

บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. การแยกแบคทีเรียที่ร้อนจากถั่วเน่า

จากการเก็บตัวอย่างถั่วเน่าจากแหล่งผลิตต่างๆ ในภาคเหนือตอนบน สามารถแยกแบคทีเรียที่ร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ได้ทั้งหมด 108 ไอโซเลท เมื่อนำโคโลนีที่เลี้ยงบน nutrient agar มาตรวจสอบ โดยการย้อมสีกรัม แล้วตรวจดูลักษณะรูปร่างของเซลล์และการติดสีกรัม ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ได้ผลดังตาราง 5

ตาราง 5 ลักษณะของเซลล์และการติดสีกรัมของแบคทีเรียที่แยกได้จากถั่วเน่า 108 ไอโซเลท

ลักษณะของเซลล์แบคทีเรียและการติดสีกรัม	จำนวนไอโซเลท
กรัมลบ รูปกลม	-
กรัมลบ รูปแท่ง	1
กรัมบวก รูปกลม	6
กรัมบวก รูปแท่ง มีสปอร์	64
กรัมบวก รูปแท่ง ไม่มีสปอร์	37

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่ร้อนที่มีประสิทธิภาพในการผลิต PGA

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 108 ไอโซเลท ใน PGA producing medium ที่มี กลูโคส 2% และแอมโมเนียมซัลเฟต 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อัตราการให้อากาศเท่ากับ 170 รอบต่อนาที พบว่ามีแบคทีเรีย 96 ไอโซเลท สามารถผลิต PGA ได้ สามารถแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียตามความสามารถในการผลิต PGA ได้ดังนี้

2.1	มากกว่า 7 mg/ml	4	ไอโซเลท
2.2	ระหว่าง 6-7 mg/ml	6	ไอโซเลท
2.3	ระหว่าง 5-6 mg/ml	10	ไอโซเลท
2.4	ระหว่าง 4-5 mg/ml	22	ไอโซเลท
2.5	ระหว่าง 3-4 mg/ml	17	ไอโซเลท
2.6	น้อยกว่า 3 mg/ml	37	ไอโซเลท

เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิต PGA ของแบคทีเรียครบทุกไอโซเลทแล้ว ได้คัดเลือกแบคทีเรียทั้งสิ้น 12 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการผลิต PGA สูงสุด มาทำการทดสอบการผลิตอีกครั้ง เพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่สามารถผลิต PGA ได้สูงสุด ได้ผลดังตาราง 6 ตาราง 6 แบคทีเรีย 12 ไอโซเลทที่สามารถผลิต PGA ได้สูงสุด

ไอโซเลท	ปริมาณการผลิต PGA ในครั้งแรก (mg/ml)	ปริมาณการผลิต PGA จาก stock culture (mg/ml)	แหล่งเก็บตัวอย่าง
RS-2	6.50	6.25	ถั่วเน่าที่ทำในห้อง ปฏิบัติการ
RS-7	6.87	5.00	“
RS-21	7.25	3.00	“
RS-30	6.50	2.25	“
MT-40	7.75	2.75	อ. แม่แตง
MT-46	7.25	3.87	“
TP-42	7.00	2.75	ตลาดต้นพยอม
TP-72	6.00	1.50	“
MH-66	6.25	2.75	จ. แม่ฮ่องสอน
MH-67	5.87	3.12	“
VH-92	6.00	2.87	อ. เวียงแหง
VH-97	5.87	1.12	“

ไอโซเลท RS-2 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากถั่วเน่าที่ผลิตขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ มีความสามารถในการผลิต PGA ได้สูงสุดเท่ากับ 6.25 mg/ml เมื่อเก็บเป็น stock culture ใน NA slant ที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นจึงคัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลท RS-2 มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PGA ต่อไป

