จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในอาหารสูตร AK#2 สูงสุดในวันที่ 1 เท่ากับ $1.75x10^8$ CFU/ml ซึ่งสูงกว่าในอาหารอีก 2 สูตร เนื่องจากในอาหารสูตร AK#2 มี pancreatic digest of casein และ pancreatic digest of gelatin ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน yeast extract และ beef extract เป็นแหล่งวิตามิน และน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตค่อนข้างคงที่ในระยะ 1-2 วัน แต่หลังจากนั้นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างมาก เมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 7 พบว่ามีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ $7.00x10^5$ CFU/ml ในอาหารสูตร Soil Extract พบว่าจำนวนเซลล์สูงสุดในวันที่ 1 เช่นกัน เท่ากับ $5.90x10^7$ CFU/ml แล้วลดลงในระยะ 1-2 วัน เท่ากับ $1.21x10^7$ CFU/ml จากนั้นพบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงเล็กน้อย เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ $2.00 x10^6$ CFU/ml และในอาหารสูตร GYS การเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตช้ากว่าในอาหาร 2 สูตรแรก พบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดในวันที่ 2 หลังจากลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเท่ากับ $5.00x10^5$ CFU/ml ซึ่งเป็นจำนวนที่ต่ำที่สุด

เมื่อตรวจการสร้างสปอร์อิสระของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมสปอร์ด้วย Malachite green พบว่าเซลล์ของสายพันธุ์ N10 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับการสร้างสปอร์ทั้ง 3 สูตรมีลักษณะที่เหมือนกันคือ vegetative cell มีขนาดใหญ่ กว้าง 0.7-1.0 ไมโครเมตร ยาว 2.0-3.0 ไมโครเมตร เรียงตัวแบบ 2 เซลล์ต่อกัน ในวันที่ 1 ยังไม่พบการสร้างสปอร์ของเชื้อในอาหารทั้ง 3 สูตร แต่สังเกตเห็นจุดใสตรงปลายเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารสูตร GYS ซึ่งคาดว่าเป็นเอนโดสปอร์ วันที่ 2 พบสปอร์อิสระในอาหารสูตร Soil extract, AK#2 และ GYS เท่ากับ 70.01, 90.12 และ 40.21% ตามลำดับ และขนาด vegetative cell ที่เลี้ยงในอาหารสูตร GYS นี้สั้นกว่าปกติ คือยาว 1.2 ไมโครเมตร เซลล์กระจายเป็นเซลล์เดี่ยว ในวันที่ 3 พบสปอร์อิสระในอาหาร Soil extract เท่ากับ 80.21% ขนาดของเซลล์กว้างน้อยกว่าปกติ คือ 0.3 ไมโครเมตร เซลล์บางส่วนต่อกันเป็นสายยาว ในอาหารสูตร AK#2 พบสปอร์อิสระ 95.25% และในอาหารสูตร GYS พบจำนวนสปอร์ 100% วันที่ 4 พบการสปอร์ในอาหารสูตร AK#2 เป็น 100% และจำนวนสปอร์ในอาหารสูตร Soil extract วันที่ 4, 5, 6 และ 7 เป็น 90.14, 95.01, 98.12 และ 100% ตามลำดับ

จำนวนสปอร์อิสระในอาหารสูตร Soil Extract เพิ่มขึ้นช้ากว่าในอาหารอีก 2 สูตร ส่วนจำนวนสปอร์อิสระในอาหารสูตร AK#2 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 2 วัน และมีจำนวนสปอร์อิสระเท่ากับ 100% ภายใน 4 วัน การสร้างสปอร์ในอาหารสูตร GYS พบว่าในช่วง 2 วันแรกมีจำนวนสปอร์อิสระน้อยกว่าในอาหารอีก 2 สูตร จากนั้นจำนวนสปอร์อิสระเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีจำนวนสปอร์อิสระเท่ากับ 100% ภายในวันที่ 3 เมื่อเปรียบเทียบการสร้างสปอร์บนอาหาร

แข็งและอาหารเหลว พบว่า *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร AK#2 และ GYS สร้างสปอร์ในอาหารเหลวได้เร็วกว่าในอาหารแข็ง จำนวนสปอร์อิสระในอาหารเหลวเท่ากับ 100% ภายใน 3 และ 4 วัน ตามลำดับ แต่ในอาหารแข็งพบว่ามีจำนวนสปอร์อิสระเท่ากับ 100% ภายใน 10 และ 7 วัน ตามลำดับ ส่วนอาหารสูตร Soil Extract พบว่า *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 มีจำนวนสปอร์อิสระเท่ากับ 100% ภายใน 7 วันทั้งบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว ซึ่งข้อมูลนี้ขัดแย้งกับ Claus and Berkeley (1986) ที่แนะนำไว้ในหัวข้อ *Bacillus* ว่าในอาหารเหลว (NB) เกิดสปอร์ยากกว่าในอาหารแข็ง (NA) ซึ่งผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าถ้าเปลี่ยนอาหารเป็นสูตรนี้จะให้ผลที่ไม่เป็นไปตามข้อแนะนำดังกล่าว

ตลอดการทดลองไม่พบสปอร์ของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ที่ทนความร้อน เมื่อนำ culture broth มาทำ heat shock โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที แล้วเกลี่ยบนอาหาร NA ผลคือไม่พบโคโลนีบนอาหารเลย แสดงให้เห็นว่าสปอร์ที่สร้างขึ้นไม่ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการทนความร้อนของสปอร์มีหลายประการดังที่มีนักวิจัยหลายคณะรายงานไว้ ปัจจัยประการแรกที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์และความทนทานของสปอร์คือไอออนโลหะ ดังที่ Atrih and Foster (2002) กล่าวว่าMn^{2+} เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนหรือเอนไซม์สำหรับการสร้างชั้น cortex ของสปอร์ ส่วน Charney at al. (1951) พบว่า *B. subtilis* ATCC 6633 ที่เลี้ยงในอาหารที่มี Mn^{2+} สร้างสปอร์ดีกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ไม่มี Mn^{2+} และการเติม Mn^{2+} ลงในอาหารหลังจากระยะ active growth ไม่สามารถกระตุ้นให้ *B. subtilis* ATCC 6633 สร้างสปอร์ ซึ่ง Claus and Berkeley (1986) ได้แนะนำไว้ในหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology ว่าหากต้องการกระตุ้นการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* ควรใช้อาหาร NA ที่ผสม $MnSO_4$ 50มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังมีรายงานอื่นๆที่กล่าวถึงผลไอออนโลหะต่อการสร้างสปอร์และการทนความร้อนของสปอร์ เช่น สปอร์ที่มี Mn^{2+} ในชั้น core ของเชื้อ *B. megaterium* ATCC 19213, *B. subtilis niger, B. stearothermophilus* ATCC 7953, *B. subtilis* IFO13722, *B. subtilis* A63 และ *Bacillus* sp. ทนความร้อนจากการต้มได้ดีกว่าสปอร์ที่ไม่มี Mn^{2+} และสปอร์ที่มีไอออนผสมของ Mn^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, K^{+} และ Fe^{2+} ทนความร้อนมากกว่าสปอร์ที่มี Mn^{2+} เพียงอย่างเดียว เพราะไอออนโลหะเหล่านี้มีหน้าที่เกี่ยวกับความเสถียรของสปอร์และการกำจัดน้ำออกจากสปอร์ (Beaman and Gerhardt, 1986; Bender and Marquis, 1985; Igura *et al.*, 2003; Maquis and Bender, 1958; Ooms and Brul, 2004)

การกำจัดน้ำออกจากสปอร์มีความสำคัญต่อความเสถียรและการทนความร้อนของสปอร์ สปอร์มีน้ำ 0.5-1.0 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ทนความร้อนได้สูงกว่า vegetative cell ซึ่งมีน้ำ 3.0-4.0 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง และการกำจัดน้ำออกจากสปอร์นั้นสัมพันธ์กับการสะสมไอออนโลหะของสปอร์ (Atrih and Foster, 2002) การที่สปอร์ของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ไม่ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที อาจอธิบายได้ว่าเกี่ยวข้องกับปริมาณน้ำภายในสปอร์

กรดไดพิโคลินิคในสปอร์ เป็นอีกปัจจัยที่ทำให้สปอร์ทนความร้อน ซึ่ง Setlow et al (2006) รายงานว่ากรดไดพิโคลินิคทำหน้าที่เป็น chelate จับกับไอออนที่มีประจุ 2+ ของ Mn^{2+}, Mg^{2+} และ Ca^{2+} และแทนที่น้ำในสปอร์ เป็นการกำจัดน้ำออกจากสปอร์ ทำให้สปอร์ทนความร้อน ช่วยป้องกัน DNA ของสปอร์จากรังสี รวมทั้งเพิ่มความเสถียรให้กับสปอร์ และ de Vries *et al.* (2004) พบว่ากลูตาเมตเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการสร้างกรดไดพิโคลินิคในสปอร์

อาหารเหลวที่กระตุ้นการสร้างสร้างสปอร์ของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 สูตร Soil Extract มีน้ำสกัดจากดินเป็นองค์ประกอบ ซึ่งน่าจะมีไอออนโลหะที่จำเป็นสำหรับการสร้างและการทนความร้อนของสปอร์ ส่วนอาหารสูตร AK#2 มี $MnSO_4$ เป็นองค์ประกอบ และอาหารสูตร GYS มีทั้ง $MgSO_4$, $CaCl_2$ และ $MnSO_4$ นอกจากนี้ในอาหารสูตร AK#2 ประกอบด้วยแหล่งของกรดอะมิโนคือ pancreatic digest of galatin และ pancreatic digest of casein ซึ่งน่าจะมีกลูตาเมตสำหรับสร้างกรดไดพิโคลินิค แต่สปอร์ที่สร้างในอาหารทั้ง 3 สูตรนี้ไม่ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จึงอาจมีสาเหตุจากปริมาณน้ำในสปอร์มากกว่าสาเหตุอื่น

