

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

1. Cellulose broth (Barron *et al.*, 1995)

Yeast extract	6.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
KH ₂ PO ₄	4.0	กรัม
MgSO ₄	2.0	กรัม
Cellulose	2.0	กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Czapek 's medium

Saccharose	30	กรัม
Sodium nitrate	2.3	กรัม
K ₂ HPO ₄	1.0	กรัม
KCl	0.5	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Fermentation carbohydrate medium

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
น้ำตาล	10	กรัม
Bromthymol blue 1.6%	4.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

pH 6.8-7.0

ใส่หลอดคัγκ้าลงในหลอดทดลอง อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วจึงเตรียมอาหารใส่ในหลอดทดลองประมาณ 6 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ อุณหภูมิ องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4. Glucose soybean medium (GSM)

Glucose	15	กรัม
Soybean	5.0	กรัม
Sodium chloride	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Gelatin

Gelatin	120	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ต้มน้ำแล้วแบ่งใส่หลอด 5 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 นาที

6. Motility

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	10	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	4.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร เติม triphenyltetrazolium chloride นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. Nitrate broth

Potassium nitrate	0.2	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	1.7	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. Nutrient agar

Nutrient broth	1,000	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม

ละลายในน้ำกลั่นโดยใช้ความร้อน นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

9. Nutrient broth

Peptone	5.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10. Tryptone broth

Tryptone	10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

11. Tryptone yeast extract broth

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

12. Voges-Proskauer medium

Proteose peptone	7.0	กรัม
Glucose	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้เป็น 6.5 แบ่งใส่หลอดละ 5 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ภาคผนวก ข
การเตรียมบัฟเฟอร์ สารเคมี และสีย้อม

1. Citrate buffer

Stock solution

A :0.1 M ของสารละลาย citric acid (21.01 กรัมในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร)

B :0.1 M ของสารละลาย trisodium citrate (29.41 กรัมของ $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$) ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

Working solution

x ml of A + y ml of B ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

x	y	pH
46.5	3.2	3.0
43.5	6.3	3.2
40.0	10.0	3.4
37.0	13.0	3.6
35.0	15.0	3.8
33.0	17.0	4.0
31.5	18.5	4.2
28.0	22.0	4.4
25.5	24.5	4.6
23.0	27.0	4.8
20.5	29.5	5.0
18.0	32.0	5.2
16.0	34.0	5.4
13.7	36.3	5.6
11.8	38.2	5.8
9.5	41.5	6.0
7.2	42.8	6.2

2. Alpha-naphthylamine solution

ละลาย alpha-naphthylamine 0.5 กรัม ในกรด 5 N acetic acid 100 มิลลิลิตร (5 N acetic acid ใช้ glacial acetic acid 294 มิลลิลิตร ผสมในน้ำกลั่น 706 มิลลิลิตร)

3. 1% Carboxymethyl cellulose (CMC)

Carboxymethyl cellulose	1.0	กรัม
-------------------------	-----	------

0.05 M citrate buffer pH 4.8	100	มิลลิลิตร
------------------------------	-----	-----------

ซึ่ง CMC 1.0 กรัม เติม 0.05 M citrate buffer pH 4.8 คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

4. Crystal violet

Crystal violet	0.5	กรัม
----------------	-----	------

น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

5. Decolourizer

95% Ethanol	250	มิลลิลิตร
-------------	-----	-----------

Acetone	250	มิลลิลิตร
---------	-----	-----------

6. 3, 5-Dinitrosalicylic acid (DNS) reagent

3, 5-Dinitrosalicylic acid	1.0	กรัม
----------------------------	-----	------

2 N Sodium hydroxide	20	มิลลิลิตร
----------------------	----	-----------

Sodium potassium tartrate	30	กรัม
---------------------------	----	------

น้ำกลั่น ปรับปริมาตรครบ	100	มิลลิลิตร
-------------------------	-----	-----------

ซึ่ง 3,5-dinitrosalicylic acid 1.0 กรัม ละลายในสารละลาย sodium hydroxide เข้มข้น 2.0 นอร์มอล (ซึ่ง sodium hydroxide 8.0 กรัมละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร คนให้ละลายจากนั้นเติม sodium potassium tartrate 30 กรัม คนต่อจนละลายหมด ปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

7. Gram iodine solution

Iodine	1.0	กรัม
--------	-----	------

Potassium iodine	2.0	กรัม
------------------	-----	------

น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร
----------	-----	-----------