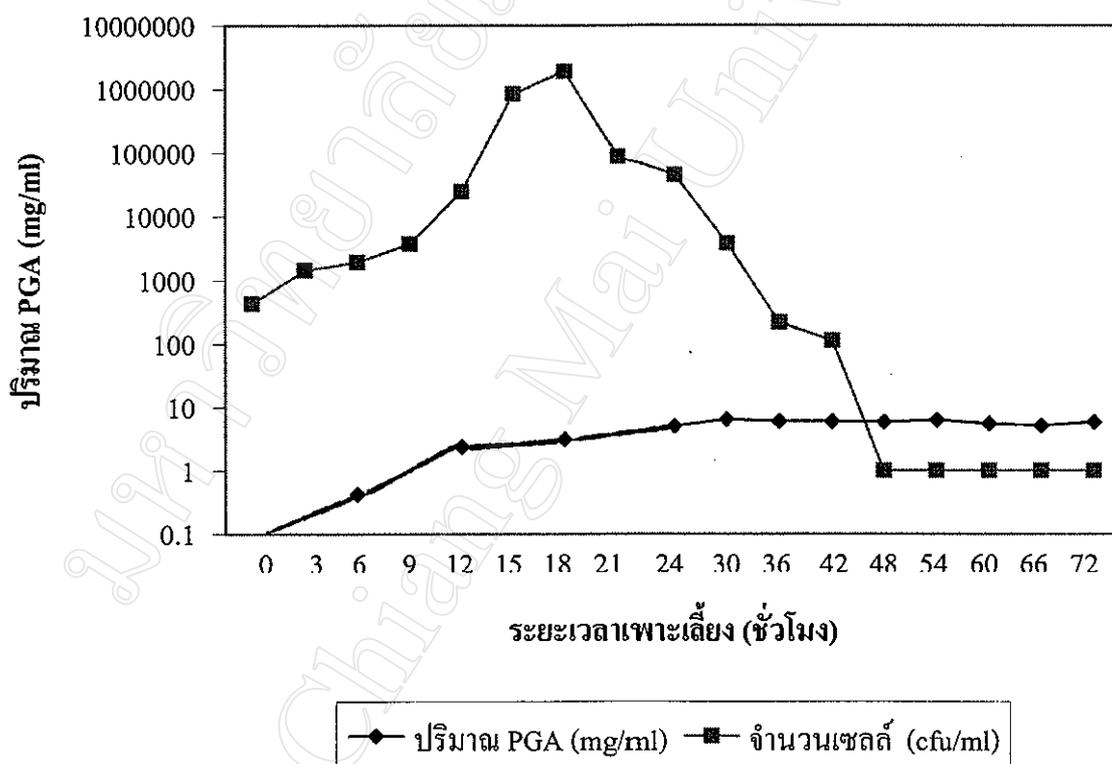
3. การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

จากการทดลองเมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลท RS-2 ไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆคือ 20, อุณหภูมิห้อง, 37, 45 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถเจริญได้ทุกอุณหภูมิกเว้นที่ 60 องศาเซลเซียส

4. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต PGA ของแบคทีเรียไอโซเลท RS-2