Atrih and Foster (2002) กล่าวว่าอุณหภูมิที่เพาะเลี้ยงแบคทีเรียเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการทนความร้อนของสปอร์ การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่งที่อุณหภูมิสูงได้สปอร์ที่ทนความร้อนดีกว่าการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิต่ำ เช่นเดียวกับที่ Beaman and Gerhardt (1986) รายงานว่า *B. stearothermophilus* สายพันธุ์ 7953 ซึ่งเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 60 และ 75 องศาเซลเซียส มีค่า D_{100} เท่ากับ 238 และ 311 นาที ตามลำดับ ในขณะที่การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีค่า D_{100} เท่ากับ 30 นาที ส่วน Sedlák *et al.* (1993) พบว่าสปอร์ของ *B. megaterium* สายพันธุ์ 27 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร SYG ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และให้ความร้อน 45 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ที่เวลา 180, 300 และ 420 นาที เป็นการกระตุ้นให้ *B. megaterium* สายพันธุ์ 27 สังเคราะห์ heat shock protein ทำให้สปอร์ทนอุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส heat shock protein เป็นกลุ่มโปรตีนที่สร้างขึ้นภายในเซลล์เมื่อเซลล์อยู่ในสภาพเครียด เช่น ได้รับ

อุณหภูมิสูงกว่าปกติ ได้รับสารพิษ หรือขาดสารอาหารเป็นต้น หน้าที่ของ heat shock protein คือ ป้องกันโปรตีนภายในเซลล์ไม่ให้ตกตะกอนเมื่อได้รับความร้อน สำหรับ *Bacillus* spp.นั้นการสร้าง heat shock protein เกิดขึ้นระหว่างการเจริญและการสร้างสปอร์(Wikipedia, 2007) การกระตุ้นให้ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 สร้างสปอร์นั้น ศึกษาโดยเพาะเลี้ยง *P. polymyxa*สายพันธุ์ N10 ที่อุณหภูมิห้อง อาจไม่เหมาะสมต่อกระตุ้นให้ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 สร้างสปอร์ที่ทนความร้อน จึงควรปรับสภาวะการเพาะเลี้ยงโดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงขึ้น แล้วตรวจสอบการทนความร้อนของสปอร์

ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหารสำหรับการสร้างสปอร์ทั้ง 3 สูตรมีความเข้มข้นเริ่มต้นประมาณ 1 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในอาหารทั้ง 3 ชนิดลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 1 วัน พร้อมกับการเจริญของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ดังนั้นการเจริญของเซลล์จึงสัมพันธ์กับการลดลงของความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส สำหรับอาหารสูตร Soil Extract พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในระหว่างวันที่ 1-6 ค่อนข้างคงที่อยู่ในช่วง 0.17-0.20 กรัมต่อลิตร แล้วลดลงอย่างรวดเร็วระหว่างวันที่ 6-7 เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าในอาหารSoil Extract มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 0.02 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในอาหารสูตร AK#2 ลดลง 2 ช่วงด้วยกัน ในวันที่ 1 ของการทดลอง ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็ว มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.60 กรัมต่อลิตร และคงที่ถึงวันที่ 2 ซึ่งสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่คงที่ หลังจากนั้นความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสลดลงอีกครั้งเท่ากับ 0.40 กรัมต่อลิตร และคงที่จนสิ้นสุดการทดลอง ในอาหารสูตร GYS พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 ของการทดลอง คือลดลงเท่ากับ 0.54 กรัมต่อลิตร และลดต่ำที่สุดในวันที่ 2 ของการทดลอง สัมพันธ์กับการเจริญของเซลล์ที่มีจำนวนสูงที่สุดในวันที่ 2 จากนั้นความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในอาหารสูตร GYS คงที่จนสิ้นสุดการทดลอง

เมื่อพิจารณาค่าพีเอชในอาหารสำหรับสร้างสปอร์ทั้ง 3 สูตรพบว่าลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 1 วัน แล้วจึงเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนสิ้นสุดการทดลอง ในวันที่ 1 ค่าพีเอชในอาหารสูตร Soil extract และ AK#2 มีค่าใกล้เคียงกัน คือลดลงจาก 6.74 และ 6.92 เหลือเท่ากับ 6.10 และ 6.00 ตามลำดับ จากนั้นค่าพีเอชในอาหารสูตร AK#2 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 1-2 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 7 พบว่าค่าพีเอชในอาหารสูตร AK#2 เท่ากับ 8.24 แต่พีเอชในอาหารสูตร Soil extract เท่ากับ 7.57 ค่าพีเอชในอาหารสูตร GYS ลดต่ำกว่าอาหารอีก 2 สูตร ในวันที่ 1 มีค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เท่ากับ 5.23 จากค่าพีเอชเริ่มต้น 6.71 จากนั้นค่าพีเอชเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะ 1-2 วัน จากนั้นค่อนข้างคงที่ เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าค่าพีเอชในอาหารสูตร GYS เท่ากับ 7.46

การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อในลักษณะที่ลดลงอย่างรวดเร็ว แล้วเพิ่มสูงขึ้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ Warriner and Waites (1999) ที่ศึกษาการสร้างสปอร์ของ *B. subtilis* สายพันธุ์ PS 346 ในอาหารสำหรับสร้างสปอร์ที่มีน้ำตาลกลูโคสและไรโบสในอัตราส่วน 1:1 เป็นแหล่งคาร์บอน รายงานว่าค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงจาก 7.0 เหลือ 6.0 ภายในระยะเวลา 320 นาที หลังจากนั้นค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนมีค่าเท่ากับ 8.5 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ซึ่ง Warriner and Waites (1999) กล่าวว่าค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ลดลงเกิดการการสะสมกรดอินทรีย์ เช่น แลคเตต ไพรูเวต และอะซิเตต หลังจากนั้นค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นเนื่องจากเกิด re-assimilation ของกรดอินทรีย์ เช่นเดียวกับ Dingman and Stahly (1983) ที่ศึกษาการสร้างเอนโดยสปอร์ของ *B. larvae* สายพันธุ์ NRRL B-3650 ในอาหารเหลวสูตร TMYGP พีเอช 7.0 ซึ่งประกอบด้วย yeast extract น้ำตาลกลูโคส โซเดียมไพรูเวต และรายงานว่าค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงจาก 6.9 เหลือ 6.6 ภายใน 10 ชั่วโมง จากนั้นค่าพีเอชจึงเพิ่มขึ้นเท่ากับ 7.6 ในชั่วโมงที่ 70 แต่ Dingman and Stahly (1983) สรุปว่าค่าพีเอชที่ลดลงมีสาเหตุจากการออกซิเดชันอย่างไม่สมบูรณ์ของ yeast extract เนื่องจากค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงพร้อมกับความเข้มข้นของ yeast extract ที่ลดลง ในขณะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง

โดยทั่วไปการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียเกิดขึ้นเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะขาดแคลนสารอาหารที่จำเป็น เช่น น้ำตาลกลูโคส ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่หมดไปเป็นสัญญาณส่งไปยังตัวรับสัญญาณของแบคทีเรียในลักษณะ catabolite repression การขาดสารอาหารกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ภายในและภายนอกเซลล์ เอนไซม์ภายในเซลล์คือเอนไซม์ใน tricarboxylic acid cycle (TCA cycle) และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการใช้แหล่งคาร์บอนอื่นเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ การเจริญของเซลล์ในระยะ exponential phase เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดอินทรีย์โดยการหมัก ได้ผลิตภัณฑ์ เช่น กรดแลคติก กรดไพรูวิก กรดอะซิติก ทำให้พีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อลดต่ำลงเหลือ 5-6 เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสจนหมด เอนไซม์ใน TCA cycle จึงถูกกระตุ้น เซลล์จะใช้กรดอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานโดยการเกิดออกซิเดชัน ทำให้พีเอชสูงขึ้นประมาณ 7 ระดับของ GTP ที่ลดต่ำลงเป็นอีกสาเหตุที่กระตุ้นให้ส่งสัญญาณไปยังตัวรับสัญญาณเพื่อกระตุ้นยีน spoO ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสปอร์ GTP เกี่ยวข้องกับ SpoO, RNA polymerase หรือโปรตีนควบคุมอื่นๆ และมีผลในระดับการแสดงออกของยีนในการสร้างสปอร์

มากกว่ายีนในการเกิด catabolite-repress เนื่องจากปริมาณ GTP ที่ลดลงทำให้เกิดการสร้างสปอร์ได้ แม้ว่ายังไม่มี catabolite derepression ของยีน (กัญจนา, 2537; de Vries *et al.*, 2005; Doi, 1989; Nickerson *et al.*, 1974; Warriner and Waites, 1999)

ประโยชน์ของการศึกษาการสร้างสปอร์ครั้งนี้ อาจช่วยให้ข้อมูลเบื้องต้นในการผลิตสปอร์ในรูปผงเชื้อสำเร็จรูปเป็นการค้า แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาที่พบว่าสปอร์อิสระในอาหารเหลวทุกชนิดไม่สามารถทนอุณหภูมิจากการทำ heat shock ที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จึงควรศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ความกระจ่างว่าทำอย่างไรสปอร์ของแบคทีเรียชนิดนี้จึงสามารถทนอุณหภูมิสูง เช่น ปรับปรุงสภาวะการเพาะเลี้ยงทั้งองค์ประกอบของอาหาร และอุณหภูมิขณะเพาะเลี้ยงเพื่อให้เซลล์ปรับตัวต่อความร้อน และสร้างสปอร์ที่ทนความร้อน แต่ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับปัจจัยภายในตัวเซลล์ด้วย เช่น โครงสร้างของ cortex การผลิต heat shock protein การกำจัดน้ำออกจากสปอร์ และการซ่อมแซมสารโมเลกุลใหญ่ภายในเซลล์เมื่อได้รับความร้อน (Atrih and Foster, 2002) และในขณะเดียวกันก็สามารถเสนอแนะได้ว่าการแยกแบคทีเรียที่สร้างสปอร์จากธรรมชาติควรต้องปรับเปลี่ยนวิธี ไม่ใช้วิธี heat shock เพราะอาจจะไม่ได้แบคทีเรียที่สปอร์อิสระไม่ทนร้อนจากการทำ heat shock เนื่องจากสปอร์อิสระของแบคทีเรียแต่ละชนิดทนอุณหภูมิได้แตกต่างกัน