8. Kovac's reagent

Para-dimethylaminobenzaldehyde	5.0	กรัม
Butyl alcohol	75	มิลลิลิตร
Hydrochloric acid concentrated	20	มิลลิลิตร

ละลาย para-dimethylaminobenzaldehyde จนหมดใน butyl alcohol เติมกรด hydrochloric ซ้ำๆ จนตลอดเวลาจะได้น้ำยาสีเหลืองอ่อน

9. 0.1% Safranin O

ละลาย safranin O 1.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

10. สารสำหรับหาปริมาณโปรตีน

ก. สารละลาย A: สารละลาย sodium hydroxide เข้มข้น 0.1 M ที่มี sodium carbonate เข้มข้น 0.2%

ชั่ง sodium hydroxide 1.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ให้ได้ 250 มิลลิลิตร

ชั่ง sodium carbonate 2.0 กรัม ละลายใน sodium hydroxide เข้มข้น 0.1 M ปรับปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตรด้วย sodium hydroxide

ข. สารละลาย B: สารละลาย sodium potassium tartrate เข้มข้น 1.0% ที่มี copper sulfate เข้มข้น 0.5%

ชั่ง sodium potassium tartrate 1.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 80.0 มิลลิลิตร เติม copper sulfate 0.5 กรัม คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

ค. สารละลาย C

สารละลาย A ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และสารละลาย B ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร

ง. สารละลาย D (Folin-Ciocalteu reagent)

สารละลาย Folin-Ciocalteu เจือจางด้วยน้ำกลั่น อัตราส่วน 1:1 เก็บในขวดสีชา ปิดด้วยฟอยล์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก ค
การทำกราฟมาตรฐาน

1. การทำกราฟมาตรฐานกลูโคส

1.1 เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 2.0 มิลลิโมลาร์ ชั่งกลูโคส 0.036 กรัม ละลายใน น้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

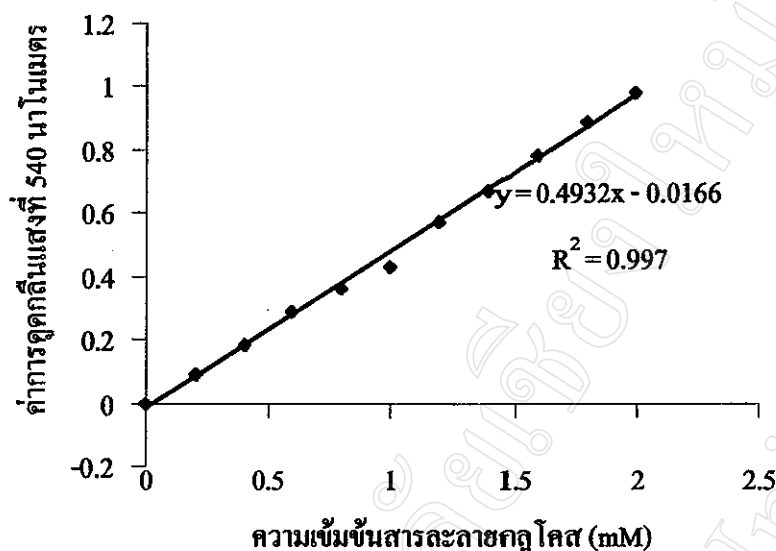
1.2 บีบอัดสารละลายกลูโคส 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2-2.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติม DNS reagent ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเติมน้ำกลั่น แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นลงทันทีโดยแช่ในน้ำเย็น

1.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ตามตาราง 1 และนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐาน ตามรูป 1

ตาราง 1 การเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส

สารที่ใช้ (มล)	หลอดที่							
	Blank	1	2	3	4	5	6	7
สารละลายกลูโคส 2mM	-	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4
น้ำกลั่น	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8	0.6
DNS reagent	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

เขย่าให้เข้ากันแล้วต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในน้ำเย็น
แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร



รูป 1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

2. วิธีการวัดการทำงานของเอนไซม์ (จารุพรรณ และ จิตติมา, 2542)

2.1 คูลสารละลาย 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่มี 1% CMC ใน 0.05 M citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2.2 เติมสารละลาย DNS 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิห้อง

2.3 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดย Blank คือ 0.05 M citrate buffer pH 4.8 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นอ่านได้จากกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน หลังจากหักค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ของหลอดเปรียบเทียบออกแล้ว

หลอดเปรียบเทียบ

หลอดที่ 1 ประกอบด้วย 1% CMC ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ 0.05 M citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