4.1 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท RS-2 ต่อการผลิต PGA

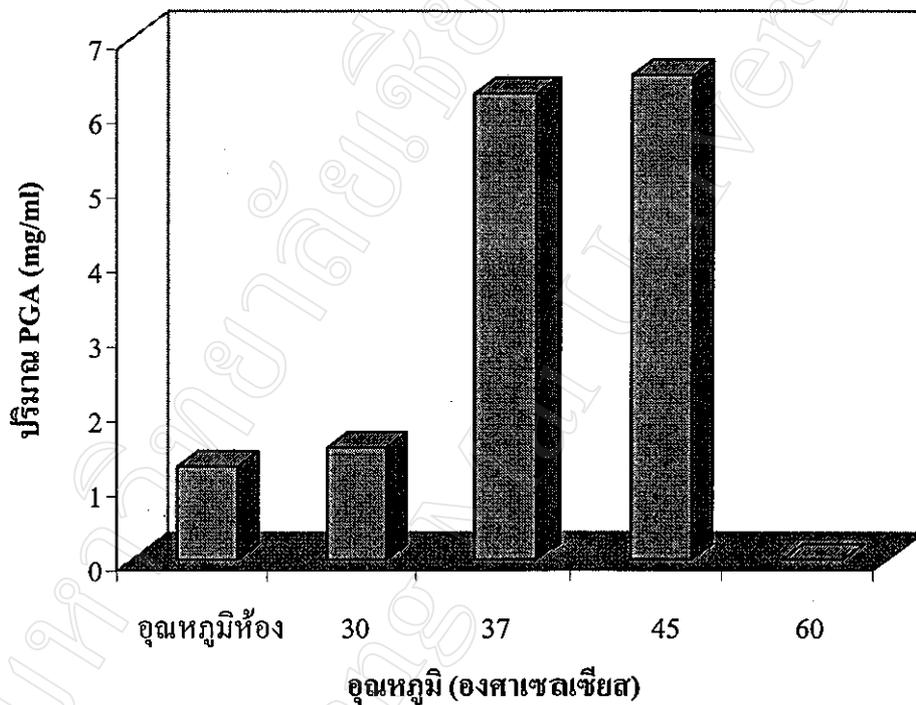
จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท RS-2 ใน PGA producing medium ที่มีกลูโคส 2% และแอมโมเนียมซัลเฟต 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 170 รอบต่อนาที โดยศึกษาอัตราการเจริญเติบโตพร้อมกับปริมาณการผลิต PGA ไปพร้อมๆกัน พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท RS-2 มีการเจริญสูงสุดที่เวลา 15 ชั่วโมง โดยมีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 8.5×10^9 cfu/ml และมีปริมาณการผลิต PGA สูงสุดที่เวลา 30 ชั่วโมง เท่ากับ 6.37 mg/ml ดังภาพ 7 และตารางผนวก 2 (ภาคผนวก จ)



ภาพ 7 การเจริญของแบคทีเรียไอโซเลท RS-2 เปรียบเทียบกับปริมาณการผลิต PGA

4.2 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิต PGA ของแบคทีเรียไอโซเลท RS-2

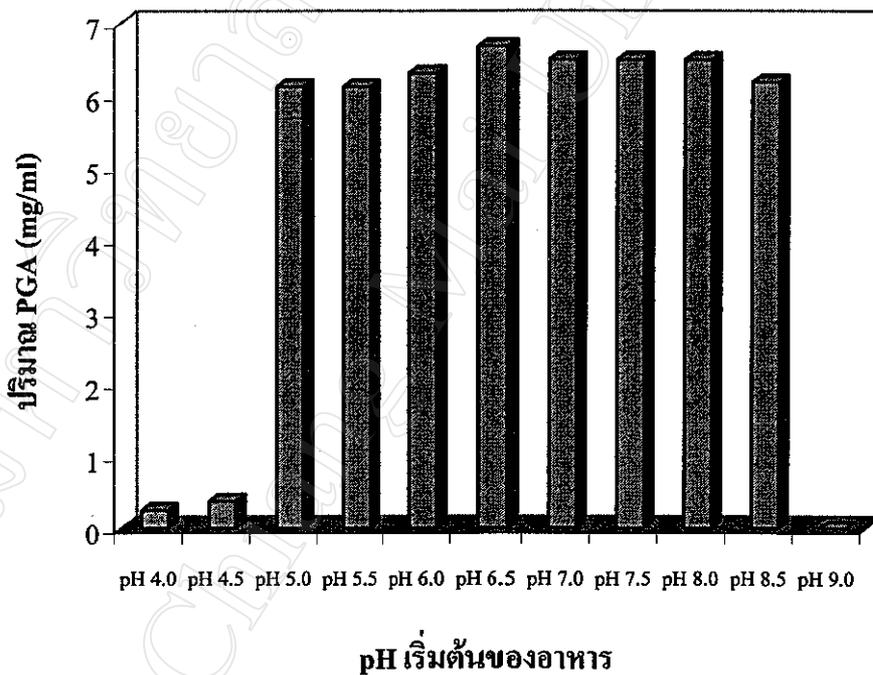
จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท RS-2 ใน อุณหภูมิต่างๆกัน คือ อุณหภูมิห้อง , 30, 37 , 45 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ใน PGA producing medium ที่มีกลูโคส 2% และ แอมโมเนียมซัลเฟต 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ อัตราการให้อากาศเท่ากับ 170 รอบต่อนาที พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท RS-2 สามารถผลิต PGA ได้สูงสุด 6.50 mg/ml ที่ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ดังภาพ 8 และตารางที่ 3 (ภาคผนวก จ)



