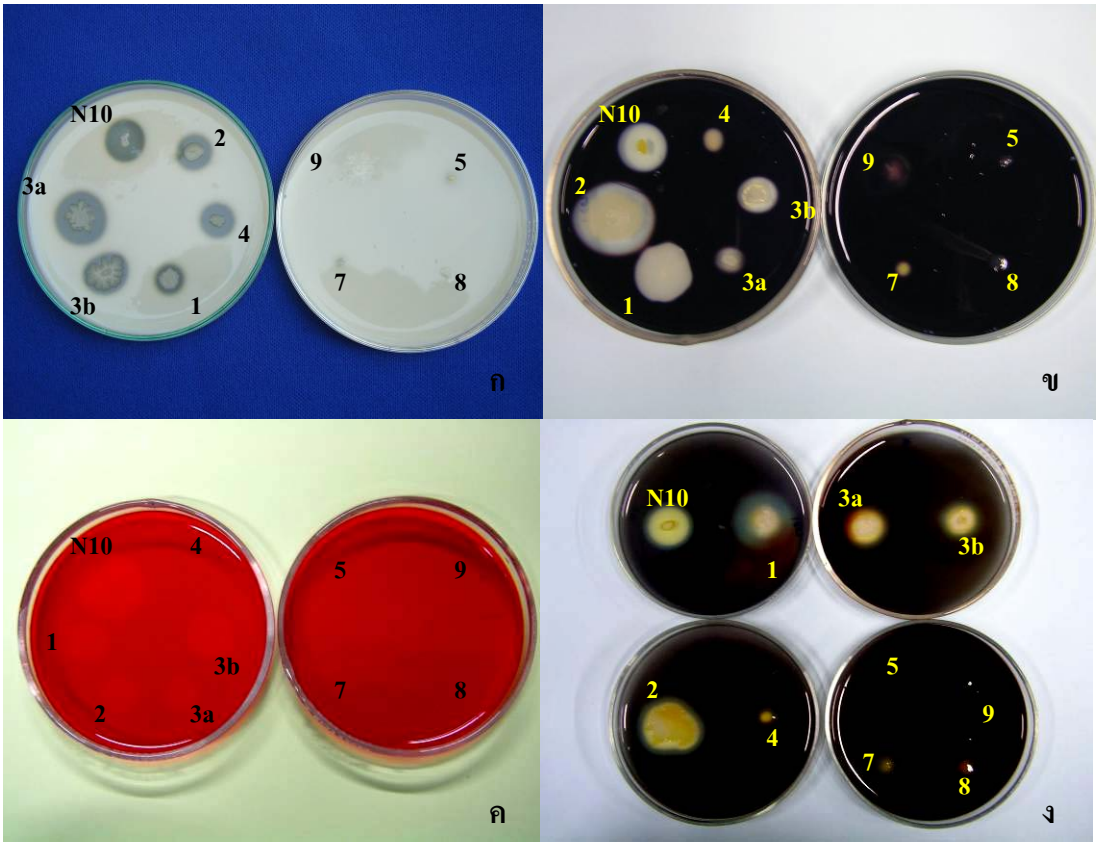


ภาพที่ 7 การผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์ โปรตีเอส, อะไมเลส, เซลลูเลสและไซลาเนสบนอาหารแข็ง โดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 (N10) และ *Bacillus* sp. (1-9 คือ LDD1-LDD9) ที่แยกจากสารเร่งปุ๋ยหมัก พด.1

ก. ทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส ข. ทดสอบการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

ค. ทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ง. ทดสอบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

P. polymyxa สายพันธุ์ N10, แบคทีเรียสายพันธุ์ LDD2 ที่คล้าย *B. licheniformis* , แบคทีเรียสายพันธุ์ LDD3a และ LDD3b ที่คล้าย *B. subtilis* ผลิตเอนไซม์ 4 ชนิดคือ โปรตีเอส อะไมเลส เซลลูเลส และไซลาเนส แบคทีเรียสายพันธุ์ LDD1 ที่คล้าย *B. subtilis* ผลิตเอนไซม์ 3 ชนิดคือ โปรตีเอส อะไมเลส และเซลลูเลส *B. megaterium* สายพันธุ์ LDD4, *B. firmus* สายพันธุ์ LDD7 และ LDD9 เอนไซม์ได้ 2 ชนิดคือโปรตีเอส และอะไมเลส ส่วน unidentified *Bacillus* sp. สายพันธุ์ LDD5 และ LDD8 ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ และไม่มี *Bacillus* sp. สายพันธุ์ใดสามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนส จะเห็นว่า *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ผลิตเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดดีกว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์อื่นอย่างเห็นได้ชัดโดยมีค่า Cz/Co สูงกว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์อื่นประมาณ 2-4 เท่า แบคทีเรียสายพันธุ์ LDD3a และ LDD3b ที่คล้าย *B. subtilis* มีค่า Cz/Co ใกล้เคียงกันทุกเอนไซม์

ประกอบกับคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาที่เหมือนกันทุกประการ จึงทำให้สามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์นี้น่าจะเป็นชนิดเดียวกัน *B. firmus* สายพันธุ์ LDD7 ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและอะไมเลส เพียง 2 ชนิด และสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูง

3.1 การผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์โดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ในอาหารเหลว

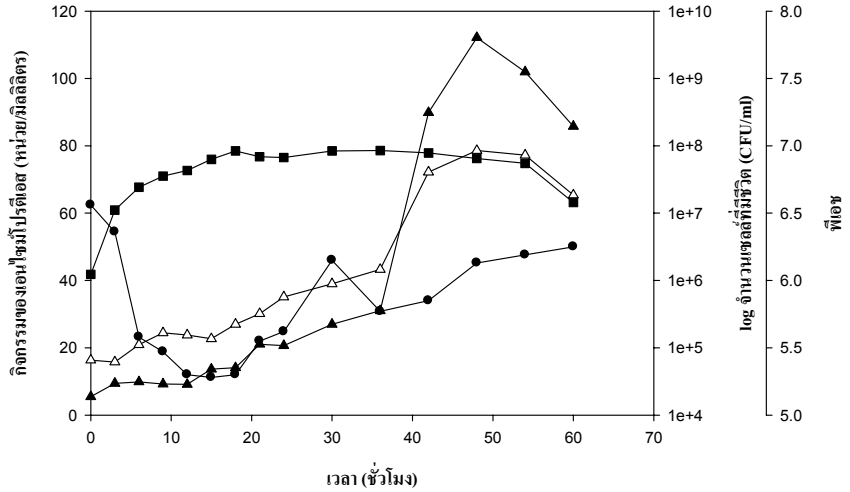
เตรียม *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ในอาหาร NB ที่มีน้ำตาลกลูโคส 0.5 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อยู่ในฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 12 ชั่วโมง ปั่นแยกตะกอนเซลล์เพื่อเป็นกล้าเชื้อปริมาณ 5% ถ่ายลงอาหารเหลวสำหรับการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส อะไมเลส เซลลูเลส และไซลาเนส ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆกัน เพื่อวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ และกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ดังแสดงในผลการทดลองต่อไปนี้

3.2.1 การผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

การผลิตเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสและแอสิดโปรตีเอสในอาหาร BMSM broth สูตรดัดแปลงโดยมี skim milk เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โดยวัดปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้นหลังจากย่อยซับสเตรต คือสารละลายเคซีนที่มีความเข้มข้น 2% ใน Tris-HCl buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 สำหรับเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสและ พีเอช 4.0 สำหรับเอนไซม์แอสิดโปรตีเอส

การผลิตเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอส และแอสิดโปรตีเอสเป็นไปในลักษณะเดียวกัน คือกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเรื่อยๆใน 36 ชั่วโมงแรก และกิจกรรมของแอสิดโปรตีเอสสูงกว่านิวทรัลโปรตีเอส กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 36-48 และสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งเป็นช่วงที่การเจริญของเซลล์อยู่ในระยะ stationary phase กิจกรรมของนิวทรัลโปรตีเอสเท่ากับ 112.16 หน่วยต่อมิลลิลิตร และแอสิดโปรตีเอส 78.60 หน่วยต่อมิลลิลิตร และพบว่าตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 จนสิ้นสุดการทดลองในชั่วโมงที่ 60 กิจกรรมของนิวทรัลโปรตีเอสสูงกว่าแอสิดโปรตีเอส

ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ใช้หมักเท่ากับ 1.23x10^6 CFU/ml แบคทีเรีย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 เพิ่มจำนวนสูงสุดเท่ากับ 6.90 x 10^7CFU/ml ในชั่วโมงที่ 21 จากนั้นจำนวนของเซลล์ค่อนข้างคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 54 แล้วจึงลดลง พีเอชเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.56 ลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 12 ชั่วโมงเหลือ 5.30 แล้วคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 18 จากนั้นค่าพีเอชเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วอีกครั้งจนถึงชั่วโมงที่ 30 มีค่าพีเอชเท่ากับ 6.15 แล้วลดลงเหลือ 5.77 จากนั้นเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนสิ้นสุดการทดลองมีค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.25 ช่วงที่ค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นครั้งสุดท้ายเป็นสัญญาณว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสกำลังเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว



ภาพที่ 8 การเจริญและการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสโดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 กิจกรรมของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอส (▲), แอสิดโปรตีเอส (△), จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (■) และ พีเอช(●)

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสจาก *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 เลือกวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ในช่วงพีเอชที่เป็นกรดและเป็นกลาง เนื่องจากขั้นตอนการจำแนกโดยคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยา พบว่า *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 เจริญที่พีเอชเป็นกรด (5.7) และเป็นกลาง (6.8) ประกอบกับเคยมีรายงานว่า *P. polymyxa* ผลิตเอนไซม์โปรตีเอสที่มีกิจกรรมสูงสุดในช่วงพีเอชเป็นกลาง โดยที่ Matta and Punj (1998) เพาะเลี้ยง *B. polymyxa* สายพันธุ์ B-17 ในอาหาร TDYA ที่มีพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 และรายงานว่าเอนไซม์โปรตีเอสบริสุทธิ์ของ *B . polymyxa* สายพันธุ์ B-17 มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 7.5 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับ Larson *et al.* (2006) และ Takekawa *et al.* (1991) ที่วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสจาก *B. polymyxa* ที่พีเอช 7.5

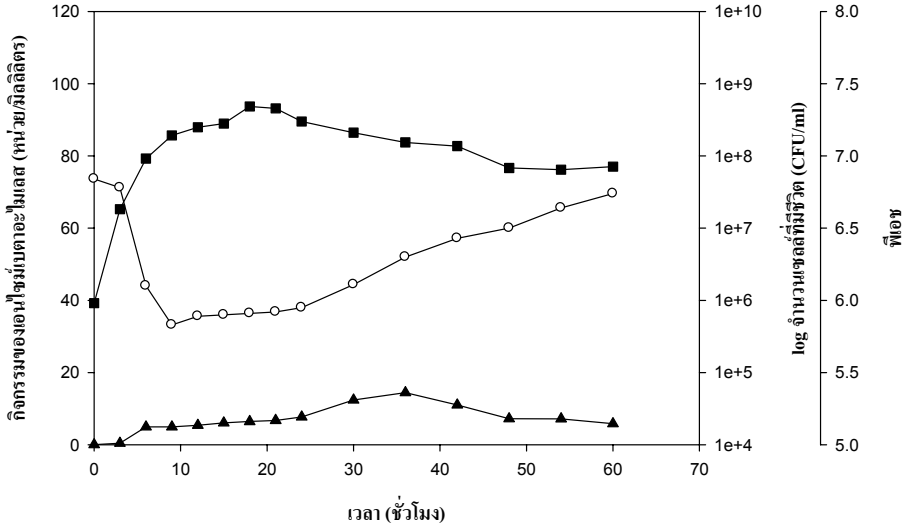
เอนไซม์โปรตีเอสจาก *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 มีกิจกรรมสูงสุดเมื่อเซลล์เจริญอยู่ในระยะปลาย stationary phase (ชั่วโมงที่ 48) คือมีกิจกรรมของเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสและแอสิดโปรตีเอส เท่ากับ 112.16 และ 78.60 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ Patel *et al.* (2005) รายงานว่าการผลิตอัลคาไลน์โปรตีเอสจาก *B. pseudofirmus* สายพันธุ์ Ve1 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Gelatin Broth พีเอช 9.0 เขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมสูงสุด (410 หน่วยต่อมิลลิลิตร) เมื่อการเจริญของเซลล์อยู่ในช่วงต้นระยะ stationary phase (ชั่วโมงที่ 68) และNilegaonkar *et al.* (2007) รายงานว่า *B. cereus* สายพันธุ์ MCM B-326 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร Starch Soybean Meal Medium พีเอช 9.0 เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสสูงสุด (126.87±1.32 หน่วยต่อมิลลิลิตร) เมื่อการเจริญของเซลล์อยู่ในช่วงต้น stationary phase (ชั่วโมงที่ 36) แต่มีรายงานว่า *Bacillus* บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ได้เร็ว เช่น Shikha *et al.* (2007) รายงานว่า *B. pantotheneticus* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส, peptone, yeast extract, KH_2PO_4 และ $MgSO_4 \bullet H_2O$ พีเอช 10.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรใน ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าที่ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสได้สูงสุด (68 หน่วยต่อมิลลิลิตร) เมื่อเซลล์อยู่ในระยะ exponential phase (ชั่วโมงที่ 24) ในการศึกษานี้สังเกตว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสจาก *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 มีกิจกรรมสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 จากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเรื่อยๆจนสิ้นสุดการทดลอง เช่นเดียวกับ *B. pseudofirmus* สายพันธุ์ Ve1 (Patel *et al.*, 2005), *B. cereus* สายพันธุ์ MCM B-326 (Nilegaonkar *et al.*, 2007) และ *B. pantotheneticus* (Shikha *et al.*,2007) ที่เป็นเช่นนี้ Nilegaonkar *et al.* (2007) กล่าวว่าอาจเกิดจากการย่อยสลายตัวเองของเอนไซม์