หลอดที่ 2 ประกอบด้วยสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร และ 0.05 M citrate buffer pH 4.8 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

กำหนด 1 unit เซลลูเลส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์น้ำตาลรีดิวซ์ 1 ไมโครโมล ต่อ 1 นาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 4.8

3. การทำกราฟมาตรฐาน BSA (bovine serum albumin)

3.1 ชั่ง BSA 0.0625 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรครบ 250 มิลลิลิตร

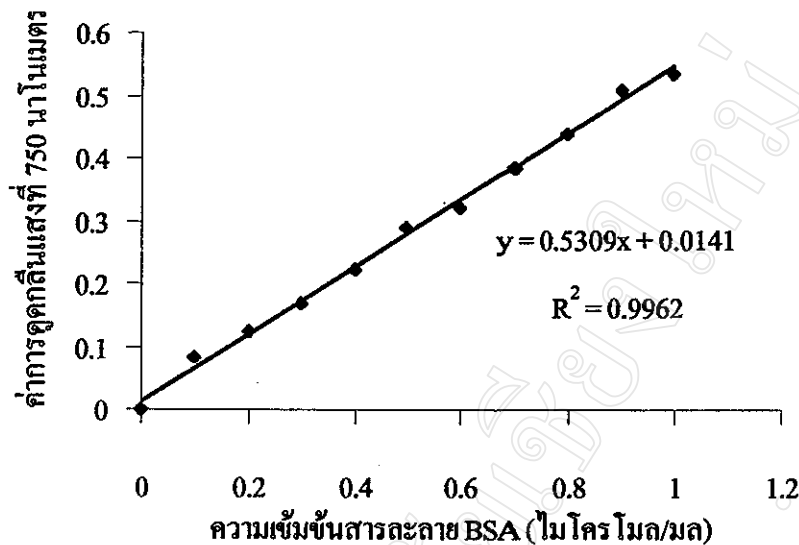
3.2 ปิเปตสารละลาย BSA ปริมาตร 0.1-1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร

3.3 เติมน้ำกลั่น C ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติมน้ำกลั่น D ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าแล้ววางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

3.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ตามตาราง 2 และนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐาน ตามรูป 1

ตาราง 2 การเตรียมกราฟมาตรฐาน BSA

	หลอดที่				
	Blank	1	2	...	10
สารละลาย BSA	-	0.1	0.2	...	1.0
น้ำกลั่น	1.0	0.9	0.8	...	-
สารละลาย C	5.0	5.0	5.0	...	5.0
ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที					
สารละลาย D	0.5	0.5	0.5	...	0.5
เขย่าและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร					



รูป 2 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร

4. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry

4.1 นำสารละลายเอนไซม์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 0.9 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมสารละลาย C ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติมสารละลาย D ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

4.2 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร เทียบกับ Blank คือ น้ำกลั่น นำค่าที่อ่านได้ เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลาย BSA

ภาคผนวก ง

ตารางแสดงผลการทดลอง

ตาราง 3 ผลของอาหารตั้งคั้งต่อการเจริญของแบคทีเรีย

อาหาร	อัตราการเจริญ (OD)	
	CMU4-4	T1-5
Tryptone yeast extract broth	0.297a	0.313a
Nutrient broth	0.234b	0.189bd
Czapek's medium	0.026c	0.026cd
Glucose soybean medium	0.147d	0.140bcd
CV (%)	16.258	36.947

ตาราง 4 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเซลล์

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	enzyme activity (U/ml)		specific activity (U/mg protein)	
	CMU4-4	T1-5	CMU4-4	T1-5
+/-28	0.106 a	0.082 a	1.330 a	0.235 a
37	0.173 b	0.112 b	1.335 a	0.450 b
45	0.224 c	0.099 ab	1.422 b	0.277 c
50	0.171 b	0.083 a	1.358 a	0.210 d
55	0.023 d	0.022 c	0.533 c	0.133 e
C.V.	4.098	12.017	1.818	4.307

หมายเหตุ อักษรตามหลังค่าเฉลี่ยที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

C.V. คือสัมประสิทธิ์ความแปรผัน

ทดสอบที่ความเชื่อมั่น 95%

ตาราง 5 ANOVA ผลของอุณหภูมิต่อ enzyme activity ของเอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* CMU4-4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7.202E-02	4	1.800E-02	551.151	.000
Within Groups	3.267E-04	10	3.267E-05		
Total	7.234E-02	14			

ตาราง 6 ANOVA ผลของอุณหภูมิต่อ enzyme activity ของเอนไซม์จาก *Bacillus coagulans* T1-5