ภาพ 8 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิต PGA ของแบคทีเรียไอโซเลท RS-2

4.3 pH เริ่มต้นของอาหาร PGA producing medium ที่เหมาะสมต่อการผลิต PGA ของแบคทีเรีย ไอโซเลท RS-2

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท RS-2 ใน PGA producing medium ที่มีกลูโคส 2% และแอมโมเนียมซัลเฟต 1% เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง อัตราการให้อากาศเท่ากับ 170 รอบต่อนาที โดยมี pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน คือ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 พบว่าแบคทีเรีย ไอโซเลท RS-2 สามารถผลิต PGA ได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.5 โดยมี ปริมาณการผลิต PGA เท่ากับ 6.687 mg/ml ดังภาพ 9 และตารางผนวก 4 (ภาคผนวก จ)

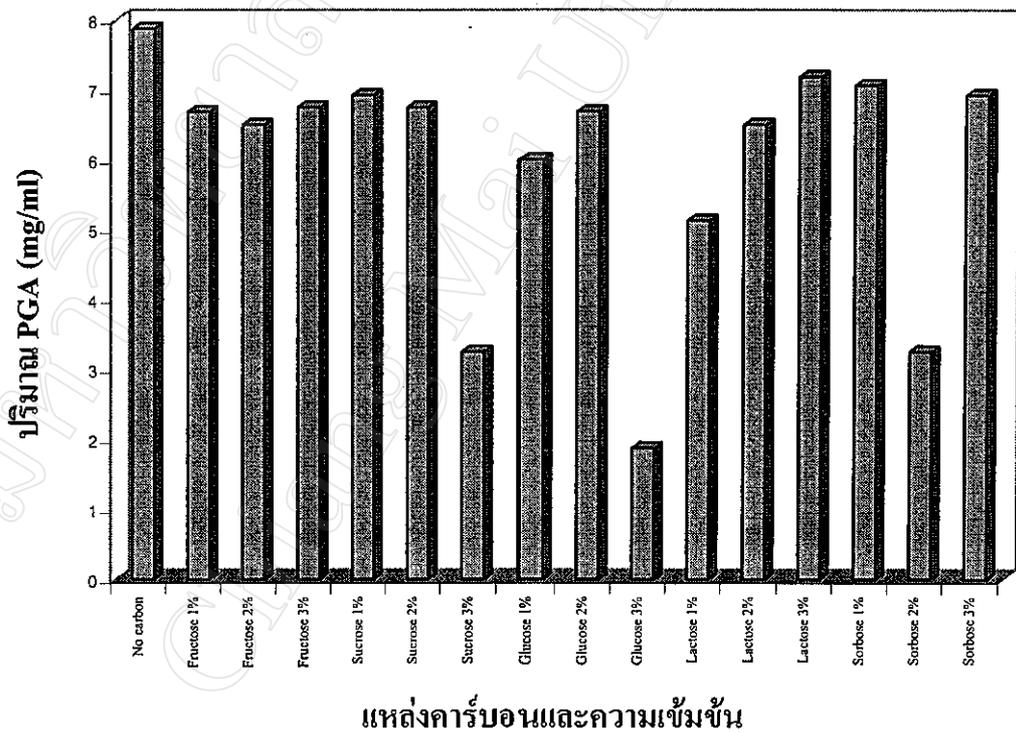


ภาพ 9 pH เริ่มต้นของ PGA producing medium ที่เหมาะสมต่อการผลิต PGA ของแบคทีเรีย ไอโซเลท RS-2