สรุป

แบคทีเรียสายพันธุ์ N10 แยกจากเปลือกปอสาแห้งในธรรมชาติ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน ขนาดกว้างใกล้เคียง 1 ไมโครเมตร ยาว 2-3 ไมโครเมตร สร้างเอนโดสปอร์รูปวงรีที่บริเวณปลายเซลล์ ทำให้ vegetative cell โป่ง ผลิตเอนไซม์คะตะเลส และเป็น facultative anaerobe จึงสามารถจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์นี้อยู่ในจีนัส *Bacillus* กลุ่ม II และจำแนกระดับสปีชีส์โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาเปรียบเทียบกับข้อมูลของ Gordon (1989) และ Claus and Berkeley (1986) พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ N10 มีคุณสมบัติเหมือน *B. polymyxa* ซึ่งปัจจุบันถูกเปลี่ยนเป็นจีนัส *Paenibacillus* โดย Ash *et al.* (1993) ตามเกณฑ์ของความแตกต่างของลำดับเบสของ 16S rRNA เป็น *P. polymyxa*

งานวิจัยนี้ได้แยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนโดสปอร์จากสารเร่งพด.1 ของกรมพัฒนาที่ดิน โดยวิธี heat shock และเกลี่ยบนอาหาร NA ได้แบคทีเรีย 9 สายพันธุ์ ได้แก่ LDD1, LDD2, LDD3a, LDD3b, LDD4, LDD5, LDD7, LDD8 และ LDD9 ตามความแตกต่างของโคโลนี แบคทีเรียเหล่านี้มีรูปท่อน ติดสีแกรมบวก สร้างเอนโดสปอร์ ผลิตเอนไซม์คะตะเลส และเป็น aerobe หรือ facultative anaerobe จึงสามารถจำแนกแบคทีเรียเหล่านี้อยู่ในจีนัส *Bacillus* การจำแนกระดับสปีชีส์โดยอาศัยคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยา สามารถจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ LDD1, LDD3a และ LDD3b ว่าคล้าย *B. subtilis* แบคทีเรียสายพันธุ์ LDD2 จำแนกว่าคล้าย *B. licheniformis* แบคทีเรียสายพันธุ์ LDD4 จำแนกเป็น *B. megaterium* แบคทีเรียสายพันธุ์ LDD7 และ LDD9 จำแนกเป็น *B. firmus* และไม่สามารถจำแนกแบคทีเรียสายพันธุ์ LDD5 และ LDD9 ในระดับสปีชีส์โดยวิธีการนี้ แบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดนำมาทดสอบร่วมกับ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ในแง่ของศักยภาพของการผลิตเอนไซม์และการผลิตกรด ตลอดจนการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช

การตรวจสอบศักยภาพในการผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์ชนิดต่างๆ โดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 บนอาหารแข็ง เปรียบเทียบกับ *Bacillus* sp. ที่แยกจากพด.1 ทั้ง 9 สายพันธุ์ พบว่า *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 นอกจากมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เพคติเนสได้สูงแล้วยังสามารถผลิตเอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ โปรตีเอส อะไมเลส เซลลูเลส และไซลาเนส เช่นเดียวกับแบคทีเรียที่คล้าย *B. licheniformis* และแบคทีเรียที่คล้าย *B. subtilis* ขณะที่ *B. megaterium* สายพันธุ์ LDD4 และ *B. firmus* ผลิตเอนไซม์เพียง 2 ชนิดคือโปรตีเอส และอะไมเลส ส่วน

unidentified *Bacillus* sp. ไม่สามารถผลิตเอนไซม์บนอาหารแข็ง และในการศึกษานี้พบว่าไม่มี *Bacillus* sp. สายพันธุ์ใดที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสบนอาหารแข็ง

พบว่าการผลิตเอนไซม์โดยแบคทีเรียที่จำแนกอยู่ในสปีชีส์เดียวกันสามารถผลิตเอนไซม์ชนิดเดียวกัน แต่ขนาดของ Cz/Co แตกต่างกัน ยกเว้นแบคทีเรียที่คล้าย *B. subtilis* เท่านั้นที่สายพันธุ์ LDD3a และ LDD3b สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนส แต่สายพันธุ์ LDD1 ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ ขนาดของ Cz/Co จากการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส อะไมเลส เซลลูเลส และไซลาเนสโดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 เท่ากับ 3.71, 3.71, 7.54 และ 3.89 เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องนาน 2, 1, 4 และ 2 วันตามลำดับ ขณะที่ขนาด Cz/Co ของ *Bacillus* sp. จากพด.1 อยู่ในช่วง 1.12-2.68, 1.00-2.67, 2.34-4.13 และ 1.00-2.39 ตามลำดับ การผลิตเอนไซม์โดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 บนอาหารแข็งจึงสูงกว่า *Bacillus* sp. จากพด.1 อย่างเห็นได้ชัด

การผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์โปรตีเอส อะไมเลส เซลลูเลส และไซลาเนสโดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ในอาหารเหลว แตกต่างกันตามชนิดของเอนไซม์ โดยที่ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและเซลลูเลสสูงกว่าเอนไซม์ชนิดอื่น กิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอส แอสิดโปรตีเอส ไซลาเนส เบตาอะไมเลส เซลลูเลสที่ย่อยสลาย CMC (endo-1,4-β-glucanase) และกระดาษกรอง (exo-1,4-β-glucanase) เท่ากับ 112.16, 78.60, 25.69, 14.45, 0.859 และ 0.127 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ในแง่การผลิตกรดในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลดี-กลูโคส 0.5% พบว่า *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 แสดงค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต่ำกว่า *Bacillus* sp. ในกลุ่ม *B. subtilis* และ *Bacillus* sp. จากพด.1 ที่นำมาเปรียบเทียบอย่างชัดเจน โดยมีค่าพีเอชที่ 24 ชั่วโมงเท่ากับ 4.79 ขณะที่ *Bacillus* sp. อื่นๆมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 5.6-6.3

จากการศึกษาศักยภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์โรคพืช พบว่า *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 สามารถยับยั้งแบคทีเรียโรคพืชดังต่อไปนี้ *X. campestris* pv. *campestris*, *X. campestris* pv. *glycines*, *X. campestris* pv. *phaseoli* และยับยั้งราโรคพืชได้แก่ *F. oxysporum, Alternaria* sp., *A. niger*, *R. oligosporus* และ *Sclerotium* sp. นอกเหนือจากการยับยั้งราโรคพืชแล้ว ยังพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ยังยับยั้งการเจริญของเส้นใยเห็ดใน class Basidiomycete ได้แก่ เห็ดนางฟ้าภูฏาน (*Pleurotus ostreatu*s) เห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulus* Mont.) เห็ดหูหนู (*Auricularia*

auricular (Hook.) Underw.) เห็ดฟาง (*Volvariella volvacea* (Bull. Ex Fr.) Sing.) และเห็ดเป๋าฮื้อ (*Pleurotus ablonus* Han) ข้อมูลเบื้องต้นเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียชนิดนี้อาจเหมาะกับการนำไปใช้ในการทำปุ๋ยหมักสำหรับปลูกพืช เพราะสามารถยับยั้งจุลินทรีย์โรคพืช แต่อาจไม่เหมาะสำหรับใช้ย่อยสลายวัสดุเพาะเห็ด เพราะมีผลยับยั้งเส้นใยเห็ด

ปกติแล้วการสร้างสปอร์ของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 บนอาหาร NA ใช้เวลาประมาณ 15 วัน จึงได้สปอร์อิสระเป็นส่วนใหญ่ เมื่อศึกษาเปรียบเทียบบนอาหารแข็งชนิดอื่นๆ พบว่าอาหาร Soil Extract Agar, AK Agar # 2 และ GYS Agar ให้ผลดีกว่า คือสามารถได้สปอร์อิสระภายใน 7-10 วัน และเมื่อศึกษาการสร้างเอนโดสปอร์ในอาหารเหลว Soil Extract, AK#2 และ GYS พบว่าเกิดสปอร์อิสระดีกว่า และเร็วกว่าอาหารแข็งในสูตรเดียวกัน คือเกิดสปอร์อิสระได้ 100% ที่ 7,4 และ 3 วัน ตามลำดับ ดังนั้นอาหารเหลวที่เหมาะสมควรเป็น GYS หรือ AK#2 มากกว่า Soil Extract Broth อย่างไรก็ตามสปอร์อิสระเหล่านี้ไม่สามารถทนความร้อนในระดับ 80 องศาเซลเซียส 10 นาที

จากคุณสมบัติของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ที่ศึกษาทั้งหมดนี้ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ไปประยุกต์ใช้ร่วมกับจุลินทรีย์อื่นเพื่อย่อยสลายวัสดุทางการการเกษตรสำหรับทำปุ๋ยหมัก เพราะนอกจากสามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอส อะไมเลส เซลลูเลส และไซลาเนสแล้ว *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ยังสามารถยับยั้งราและแบคทีเรียโรคพืช จึงเป็นประโยชน์ต่อการควบคุมจุลินทรีย์โรคพืชที่ปนเปื้อนอยู่ในกองปุ๋ยหมัก แต่อาจไม่เหมาะสมต่อการย่อยสลายวัสดุเพาะเห็ด เนื่องจาก *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเห็ดในระดับห้องปฏิบัติการ แต่ทั้งนี้ควรศึกษาสภาวะหรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่สนับสนุนให้ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ผลิตเอนไซม์สูงที่สุด รวมทั้งควรศึกษาสภาวะที่กระตุ้นให้ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 สร้างเอนโดสปอร์จำนวนมากและทนความร้อน เพื่อการนำไปใช้ในรูปผงเชื้อสำเร็จรูป

ข้อเสนอแนะ

1. การแยกแบคทีเรียที่สร้างเอนโดสปอร์จากตัวอย่างธรรมชาติ หรือจากสารเร่งพด.1 ควรใช้ทั้งวิธี heat shock ควบคู่กับตัวอย่างที่ไม่ผ่านการ heat shock อาจทำให้ได้ชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่สร้างเอนโดสปอร์มากขึ้น

2. แบคทีเรีย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 จะมีศักยภาพในการทำปุ๋ยหมักได้เร็วขึ้นหรือไม่ ต้องมีการศึกษาในสภาพธรรมชาติต่อไป ทั้งแง่การผลิตเอนไซม์ และการผลิตกรดจากสารคาร์โบไฮเดรต

3. *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 นี้อาจเหมาะกับการทำปุ๋ยหมักที่ใช้กับพืช เพื่อส่งเสริมการเจริญของพืชและควบคุมโรคพืช เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียและราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด แต่อาจไม่เหมาะสำหรับนำไปใช้ย่อยสลายวัสดุเพาะเห็ด เนื่องจากยับยั้งเส้นใยเห็ดในระดับห้องปฏิบัติการ อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาเบื้องต้นในการเพาะเห็ดฟางแบบกองเตี้ยของกลุ่มงานจุลชีววิทยาประยุกต์ กรมวิชาการเกษตร โดยใส่เชื้อนี้ พบว่าให้ผลผลิตเห็ดที่สูงขึ้น จึงเป็นเรื่องที่น่าศึกษาต่อไปถึงศักยภาพของเชื้อนี้ที่ช่วยในการเพาะเห็ด ว่ายับยั้งการเจริญของเส้นใยเห็ดในสภาพธรรมชาติหรือไม่ เนื่องจากสภาพธรรมชาติเป็นเชื้อผสม ไม่ใช่เชื้อบริสุทธิ์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมพัฒนาที่ดิน. 2546. **การผลิตปุ๋ยหมักโดยใช้สารเร่งพด.1.** แหล่งที่มา: http://www.ldd.go.th/web_ldd/soil/page04.htm, 18 มกราคม 2547.

