

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

จากการนำเชื้อแบคทีเรียที่แยกจากตัวอย่างดินซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจำนวน 2 ไอโซเลท คือ CMU4-4 และ T1-5 ทำการตรวจสอบพื้นฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรม พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท คีลีสแกรมบวก รูปร่างแท่ง และสร้างสปอร์ นำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าไอโซเลท CMU4-4 คือ *Bacillus subtilis* และไอโซเลท T1-5 คือ *Bacillus coagulans* เมื่อทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลลูเลส พบว่า *Bacillus subtilis* CMU4-4 เจริญได้ดีใน tryptone yeast extract broth ซึ่งเป็นอาหารตั้งต้น โดยค่า optical density (OD) เท่ากับ 0.297 และเมื่อเลี้ยงใน cellulose broth เพื่อทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH ของอาหารเท่ากับ 5.5 มี 0.2% CMC เป็นแหล่งคาร์บอน 0.2% tryptone เป็นแหล่งไนโตรเจน และ 0.1% KH_2PO_4 เพาะเลี้ยง 18 ชั่วโมง วัด enzyme activity ได้ 0.281 unit/ml และ specific activity 1.778 unit/mg protein ส่วน *Bacillus coagulans* T1-5 เจริญได้ดีใน tryptone yeast extract broth เช่นกัน มีค่า OD เท่ากับ 0.313 สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงใน cellulose broth บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้นของอาหาร เท่ากับ 5.5 มี 0.2% cellulose acetate เป็นแหล่งคาร์บอน 0.2% peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน และ 0.4% KH_2PO_4 เพาะเลี้ยง 18 ชั่วโมง มี enzyme activity เท่ากับ 0.168 U/ml และ specific activity เท่ากับ 1.108 U/mg protein

การศึกษาคุณสมบัติบางประการของเซลลูเลส โดยนำ crude เอนไซม์มาทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานและความเสถียรของเอนไซม์ พบว่า *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5 มี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ pH 5.0 และเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 มีความเสถียร ในช่วง pH 4.0-8.0 เมื่อบ่มที่ pH ต่างๆ เป็นเวลา 15 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วนเอนไซม์จาก *Bacillus coagulans* T1-5 มีความเสถียรในช่วง pH 4.8-6.0 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5 มีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 60 องศาเซลเซียส และเมื่อนำเอนไซม์บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 10 นาที พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรต่ออุณหภูมิช่วงไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส และพบว่าเอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงสุด เมื่อบ่มที่เวลา 5 นาที และเมื่อเวลาที่ 60 นาที ปฏิกิริยาจะเริ่มคงที่ ส่วน *Bacillus coagulans* T1-5 มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงสุด เมื่อบ่มที่เวลา 15 นาที และเมื่อเวลาที่ 60 นาที ปฏิกิริยาจะเริ่มคงที่ และเมื่อทดสอบความจำเพาะต่อซับสเตรท พบว่าเอนไซม์ที่ได้จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 จะทำปฏิกิริยา

กับ CMC, LBG, xylose และ arabic gum แต่ *Bacillus coagulans* T1-5 จะไม่ทำปฏิกิริยากับ Arabic gum

เซลล์ที่ผลิตจาก *Bacillus subtilis* CMU4-4 และ *Bacillus coagulans* T1-5 เมื่อทำปฏิกิริยากับ CMC แล้วตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ ด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ไอโซเลท มีกลูโคส และ cellobiose เป็นองค์ประกอบ