4.4 ชนิดของแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตPGAของแบคทีเรียไอโซเลท

RS- 2

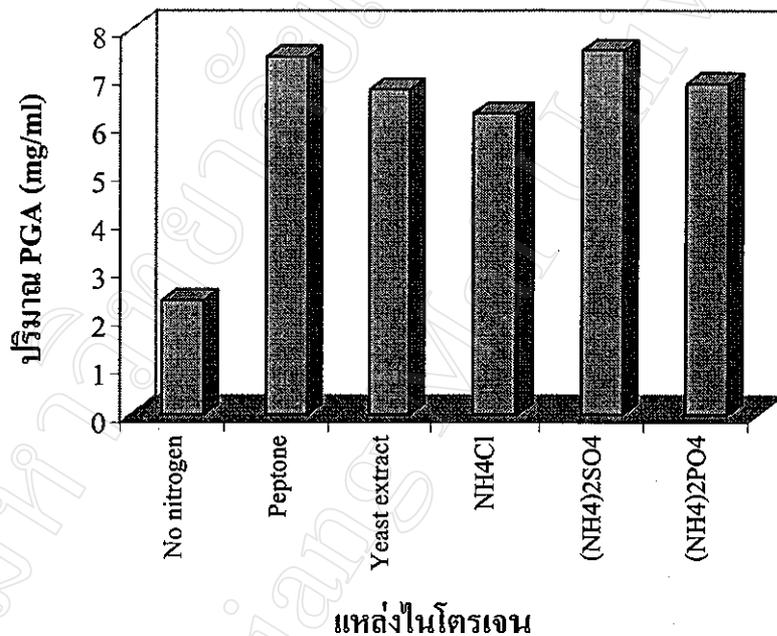
จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท RS-2 ใน PGA producing medium ที่มีแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นต่างกัน คือ ไม่เติมแหล่งคาร์บอน ฟรุกโตส ซูโครส กลูโคส แลคโตส และซอร์บอส์ที่ความเข้มข้น 1%, 2% และ 3% และแอมโมเนียมซัลเฟต 1% เป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH 6.5 เป็นเวลา 30 ชั่วโมง อัตราการให้อากาศเท่ากับ 170 รอบต่อนาที พบว่าเมื่อไม่เติมแหล่งคาร์บอนเพิ่มลงไปในการอาหารแบคทีเรียไอโซเลท RS-2 สามารถผลิต PGA ได้สูงสุดเท่ากับ 7.875 mg/ml ดังภาพ 10 และตารางผนวก 5 (ภาคผนวก จ)



ภาพ 10 ชนิดของแหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตPGAของแบคทีเรียไอโซเลท RS-2

4.5 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต PGA ของแบคทีเรียไอโซเลท RS-2

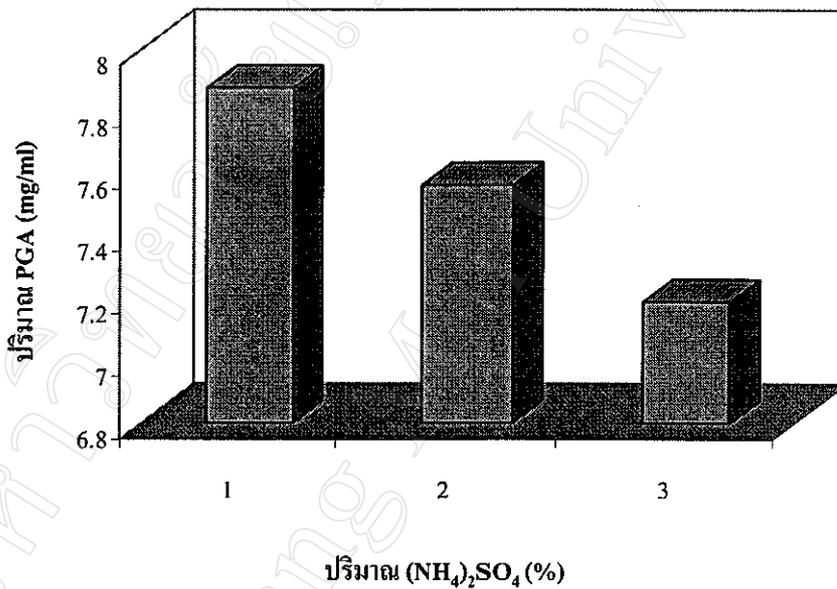
จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท RS-2 ใน PGA producing medium ที่มีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกัน คือ ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน เปปไทด์ สารสกัดจากยีสต์ แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต และ แอมโมเนียมฟอสเฟต ความเข้มข้นอย่างละ 2% โดยไม่เติมแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH 6.5 เป็นเวลา 30 ชั่วโมง อัตราการให้อากาศเท่ากับ 170 รอบต่อนาที พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท RS-2 สามารถผลิต PGA ได้สูงสุดเท่ากับ 7.562 mg/ml เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ดังภาพ 11 และตารางผนวก 6 (ภาคผนวก จ)



