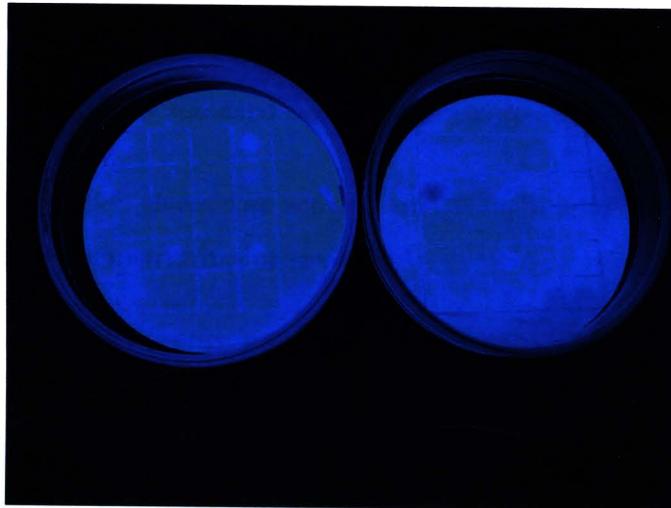


ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิต β -glucosidase สูงสุด

แบคทีเรียไอโซเลท B6 เป็นแบคทีเรียที่พบว่าสีกำปรากฏชัดเจนที่สุดบนกระดาษกรองที่ชุบสาร Esculin buffer solution แสดงว่าสร้าง β -glucosidase สูงสุดที่สุด โดย β -glucosidase หรือชื่ออื่นในที่นี่คือคือ esculinase ซึ่งจะไฮโดรไลซ์ esculin ปลดปล่อย esculetin และ glucose ซึ่ง esculetin จะทำปฏิกิริยากับ ferric iron ให้เป็นสีดำ จึงเลือกไอโซเลท B6 ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์ β -glucosidase

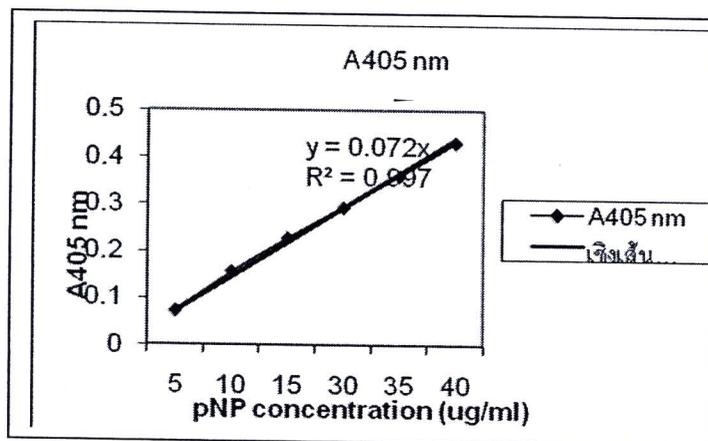


รูปที่ 4 การคัดเลือกไอโซเลทที่สร้างเอนไซม์ β -glucosidase สูงสุด

2. การศึกษาการผลิตเอนไซม์ β -glucosidase ใน cellobiose medium, glucose medium

2.1 Standard curve ของ p-nitrophenol

ซึ่งเป็นผลผลิตที่เกิดจากการที่ β -glucosidase ไฮโดรไลซ์ซับสเตรท PNPG (p-Nitrophenyl--D-glucopyranoside) โดยการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ p-nitrophenol และค่าดูดกลืนแสงที่ 405 nm มีค่า $y = 0.072x$ มีค่า $R^2 = 0.997$



รูปที่ 5 standard curve ของ p - nitrophenol

2.2 ค่า pH และ β - glucosidase activity ในการเจริญใน cellobiose medium และ glucose medium ที่ช่วงเวลากการบ่มเชื้อต่างๆ

พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท B6 เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีค่า pH ลดลงเมื่อเวลาบ่มนานขึ้น โดยค่า pH ใน cellulose medium ที่เวลาบ่ม 12 ชม. มีค่า 7.38 ลดลงในระหว่างเวลาบ่มในช่วง 48-96 ชม. มีค่า 6.42, 6.38, 3.99 ตามลำดับ ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ β - glucosidase จะเริ่มพบที่เวลาบ่ม 24 ชม. เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาบ่มนานขึ้น โดยมีค่าสูงสุดที่ 72 ชม.เท่ากับ 15761.57 μ unit และลดลงที่เวลา 96 ชม. มีค่า 9584.74 μ unit ส่วนค่า pH ใน glucose medium ที่เวลาบ่ม 12 ชม. มีค่า 6.03 ลดลงในระหว่างเวลาบ่มในช่วง 48-96 ชม. มีค่า 4.15, 4.03, 3.04 ตามลำดับ ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ β - glucosidase จะเริ่มพบที่เวลาบ่ม 24 ชม. เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาบ่มนานขึ้น โดยมีค่าสูงสุดที่ 72 ชม.เท่ากับ 9904.57 μ unit และลดลงที่เวลา 96 ชม. มีค่า 5431.35 μ unit

ข้อสรุปที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียไอโซเลท B6 ในการสร้างเอนไซม์ β - glucosidase ได้แก่ cellobiose ส่วนเวลาบ่มที่เหมาะสมสำหรับที่อุณหภูมิ 30°C ได้แก่เวลา 72 ชม. หากมีการบ่มเชื้อนานกว่านี้จะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง



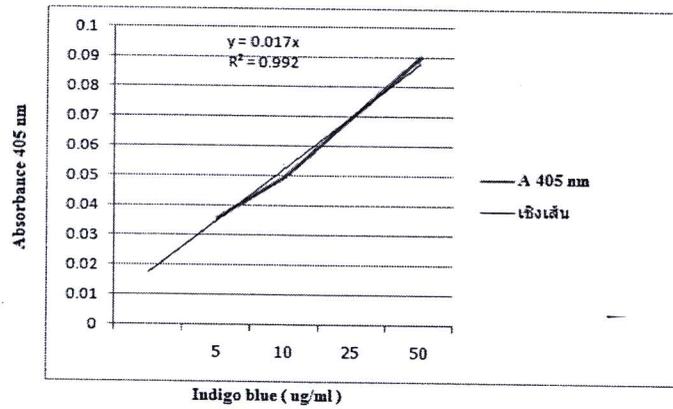
ตารางที่ 1 ค่า pH และ β – glucosidase activity ใน cellobiose medium และ glucose medium

เวลาบ่ม (ชม.)	Cellobiose medium		Glucose medium	
	pH	β – glucosidase activity (μ unit)	pH	β – glucosidase activity (μ unit)
12	7.38	0	6.03	0
24	7.38	2555.93	5.02	319.49
48	6.42	14483.61	4.15	9797.74
72	6.38	15761.57	4.03	9904.23
96	3.99	9584.74	3.04	5431.35

3. การศึกษาการผลิต indigo blue ใน indigo leave mince medium

3.1 Standard curve ของสาร indigo blue ซึ่งถูกรีดด้วย sodium dithionite saturated ใน 2N NaOH ไปเป็นสาร leuco indigo จากนั้นจึงนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm โดยการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ indigo blue และค่าดูดกลืนแสงที่ 405 nm มีค่า $y = 0.017x$ มีค่า $R^2 = 0.992$





รูปที่ 3 Standard curve ของ Indigo blue

3.2 การเจริญของแบคทีเรียไอโซเลท B6 ใน minced indigo leave medium

พบปริมาณ indigo blue สูงสุดที่เวลาหมัก 72 ชม. มีค่า 510.40 $\mu\text{g/ml}$ โดยเริ่มตรวจพบ indigo blue ที่เวลาบ่ม 24 ชม. มีค่า 402.31 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนค่า pH เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงเวลาหมัก 12-96 ชม. มีค่าในช่วง 6.98-7.55

ตารางที่ 2 ค่า pH และ ปริมาณ indigo blue ใน
indigo leave minced medium

เวลาบ่ม (ชม.)	Indigo leave minced medium	
	pH	Indigo ($\mu\text{g/ml}$)
12	6.98	0.00
24	7.18	402.31
48	7.15	423.48
72	7.28	510.40
96	7.55	500.02



3. ศึกษาการรีดิว indigo blue ให้เป็น leuco indigo โดยใช้โดย indigo blue reducing bacteria

แบคทีเรียไอโซเลท D6 สามารถเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium A ซึ่งมี indigo carmine เป็นองค์ประกอบภายในเวลา 24 ชั่วโมง โดยอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็น ไม่มีสี ค่า pH 5.78 ส่วน Redox potential มีค่า -213.2 mv และสามารถเปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อ Medium B ซึ่งมีตะกอนครามเป็นองค์ประกอบภายในเวลา 24 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเหลืองจางๆ มีค่า pH 11.15 ส่วน Redox potential มีค่า -633 mv เมื่อเวลาบ่มนานขึ้นจะทำให้ pH ลดลง แต่สีของอาหารเลี้ยงเชื้อยังไม่มีสีหรือเป็นสีเหลืองจางๆ

ตารางที่ 3 ค่า pH ค่า Redox potential และสีของอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการเจริญของเชื้อ D6 ใน Medium A และ Medium B

เวลา (ชม.)	Medium A			Medium B		
	pH	Redox potential (mv)	สี	pH	Redox potential (mv)	สี
12	5.78	-213.2	ฟ้าจางๆ	11.15	-633	เหลืองจางๆ
24	4.82	+184	ไม่มีสี	9.86	-414.2	เหลืองจางๆ
72	4.80	+184	ไม่มีสี	9.66	-152	เหลืองจางๆ

4. ศึกษาวิธีการเก็บรักษาเนื้อคราม (indigo blue) ในสภาพที่เหมาะสมต่อการเก็บและการใช้งาน

เก็บ indigo blue ไว้ในรูปตะกอนครามที่มีความชื้น 60-70% แล้วนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 10°C เป็นวิธีที่เหมาะสมและสะดวกในการใช้งาน โดยสามารถนำไปผสมใน Medium B แล้วใช้เชื้อ D6 เจริญพบว่าตะกอนครามแขวนลอยทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสีน้ำเงิน และเชื้อ D6 จะรีดิวสีตะกอนครามจากสีน้ำเงินไปเป็นสีเหลืองจางๆภายใน 12 ชม. เมื่อเปรียบเทียบกับตะกอนครามที่เก็บไว้ในสภาพแห้งเมื่อนำไปละลายใน Medium B พบว่าตะกอนครามมีขนาดใหญ่แตกต่างกันและตกตะกอนอยู่ด้านล่าง ทำให้ใช้เชื้อ D6 ไม่สามารถรีดิวได้

5. ศึกษาวิธีการเก็บรักษา leuco indigo ในสภาพที่เหมาะสมต่อการเก็บและการใช้งาน
เก็บ leucoindigo ไว้ในสภาพของเหลว โดยบรรจุให้เต็มขวดไม่ให้มีช่องว่างเหนือของเหลว
แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 10°C เป็นวิธีที่เหมาะสมและสะดวกในการใช้งาน โดยพบว่า
leucoindigo ยังคงมีสีเหลืองจางๆ ไม่ถูกออกซิไดซ์ไปเป็นเงินของ indigo blue ซึ่งมีสีน้ำเงิน