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.408E-02	4	3.519E-03	38.367	.000
Within Groups	9.173E-04	10	9.173E-05		
Total	1.500E-02	14			

ตาราง 7 ANOVA ผลของอุณหภูมิต่อ specific activity ของเอนไซม์จาก *B. subtilis* CMU4-4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.663	4	0.416	879.094	.000
Within Groups	4.728E-03	10	4.728E-04		
Total	1.667	14			

ตาราง 8 ANOVA ผลของอุณหภูมิต่อ specific activity ของเอนไซม์จาก *B. coagulans* T1-5

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.167	4	4.164E-02	328.401	.000
Within Groups	1.268E-03	10	1.268E-04		
Total	0.168	14			

ตาราง 9 ผลของ pH ต่อการผลิตเซลล์

PH	enzyme activity (U/ml)		specific activity (U/mg protein)	
	CMU4-4	T1-5	CMU4-4	T1-5
3	0.000 a	0.000 a	0.000 a	0.000 a
4	0.118 b	0.048 a	0.903 b	0.363 b
4.5	0.211 c	0.083 b	1.312 c	0.422 c
5	0.223 d	0.114 c	1.457 d	0.477 d
5.5	0.234 e	0.127 d	1.498 d	0.468 d
6	0.192 f	0.060 c	1.226 c	0.238 e
6.5	0.124 g	0.049 a c	1.029 e	0.215 f
7	0.095 h	0.017 f	0.889 b	0.199 f
8	0.086 i	0.000 g	0.754 f	0.000 g
9	0.026 j	0.000 g	0.198g	0.000 g
C.V.	3.868	12.187	7.465	4.431

ตาราง 10 ANOVA ผลของ pH ต่อ enzyme activity ของเอนไซม์จาก *B. subtilis* CMU4-4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.189	9	2.098E-02	743.181	.000
Within Groups	5.647E-04	20	2.823E-05		
Total	0.189	29			

ตาราง 11 ANOVA ผลของ pH ต่อ enzyme activity ของเอนไซม์จาก *B. coagulans* T1-5

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.168E-02	9	5.742E-03	131.606	.000
Within Groups	8.727E-04	20	4.363E-05		
Total	5.255E-02	29			

ตาราง 12 ANOVA ผลของ pH ต่อ specific activity ของเอนไซม์จาก *B. subtilis* CMU4-4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.875	9	0.764	159.887	.000
Within Groups	9.555E-02	20	4.778E-03		
Total	6.971	29			

ตาราง 13 ANOVA ผลของ pH ต่อ specific activity ของเอนไซม์จาก *B. coagulans* T1-5

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.951	9	0.106	922.060	.000
Within Groups	2.293E-03	20	1.146E-04		
Total	0.954	29			

ตาราง 14 ผลของชนิดแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเซลลูเลส

ชนิดของแหล่ง คาร์บอน	enzyme activity (U/ml)		specific activity (U/mg protein)	
	CMU4-4	T1-5	CMU4-4	T1-5
CMC	0.258 a	0.016 a	1.524 a	0.158 a
Cellulose acetate	0.156 b	0.161 b	1.212 b	0.545 b
Cellulose	0.237 d	0.123 d	1.441 a	0.445 d
Cellobiose	0.171 c	0.002 c	1.148 b	0.020 c
C.V.	1.013	6.967	7.323	3.717

ตาราง 15 ANOVA ผลของแหล่งคาร์บอนต่อ enzyme activity ของเอนไซม์จาก *B. subtilis* CMU4-4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.224E-02	3	7.412E-03	1710.481	.000
Within Groups	3.467E-05	8	4.333E-06		
Total	2.227E-02	11			

ตาราง 16 ANOVA ผลของแหล่งคาร์บอนต่อ enzyme activity ของเอนไซม์จาก *B. coagulans* T1-5

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.545E-02	3	1.848E-02	668.092	.000
Within Groups	2.213E-04	8	2.767E-05		
Total	5.567E-02	11			

ตาราง 17 ANOVA ผลของแหล่งคาร์บอนต่อ specific activity ของเอนไซม์จาก *B. subtilis* CMU4-4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.290	3	9.683E-02	10.179	.004
Within Groups	7.611E-02	8	9.513E-03		
Total	0.367	11			

ตาราง 18 ANOVA ผลของแหล่งคาร์บอนต่อ specific activity ของเอนไซม์จาก *B. coagulans* T1-5

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.537	3	0.179	143.954	.000
Within Groups	9.954E-03	8	1.244E-03		
Total	.547	11			