ภาพ 11 ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต PGA ของแบคทีเรียไอโซเลท RS-2

4.6 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต PGA ของแบคทีเรียไอโซเลท RS-2

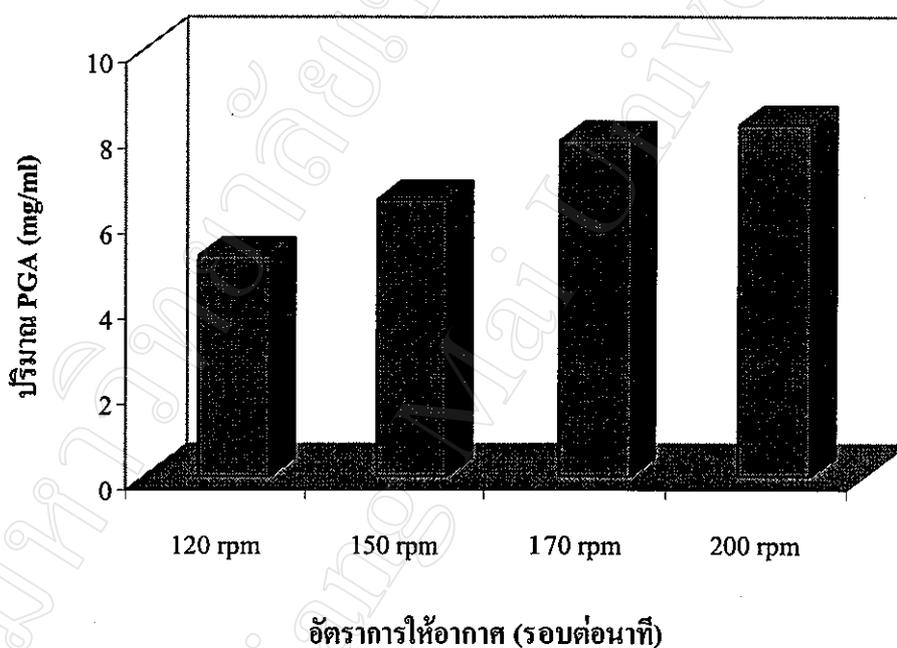
จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท RS-2 ใน PGA producing medium ที่มี แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 1%, 2% และ 3% เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยไม่เติมแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH 6.5 เป็นเวลา 30 ชั่วโมง อัตราการให้อากาศเท่ากับ 170 รอบต่อนาที พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท RS-2 สามารถผลิต PGA ได้สูงสุดเท่ากับ 7.875 mg/ml เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 1% เป็นแหล่งไนโตรเจน ดังภาพ 12 และตารางผนวก 7 (ภาคผนวก จ)



ภาพ 12 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต PGA ของแบคทีเรียไอโซเลท RS-2

4.7 อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิต PGA ของแบคทีเรียไอโซเลท RS-2

