



การแยก การหาลักษณะ และการต้านราของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจาก

*Bacillus subtilis* NSRS89-24

Isolation, Characterization and Antifungal Activity of  $\beta$ -1,3-glucanase from

*Bacillus subtilis* NSRS89-24

ปรานอม ศิวนันท์สกุล

Pranom Siwanansakul

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Sciences

Prince of Songkla University

2541

A

เลขหมู่.....	QP609.B44 v.46 2041 ค. 2
Bib Key.....	141918
.....	.....

(1)

ชื่อวิทยานิพนธ์ การแยก การหาลักษณะและการต้านราของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

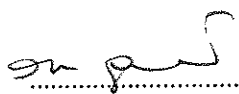
จาก *Bacillus subtilis* NSRS89-24

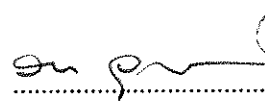
ผู้เขียน นางปรานอม คิวนันท์สกุล

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

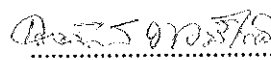
คณะกรรมการสอบ

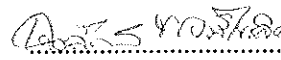
.....ประธานกรรมการ

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิจิตรา จุติดำรงค์พันธ์)

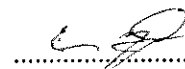
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิจิตรา จุติดำรงค์พันธ์)

.....กรรมการ

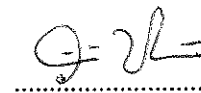
.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร)

(รองศาสตราจารย์ ดร. เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร)

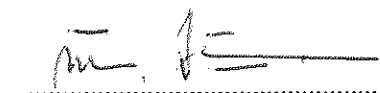
.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นงพร ไตวัฒนะ)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. วสันต์ เพชรรัตน์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. ก้าน จันทร์พรมมา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

$\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ ค่า  $\text{EC}_{50}$  ต่อเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* เท่ากับ 168.34 และ 129.83  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ เมื่อทดสอบการทำงานร่วมกันของสารปฏิชีวนะและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจาก *B. subtilis* NSRS89-24 โดยวิธี checkerboard พบว่าสารทั้งสองชนิดสามารถออกฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งเชื้อราทั้งสองชนิด

Thesis Title Isolation, Characterization and Antifungal Activity of  $\beta$ -1,3-glucanase from  
*Bacillus subtilis* NSRS89-24  
Author Mrs. Pranom Siwanansakul  
Major Program Biological Sciences  
Academic Year 1997

### Abstract

*B. subtilis* NSRS89-24 and culture filtrate were shown to inhibit growth of *R. solani* (sheath blight disease) and *P. grisea* (blast disease). Three day-old culture medium of *B. subtilis* NSRS89-24 reached maximum inhibition of both fungi. *B. subtilis* NSRS89-24 produced  $\beta$ -1,3-glucanase and released into the culture. The activity of the released enzyme was shown to increase when culture medium supplemented with 0.3% chitin. The  $\beta$ -1,3-glucanase was purified by biochemical methods firstly by 0-80% ammonium sulfate precipitation, followed by a DEAE-sephacel ion exchange column chromatography and a Sephadex G-100 gel filtration. Purification of the enzyme was recovered about 27.56% and its specific activity was 6.22  $\mu$ moles glucose equivalence/min/milligram protein (unit, U). A relative molecular weight of the purified  $\beta$ -1,3-glucanase determined by SDS-PAGE and gel filtration were 96.93 and 95.49 Kd, respectively. Kinetic study of the enzyme using 0.3-1.1 mg/ml laminarin as a substrate showed that  $K_m$  of the enzyme was 1.13 mg/ml and  $V_{max}$  was 1.33 unit. The optimal temperature was 30-40°C and the pH was 7.5. The purified  $\beta$ -1,3-glucanase demonstrated a strong inhibition of the growth of both fungi on agar plate. A minimum inhibitory concentration (MIC) of the purified enzyme for *R. solani* and *P. grisea* were 12.50 and 6.25 mU/ml, respectively and  $EC_{50}$  (50% Effective Concentration) for *R. solani* and *P. grisea* were 658.90 and 561.18 mU/ml, respectively. The antibiotics extracted from synthetic culture medium of a *B. subtilis* NSRS89-24 showed a higher efficient than the purified enzyme in inhibition of fungal growths. MIC of the antibiotics against *R. solani* and *P. grisea* were 3.13 and 1.56  $\mu$ g/ml, respectively and  $EC_{50}$  for

*R. solani* and *P. grisea* were 168.34 and 129.83  $\mu\text{g/ml}$ , respectively.  $\beta$ -1,3-glucanase and antibiotics produced by *B. subtilis* NSRS89-24 showed inhibition of growth synergistically of both *R. solani* and *P. grisea*.

## กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิจิตรา จุติดำรงค์พันธ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาสละเวลาเพื่อการแนะนำ การค้นคว้าวิจัย และการเขียนวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.เสาวลักษณ์พงษ์ไพจิตร กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาในการค้นคว้าวิจัย การตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดียิ่ง

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นงพร ไตวัฒนนะ กรรมการภาควิชาชีวเคมี รองศาสตราจารย์ ดร. วสันต์ เพชรรัตน์ กรรมการบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้กรุณาสละเวลาเป็นกรรมการตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณณลินี จาริกภากร และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยข้าวพัทลุงที่กรุณาให้ตัวอย่างสำหรับการทดลอง ขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาชีวเคมีทุกท่านที่ได้กรุณาถ่ายทอดความรู้และให้คำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัยด้วยดีมาตลอด ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ เพื่อนๆ พี่ๆ ภาควิชาชีวเคมี รวมทั้งสมาชิก PR 432 ทุกท่านที่ให้คำแนะนำ ช่วยอำนวยความสะดวกเกี่ยวกับวัสดุอุปกรณ์ และสารเคมีต่างๆ ในการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่สาว พี่ชาย ที่ช่วยให้กำลังใจและห่วงใยตลอดมา ขอขอบคุณหลานๆ ที่ช่วยให้กำลังใจ และขอขอบคุณ คุณโกสิต ศิวนนท์สกุล ที่ช่วยให้กำลังใจ และให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีตลอดมา

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ และบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนบางส่วนสำหรับการวิจัยครั้งนี้

ประโยชน์ที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ ขออุทิศให้แก่ผู้มีพระคุณต่อข้าพเจ้าทุกท่าน

ปรานอม ศิวนนท์สกุล

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(10)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(13)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	4
วัตถุประสงค์	21
2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	22
วัสดุ	22
อุปกรณ์	24
วิธีการ	25
3. ผลการทดลอง	47
4. วิจารณ์	90
5. สรุป	100
เอกสารอ้างอิง	101
ภาคผนวก	109
ประวัติผู้เขียน	113

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. สารปฏิชีวนะบางชนิดที่ผลิตจาก <i>B. subtilis</i>	6
2. ตัวอย่างสับสเตรตที่เป็นเบต้า-ดี-กลูแคน ( $\beta$ -D-glucan)	12
3. โพลีแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์เชื้อรากลุ่มต่างๆ	20
4. สารเคมีที่ใช้	22
5. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>R. solani</i> โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B. subtilis</i> NSRS89-24 อายุ 1-7 วัน	54
6. เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>P. grisea</i> โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B. subtilis</i> NSRS89-24 อายุ 1-7 วัน	55
7. ขั้นตอนการทำเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสให้บริสุทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B. subtilis</i> NSRS89-24	65
8. คำนำนั้หนักโมเลกุลของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส (G1 และ G2) และโปรตีนมาตรฐาน	72
9. ค่า K ที่คำนวณได้จากปริมาตรระ ( $V_0$ ) ของโปรตีนและสารตัวอย่างแต่ละชนิดของคอลัมน์ Sephadex G-100	75
10. แสดงแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เมื่อใช้สับสเตรตลามินารินที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน	76
11. ค่า MIC และ $EC_{50}$ ของสารปฏิชีวนะและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B. subtilis</i> NSRS89-24 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>R. solani</i> และ <i>P. grisea</i>	86



## รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างของสารปฏิชีวนะบางชนิดจาก <i>Bacillus</i>	9
2	ลักษณะสูตรโครงสร้างของโพลีแซ็กคาไรด์ที่มีพันธะเป็นเบต้า-1,3-กลูแคน	13
3	การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราแบบ dual-culture plate	26
4	การทดสอบฤทธิ์การต้านราของสารบนสไลด์หลุม	
5	อัตราส่วนผสมระหว่างสารปฏิชีวนะกับเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส บริสุทธิ์ที่ถูกเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 1, 1/2, 1/4 และ 1/8 เท่า ของค่า MIC ตามวิธี checkerboard	45
6	ตารางการประเมินผลการทำงานร่วมกันของสาร A และสาร B ในการ ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา	46
7	การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>R. solani</i> และ <i>P. grisea</i> ด้วยแบคทีเรีย ปฏิบัักร์ <i>B. subtilis</i> NSRS89-24 โดยวิธี dual-culture plate	48
8	การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>R. solani</i> ของน้ำเลี้ยง <i>B.</i> <i>subtilis</i> NSRS89-24 ที่ผ่านการกรองและผสมกับอาหาร PDA	50
9	การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>R. solani</i> ของน้ำเลี้ยง <i>B.</i> <i>subtilis</i> NSRS89-24 ที่ผ่านการนึ่งและผสมกับอาหาร PDA	51
10	การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>P. grisea</i> ของน้ำเลี้ยง <i>B.</i> <i>subtilis</i> NSRS89-24 ที่ผ่านการกรองและผสมกับอาหาร PDA	52
11	การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>P. grisea</i> ของน้ำเลี้ยง <i>B.</i> <i>subtilis</i> NSRS89-24 ที่ผ่านการนึ่งและผสมกับอาหาร PDA	53
12	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>R. solani</i> และ <i>P. grisea</i> โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B. subtilis</i> NSRS89-24 อายุต่างๆ กันที่ผ่านการกรองและการนึ่ง	56