ตาราง 19 ผลความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเซลล์

ความเข้มข้นของ แหล่งคาร์บอน(%)	enzyme activity (U/ml)		specific activity (U/mg protein)	
	CMU4-4	T1-5	CMU4-4	T1-5
0.05	0.182a	0.022a	1.212a	0.121a
0.1	0.208b	0.101b	1.437b	0.404b
0.2	0.255c	0.16c	1.533c	0.543c
0.3	0.251c	0.163c	1.558c	0.601d
0.4	0.256c	0.166c	1.578c	0.709e
0.5	0.254c	0.165c	1.595c	0.734e
C.V.	1.579	5.495	3.331	3.717

ตาราง 20 ANOVA ผลความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อ enzyme activity ของเอนไซม์จาก
B.subtilis CMU4-4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.927	5	0.385	0.873	0.527
Within Groups	5.294	12	0.441		
Total	7.221	17			

ตาราง 21 ANOVA ผลความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อ enzyme activity ของเอนไซม์จาก
B. coagulans T1-5

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.088E-02	5	1.018E-02	200.628	.000
Within Groups	6.087E-04	12	5.072E-05		
Total	0.149E-02	17			

ตาราง 22 ANOVA ผลความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อ specific activity ของเอนไซม์จาก
B.subtilis CMU4-4

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
COCSPM	Between Groups	316	5	6.318E-02	25.749	.000
	Within Groups	2.945E-02	12	2.454E-03		
	Total	.345	17			

ตาราง 23 ANOVA ผลความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนต่อ specific activity ของเอนไซม์จาก
B. coagulans T1-5

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.783	5	0.157	420.676	.000
Within Groups	4.468E-03	12	3.723E-04		
Total	0.788	17			

ตาราง 24 ผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ชนิดของแหล่ง ไนโตรเจน(%)	enzyme activity (U/ml)		specific activity (U/mg protein)	
	CMU4-4	T1-5	CMU4-4	T1-5
Tryptone	0.269 a	0.148 a	1.742 a	0.586 a
Peptone	0.255 a	0.163 b	1.587 b	0.800 b
Soytone	0.209 c	0.146 a	1.625 c	0.611 c
Ammonium nitrate	0.082 b	0.043 c	0.669 d	0.322 d
Ammonium sulphate	0.211 c	0.066 d	0.954 c	0.494 e
C.V.	4.352	6.82	2.451	2.758

ตาราง 25 ANOVA ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อ enzyme activity ของเอนไซม์จาก *B. subtilis*

CMU4-4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.531E-02	4	1.633E-02	204.621	.000
Within Groups	7.980E-04	10	7.980E-05		
Total	6.611E-02	14			

ตาราง 26 ANOVA ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อ enzyme activity ของเอนไซม์จาก *B.coagulans* T1-5

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.597E-02	4	8.994E-03	151.237	.000
Within Groups	5.947E-04	10	5.947E-05		
Total	3.657E-02	14			

ตาราง 27 ANOVA ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อ specific activity ของเอนไซม์จาก *B.subtilis* CMU4-4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
NSPM Between Groups	2.702	4	0.675	649.521	.000
Within Groups	0.040E-02	10	1.040E-03		
Total	2.712	14			

ตาราง 28 ANOVA ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อ specific activity ของเอนไซม์จาก *B. coagulans* T1-5

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
NSPT	Between Groups	0.363	4	9.085E-02	381.207	.000
	Within Groups	2.383E-03	10	2.383E-04		
	Total	0.366	14			

ตาราง 29 ผลความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเซลลูเลส

ความเข้มข้นของ แหล่งไนโตรเจน(%)	enzyme activity (U/ml)		specific activity (U/mg protein)	
	CMU4-4	T1-5	CMU4-4	T1-5
0.1	0.275a	0.147a	1.518a	1.013a
0.2	0.275ab	0.166b	1.706b	1.159b
0.3	0.277a	0.145a	1.774c	0.769c
0.4	0.268ab	0.142a	1.746bc	0.743c
0.5	0.266b	0.138a	1.602d	0.609d
0.6	0.269ab	0.137a	1.565ad	0.502e
0.7	0.198c	0.137a	1.547ad	0.501e
C.V.	2.014	5.468	2.302	3.148

ตาราง 30 ANOVA ผลความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อ enzyme activity ของเอนไซม์จาก *B.subtilis* CMU4-4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.431E-02	6	2.385E-03	86.196	.000
Within Groups	3.873E-04	14	2.767E-05		
Total	1.470E-02	20			