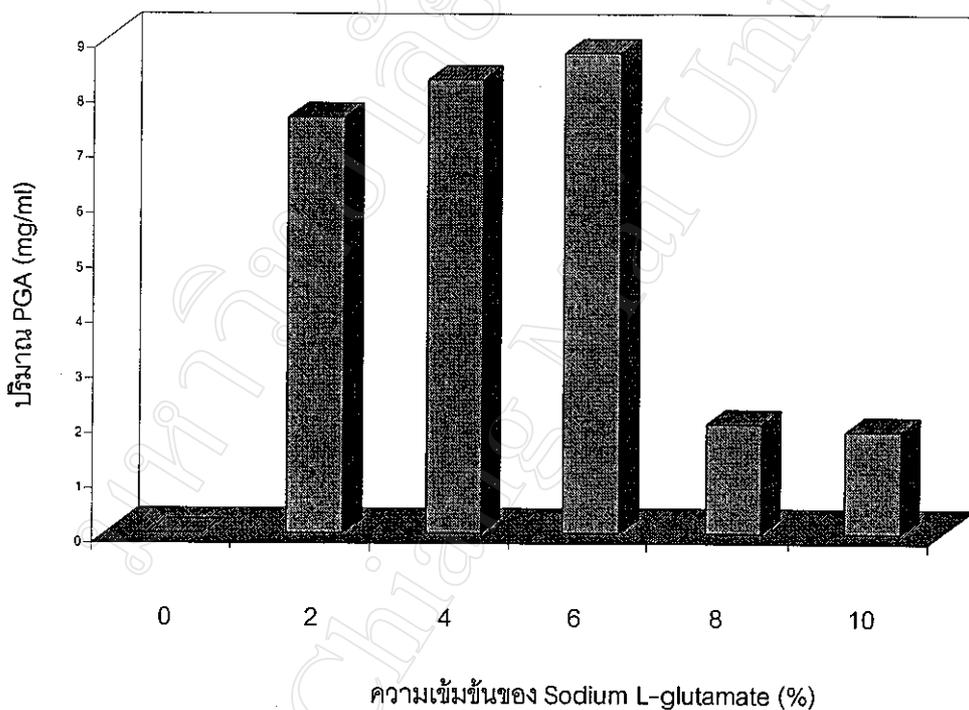
จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท RS-2 ใน PGA producing medium ที่มี แอมโมเนียมซัลเฟต 1% เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยไม่เติมแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH 6.5 เป็นเวลา 30 ชั่วโมง โดยมีอัตราการให้อากาศแตกต่างกัน คือ 120, 150, 170 และ 200 รอบต่อนาที พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท RS-2 สามารถผลิต PGA ได้สูงสุดเท่ากับ 8.25 mg/ml เมื่อมีอัตราการให้อากาศเท่ากับ 200 รอบต่อนาทีดังภาพ 13 และตารางผนวก 8 (ภาคผนวก จ)



ภาพ 13 อัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิต PGA ของแบคทีเรียไอโซเลท RS-2

4.8 ความเข้มข้นของ sodium L-glutamate ที่เหมาะสมต่อการผลิต PGA ของแบคทีเรียไอโซเลท RS-2

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียไอโซเลท RS-2 ใน PGA producing medium ที่มีความเข้มข้นของ sodium L-glutamate ต่างๆกัน คือ 0%, 2%, 4%, 6%, 8% และ 10 % medium ที่มี แอมโมเนียมซัลเฟต 1% เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยไม่เติมแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH 6.5 เป็นเวลา 30 ชั่วโมง โดยมีอัตราการให้อากาศ 200 รอบต่อนาที พบว่าเมื่ออาหารมีความเข้มข้นของ sodium L-glutamate 6% แบคทีเรียไอโซเลท RS-2 สามารถผลิต PGA ได้สูงสุดเท่ากับ 8.75 mg/ml ดังภาพ 14 ตารางผนวก 9 (ภาคผนวก จ)



