila* และ *Trichoderma reesei* โดยเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิดแตกต่างกัน คือ 30, 40, และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

pH เป็นอีกปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการผลิตเซลลูเลส จากการทดลองพบว่า *Bacillus subtilis* CMU4-4 มี pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส คือ 5.5 มี enzyme activity และ specific activity เท่ากับ 0.234 U/ml และ 1.498 U/mg protein ตามลำดับ แต่ที่ pH 3 เชื้อไม่สามารถผลิตเซลลูเลสได้

เพราะเชื้อไมเจอริอุที่ pH ระดับนี้ เนื่องจากแบคทีเรียส่วนใหญ่มี pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญประมาณ 6.0-8.0 (บัญญัติ, 2534) แต่จะผลิตเอนไซม์ได้ในช่วงตั้งแต่ pH 4.0-9.0 ส่วน *Bacillus coagulans* T1-5 จะผลิตเอนไซม์ได้ในช่วง pH 4.0-7.0 มี pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส คือ 5.5 เช่นกัน มี enzyme activity และ specific activity เท่ากับ 0.127 U/ml และ 0.468 U/mg protein ตามลำดับ และพบว่าที่ pH 3.0, 8.0 และ 9.0 ไม่มีการผลิตเซลลูเลส เนื่องจากเชื้อไม่สามารถเจริญได้ ซึ่งที่ pH ต่ำหรือสูงเกินไปจะมีผลต่อการผลิตเซลลูเลส คังการทดลองของจิตตเสน (2529) ศึกษา *Hemicella nigrescens* CM 33 B โดยการเพาะเลี้ยงใน cellulose broth พบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลสมากที่สุด คือ pH 5.5 และที่ pH 4.5 ไม่มีการผลิตเซลลูเลส และจากรายงานของ Keskar (1992) พบว่า pH 4.5-5.5 เป็น pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลสของ *Penicillium janthinellum* ส่วนที่ pH 3.0 มีการผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่ต่ำมาก และที่ pH 6.5 ไม่มีการผลิตเอนไซม์

ความเข้มข้นและแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส พบว่าจากการทดลอง *Bacillus subtilis* CMU4-4 มี CMC เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส มี enzyme activity และ specific activity เท่ากับ 0.258 U/ml และ 1.524 U/mg protein และเมื่อมี cellulose acetate และ cellulobiose เป็นแหล่งคาร์บอนเชื้อจะผลิตเอนไซม์ได้ต่ำ ความเข้มข้นของ CMC ที่เหมาะสมที่ระดับ 0.2% ซึ่งที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.2% ขึ้นไป ค่า activity ไม่แตกต่างทางสถิติ แต่ที่ความเข้มข้น 0.05-0.1% ค่า enzyme activity จะต่ำ จึงเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 0.2% และ enzyme activity และ specific activity เท่ากับ 0.255 U/ml และ 1.533 U/mg ตามลำดับ ส่วน *Bacillus coagulans* T1-5 มี cellulose acetate เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส มี enzyme activity และ specific activity เท่ากับ 0.161 U/ml และ 0.545 U/mg protein ตามลำดับ และเมื่อใช้ cellulobiose เป็นแหล่งคาร์บอนจะมีผลิตเอนไซม์ได้ต่ำมาก ส่วนความเข้มข้นของ cellulose acetate ที่เหมาะสม คือ ที่ความเข้มข้น 0.2% เนื่องจากเมื่อทดสอบทางสถิติพบว่าที่ความเข้มข้น 0.2-0.4% ไม่ต่างกัน จึงใช้ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งมี enzyme activity และ specific activity เท่ากับ 0.16 U/ml และ 0.543 U/mg protein ตามลำดับ ซึ่งมีรายงานว่า การผลิตเซลลูเลสจาก *Peronia oedipus* ที่เจริญในซับสเตรตต่างๆ คือ กระดาษกรอง soluble CMC และกลูโคส เป็นเวลา 35 วัน พบว่า soluble CMC จะเป็นตัวชักนำให้เกิดการผลิตเซลลูเลสมากที่สุด และในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะไม่มีการผลิตเอนไซม์ ส่วนความเข้มข้นของซับสเตรตต่อการผลิตเซลลูเลส พบว่ากระดาษกรองที่ความเข้มข้น 114 mg/ml จะมี enzyme activity เท่ากับ 0.6 unit/ml และ CMC ที่ความเข้มข้น 20 mg/ml มี enzyme activity เท่ากับ 0.7 unit/ml (Denison and Koehn, 1977) และ Oikawa *et al.* (1994) ได้ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ เพื่อศึกษาการผลิตเซลลูเลสจาก *Acetobacter xylinum* KU-1 พบว่า glycerol เป็นแหล่งที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเซลลูเลส

ผลความเข้มข้นและแหล่งของไนโตรเจน จากการทดลองพบว่า *Bacillus subtilis* CMU4-4 มี tryptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส มี enzyme activity และ specific activity เท่ากับ 0.269 U/ml และ 1.742 U/mg protein ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 0.1-0.4% การผลิตเซลลูเลสไม่ต่างกัน จึงเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 0.2% เนื่องจาก specific activity มีค่าสูงกว่าที่ 0.1% โดย enzyme activity และ specific activity เท่ากับ 0.275 U/ml และ 1.706 U/mg protein ตามลำดับ ส่วน *Bacillus coagulans* T1-5 มี peptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส มี enzyme activity และ specific activity เท่ากับ 0.163 U/ml และ 0.800 U/mg protein ตามลำดับ และที่ความเข้มข้น 0.2% มีการผลิตเซลลูเลสได้สูงสุด โดยมี enzyme activity และ specific activity เท่ากับ 0.166 U/ml และ 1.159 U/mg protein ตามลำดับ ซึ่งส่วนใหญ่ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตจะเป็นสารอินทรีย์ ดังการทดลองของระพีพรรณ (2530) ได้ใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ soytone, tryptone, casitone และ peptone พบว่า tryptone เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลสของ *Ruminococcus albus* 21Aa และในการเพาะเลี้ยง *Acetobacter xylinum* KU-1 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ ได้แก่ polypeptone, peptone และ tryptone พบว่าแหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิดสามารถกระตุ้นให้เชื้อมีการผลิตเซลลูเลส และยังพบอีกว่า yeast extract จะไม่มีผลต่อการผลิตเซลลูเลส (Oikawa *et al.*, 1994)

ความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ต่อการผลิตเซลลูเลสของ *Bacillus subtilis* CMU4-4 พบว่าที่ความเข้มข้น 0.1-0.6% จะไม่แตกต่างทางสถิติ แต่เมื่อที่ความเข้มข้นสูงขึ้น การผลิตเซลลูเลสของเชื้อเริ่มลดลง โดยเลือกความเข้มข้นที่ 0.1% ในการผลิตเซลลูเลส enzyme activity และ specific activity เท่ากับ 0.278 U/ml และ 1.761 U/mg protein ตามลำดับ และความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ต่อการผลิตเซลลูเลสจาก *Bacillus coagulans* T1-5 เมื่อมีความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ต่างๆ พบว่าไม่แตกต่างทางสถิติ แต่ specific activity ที่ความเข้มข้น 0.4% จะสูงที่สุด และ enzyme activity สูงที่สุดด้วย ซึ่ง enzyme activity และ specific activity เท่ากับ 0.165 U/ml และ 1.076 U/mg protein ตามลำดับ ซึ่ง Jin and Toda (1989) พบว่า phosphate จะมีผลต่อการผลิตเซลลูเลส โดยพบว่าความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ที่ 2.9-8.8 กรัม/ลิตร จะมีผลทำให้มีการผลิต endocellulase เพิ่มขึ้น 31.7% แต่ทำให้การผลิต β -glucosidase ลดลง โดยลดลง 10%

ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส จากการทดลอง พบว่าที่เวลา 18 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ของเชื้อทั้ง 2 ชนิด โดยเซลลูเลสจาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 มี enzyme activity และ specific activity เท่ากับ 0.281 U/ml และ 1.778 U/mg protein ตามลำดับ ส่วนเซลลูเลสจาก *Bacillus coagulans* T1-5 มี enzyme activity และ specific activity เท่ากับ 0.168 U/ml และ 1.108 U/mg protein ตามลำดับ และเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นการผลิต

เอนไซม์จะเริ่มลดลง อาจเกิดจากเอนไซม์จะย่อยยับสเตรทไดกลูโคส ซึ่งจะยับยั้งการผลิตเซลลูเลส (จิตตเสน, 2527) และเมื่อวัดการเจริญของเชื้อควบคู่ไปด้วย พบว่าที่เวลา 12 ชั่วโมง *Bacillus subtilis* CMU4-4 มีอัตราการเจริญสูงสุด คือ 9.65×10^7 cfu/ml และ *Bacillus coagulans* T1-5 มีอัตราการเจริญสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง คือ 8.6×10^8 cfu/ml ซึ่งระพีพรรณ (2530) พบว่าที่เวลา 72 ชั่วโมง *Ruminococcus albus* 21Aa สามารถผลิตเซลลูเลสได้สูงสุด ส่วน *Pennicillium janthinellum* เวลาที่ 48 ชั่วโมง เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส (Keskar, 1992) และ *Acetobacter xylinum* KU-1 มีเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส คือ 96 ชั่วโมง (Oikawa et al., 1994)