ตาราง 31 ANOVA ผลความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อ enzyme activity ของเอนไซม์จาก
B. coagulans T1-5

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.895E-03	6	3.159E-04	5.060	.006
Within Groups	8.740E-04	14	6.243E-05		
Total	2.769E-03	20			

ตาราง 32 ANOVA ผลความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อ specific activity ของเอนไซม์จาก
B. subtilis CMU4-4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.193	6	3.222E-02	22.731	.000
Within Groups	1.984E-02	14	1.417E-03		
Total	0.213	20			

ตาราง 33 ANOVA ผลความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนต่อ specific activity ของเอนไซม์จาก
B. coagulans T1-5

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.138	6	0.190	334.003	.000
Within Groups	7.953E-03	14	5.681E-04		
Total	1.146	20			

ตาราง 34 ผลความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ต่อการผลิตเซลลูเลส

ความเข้มข้นของ KH_2PO_4 (%)	enzyme activity (U/ml)		specific activity (U/mg protein)	
	CMU4-4	T1-5	CMU4-4	T1-5
0.1	0.278a	0.148 ^{ns}	1.761a	0.727a
0.2	0.275ab	0.150 ^{ns}	1.742a	0.755a
0.3	0.275ab	0.152 ^{ns}	1.715a	0.992b
0.4	0.274abc	0.165 ^{ns}	1.646b	1.072c
0.5	0.263bcd	0.154 ^{ns}	1.610bc	0.911d
0.6	0.261bcd	0.154 ^{ns}	1.563c	0.906d
0.7	0.253cd	0.152 ^{ns}	1.369d	0.842e
C.V.	2.919	6.320	1.699	3.564

ตาราง 35 ANOVA ผลความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ต่อ enzyme activity ของเอนไซม์จาก *B.subtilis* CMU4-4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.610E-03	6	2.684E-04	4.386	0.011
Within Groups	8.567E-04	14	6.119E-05		
Total	2.467E-03	20			

ตาราง 36 ANOVA ผลความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ต่อ enzyme activity ของเอนไซม์จาก *B. coagulans* T1-5

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.485E-04	6	9.141E-05	0.971	0.480
Within Groups	1.319E-03	14	9.419E-05		
Total	1.867E-03	20			

ตาราง 37 ANOVA ผลความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ต่อ specific activity ของเอนไซม์จาก *B. subtilis*

CMU4-4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.330	6	5.494E-02	71.670	.000
Within Groups	1.073E-02	14	7.666E-04		
Total	0.340	20			

ตาราง 38 ANOVA ผลความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ต่อ specific activity ของเอนไซม์จาก *B. coagulans*

T1-5

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.285	6	4.753E-02	47.083	.000
Within Groups	1.413E-02	14	1.010E-03		
Total	0.299	20			

ตาราง 39 ผลของเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตเซลล์

เวลา (ชั่วโมง)	enzyme activity (U/ml)		specific activity (U/mg protein)	
	CMU4-4	T1-5	CMU4-4	T1-5
6	0.006 a	0.000 a	0.200 a	0.000 a
12	0.198 b	0.128 b	1.268 b	0.258 b
18	0.281 c	0.168 c	1.778 c	1.110 c
24	0.274 c	0.152 d	1.726 c	1.083 c
30	0.188 b	0.149 d	1.563 d	0.770 d
36	0.206 b	0.145 d	1.534 d	0.731 d
42	0.134 d	0.145 d	1.555 d	0.610 e
C.V.	5.807	1.953	4.178	4.995

ตาราง 40 ANOVA ผลของเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อ enzyme activity ของเอนไซม์จาก *B. subtilis*
CMU4-4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	0.157	6	2.621E-02	229.702	.000
Within Groups	1.597E-03	14	1.141E-04		
Total	0.159	20			

ตาราง 41 ANOVA ผลของเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อ enzyme activity ของเอนไซม์จาก *B. coagulans*
T1-5

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.878E-02	6	9.797E-03	248.779	.000
Within Groups	5.513E-04	14	3.938E-05		
Total	5.933E-02	20			

ตาราง 42 ANOVA ผลของเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อ specific activity ของเอนไซม์จาก *B. subtilis*
CMU4-4

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.744	6	0.957	293.337	.000
Within Groups	4.569E-02	14	3.263E-03		
Total	5.789	20			

ตาราง 43 ANOVA ผลของเวลาในการเพาะเลี้ยงต่อ specific activity ของเอนไซม์จาก *B. coagulans*
T1-5