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
13	ปริมาณโคตินในน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B. subtilis</i> NSRS89-24 ที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส	58
14	แอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อของ <i>B. subtilis</i> NSRS89-24 อายุต่างๆ กัน	60
15	การทำเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B. subtilis</i> NSRS89-24 ให้บริสุทธิ์ โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุกับ DEAE-sephacel	62
16	การแยกเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสด้วยคอลัมน์ Sephadex G-100	64
17	แถบโปรตีนบน ND-PAGE ย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R-250	67
18	แถบเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสบน ND-PAGE ที่ย้อมสับสเตรตลามินาริน และย้อมสีด้วย 0.15% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride	68
19	แถบโปรตีนบน SDS-PAGE ย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R-250	70
20	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า log molecular weight และค่า $R_f$ เพื่อคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส (G1 และ G2) โดยวิธี SDS-PAGE	71
21	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log molecular weight กับค่า K ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส โดยวิธีเจลฟิลเตรชัน	74
22	กราฟแสดงการหาค่า $K_m$ และ $V_{max}$ ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B. subtilis</i> NSRS89-24	77
23	ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B. subtilis</i> NSRS89-24	79
24	ค่าแอกติวิตี ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ในปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ที่มี pH แตกต่างกันในช่วง 3-11	81

## รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
25	กราฟการตอบสนอง (dosage response curve) ของสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>R. solani</i> และ <i>P. grisea</i>	84
26	กราฟการตอบสนอง (dosage response curve) ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>R. solani</i> และ <i>P. grisea</i>	85
27	ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>R. solani</i> ของสารผสมระหว่างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและสารปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน	88
28	ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา <i>P. grisea</i> ของสารผสมระหว่างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและสารปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน	89

## ตัวย่อและสัญลักษณ์

BSA	=	Bovine Serum Albumin
cm	=	centimetre
CM-cellulose	=	carboxymethyl cellulose
DNS	=	3,5-dinitrosalicylic acid
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
Kd	=	kilo daltons
$K_m$	=	Michaelis-Menten constant
mA	=	milliampere
mg	=	milligram
ml	=	millilitre
mm	=	millimetre
mM	=	millimolar
MW	=	molecular weight
ND-PAGE	=	non denature polyacrylamide gel electrophoresis
nm	=	nanometre
OD	=	optical density
PAGE	=	polyacrylamide gel electrophoresis
pH	=	$-\log$ hydrogen ion concentration
pI	=	isoelectric point
$R_f$	=	relative mobility
rpm	=	revolution per minute
SDS	=	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	=	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	=	N, N', N', N' -tetramethylethylenediamine

ตัวย่อและสัญลักษณ์ (ต่อ)

Tris	=	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
U	=	unit
$V_{\max}$	=	maximal velocity
$\beta$	=	beta
$\mu\text{g}$	=	microgram
$\mu\text{l}$	=	microlitre
$\mu\text{M}$	=	micromolar
%	=	percent
$^{\circ}\text{C}$	=	degree Celsius