จากการศึกษาสมบัติบางประการของเซลลูเลส พบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5 คือ 5.0 ส่วนความเสถียรของเอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 ในช่วง 4.0-8.0 และ *Bacillus coagulans* T1-5 มีความเสถียรในช่วง 4.8-6.0 ซึ่งจากการทดลองของ Okada (1985) พบว่าเซลลูเลสจาก *A. niger* เมื่อเก็บเอนไซม์ไว้ที่ pH ต่างๆ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีความเสถียรที่ 5.0-8.0 และอีกชุดเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีความเสถียรที่ 5.5-6.5 ส่วนการทดลองของ Takashima et al. (1996) พบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเซลลูเลส จาก *Humicola grisea* คือ 5.0-7.0 และมีความเสถียรในช่วง 5.0-9.4 เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4.0 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง และ β -glucosidase จาก *A. niger* CCRC-31494 มี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงาน ที่ pH 5.0 และเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4.0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะมีความเสถียรที่ pH 5.0-7.0 (Yan and Lin, 1997) และรายงานของ Lusterio et al. (1992) พบว่า endoglucanase จาก *Bacillus* sp. PKM-5430 ซึ่งเป็น alkaline resistant มี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานที่ 9.0-10.0 และมีความเสถียรในช่วงไม่เกิน 12.7 เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5 คือ 60 องศาเซลเซียส และจะลดลงเมื่ออุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ส่วนความเสถียรของเอนไซม์จากทั้ง 2 เชื้อ อยู่ในช่วงไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส และจะเริ่มลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น อาจเกิดจากที่อุณหภูมิที่สูงเกินไปทำให้เอนไซม์เสียสภาพไป ซึ่งเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์แต่ละชนิด จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมและมีความเสถียรแตกต่างกัน ดังการทดลองของ Okoshi et al. (1990) พบว่า CMCase จาก *Bacillus* KSM-522 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานแตกต่างกัน คือ เซลลูเลส E I เหมาะสมที่ 60 องศาเซลเซียส ส่วนเอนไซม์ E II, E III เหมาะสมที่ 50 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 30 นาที เซลลูเลส E II, E III มีความเสถียรในช่วงไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส แต่ E I จะไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส ส่วน β -glucosidase จาก *Bacillus* PKM-5430 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน

คือ 55 องศาเซลเซียส (Lusterio *et al.*, 1992) สำหรับจุลินทรีย์พวก thermophilic จะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานสูงดังรายงานของ Mori (1992) พบว่า CMCase จาก *Clostridium thermocellum* ซึ่งเป็น thermophilic มีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 60 องศาเซลเซียส และ Ahsan *et al.* (1997) พบว่าเอนไซม์ที่ได้จาก *Clostridium thermocellum* มีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 70 องศาเซลเซียส มีความเสถียรอยู่ในช่วงไม่เกิน 80 องศาเซลเซียส

การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ พบว่าในช่วงเวลาเริ่มต้นของปฏิกิริยาเมื่อป้อนเอนไซม์กับซับสเตรทจะเกิดได้สูง แล้วจะลดลงและเริ่มคงที่เมื่อเวลาผ่านไป สำหรับเอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 มีปฏิกิริยาสูงสุดที่เวลา 5 นาที และปฏิกิริยาคงที่เมื่อเวลา 60 นาที ส่วนเอนไซม์จาก *Bacillus coagulans* T1-5 มีปฏิกิริยาสูงสุดที่เวลา 15 นาที และปฏิกิริยาคงที่เมื่อเวลา 60 นาที ซึ่งในช่วงเริ่มต้นของปฏิกิริยาจะมีความเข้มข้นของซับสเตรทสูงจึงทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้เร็วด้วย

เมื่อศึกษาความจำเพาะต่อซับสเตรท พบว่าเอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 สามารถทำปฏิกิริยากับ CMC, LBG, xylose และ arabic gum แต่เอนไซม์จาก *Bacillus coagulans* T1-5 ไม่ทำปฏิกิริยากับ arabic gum แสดงว่าเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีเอนไซม์ชนิดอื่นรวมอยู่ด้วย เนื่องจากใช้ crude เอนไซม์ในการทดลอง จึงทำให้เอนไซม์สามารถทำปฏิกิริยากับซับสเตรทชนิดอื่นด้วย

จากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ ทั้ง 2 ชนิด ด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) มีกลูโคสและ cellobiose เป็นน้ำตาลมาตรฐาน พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีทั้งกลูโคสและ cellobiose ซึ่งในการย่อยสลายเซลลูโลสของเซลลูเลสสุดท้ายจะได้น้ำตาลกลูโคส ดังการทดลองของ Idogaki and Kitamoto (1992) เมื่อนำเอนไซม์ทำปฏิกิริยากับซับสเตรท (cellohexose) จะได้ผลิตภัณฑ์ คือ cellobiose กลูโคสและ cellotriose