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.991	6	0.499	471.449	.000
Within Groups	1.480E-02	14	1.057E-03		
Total	3.006	20			

ตาราง 44 ผลของ pH ต่อการทำงานของเซลล์

pH	enzyme activity (U/ml)	
	CMU4-4	T1-5
3	0	0.005
4	0.179	0.086
4.8	0.281	0.168
5	0.283	0.170
6	0.203	0.024
7	0.192	0.012
8	0.087	0.010

ตาราง 45 ผลของอุณหภูมิการทำงานของเซลล์

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	enzyme activity (U/ml)	
	CMU4-4	T1-5
+/-28	0.214	0.114
37	0.266	0.127
40	0.283	0.171
45	0.283	0.173
50	0.2285	0.173
55	0.286	0.173
60	0.288	0.176
70	0.215	0.093

ตาราง 46 ผลของเวลาต่อการทำงานของเซลล์

เวลา (นาที)	enzyme activity (U/ml)	
	CMU4-4	T1-5
5	0.951	0.262
10	0.593	0.343
20	0.321	0.224
30	0.282	0.173
40	0.195	0.113
50	0.162	0.088
60	0.129	0.087
70	0.117	0.087
80	0.108	0.056
90	0.055	0.035
100	0.08	0.035
120	0.08	0.026
150	0.055	0.025

ตาราง 47 ผลของความเสถียรต่อ pH ของเซลล์

pH	enzyme activity (U/ml)	
	CMU4-4	T1-5
3	0.116	0.094
4	0.282	0.132
4.8	0.284	0.173
5	0.283	0.173
6	0.284	0.173
7	0.284	0.143
8	0.282	0.068
9	0.134	0.049

ตาราง 48 ผลของความถี่ยีสต์ต่ออุณหภูมิของเซลล์

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	enzyme activity (U/ml)	
	CMU4-4	T1-5
50	0.285	0.173
60	0.285	0.173
70	0.123	0.087
80	0.094	0.016
90	0.056	0.002

ภาคผนวก จ
การทดสอบทางชีวเคมี

1. Acid form

วัตถุประสงค์

ตรวจสอบการหมักคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรีย ตรวจสอบผลจากการเกิดกรดหรือทั้งกรดและก๊าซในอาหาร

วิธีทดสอบ

1. เพาะเชื้อทดสอบลงในอาหาร fermentation carbohydrate medium
2. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ประมาณ 18-24 ชั่วโมง
3. ตรวจสอบการเปลี่ยนสีของอาหาร และการเกิดก๊าซในหลอดคักก๊าซ

ผลบวก : อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แต่ไม่เกิดก๊าซในหลอดคักก๊าซ แสดงว่า หมัก

คาร์โบไฮเดรตแล้ว ได้เฉพาะกรด

: อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและเกิดก๊าซในหลอดคักก๊าซ แสดงว่าหมักแล้ว

ได้กรดและก๊าซ

ผลลบ : อาหารไม่เปลี่ยนสี

2. Catalase test

วัตถุประสงค์

ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียในการสลาย H_2O_2 โดย catalase ถ้าสลายได้จะทำให้เกิดฟองก๊าซขึ้น ซึ่งเป็นก๊าซ O_2

วิธีทดสอบ

1. ปักเชื้อลงในอาหารวันเอียง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
2. เติม 1 มิลลิลิตร ของ 3% H_2O_2 เอียงให้ไหลไปมาบนผิวอาหาร

ผลบวก : เกิดฟองแก๊ส

ผลลบ : ไม่มีฟอง

3. Gelatin

วัตถุประสงค์

ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่ผลิต gelatinase ในการย่อยสลาย gelatin

วิธีทดสอบ

1. เพาะเชื้อทดสอบลงใน gelatin broth

2. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 48 ชั่วโมง

3. อ่านผลโดยนำไปแช่ในตัวย่น หรือในน้ำเย็นอย่างน้อย 5-10 นาที

ผลบวก : อาหารยังเหลวเหมือนเดิม

ผลลบ : อาหารแข็งตัว

4. Indole test

วัตถุประสงค์

เป็นการตรวจเอนไซม์ทริปโตฟานเนส แบคทีเรียที่มีเอนไซม์ชนิดนี้จะสลายกรดอะมิโนทริปโตฟานโดยวิธีการออกซิเดชัน เกิดเป็นสารอินโดล ตรวจสอบการเกิดอินโดลโดยใช้น้ำยาโคแว็กซ์