กัญจนา ธีระกุล. 2537. **สรีรวิทยาของจุลินทรีย์และสรีรวิทยาของแบคทีเรีย.** (เอกสารประกอบการสอน). ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เกษม สร้อยทอง. 2532. **การควบคุมเชื้อโรคพืชโดยชีววิธี.** ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิต, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

เจษฎาวรรณ วิจิตรเวชการ. 2544. **โครงสร้างและการทำงานของเซลล์.** (เอกสารประกอบการสอน). ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม, มหาวิทยาลัยศิลปากร, นครปฐม.

ชาญวิทย์ สุริยฉัตรกุล. 2546. **แอคติโนมัยสีทที่หายากในดินจากพื้นที่สงวนชีวมณฑลสะแกราชและสถานีวิจัยพื้ชไร่สุวรรณวาจกกสิกิจ จังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชาตรี สิทธิกุล. 2534. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อราใน Class Basidiomycetes, น. 110-123. *ใน* ประสาทพร สมิตะมาน, บรรณาธิการ. **โรคพืชวิทยา.** ภาควิชาโรคพืช, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

ทองเลียน บัวจูม. 2541. **การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเพื่อใช้ปรับปรุงคุณภาพพืชอาหารสัตว์.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิตยา สุวรรณรัตน์. 2534. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อราชั้นต่ำ, น. 67-88. *ใน* ประสาทพร สมิตะมาน, บรรณาธิการ. **โรคพืชวิทยา.** ภาควิชาโรคพืช, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

นุชนารถ จงเลขา. 2534. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อราใน Class Ascomycetes, น. 89-109. *ใน* ประสาทพร สมิตะมาน, บรรณาธิการ. **โรคพืชวิทยา.** ภาควิชาโรคพืช, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

ประสาทพร สมิตะมาน. 2534. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย, น. 144-182. *ใน* ประสาทพร สมิตะมาน, บรรณาธิการ. **โรคพืชวิทยา.** ภาควิชาโรคพืช, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

ปาริชาต คนซื่อ. 2549. **การคัดเลือกและการผลิตเอนไซม์อาหารสัตว์จากเชื้อราชอบร้อน *Thermomyces lenuginosus* (Tsiklinskaya).** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไพโรจน์ จ๋วงพานิช. 2525. **หลักวิชาโรคพืช.** พิมพ์ครั้งที่ 2. บริษัท สารมวลชน จำกัด. กรุงเทพฯ.

รัชฎาวรรณ เดชมณี และสุดฤดี ประเทืองวงศ์. 2547. **การศึกษาลักษณะบางประการของสาร secondary metabolites ที่ผลิตโดย *Bacillus firmus* ในการยับยั้งเชื้อ *Xanthomonas campestris* pv. *glycines.*** ภาควิชาโรคพืช, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สมคิด ดิสถาพร. 2540. **การป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี.** กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

สมบัติ ศรีชูวงศ์. 2534. โรคพืชที่เกิดจากเชื้อราใน Form-Class Deuteromycetes, น. 144-182. *ใน* ประสาทพร สมิตะมาน, บรรณาธิการ. **โรคพืชวิทยา.** ภาควิชาโรคพืช, คณะเกษตร, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

สุดธิดา แสงยนต์. 2548. **สมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากแบคทีเรียที่แยกได้จากดิน.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Ajayi, A.O. and O.E. Fagade. 2006. Growth pattern and structural nature of amylases produced by some *Bacillus species* in starchy substrates. **Afr. J. Biotechnol.** 5:440-444.

Ash, C., F.G. Priest and M.D. Collins. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus Paenibacillus. **Antonei Van Leeuwenhoek.** 64:253-260.

Asher, M., M.J. Javaid, S.U. Rahman and R.L. Legge. 2007. A thermostable α-amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starchy processing. **J. Food Eng.** 79:950-955.

Atrih, A. and S.J. Foster. 2002. Bacterial endospores the ultimate survivors. **Int. Dairy J.** 12:217-223.

Bacon, C.W. and D.M. Hinton. 2002. Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavensis* and related species. **Biological control.** 23:274-284.

Banik, R.M. and M. Prakash. 2004. Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. **Microbiol. Res.** 159:135-140.

Beaman., T.C. and P. Gerhardt. 1986. Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization, and thermal adaptation. **Appl. Environ. Microbiol.** 52:1242-1246.

Beg, Q.K. and R. Gupta. 2003. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis.* **Enzyme Microb. Technol.** 32:294-304.

Bender. G.R., and R.E. Marquis. 1985. Spore heat resistance and specific mineralization. **Appl. Environ. Microbiol.** 50:1414-1421.

Budi, S.W., D. Van Tuinen, G. Martinotti and S. Gianinazzi. 1999. Isolation from the *Sorghum bicolor* mycorrhizosphere of a bacterium conpatible with arbuscular mycorrhiza develoment and antagonistic towards soilborne fungal pathogens. **Appl. Environ. Microbiol.** 65:5148-5150.

_____, _____, C. Arnould, E. Dumas-Gaudot, V. Gianinazzi-Pearson and S. Gianinazzi. 2000. Hydrolytic enzyme activity of *Paenibacillus* sp. strain B2 and effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil-borne pathogenic fungi. **Appl. Soil Ecol.** 15:191-199.

Cavaglieri, L., J. Orlando, M.I. Rodríguez, S. Chulze and M. Etcheverry. 2005. Biological of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* in vitro and at the maize root level. **Research Biol.** 156:748-754.

Chang, W.T., Y.C. Chen and C.L. Jao. 2007. Antifungal activity and enhancement of Plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. **Biores. Technol.** 98:1224-1230.

Charney J., W.P. Fisher and C.P. Hegarty. 1951. Manganese as an essential element for sporulation in the genus *Bacillus*. **J. Bacteriol.** 62:145-148.

Chauhan,B. and R. Gupta. Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14. **Process Biochem.** 39:2115-2122.

Chung, B.H., Y. Cannon and R.C. Smith. 1976. Influence of growth temperature on glucose metabolism of a psychrotrophic strain of *Bacillus cereus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 31:39-45. Cited L. DeMay and A. Wilseens. 1970 The composition of the wash after fermentation of isotopic carbon compound by *Bacillus polymyxa* and *Bacillus maceran.* **Meded Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent.** 35:1183-1188.

Claus, D. and R.C.W. Berkeley. 1986. Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci, pp. 1105-1139. *In* Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe, J.G. Holt, M.D. Balimore, ed. **Bergey's Manul of Systematic bacteriology. Vol 2,** Williams and Wilkins.

da Mota, F.F., A. Nobrega, I.E. Marriel, E. Paiva and L. Seldin. 2002. Genetic diversity of *Paenibacillus polymyxa* populations isolated from the rhizosphere of four cultivars of maize (*Zea mays*) planted in Cerrado soil**. Appl. Soil Ecol.** 20:119-132.

Demoz, B.T. and L. Korsten. 2006. *Bacillus subtilis* attachment, colonization, and survival on avocado flowers and its mode of action on stem-end rot pathogens. **Biological Control.** 37:68-74.

de Vries, Y.P., R.D. Atmadja, L.M. Hornstra, W.M. de Vos and T.Abee. 2005. Influence of glutamate on growth, sporulation, and spore properties of *Bacillus cereus* ATCC 14579 in defined medium. **Appl. Environ. Microbiol.** 71:3248-3254.

Dhillon, A., J.K. Gupta, B.M. Jauhari and S. Khanna. 2000. A cellulase-poor, thermostable, alklitolerant xylanase produced by *Bacillus circulans* AB 16 grown on rice straw and its application in biobleaching of eucalyptus pulp. **Biores. Technol.** 73:273-277.

Dingman, D.W. and D.P. Stahly. 1983. Medium [rpmoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. **Appl. Environ. Microbiol.** 46:860-869.

Doi, R.H. 1989. Sporulation and germination, pp. 169-205. *In* C.R. Harwood, ***Bacillus*.** Plenum Press. London.

Duarte, M.C.T., E.P. Portugal, A.N. Ponezi, M.A. Bim and C.V. Tagliari. 1999. Production and purification of alkaline xylanses. **Biores. Technol.** 68:49-53.

Dunne, C., J.J. Crowley, Y. Moenne-Loccoz, D.N. Dowling, F.J. de Bruijin and F. O'Gara. 1997. Biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophila* W81 is mediated by extracellular proteolytic activity. **Microbiol.** 143:3921-3931.

Glick, B.R., C.L. Patten, G. Holguin and D.M. Penrose. 1999. **Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria.** Imperial College Press., Singapore.

Gordon, R.E. 1989. The genus *Bacillus*, pp. 109-126. *In* W.M. O'Leary, ed. **Practical Handbook of Microbiolgy.** CNC Press, Florida.

Hakamada, Y., K. Endo, S Takizawa, T. Kobayashi, T. Shirai, T. Yamane and S. Ito. 2002. Enzymatic propertes, crystallization, and deduced amino acid sequence of an alkaline endoglucanase from *Bacillus circulans*. **Biochimica Biophysica Acta.** 1570:174-180.

Hamilton, L.M., C.T. Kelly, W.M. Forgarty. 1999. Production and properties of the raw starch-digesting α-amylase of *Bacillus* sp. IMD 435. **Process Biochem.** 35:27-31.

Haq, I., H. Ashraf, J. Iqbal and M.A. Qadeer. 2003. Production of alpha amylase by *Bacillus licheniformis* using an economical medium. **Biores. Technol.** 87:57-61.