3.2.2 การผลิตเอนไซม์อะไมเลส

ศึกษาการผลิตเอนไซม์เบตาอะไมเลสจาก *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบตาอะไมเลสโดยวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลมอลโตสที่เกิดขึ้นหลังจากย่อยซับสเตรตคือ soluble starch ความเข้มข้น 1% ใน phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0

ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 9 พบว่าในระยะ 3 ชั่วโมงแรก *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ผลิตเอนไซม์เบตาอะไมเลสพียงเล็กน้อย หลังจากชั่วโมงที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์เบตาอะ

ไมเลสเพิ่มขึ้น และสูงสุดเท่ากับ 14.45 หน่วยต่อมิลลิลิตรในชั่วโมงที่ 36 ซึ่งเจริญของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 อยู่ในระยะ stationary phase จากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงจนสิ้นสุดการทดลอง การเจริญของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 9 ชั่วโมง แล้วค่อนข้างคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 42 ค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อใน 9 ชั่วโมงแรกลดลงอย่างรวดเร็ว คือลดลงจาก 6.84 เหลือ 5.83 ซึ่งอาจเกิดจากการสะสมกรดอินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ อาจเกิดจากการใช้กรดอินทรีย์ที่สะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อสิ้นสุดการทดลองอาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชเท่ากับ 6.85



ภาพที่ 9 การเจริญและการผลิตเอนไซม์เบตาอะไมเลสโดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10
กิจกรรมของเอนไซม์เบตาอะไมเลส (▲), จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (■) และ พีเอช (○)

Bacillus sp. ผลิตเอนไซม์อะไมเลสที่มีกิจกรรมของแอลฟาอะไมเลส ซึ่งย่อยสลายพันธะ α-1,4 glycosidic แบบสุ่มภายในโมเลกุลของแป้ง ได้สารผสมของมอลโตส มอลโตไทรโอส และโอลิโกแซคคาไรด์คือเด็กซ์ตริน ที่ประกอบด้วยกิ่ง α-1,6 และ เบตาอะไมเลส ซึ่งย่อยสลายพันธะ α-1,4 glycosidic โดยตัดพันธะจากปลาย non-reducing เข้ามาทีละ 2 โมเลกุล ได้น้ำตาลมอลโตส และเด็กซ์ตริน การศึกษาครั้งนี้วิเคราะห์เพียงกิจกรรมของเอนไซม์เบตาอะไมเลสเท่านั้น เนื่องจากมีรายงานว่าเอนไซม์อะไมเลสจาก *P. polymyxa* มีเฉพาะกิจกรรมของเบตาอะไมเลส (Ajayi and Fagade, 2006; Hensley *et al.*, 1980; Marshall, 1974)

กิจกรรมของเอนไซม์เบตาอะไมเลสสูงสุดที่พบใน *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 เท่ากับ 14.45 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่ากิจกรรมของเอนไซม์เบตาอะไมเลสจาก *B. polymyxa*

สายพันธุ์อื่น เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่มีผู้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ อาจเป็นเพราะมีแหล่งคาร์บอนและสภาวะการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกัน เช่น *B. polymyxa* สายพันธุ์ NRRL B-367 ที่ Hensley *et al.* (1980) รายงานว่าเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี soluble starch 8% และ corn steep 4% เป็นแหล่งคาร์บอน อาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.8 โดยเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 20 ลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 10 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิให้เท่ากับ 35 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และให้อากาศ 1.0 VVM สามารถผลิตเอนไซม์เบตาอะไมเลสที่มีกิจกรรม 6.04 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ Ajayi and Fagade (2006) รายงานว่า *B. polymyxa* สายพันธุ์ WBP ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 200 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีกิจกรรมของเอนไซม์เบตาอะไมเลส 6.0 และ 1.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในอาหารที่มีแป้งข้าวโพดและ soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอนตามลำดับ

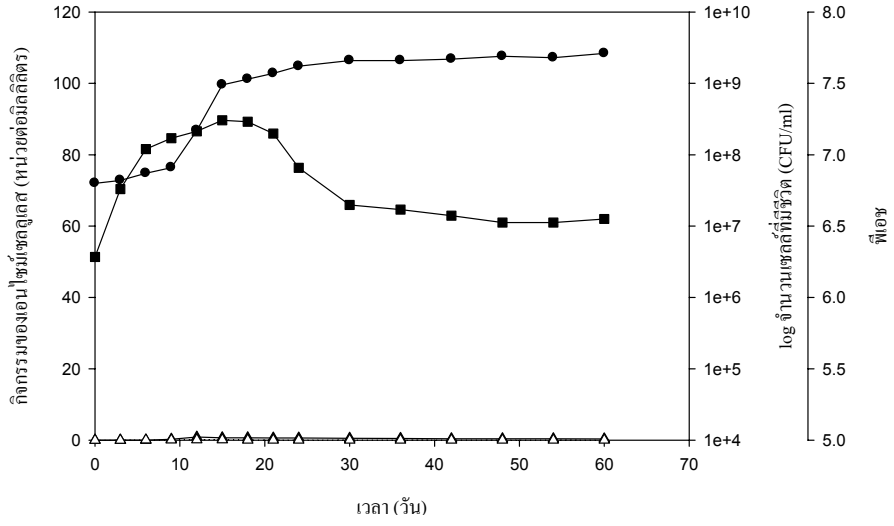
อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเอนไซม์อะไมเลส (Hensley *et al.*, 1980) ทำให้ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 เจริญดี สามารถเพิ่มจำนวนจาก $9.15x10^5$ CFU/ml และมีจำนวนมากกว่า 10^8 เป็นระยะเวลานาน คือระหว่างชั่วโมงที่ 9-42 อาหารเหลวสำหรับผลิตเอนไซม์อะไมเลสในการศึกษานี้มี peptone เป็นองค์ประกอบ ซึ่ง Teodoro and Martins (2000) กล่าวว่า peptone เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์ นอกจากนี้ Hamilton *et al.* (1999) พบว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ IMD 435 ที่เจริญในอาหารที่มี yeast extract เป็นองค์ประกอบ มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงกว่าเมื่อเจริญในอาหารที่มี bactopeptone เป็นองค์ประกอบ

เอนไซม์เบตาอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ส่วนมากได้จากพืช มีจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ เช่น *B. cereus, B. polymyxa, B. licheniformis, B. megaterium*, *Stretococcus* sp., *Pseudomonas* sp. และ *Rhizopus japonicus*แต่เอนไซม์เบตาอะไมเลสจากจุลินทรีย์สามารถทนความร้อนสูงกว่าเอนไซม์จากพืช เอนไซม์เบตาอะไมเลสสามารถย่อยแป้งที่สายโซ่ที่ปลายด้าน non-reducing ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลมอลโตส ส่วนเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ย่อยแป้งแบบสุ่ม ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารผสมของมอลโตส มอลโตไทรโอส และโอลิโกแซคคาไรด์ คือ เด็กซ์ตริน การที่ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 สามารถผลิตเอนไซม์เบตาอะไมเลส จึงเป็นข้อดีสำหรับการนำไปใช้ร่วมกับจุลินทรีย์อื่นสำหรับย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เพื่อทำปุ๋ยหมัก เนื่องจากได้ผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดเล็กที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ง่ายกว่าผลิตภัณฑ์จากการย่อยของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

3.2.3 การผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

การศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (CMC) เป็นแหล่งคาร์บอน แล้ววิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสทั้ง endo-1,4-β-glucanase ที่ย่อยสลาย CMC ซึ่งเป็นเซลลูโลสที่โครงสร้างไม่เป็นผลึก (amorphous cellulose) และ exo-1,4-β-glucanase ที่ย่อยสลายกระดาษกรอง Whatman No.1 ที่มีโครงสร้างที่เป็นผลึก (crystalline cellulose) โดยวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นหลังจากย่อยซับสเตรตคือ CMC ที่มีความเข้มข้น 1% ใน phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0 สำหรับ endo-1,4-β-glucanase ที่ย่อยเซลลูโลสที่โครงสร้างไม่เป็นผลึก และกระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาดกว้าง 10x60 มิลลิเมตรสำหรับวิเคราะห์ exo-1,4-β-glucanase ที่ย่อยเซลลูโลสที่โครงสร้างเป็นผลึก .

การศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 นี้ ไม่พบกิจกรรมของ endo-1,4-β-glucanase ใน 6 ชั่วโมงแรก และกิจกรรมของ exo-1,4-β-glucanaseใน 3 ชั่วโมงแรก และพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 วิเคราะห์กิจกรรมของ endo-1,4-β-glucanase และ exo-1,4-β-glucanase เท่ากับ 0.86 และ 0.13 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 10



<u>ภาพที่ 10</u> การเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 กิจกรรมของ endo-1,4-β-glucanase (▲), กิจกรรมของ exo-1,4-β-glucanase (△), จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (■) และพีเอช (●)

P. polymyxa สายพันธุ์ N10 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในปริมาณที่ต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับที่ Robson and Chambliss (1984) กล่าวว่า *Bacillus* sp. มีกิจกรรมของ endo-1,4-β-glucanase น้อย และไม่พบกิจกรรมของ exo-1,4-β-glucanase จากการศึกษาของ Robson and Chambliss (1984) พบว่า*Bacillus* sp. สายพันธุ์ DLG มีกิจกรรมของ endo-1,4-β-glucanase 2.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร และกิจกรรมของ exo-1,4-β-glucanase น้อยมากจนแทบจะไม่มี เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร GS ที่มีพีเอชเท่ากับ 7.0 บ่มในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

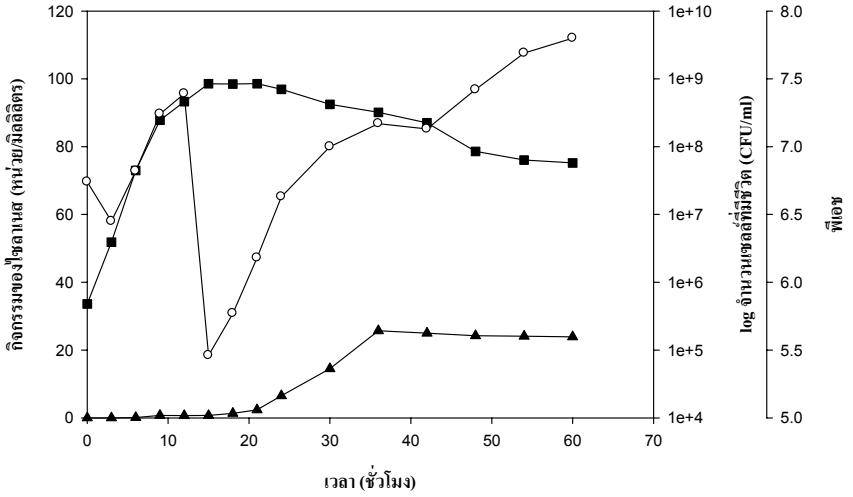
การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 เท่ากับ $3.70x10^6$ CFU/ml ซึ่ง *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 นี้สามารถเพิ่มจำนวนมากกว่า 10^8 CFU/mlในระหว่างชั่วโมงที่ 6-21 แล้วลดลงเรื่อยๆจนถึงชั่วโมงที่ 30 จากนั้นปริมาณเซลล์ค่อนข้างคงที่จนสิ้นสุดการทดลอง กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเมื่อเซลล์เจริญอยู่ในช่วงต้น stationary phase ค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อใน 9 ชั่วโมงแรกเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจาก 6.80 เป็น 6.91 และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเท่ากับ 7.49 ในชั่วโมงที่ 15 หลังจากนั้นค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนเกือบคงที่จนสิ้นสุดการทดลองมีค่าพีเอช 7.71

ในการศึกษานี้ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดเมื่อเซลล์เจริญอยู่ในระยะ stationary phase เช่นเดียวกับที่ Robson and Chambliss (1984) รายงานว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ DLG มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดในระยะ stationary phase และไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในระหว่างที่เซลล์เจริญอยู่ในระยะ exponential phase ส่วน

3.2.4 การผลิตเอนไซม์ไซลาเนส

การผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี oat spelt xylan ที่ละลายน้ำเป็นแหล่งคาร์บอน เตรียม oat spelt xylan ที่ละลายน้ำโดยชั่ง oat spelt xylan หนักเป็น 2 เท่าของสูตรอาหาร ต้มในน้ำกลั่นให้เดือด แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที เพื่อแยก oat spelt xylan ส่วนที่ไม่ละลายน้ำออกจากส่วนที่ละลายน้ำ (ปาริชาต, 2549) ใช้ส่วนใสที่แยกได้สำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสโดยวัดปริมาณน้ำตาลไซโลสที่เกิดขึ้นหลังจากย่อยซับสเตรตคือ soluble oat spelt xylan ที่มีความเข้มข้น 1% ใน phosphate buffer ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0

ผลการทดลองที่แสดงดังภาพที่ 11 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 เพิ่มขึ้นเล็กน้อยในระยะ exponential phase คือระยะ 15 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระหว่างชั่วโมงที่ 21-36 และมีกิจกรรมสูงสุดในชั่วโมงที่ 36 ซึ่งการเจริญของเซลล์อยู่ในช่วงปลาย stationary phase วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 25.69 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งปริมาณเอนไซม์ไซลาเนสจาก *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 จากการศึกษานี้ใกล้เคียงกับที่ Dhillon *et al.* (2000) รายงานว่า *B. circulans* สายพันธุ์ AB 16 ที่หมักแบบ submerged ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 20.6 หน่วยต่อมิลลิลิตร