วิธีทดสอบ

1. ปักเชื้อลงในอาหารเหลวทริปโตน บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

2. หยคน้ำยาโคแว็กซ์ลงไปหลอดละ 1-2 หยด เขย่าหลอดเบาๆ

ผลบวก : สีแดงที่ผิวชั้นบน

ผลลบ : ไม่เกิดสี

5. Motility test

วัตถุประสงค์

ทดสอบความสามารถในการเคลื่อนที่ โดยเชื้อที่มี flagella จะสามารถเคลื่อนที่ออกจากบริเวณเดิมไปยังบริเวณใหม่ซึ่งจะเกิดการเจริญ และแบ่งตัวยังบริเวณนั้นต่อไป

วิธีทดสอบ

1. เพาะเชื้อลงใน motility test medium โดย stab ลงไปตรงๆ เพียงครั้งเดียว ประมาณ

2/3 ของส่วนสูงของอาหาร

2. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 18-24 ชั่วโมง

ผลบวก : เห็นการเจริญของเชื้อออกมากรวย stab

ผลลบ : เห็นการเจริญของเชื้ออย่างชัดเจนที่รอย stab

6. Nitrate reduction and denitrification

วัตถุประสงค์

แบคทีเรียที่มีเอนไซม์ nitrate reductase และ nitrite reductase สามารถใช้ในเครทเป็นโมเลกุลรับอิเล็กตรอนขั้นสุดท้ายของระบบเรสไปเรชันได้ โดยเอนไซม์จะเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ จนไปเป็นก๊าซแอมโมเนีย

วิธีทดสอบ

ปลุกเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเกิดในไตรท์โดยใช้น้ำยาอัลฟาเนฟทิลามีน และน้ำยากรดซัลฟานิลิค ซึ่งจะเกิดสีแดง แต่ถ้าในไตรท์ถูกย่อยสลายต่อไปเป็นแก๊สแอมโมเนีย และก๊าซไนโตรเจน จะไม่เกิดสีแดงต้องทำการทดสอบขั้นที่ 2 โดยเติมผงสังกะสี (zinc power) ลงไป ผงสังกะสีจะรีดิวส์ไนโตรท์ให้เป็นไนเตรท ดังนั้นถ้าเกิดสีแดงในหลอดอาหาร แสดงว่ามีไนเตรทเหลืออยู่ หมายความว่าเชื้อที่ทดสอบไม่สามารถรีดิวส์ไนเตรทได้ ผลการทดสอบเป็นลบ

หากใส่ผงสังกะสีแล้วเกิดไม่สีแดงแสดงว่าไม่มีไนเตรท นั่นคือไนโตรท์ถูกเชื้อทดสอบรีดิวส์ เปลี่ยนเป็นแก๊สไปหมด ผลการทดสอบเป็นบวก

7. Oxidation – Fermentation

วัตถุประสงค์

ทดสอบการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ในสภาพที่มีหรือไม่มีออกซิเจน

วิธีทดสอบ

1. เพาะเชื้อลงในอาหาร 2 หลอด หลอดหนึ่งคลุมด้วย mineral oil หรือพาราฟิน อีกหลอดไม่ต้องคลุม

2. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

ผลบวก : อาหารเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง

ผลลบ : อาหารไม่เปลี่ยนสี

8. Voges-Proskauer test (V-P test)

วัตถุประสงค์

ทดสอบความสามารถในการผลิตสาร acetone ซึ่งตรวจสอบโดยไปแคสเซียมไฮดรอกไซด์ และแคลทิสอัลฟาเนฟทอล เกิดเป็นสาร diacetyl ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับสารประเภทัวนิติน ซึ่งมีอยู่ใน peptone ในสภาพด่างเกิดสีแดงสด

วิธีทดสอบ

1. ปลุกเชื้อทดสอบลงในอาหาร

2. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

3. เติม creatine 0.5-1.0 มิลลิกรัม และ 40% NaOH ลงไป 5.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

ผลบวก : เกิดสีแดงส้ม

ผลลบ : สีเหลือง

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นฤมล นະธรรมโม
วัน เดือน ปี เกิด	17 มิถุนายน 2518
การศึกษา	สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนรัตนภูมิวิทยา จังหวัด สงขลา ปีการศึกษา 2536 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยี การประมง) มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่ ปีการศึกษา 2540
สถานที่ติดต่อ	150/1 หมู่ 1 ถนนอนามัย ตำบลกำแพงเพชร อำเภอรัตนภูมิ จังหวัด สงขลา 90180 โทร. 0-74388672