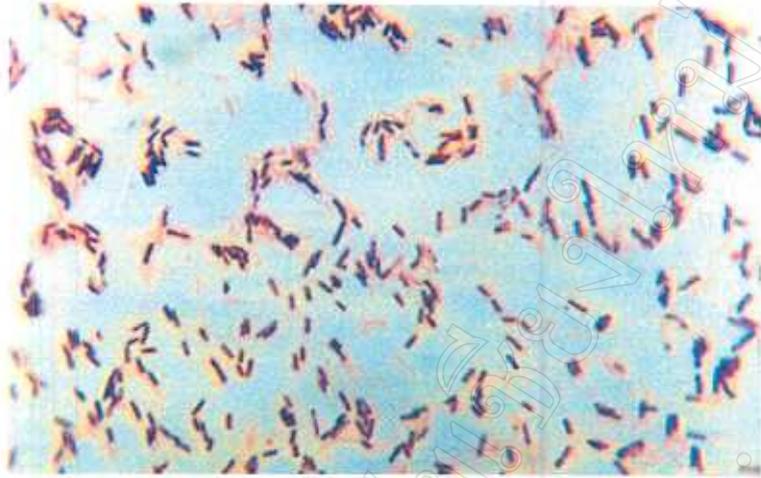
ภาพ 14 ความเข้มข้นของ sodium L-glutamate ที่เหมาะสมต่อการผลิต PGA ของแบคทีเรียไอโซเลท RS-2

5. การจัดจำแนกแบคทีเรีย

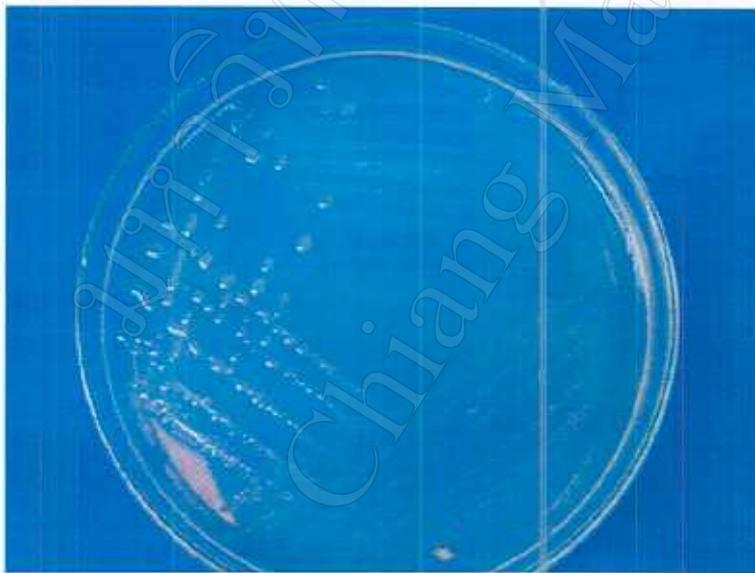
จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียไอโซเลท RS-2 มีความสามารถในการผลิต PGA ได้สูงสุด เมื่อทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีกรัมและตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท RS-2 คือ *Bacillus subtilis* ดังแสดงในตาราง 7

ตาราง 7 ลักษณะทางชีวเคมีและทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลท RS-2

ลักษณะที่ศึกษา	Isolate RS-2	<i>Bacillus subtilis</i>
Shape of cell	Rod	Rod
Width (μm)	1.0-1.2	0.6-0.7
Length (μm)	2.0-3.5	2.0-3.0
Gram reaction	+	+
Spores	central	episoidal, central, paracentral
Catalase test	+	+
V-P reaction	+	+
Egg yolk reaction	-	-
5% NaCl	+	+
7% NaCl	+	+
10% NaCl	+	+
Acid from		
- glucose	+	+
- mannitol	+	+
- glycerol	-	-
Hydrolysis of starch	+	+
Reaction of NO_3 to NO_2	+	+
Indole test	-	-



ภาพ 15 สัณฐานวิทยาของ *Bacillus subtilis* RS-2



ภาพ 16 ลักษณะโคโลนีของ *Bacillus subtilis* RS-2