Hayashida, S., Y. Teramoto and T. Inoue. 1988. Production ans characteristics of raw-syarch-digesting α-amlylase from *Bacillus subtilis* 65. **Appl. Environ. Microbiol.** 54:1516-1522.

Heck, J.X., P.F. Hertz and A.Z. Ayub. 2002. Cellulase and xylanse production by isolated amazon *Bacillus* strains using soybeans industrial residues based solid-state cultivation**.** **Brazil. J. Microbiol.** 33:213-218.

Heck, J.X., S.H. Flores, P.F. Hertz, M.A.Z. Ayub. 2005. Optimization of cellulase-free xylanase activity produced by *Bacillus coagulans* BL69 in solid-state cultivation. **Process. Biochem.** 40:107-112.

Hensley, D.E., K.L. Smiley, J.A. Boundy and A.A. Lagoda. 1980. Beta-amylase production by *Bacillus polymyxa* on a corn steep-starch-salts medium. **Appl. Environ. Microbiol.** 39:678-680.

Hiradate, S., S. Yoshida, H. Sugie, H. Yada and Y. Fujii. 2002. Mulberry anthracnose antagonists (irturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. **Phytochem.** 61:693-698.

Huang, C.J., T.K. Wang, S.C. Chung and C.Y. Chen. 2005. Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28-9. **J. Biochem. Mol. Biol.** 38:82-88.

Idris, H.A., N. Labuschagne and L. Korsten. 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia. **Biological Control.** 40:97-106.

Igura, N., Y. Kamimura, M.S. Islam, M. Shimoda and I. Hayakawa. 2003. Effects of minerals on resistance of *Bacillus subtilis* spores to heat and hydrostatic pressure. **Appl. Environ. Microbiol.** 69:6307-6310.

Johnvesly, B., B.R. Manjunath and G.R. Naik. 2002. Pegeon pea waste as a novel, inexpensive, substrate for production of a thermostable alkali protease from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99. **Biores. Technol.** 82:61-64.

_____ and G.R. Naik. 2001. Studies on production of thermostable alkali protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. **Process Biochem.** 40:1263-1270.

Joo, H.S. and C.S. Chang. 2005. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties. **Proc. Biochem**. 40:1263-1270.

_____ and _____ . 2006. Production of an SDS-stable alkaline protease from an alkalophilic *Bacillus clausii* I-52 by submerged fermentation: feasibility as a laundry additive. **Enzyme Microb. Technol.** 38:176-183.

Jung, W.J., K.N. An, Y.L. Jin, R.D. Park, K.T. Lim, K.Y. Kim and T.H. Kim. 2003. Biological control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using chitinase-producing *Paenibacillus illinoisensis* KJA-424. **Soil Biol. and Biochem.** 35:1261-1264.

Konsula, Z. and M. Liakopoulou-Kyriakides. 2004. Hydrolysis of starch by the action of an α-amylase from *Bacillus subtilis*. **Process Biochem**. 39:1745-1749.

Krishnan, T. and A.K. Chandra. 1983. Purification and characterization of α-amylase from *Bacillus lolicheniformis* CUMC305. **Appl. Environ. Microbiol.** 46:430-437.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193:256-275.

Marquis, R. and G.R. Bender. 1985. Mineralization and heat resisitance of bacterial spores. **J. Bacteriol.** 161:789-791.

Marshall, J.J. 1974. characterization of *Bacillus polymyxa* amylase as an exo-acting (1→4)- α-D-glucan maltohydrolase. **FEBS Lett.** 46:1-4.

Matta, H. and V. Punj. 1998. Isolation and partial characterization of a thermostable extracellular protease of *Bacillus polymyxa* B-17. **Int. J. Food Microbiol**. 42:139-145.

Mavingui, P., G. Laguerre, O. Berge and T. Heulin. 1992. Genetic and phenotypic diversity of *Bacillus polymyxa* in soil and in wheat rhizosphere, **Appl. Environ. Microbiol.** 58:1894-1903.

Mawadza, C., R. Hatti-Kual, R. Zvauya and B. Mattiasson. 2000. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strain. **J. Biotechnol.** 83:177-187.

Mercier J. and S.E. Lindow. 2001. Field performance of antagonistic bacterial identified in novel laboratory assay for biological control of fire blight of pear. **Biol. Control.** 22:66-71.

Morales, P., A. Modarro, J.A. Perez-Gonzalez, J.M. Sendra, F. Pinaga and A. Flors. 1993. Purification and characterization of alkaline xylanases from *Bacillus polymyxa*. **Appl. Environ. Microbiol.** 59:1376-1382.

_____, _____, A. Flors, J.M. Sendra and J.A. Perez-Gonzalez. 1995. Purification of a xylanase and an arabinofuranosidase from *Bacillus polymyxa*. **Enzyme Microb. Technol.** 17:424-429.

Monteiro, L., R. de L.R. Mariano and M. Souto-Maior. 2005. Antagonism of *Bacillus* spp. against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris.* **Brazil. Arch. Biol. Technol.** 48:23-29.

Nakano, M.M., Y.P. Dailly, P. Zuber and D.P. Clark. 1997. Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth. **J. Bacteriol.** 179:6749-6755.

Nielsen, P. and J. Sørensen. 1997. Multi-target and medium-independent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. **FEMS Microbiol. Ecol.** 22:183-192.

Nilegaonkar S.S., V.P. Zambare, P.P. Kanekar, P.K. Dhakephalkar and S.S. Sarnaik. 2007. Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. **Biores. Technol.** 98:1238-1245.

Nickerson, K.W., J. de Pinto and L.A. Bulla, JR. 1974. Sporulation of *Bacillus thuringiensis* without concurrent depression of tricarboxylic acid cycle. **J. Bacteriol.** 117:321-323.

Olajuyigbe, F.M. and J.O. Ajele. 2005. Production dynamics of extracellular protease from *Bacillus* species. **Afr. J. Biotechnol.** 4:776-779.

Oomes, S.J.C.M. and S. Brul. 2004. The effect of metal ions commonly present in food on gene expression of sporulating *Bacillus subtilis* cells in relation to spore wet heat resistance. **Inno. Food Science Emerg. Technol.** 5:307-316.

Patel, R., M. Dodia and S.P. Singh. 2005. Extracellular alkali protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: production and optimization. **Process Biochem.** 40:3569-3575.

Paul, B., A. Chereyathmanjiyil, I. Masih, L. Chapuis and A. Benoît. 1998. Biological control of *Botrytis cinerea* causing grey mould disease of grapevine and elicitation of stilbene phytoalexin (resveratrol) by a soil bacterium. **FEMS Microbiol. Lett.** 165:65-70.

Paulus, H. and E. Gray. 1963. The iosynthesis of polymyxin B by growing culture of *Bacillus polymyxa.* **J. Biol. Chem.** 239:865-871.

Perrin H.B. and S.E. Jensen. 2002. *Paenibacillus polymyxa* produces fusaricidin-type antifungal antibiotics active against *Leptosphaeria maculans*, the causative agent of blackleg of canola. **Can. J. Microbiol.** 48:159-169.

Pichard, B., J.P. Larue and D. Thouvenot. 1995. Gavaserin and saltavalin, new peptide antibiotics produced by *Bacillus polymyxa.* **FEMS Microbiol. Lett.** 133:215-218.

Pham, P.L., P. Taillandier, M. Delmas and P. Strehaiano. 1998. Production of xylanses by *Bacillus polymyxa* using lignocellulosic wastes. **Indust. Crops Prod.** 7:195-203.

Poorna, C.A. and P. Prema. 2006. Production and partial characterization of endoxylanase by *Bacillus pumilus* using agro industrial residues. **Biochem. Eng. J.** 32:106-112.

_____ and _____. 2007. production of cellulose-free endoxylanase from novel alkalophilic thermotolerant *Bacillus pumilus* by solid-state fermentation and its application in wasrepaper recycling. **Biores. Technol.** 98:485-490.

Prakasham, R.S., Ch.S. Rao and P.N. Sarma. 2006. Green gram husk-an inexpensive substrate for alkali protease production by *Bacillus* sp. In solid-state fermentation. **Biores. Technol.** 97:1449-1454.

Pujol, M., E.Badosa, J. Cabrefiga and E. Montesinos. 2005. development of a strain-specific quantitative method for monitoring *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, a novel biocontrol agent of fire blight. **FEMS Microbiol. Lett. 249:343-352.**

Reiter, B., U. Pfeifer, H. Schwab and A. Sessitsch. 2002. Response of endophytic bacteria communities in potato plants to infection with *Erwina carotovora* subsp. *atroseptica.* **Appl. Environ. Microbiol.** 68:2261-2268.

Robson, L.M. and G.H. Chambliss. 1984. Characterization of the cellulolytic activity of *Bacillus* isolate. **Appl. Environ. Microbiol.** 47:1039-1046.

San-Lang, W., I.L. Shih, C.H. Wang, K.C Tseng, W.T. Chang, Y.K. Twu, J.J. Ro and C.L. Wang. 2002. Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis.* **Enzyme Microb. Technol.** 31:321-328.

Sedlák, M., V. Vinter, J. Adamec, J. Vohradský, Z. Voburka and J. Chaloupka. 1993. Heat shock applied early in sporulation affects heat resistance of *Bacillus megaterium* spores. **J. Bacteriol.** 175:8049-8052.

Setlow, B., S. Atluri, R. Kitchel, K. Koziol-Dube and P. Setlow. 2006. Role of dipicolinic acid in resistance and stability of spores of *Bacillus subtilis* with or without DNA-protective α/β-type small acid-soluble proteins. **J. Bacteriol.** 188:3740-3747.

Silva, H.S.A., R. de S. Romeiro, D. Macagnan, B. de A. Halfeld-Vieira, M.C.B. Pereira and A. Mounteer. 2004. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control.** 29:288-295.

Sittidilokratna, C., P. Vaithanomsat, S. Suthirawut, L. Chitradon, V. Punsuvon and Prianar Siriacha. 2007. Screening of pectinase producing bacteria and their efficiency in biopulping pf paper mulberry bark. **Science Asia.** 33:131-135.

Shida, O., H. Takagi, K. Kadowaki, L.K. Nakamura and K. Komakata. 1997. Transfer of *Bacillus alginplyticus, Bacillus chondroitinus, Bacillus acuedlanolyticus, Bacillus glucanolyticus, Bacillus kobensis* and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of genus *Paenibacillus.* **Int . J. Syst. Bacteriol.** 47:289-298.