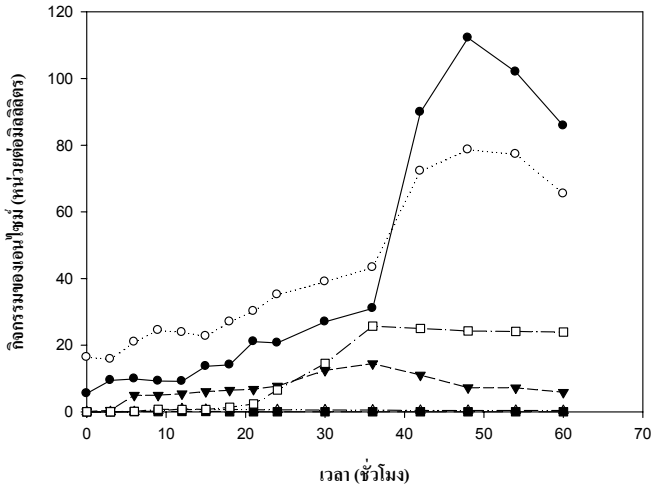


ภาพที่ 11 การเจริญและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10
กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส (▲), จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (■) และพีเอช(○)

หลังจากที่กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 สูงสุดในชั่วโมงที่ 36 แล้วพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเพียงเล็กน้อยจนสิ้นสุดการทดลองในชั่วโมงที่ 60 สอดคล้องกับที่มีรายงานก่อนหน้านี้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจาก *B. circulans* สายพันธุ์ AB 16 (Dhillon *et al.*, 2000) และ *B. polymyxa* สายพันธุ์ S และ B (Pham *et al.*, 1998) ลดลงเพียงเล็กน้อยหลังจากที่มีกิจกรรมสูงสุด ซึ่ง Pham *et al.* (1998) กล่าวว่าการที่กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเพียงเล็กน้อยเนื่องจากไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเอนไซม์ไซลาเนส แต่ Duarte *et al.* (1999) รายงานว่าเอนไซม์ไซลาเนสจาก *B. pumilus* เมื่อมีกิจกรรมสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 แล้วพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างมาก

เมื่อพิจารณาค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าใน 3 ชั่วโมงแรกลดลงจาก 6.74 เหลือเท่ากับ 6.45 จากนั้นค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเท่ากับ 7.39 ในชั่วโมงที่ 12 แล้วลดลงอย่างรวดเร็วจนเท่ากับ 5.46 ในชั่วโมงที่ 15 จากนั้นค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนสิ้นสุดการทดลอง มีค่าพีเอชเท่ากับ 7.80 ช่วงที่ค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้นเป็นครั้งที่สอง เป็นช่วงเดียวกับที่การผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

การศึกษาการผลิตเอนไซม์ของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์หลายชนิด ซึ่งมีกิจกรรมแตกต่างกัน กล่าวคือ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 สามารถผลิตเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอสสูงสุด รองลงมาคือแอสิดโปรตีเอส ไซลาเนส เบตาอะไมเลส และเซลลูเลสที่ย่อยสลาย CMC (endo-1,4-β-glucanase) และกระดาษกรอง (exo-1,4-β-glucanase) โดยกิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 112.16, 78.60, 25.69, 14.45, 0.86 และ 0.13 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเกิดเร็วที่สุด มีกิจกรรมสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 ชั่วโมง แต่จากภาพที่ 12 ไม่อาจเห็นได้เพราะมีค่าน้อยมาก ส่วนการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสเกิดช้าที่สุด คือมีกิจกรรมสูงสุดในชั่วโมงที่ 48



ภาพที่ 12 การผลิตเอนไซม์นิวทรัลโปรตีเอส (●), แอสิดโปรตีเอส (○), เบตาอะไมเลส (▼), endo-1,4-β-glucanase (△), exo-1,4-β-glucanase (■) และไซลาเนส (□)โดย *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10

การศึกษาการผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์จาก *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 เป็นการตรวจสอบว่า *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 สามารถผลิตไฮโดรไลติกเอนไซม์ในอาหารเหลว และ