Shikha, A. Sharan and N.S. Darmwal. 2007. Improved production of alkaline protease from a mutant of alkaophilic *Bacillus panthotheneticus* using molasses as a substrate. **Biores. Technol.** 98:881-885.

Sodhi, H.S., K. Sharma, J.K. Gupta and A.K. Soni. 2005. Production of a thermostable α-amylase from *Bacillus* sp. PS-7 by solid state fermentation and its synergistic use in the hydrolysis of malt starch for alcohol production. **Process Biochem.** 40:525-534.

Stoll, V.S. and J.S. Blanchard. 1990. Buffers: principles and practice, pp. 24-38. *In* Deutscher, M.P., editor**. Methods in enzymology Vol. 183, guide to protein purification.** Acadamic Press, Inc., California.

Takekawa, S., N. Uozumi, N. Tsukagoshi and S. Udaka. 1991. Protease involved in generation of β- and α- amylases from a large amylase precursor in *Bacillus polymyxa*. **J. Bacteriol.** 173:6820-6825.

Tautorus, T.E. and P.M. Townsley. 1983. Biological control of olive green mold in *Agaricus bisporus* cultivation. **Appl. Envion. Microbiol.** 45:511-515.

_____ and _____ . 1984. Analysis of an effective antibiotic (chaetomacin) isolated from a thermophilic *Bacillus* sp. Against olive green mold. **Appl. Envion. Microbiol**_47:775-779.

Teodoro, C.E. de S. and M.L.L. Martins. 2000. Culture conditions for the production of thermostable by *Bacillus* sp **Brazil. J. Microbiol.** 31:298-302.

Tindal, B.J. 2000. Whatis the type species of the genus *Paenibacillus*? Reques for an opinion. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 50:939-940. Cited Ash, C., F.G. Priest and M.D. Collins. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus Paenibacillus. **Antonei Van Leeuwenhoek.** 64:253-260.

Tseng, M.J., M.N. Yap, K. Ratanakhanokchai, K.L. Kyu and S.T. Chen. 2002. Purification and characterization of two cellulose free xylanases from an alkaliphilic *Bacillus firmus*. **Enzyme Microb. Technol.** 30:590-595.

von der Wied, I., E. Paiva, A. Nobrega, J.D. van Elsas and L. Seldin. 2000. Diversity of *Paenibacillus polymyxa* strains isolated from the rhizosphere of maize planted in Cerrado soil. **Res. Microbiol.** 151:369-381.

Wang, S.L and P.Y. Yeh. 2006. Production of a surfactant- and solvent-stable alkaliphilic protease by bioconversion of shrimp shell waste fermented by *Bacillus subtilis* TKU007. **Process Biochem.** 41:1545-1552.

_____, T.Y. Kao, C.L. Wang, Y.H. Yen, M.K. Chern and Y.H. Chen. 2006. A solvent stable metalloprotease produced by *Bacillus* sp. TKU004 and its application in the deproteinization of squid pen for β-chitin preparation. **Enzyme Microb. Technol.** 39:724-731.

Walker, R., A.A. powell and B. Seddon. 1998. *Bacillus* isolates from the spermosphere of peas and dwarf French beans with antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Pythium sp.* **J. Appl. Microbiol.** 84:791-801.

Warriner, K. and W.M. Waites. 1999. Enhanced sporulation in *Bacillus subtilis* grown on medium containing glucose:ribose. **Lett. Appl. Microbiol.** 29:97-102.

Watanabe, T., W. Oyanaku, K. Suzuki and H. Tanaka. 1990. Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. **J. Bacteriol.** 172:4017-4022.

Wen, C.M., C.S. Tseng, C.Y. Cheng and Y.K. Li. 2002. Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Bacillus* sp. NCTU2. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 35:213-219.

Wikipedia. 2007. Heat shock protein. **Heat shock protein.** Available source: http://en.wikipedia.org/wiki/Heat_shock_protein, February 18, 2007.

Xu, D. and J.C. Côte. 2003. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotides sequences. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 53:695-704.

Yang, J., P.D. Kharbanda and M. Mirza. 2004. Evolution of *Paenibacillus polymyxa* PKB1 for biocontrol of *Pythium* disease of cucumber in a hydroponic system. Available source: http://www.actahort.org/books/635/635_7.htm, January 15, 2004.

Yang, J.K., I.L. Shih, Y.M. Tzeng and S.L Wang. 2000. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. **Enzyme Microb. Technol.** 26:406-413.

Yu, G.Y., J.B. Sinclair, G.L. Hartman and B.L. Bertagnolli. 2002. Production of irtuin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani.* **Soil Biol. Biochem.** 34:955-963.

Zhang, C., X.H. Xing and M.S. Liu. 2004. Production of multienzyme consisting of alkali amylase and cellulose by mixed alkalophilic culture and their potential use in the saccharification of sweet potato. **Biochem. Eng. J.** 19:181-187.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารแข็งสำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์อะไมเลส (Starch Agar)

Soluble starch	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	50.0	มิลลิลิตร
Nutrient agar	1.0	ลิตร

ละลายแป้งจนหมดในน้ำ ผสมกับ Nutrient agar ที่กำลังหลอมเหลว
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
ตรวจผลการทดลองโดยราดด้วยสารละลายไอโอดีน ดูวงใสรอบโคโลนี

สารละลายไอโอดีน

Iodine	1.0	กรัม
KI	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

ละลาย Iodine และ KI ในน้ำกลั่นปริมาตรน้อยๆก่อน แล้วเติมน้ำให้ครบ เก็บในขวดสีชา

2. อาหารแข็งสำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส (Milk Agar)

A. skim milk 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50.0 มิลลิลิตร
B. agar 1.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50.0 มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ผสมกันแล้วเทลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

3. <u>อาหารแข็งสำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Budi *et al.*, 2000)</u>

$MgSo_4 \cdot 7H_2O$	0.1	กรัม
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.2	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.04	กรัม
NaCl	0.2	กรัม
KH_2PO_4	0.3	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
Caboxymethyl ccellulose (CMC)	5.0	กรัม
Yeast extract	0.1	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตรวจผลการทดลองโดยราดผิวหน้าด้วยสารละลาย Congo red เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นาน 15 นาที ล้างออกด้วยสารละลาย NaCl เข้มข้น 1 โมลาร์ ดูวงใสรอบโคโลนี

สารละลาย Congo red ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร
ชั่ง Congo red 0.1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย NaCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์
ชั่ง NaCl 5.85 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4. <u>อาหารแข็งสำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (ดัดแปลงจาก Pham *et al.*, 1998)</u>

Beef extract	1.0	กรัม
Yeast extract	2.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
Oat spelt xylan	1.0	กรัม

Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.4

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. <u>อาหารแข็งสำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์ไคติเนส (Dunne *et al.*, 1997)</u>

K_2HPO_4	0.8	กรัม
KH_2PO_4	0.2	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	0.5	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัม
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.01	กรัม
$FeCl_3 \cdot 76H_2O$	0.01	กรัม
$MgSo_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัม
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.001	กรัม
Cassamino acid	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

Colloidal chitin suspension ความเข้มข้น 1% (w/v) ในปริมาตรที่เท่ากัน

ปรับพีเอชเป็น 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Colloidal chitin (ชาญวิทย์, 2546)

ชั่งผงไคตินจากเปลือกกุ้ง 10 กรัม แช่ในกรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 85% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าแรงๆนาน 12 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่นจนมีค่าพีเอช 5.0 ปรับพีเอชด้วย NaOH จนมีค่าพีเอช 7.0 กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 เก็บ colloidal chitin ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

6. <u>อาหารเหลวสำหรับผลิตเอนไซม์โปรตีเอส (ดัดแปลงจากสุดธิดา, 2548)</u>

Glucose	5.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
K_2HPO_4	1.0	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัม
Skim milk	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

7. <u>อาหารเหลวสำหรับการผลิตเอนไซม์อะไมเลส (Hansley *et al.*, 1980)</u>

KCl	1.0	กรัม
$MgCl_2 \cdot 2H_2O$	0.2	กรัม
$NaHPO_4$	5.4	กรัม
$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	7.0	กรัม
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.25	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.005	กรัม
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	0.001	กรัม
Soluble starch	20.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. <u>อาหารเหลวสำหรับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Zhang *et al.*, 2004)</u>

CMC	20.0	กรัม
Tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
KH_2PO_4	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.0
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

9. <u>อาหารเหลวสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส (ดัดแปลงจาก Pham *et al.*, 1998)</u>

K_2HPO_4	0.75	กรัม
KH_2PO_4	0.5	กรัม
Oat spelt xylan	5.0	กรัม
Yeast extract	4.0	กรัม
Tryptic peptone	2.0	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	2.0	กรัม
Trace element solution	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.0
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Trace element solution (Shoham et al, 1993)

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.39	กรัม
Cu_4SO_4	0.62	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.60	กรัม

$MnSO_4$	0.59	กรัม
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.42	กรัม
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.79	กรัม
Na_2MoO_2	0.70	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

10. <u>Yeast extract potato dextrose agar (YPD Agar)</u>

Polypeptone	0.6	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Dextrose	3.0	กรัม
Agar	12.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.2
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

11. <u>Yeast extract potato dextrose soft agar (YPD Soft Agar)</u>

องค์ประกอบเหมือนกับอาหารสูตร YPD agar แต่ใช้ agar 6.0 กรัม

12. <u>Potato Dextrose Agar (PDA)</u>

มันฝรั่ง	200.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

13. <u>การสร้างกรดจากน้ำตาลดี-กลูโคส</u>

basal medium		
Diammonium hydrogenphosphate	1.0	กรัม
KCl	0.2	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
Yeast extract	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.0 ก่อนเติม ของ bromcresol purple เข้มข้น 0.04% (w/v)
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

สารละลายน้ำตาลกลูโคส
ละลายน้ำตาลน้ำตาลดี-กลูโคสนน้ำกลั่น ปริมาตรไม่ควรเกิน 10 มิลลิลิตร คำนวณให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5% แล้วกรองผ่านเมมเบรน เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.2 um จากนั้นผสมกับ basal medium ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

14. <u>อาหารแข็งสำหรับสร้างสปอร์สูตร Nutrient Agar ที่เติม $MnSO_4$</u>

เติม $MnSO_4 \cdot H_2O$ 50 มิลลิกรัม ลงใน NA ปริมาตร 1 ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

15. <u>อาหารแข็งสำหรับสร้างสปอร์สูตร Soil Extract Agar</u>

Glucose	1.0	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	500.0	มิลลิลิตร

Soil extract	500.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

Soil Extract

ชั่งดินสวน 500 กรัม ใส่ลงในน้ำ 1,500 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที กรองเอาแต่ส่วนใสผ่านผ้าขาวบาง แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง ถ้ายังขุ่นให้กรองซ้ำ ถ้ายังมีความขุ่นให้เติม $CaCO_3$ 0.5 กรัม ลงไปในส่วนใสที่กรองได้ ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที กรองด้วยกระดาษกรองอีกครั้ง

16. <u>อาหารแข็งสำหรับสร้างสปอร์สูตร AK Agar#2</u>

Pancreatic digest of gelatin	6.0	กรัม
Pancreatic digest of casein	4.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Beef extract	1.5	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
$MnSO_4$	0.3	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

17. <u>อาหารแข็งสำหรับสร้างสปอร์สูตร Glucose Yeast Extract-Salt Agar (GYS Agar)</u>

Glucose	1.0	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	0.4	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.82	กรัม

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.08	กรัม
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.07	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

18. <u>อาหารแข็งสำหรับสร้างสปอร์สูตร Nutrient Agar ที่เติม ccy</u>

เติม ccy ลงใน NA ปริมาตร 1 ลิตร ให้มีความเข้มข้นดังนี้

ccy salt solution		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.50	มิลลิโมลาร์
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.01	มิลลิโมลาร์
$Fe_2(SO_4)_3 \cdot 9H_2O$	0.05	มิลลิโมลาร์
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05	มิลลิโมลาร์
K_2SO_4	1.00	มิลลิโมลาร์
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	0.10	มิลลิโมลาร์

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

19. <u>อาหารเหลวสำหรับสร้างสปอร์</u>

องค์ประกอบเหมือนกับอาหารแข็ง แต่ไม่เติมวุ้น

20. <u>การเตรียม Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) buffer</u>

สารละลาย A: สารละลาย Tris(hydroxymethyl)aminomethane ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (24.2 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B: สารละลาย HCl ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

สารละลาย A + สารละลาย B *x* มิลลิลิตร เจือจางให้มีปริมาตรสุดท้าย 200 มิลลิลิตร

x (มิลลิลิตร)	พีเอช
5.0	9.0
8.1	8.8
12.2	8.6
16.5	8.4

21. <u>การเตรียม Phosphate buffer</u>

สารละลาย A: สารละลาย monobasic sodium phosphate ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ($NaH_2PO_4 \bullet 2H_2O$ 31.2 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B: สารละลาย dibasic sodium phosphate ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ($Na_2HPO_4 \bullet 7H_2O$ 53.65 กรัม หรือ $Na_2HPO_4 \bullet 12H_2O$ 71.7 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

เตรียมโดยผสมสารละลาย A และ B ตามพีเอชที่ต้องการ เจือจางให้มีปริมาตรสุดท้าย 200 มิลลิลิตร

A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	พีเอช	A (มิลลิลิตร)	B (มิลลิลิตร)	พีเอช
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.5	90.5	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	46.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรตีเอส (ดัดแปลงจากเสุดธิดา, 2548)

1.1 สารเคมี

1.1.1 สารละลายเคซีน (casein) ใช้สารละลายเคซีนเข้มข้น 2% เป็นซับสเตรต เตรียมโดยชั่งเคซีน 2 กรัม ละลายด้วย Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 และ 4.0 (ภาคผนวก ก ข้อ 20) ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

1.1.2 สารละลาย trichloroacetic acid (TCA) 10% ใช้หยุดกิจกรรมของเอนไซม์ เตรียมโดยชั่ง trichloroacetic acid 10 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

1.2 การวิเคราะห์

1.2.1 นำสารละลายเอนไซม์มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 และ 4.0

1.2.2 ปิเปตสารละลายเคซีนเข้มข้น 2% มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง อุ่นสารละลายเคซีนและสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางแล้วในอ่างน้ำร้อนที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

1.2.3 เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายเคซีนบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย TCA ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เพื่อให้โปรตีนตกตะกอน

1.2.4 ทำหลอดควบคุม โดยเติมสารละลาย TCA ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายเคซีน 1 มิลลิลิตร และสารละลายเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร

1.2.5 นำสารละลายจากข้อ 1.2.3 มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 นำส่วนใสมาวิเคราะห์ประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการย่อยโปรตีน โดยวัดปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นเทียบกับสารละลายไทโรซีนมาตรฐาน ตามวิธีของ Lowry (Lowry, 1951)

1.2.6 การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)} = \frac{(T_1-T_0) \times V \times D}{t}$$

T_1 คือ ความเข้มข้นของไทโรซีนที่วัดได้ภายหลังจากเอนไซม์เกิดกิจกรรม

T_0 คือ ความเข้มข้นของไทโรซีนที่วัดได้จากหลอดควบคุม

V คือ ปริมาตรทั้งหมดในการทดลอง ซึ่งเท่ากับ 4 มิลลิลิตร

D คือ ความเจือจางของเอนไซม์

t คือ เวลาที่ใช้บ่มเอนไซม์กับซับสเตรต ซึ่งเท่ากับ 10 นาที

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์เท่ากับปริมาณของเอนไซม์โปรตีเอสที่สามารถย่อยเคซีนแล้วเกิดไทโรซีน 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเวลา 1 นาที

2. <u>การวิเคราะห์ปริมาณไทโรซีน (Lowry *et al.*, 1951)</u>

2.1 สารเคมี

2.1.1 สารละลายไทโรซีน (tyrosine) มาตรฐาน ชั่งไทโรซีนด้วยเครื่องชั่งละเอียด 0.1000 กรัม ใส่ลงในขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บเป็น stock solution จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของไทโรซีนตั้งแต่ 20-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.1.2 การเตรียมสารละลาย Lowry

สารละลาย A: ละลาย copper sulfate 0.5 กรัม และ sodium citrate 1 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร

สารละลาย B: ละลาย sodium carbonate 20.0 กรัม และ NaOH 4.0 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร

สารละลาย C: นำสารละลาย A มา 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย B 50 มิลลิลิตร

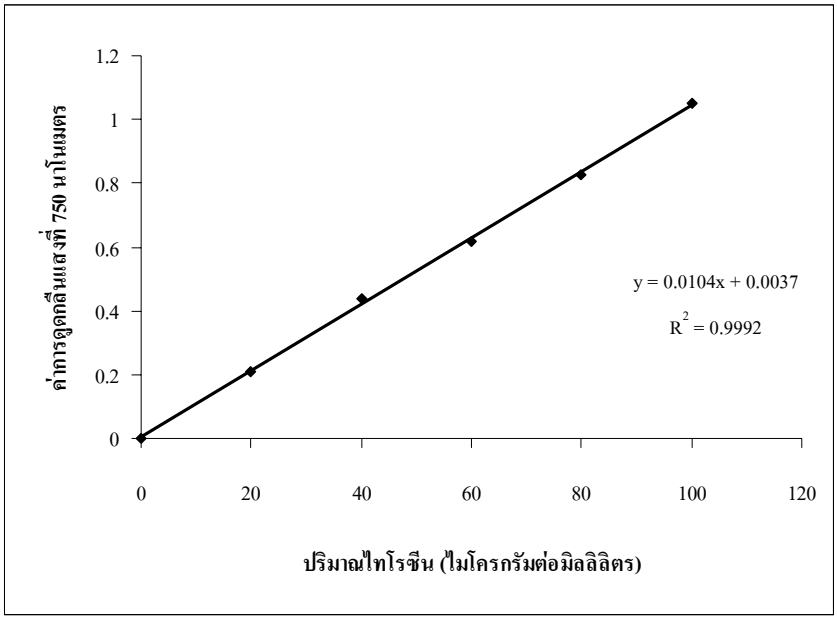
สารละลาย D: สารละลาย Folin-Ciocalteau ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

2.2 วิธีวิเคราะห์

2.2.1 สร้างกราฟมาตรฐานของไทโรซีน โดยเจือจางสารละลายมาตรฐานไทโรซีนให้มีความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2.2 ใส่สารละลายตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐาน 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด ส่วน blank จะใช้ Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์แทน

2.2.3 เติมสารละลาย C หลอดละ 2.5 มิลลิลิตร ลงในข้อ 2.2.2 ทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย D หลอดละ 0.25 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 20-30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่องเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณไทโรซีน นำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาเปรียบเทียบหาความเข้มข้นของไทโรซีน และคำนวณหาปริมาณไทโรซีน



ภาพผนวกที่ ข 1 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของไทโรซีน

3. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เบตาอะไมเลส

3.1 สารเคมี

สารละลาย soluble starch ใช้สารละลาย soluble starch เข้มข้น 1% เป็นซับสเตรต เตรียมโดยชั่ง soluble starch 1 กรัม ต้มให้ละลายด้วย Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 (ภาคผนวก ก ข้อ 21) ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

3.2 การวิเคราะห์

3.2.1 นำสารละลายเอนไซม์มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0

3.2.2 ปิเปตสารละลาย soluble starch เข้มข้น 1% มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง อุ่นสารละลาย soluble starch และสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางแล้วในอ่างน้ำร้อนที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

3.2.3 เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย soluble starch 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้ววิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เทียบกับกราฟมาตรฐาน

3.2.4 ทำหลอดควบคุม โดยเติม DNS reagent ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบที่มีสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เทียบกับกราฟมาตรฐาน

3.2.5 การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เบตาอะไมเลส

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)} = \frac{(RS_{10}-RS_0) \times 2 \times D}{\text{M.W. of maltose} \times t}$$

RS_{10} คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้ภายหลังจากเอนไซม์เกิดกิจกรรม
RS_0 คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากหลอดควบคุม
D คือ ความเจือจางของเอนไซม์
t คือ เวลาที่ใช้บ่มเอนไซม์กับซับสเตรต ซึ่งเท่ากับ 10 นาที

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์เบตาอะไมเลสเท่ากับปริมาณของเอนไซม์เบตาอะไมเลสที่สามารถย่อย soluble starch แล้วเกิดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่าน้ำตาลมอลโตส 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่ทดสอบ