สามารถผลิตเอนไซม์มากน้อยเพียงใด ในขั้นตอนนี้ไม่ได้ทดสอบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตเอนไซม์มากที่สุด การนำเชื้อ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ไปประยุกต์ใช้จึงควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบ เช่นแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน วิตามิน แร่ธาตุ ที่เหมาะสม พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ และอุณหภูมิขณะเพาะเลี้ยงเพื่อให้เชื้อเจริญได้ดีและผลิตเอนไซม์ได้มากที่สุด รวมทั้งอุณหภูมิและพีเอชสำหรับการทำปฏิกิริยา

จากรายงานของ Sittidilokratna *et al.* (2007) ที่กล่าวว่า *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ผลิตเอนไซม์เพคติเนสสูง และผลการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่า *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 สามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอส อะไมเลส เซลลูเลส และไซลาเนส โดยผลิตเอนไซม์โปรตีเอสและไซลาเนสสูงกว่าเอนไซม์ชนิดอื่น แสดงว่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ย่อยสลายได้ดี น่าจะเป็นประเภทเพคติน ไซแลน และโปรตีน ส่วนแป้งและเซลลูโลสย่อยได้น้อย อย่างไรก็ตาม เนื่องจาก *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 สามารถผลิตเอนไซม์หลายชนิดที่มีปริมาณมากน้อยแตกต่างกัน จึงอาจนำ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ผสมกับจุลินทรีย์อื่นที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสและแป้งได้ดี เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรตลอดจนอาหารเหลือต่างๆ เพื่อการประยุกต์ใช้ในการทำปุ๋ยหมัก หรือ Biogas หากแบคทีเรียสายพันธุ์นี้เป็น microaerobe

4. การยับยั้งจุลินทรีย์สาเหตุโรคพืช โดย *Paenibacillus polymyxa* สายพันธุ์ N10 และ *Bacillus* sp. จากพด.1 และผลของ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ต่อเส้นใยเห็ด

4.1 การยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช

แบคทีเรียสาเหตุโรคพืชที่ใช้ศึกษาได้แก่ *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 081-2, *X. campestris* pv. *campestris* 274-2, *X. campestris* pv. *campestris* 274-5, *X. campestris* pv. *glycines* 045-8, *X. campestris* pv. *glycines* 054-2, *X. campestris* pv. *glycines* 301-7, *X. campestris* pv. *phaseoli* 318-3, *X. campestris*, *Ralstonia solanacerum* 404-A-1-A, *PSeudomonas syringae* pv. *mori* 350-5, *Burkholderia cepacia* และ *Erwinia carotovora* ทั้งหมดนี้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน มีแฟลกเจลลา แบคทีเรียที่ใช้ศึกษาเหล่านี้เป็นสาเหตุสาเหตุโรคพืชที่พบได้บ่อยในประเทศไทย และสร้างความเสียหายต่อเศรษฐกิจอย่างมาก

Bacillus sp. ที่ใช้ศึกษาการยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช เปรียบเทียบกับ *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 คือ *Bacillus* sp. 9 สายพันธุ์จากสารเร่งพด.1 และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S1/1-3, S1(2-5), RS1/1 และ RS1/2 ซึ่งเคยทดสอบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืช ผลการศึกษาพบว่า *P. polymyxa* สายพันธุ์ N10 ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียสาเหตุสาเหตุโรคพืชในจีนัส *Xanthomonas* ได้แก่ *X. c.*pv. *campestris*, *X. c.*pv. *glycines* และ *X. c.*pv. *phaseoli* แต่ไม่ยับยั้ง *P. syringae* pv. *mori* 350-5, *R. solanacearum* 404-A-1-A, *B. cepacia* และ *E. carotovora* แบคทีเรียสายพันธุ์ LDD2 ที่คล้าย *B. licheniformis* และแบคทีเรียสายพันธุ์ LDD3b ที่คล้าย *B. subtilis* ยับยั้ง *X. c.*pv. *campestris* บางสายพันธุ์ ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ LDD1 ที่คล้าย *B. subtilis* ยับยั้งเฉพาะ *R. solanacearum* 404-A-1-A สำหรับ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S1/1-3 พบว่ายับยั้งแบคทีเรียสาเหตุโรคพืชได้เกือบทุกจีนัสที่นำมาทดสอบ ได้แก่ *X. c.*pv. *campestris* และ *X. c.*pv. *glycines*, *R. solanacearum* 404-A-1-A, *B. cepacia* และ *E. carotovora* ส่วน *Bacillus* sp. สายพันธุ์ S1(2-5), RS1/1 และ RS1/2 ยับยั้งเฉพาะ *X. c.*pv. *campestris* บางสายพันธุ์ และจากการศึกษานี้พบว่าไม่มี *Bacillus* sp. สายพันธุ์ใดสามารถยับยั้ง *P. syringae* pv. *mori* 350-5 ผลการศึกษาแสดงไว้ในตารางที่ 10