4. <u>การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์</u>

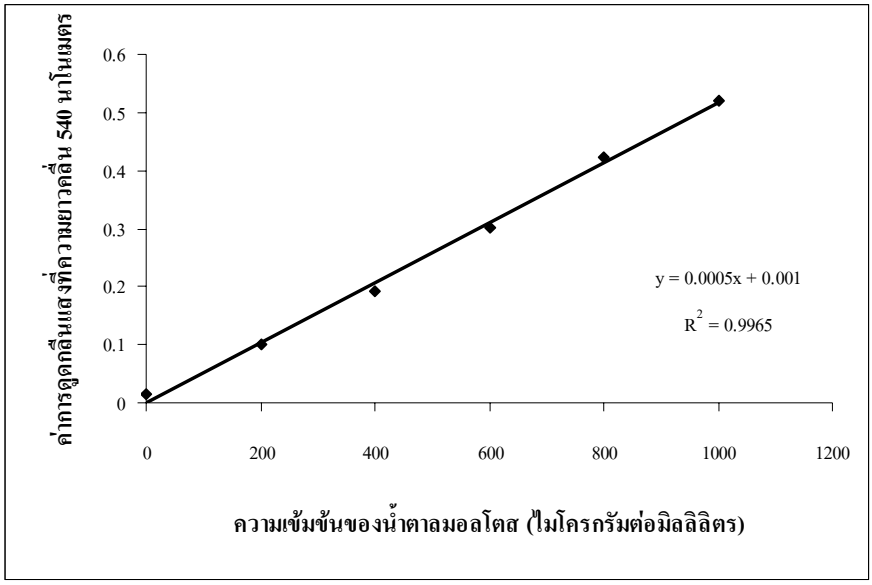
4.1 สารเคมี

DNA reagent เตรียมโดยชั่ง 3,5 dinitrosalicylic acid 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมฟีนอล 2 กรัม แล้วเติมโซเดียมไนไตรต์ 0.5 กรัม ค่อยๆเติมสารละลายโซเดียมทาร์เทรต (โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต 200 กรัม ที่อยู่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2%

ปริมาตร 500 มิลลิลิตร) คนให้เข้ากัน นำไปอังในอ่างน้ำร้อนจนสารละลายใส จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

4.2 วิธีวิเคราะห์

สร้างกราฟมาตรฐานของน้ำตาลมอลโตส โดยเจือจางสารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโตสให้มีความเข้มข้น 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เติม DNS reagent ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 5 นาที แล้วทำให้เย็นทันที เติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์



ภาพผนวกที่ ข 2 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส

5. <u>การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส</u>

5.1 สารเคมี

สารละลาย carboxymethyl cellulose (CMC) ใช้สารละลาย CMC เข้มข้น 1% เป็นซับสเตรต เตรียมโดยชั่ง CMC 1 กรัม ต้มให้ละลายด้วย Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 (ภาคผนวก ก ข้อ 21) ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

5.2 การวิเคราะห์กิจกรรม endo-1,4-β-glucanase

5.2.1 นำสารละลายเอนไซม์มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0

5.2.2 ปิเปตสารละลาย CMC เข้มข้น 1% มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง อุ่นสารละลาย CMC และสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางแล้วในอ่างน้ำร้อนที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

5.2.3 เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย CMC 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้ววิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เทียบกับกราฟมาตรฐาน ดังวิธีในข้อ 4 โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน

5.2.4 ทำหลอดควบคุม โดยเติม DNS reagent ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบที่มีสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ดังวิธีในข้อ 4 เทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน

5.2.5 การคำนวณกิจกรรมเซลลูเลส

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)} = \frac{(RS_{10}-RS_0) \times 2 \times D}{\text{M.W. of glucose} \times t}$$

RS_{10} คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้ภายหลังจากเอนไซม์เกิดกิจกรรม

RS_0 คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากหลอดควบคุม

D คือ ความเจือจางของเอนไซม์

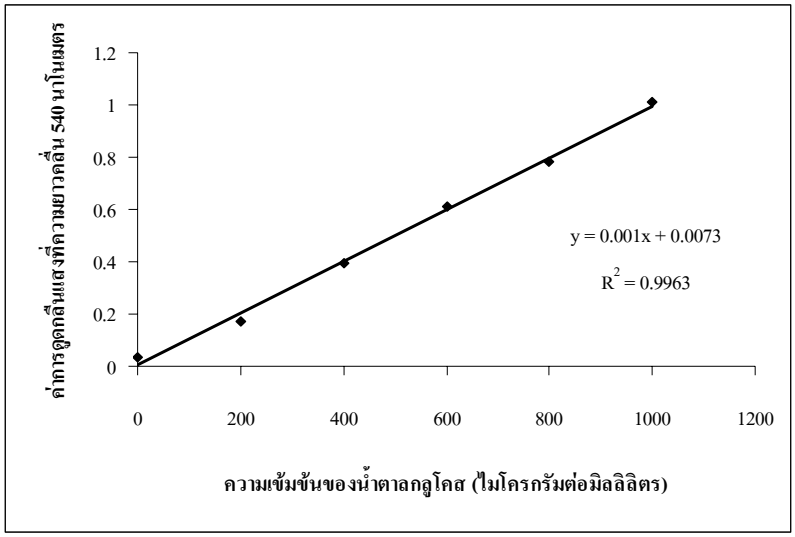
t คือ เวลาที่ใช้บ่มเอนไซม์กับซับสเตรต

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับปริมาณของเอนไซม์อะไมเลสที่สามารถย่อย CMC หรือกระดาษกรอง แล้วเกิดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่าน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่ทดสอบ

5.3 การวิเคราะห์กิจกรรม exo-1,4-β-glucanase

5.3.1 นำสารละลายเอนไซม์มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0

5.3.2 อุ่นสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วใส่กระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาดกว้าง 10x60 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เทียบกับกราฟมาตรฐาน ตามวิธีในข้อ 4 เทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน คำนวณกิจกรรมของ exo-1,4-β-glucanase ตามวิธีในข้อ 5.2.5



ภาพผนวกที่ ข 3 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

6. <u>การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส</u>

6.1 สารเคมี

สารละลาย soluble oat spelt xylan ใช้สารละลาย soluble oat spelt xylan เข้มข้น 1% เป็นซับสเตรต เตรียมโดยชั่ง oat spelt xylan 2 กรัม ต้มให้ละลายด้วย Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 (ภาคผนวก ก ข้อ 21) ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร แล้วแยกเอาแต่ส่วนที่ละลายน้ำโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำส่วนใสมาใช้เป็นซับสเตรต นำส่วนที่ไม่ละลายน้ำไปล้างด้วยน้ำกลั่นหลายๆครั้ง อบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 1 คืน ชั่งน้ำหนักได้ประมาณ 1 กรัม (ปาริชาต, 2549)

6.2 การวิเคราะห์

6.2.1 นำสารละลายเอนไซม์มาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย Phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0

6.2.2 ปิเปตสารละลาย soluble oat spelt xylan เข้มข้น 1% มา 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง อุ่นสารละลาย soluble oat spelt xylan และสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางแล้วในอ่างน้ำร้อนที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

6.2.3 เติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย soluble oat spelt xylan 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้ววิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เทียบกับกราฟมาตรฐาน ดังวิธีในข้อ 4

6.2.4 ทำหลอดควบคุม โดยเติม DNS reagent ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบที่มีสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยใช้น้ำตาลไซโลสเป็นสารละลายมาตรฐาน

6.2.5 การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)} = \frac{(RS_{10}-RS_0) \times 2 \times D}{\text{M.W. of xylose} \times t}$$

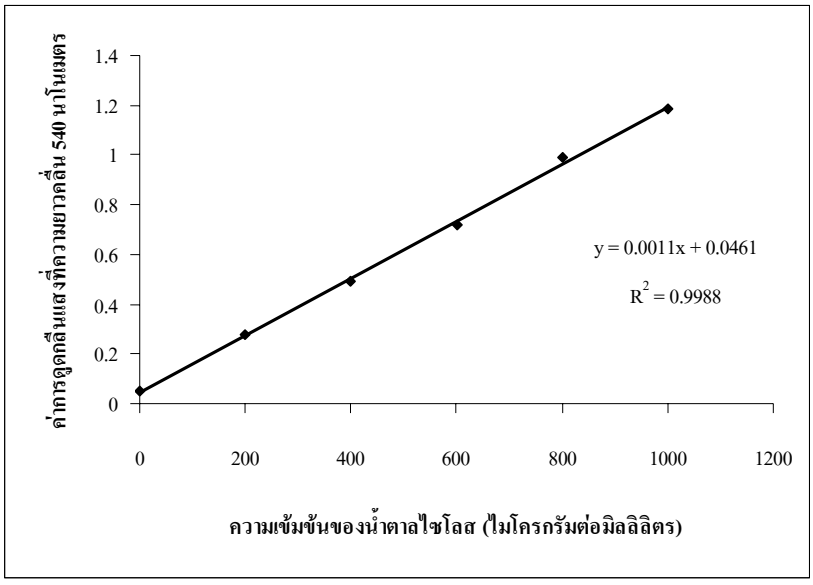
RS_{10} คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้ภายหลังจากเอนไซม์เกิดกิจกรรม

RS_0 คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้จากหลอดควบคุม

D คือ ความเจือจางของเอนไซม์

t คือ เวลาที่ใช้บ่มเอนไซม์กับซับสเตรต ซึ่งเท่ากับ 10 นาที

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ไซลาเนสเท่ากับปริมาณของเอนไซม์ไซลาเนสที่สามารถย่อย soluble oat spelt xylan แล้วเกิดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์เทียบเท่าน้ำตาลไซโลส 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่ทดสอบ



ภาพผนวกที่ ข 4 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส

ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง

1. การจำแนก *Bacillus* sp. ระดับสปีชีส์โดย Biolog Sytem

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			●	●	●	50%						
B	●		●	●	●		●		50%	50%	●	
C	●	●	●	●	●	●		●	50%	50%		
D	●		●	50%	●		●	●			●	●
E		●	●		●							
F						50%						
G												●
H				●								

ภาพผนวกที่ ค 1 pattern การใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด โดย *Paenibacillus polymyxa* สายพันธุ์ N10 จากการทดลอง 2 ครั้ง โดยที่มีการเจริญทั้ง 2 ซ้ำ (●) หรือมีการเจริญเพียง 1 ซ้ำ (50%)