## 1. บทนำ

### บทนำต้นเรื่อง

ข้าวเจ้า (*Oryza sativa*) เป็นธัญพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจของหลายประเทศ ในปัจจุบันผลผลิตที่ได้ยังเกี่ยวข้องกับปัญหาการระบาดของโรคข้าวทำให้ผลผลิตข้าวลดต่ำลงและส่งผลกระทบต่อทุกประเทศที่ปลูกข้าว จึงได้มีการคิดค้นวิธีการที่จะปรับปรุงเพื่อให้ได้พันธุ์ข้าวที่สามารถต้านทานโรคได้ แต่ยังคงพบว่าสายพันธุ์ข้าวที่ได้ไม่สามารถต้านทานโรคได้คงทนถาวรโดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่เกิดจากเชื้อรา ดังนั้นในระบบการเกษตรแผนใหม่จึงได้มีการคิดค้นการป้องกันกำจัดโรคพืชโดยวิธีการผสมผสาน (Integrated Pest Management (IPM)) และการเลือกใช้วิธีการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยชีววิธี (Biological Control) ก็เป็นกรรมวิธีหนึ่งในหลักการ IPM ซึ่งการป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยชีววิธีหมายถึงการลดลงของโรคหรือปริมาณเชื้อสาเหตุโรค (อาจเป็นผลโดยตรงหรือทางอ้อม) โดยการชักนำเชื้อจุลินทรีย์หนึ่งชนิดหรือมากกว่าหนึ่งชนิดเข้าไปยับยั้งหรือต่อต้านเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรค หรืออีกทางหนึ่งเป็นการปรับสภาวะแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการดำรงอยู่ของเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์นั้นๆ ปัจจุบันได้มีความพยายามที่จะพัฒนาเทคนิคและวิธีการนำไปใช้ อย่างเหมาะสมเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด เนื่องจากปัญหาการใช้สารเคมีในการป้องกันโรค มีผลทำให้เกิดพิษตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม ทั้งใน ดิน น้ำ อากาศ และในผลผลิตการเกษตรรวมถึงปัญหาความล้มเหลวหรือสูญเสียในการใช้พันธุ์ต้านทานโรค ฉะนั้นการใช้จุลินทรีย์และสารสกัดจากจุลินทรีย์เพื่อควบคุมโรคของพืชจึงจัดว่าเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถใช้ในการป้องกันกำจัดโรคพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Baker, 1987)

มีรายงานการทดลองใช้จุลินทรีย์ควบคุมโรคพืช ที่เกิดจากเชื้อราหรือแบคทีเรีย เช่น เกษม สร้อยทอง (2532) ได้ทำการทดสอบคุณสมบัติของรา *Chaetium cupreum* ในการควบคุมเชื้อรา *Pyricularia oryzae* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคไหม้ของข้าว จิระเดชและคณะ (2536) ได้ใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ควบคุมเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคโคนเน่าของมะเขือเทศ Baker และคณะ (1985) ได้ใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคราสนิมของถั่วโดยชีววิธี เป็นต้น

ปัจจุบันนักวิจัยในประเทศไทยได้มีความตื่นตัวในการควบคุมโรคข้าวโดยชีววิธี เพราะข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญทำรายได้ให้กับประเทศเป็นอันมาก อีกทั้งเป็นอาหารหลักของคนไทย แต่เกษตรกรยังคงประสบปัญหาโรคข้าวที่มีสาเหตุมาจากเชื้อราอย่างรุนแรง โรคที่แพร่ระบาดและก่อความเสียหายต่อนาข้าวทำให้สูญเสียผลผลิตที่มีมูลค่ามหาศาลคือ

1. โรคกาบใบแห้ง (sheath blight of rice) เกิดจากเชื้อรา *Rhizoctonia solani* เป็นโรคหนึ่งที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อเศรษฐกิจของประเทศเป็นอย่างมาก โดยมีการแพร่ระบาดเพิ่มขึ้นทุกปี ในบางปีพบว่าก่อความเสียหายต่อผลผลิตข้าวได้ถึง 40% (พากเพียร และคณะ 2526 and Arunyanart *et al.*, 1984 อ้างโดย สมคิด, 2537) ปัจจุบันยังไม่มีพันธุ์ข้าวใดๆ ที่สามารถต้านทานต่อโรคนี้เกษตรกรจึงหันมาใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดโรค ซึ่งการใช้สารเคมีนั้นวันจะมีปริมาณสูงขึ้นเรื่อย ๆ และยังก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อมจึงได้มีการศึกษาเพื่อหาวิธีการป้องกันและกำจัดโรคกาบใบแห้งโดยชีววิธี ก็คือการใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถพบได้จากสภาพท้องถิ่นมาหยุดยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรค

2. โรคใบไหม้ (leaf blight) มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Pyricularia grisea* เป็นโรคข้าวที่แพร่ระบาดไปทั่วโลกทั้งในเขตอบอุ่นและอากาศเย็น เป็นโรคข้าวที่สำคัญโรคหนึ่งที่มีการแพร่ระบาดอย่างกว้างขวางและรุนแรงในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม (Ou, 1985 and Bonman *et al.*, 1987 อ้างโดย สมคิด, 2537) มีรายงานเกี่ยวกับโรคใบไหม้ พบว่าโรคใบไหม้สามารถปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมหลากหลายได้ดี โดยความรุนแรงของโรคใบไหม้จะขึ้นอยู่กับระดับของ ไนโตรเจน อุณหภูมิ น้ำในต้นพืช ความชื้นของใบพืช รวมทั้งอายุและใบของพืช (Manibushanrao and Day, 1972 and Ou, 1985 อ้างโดย สมคิด, 2537) ปัจจุบันเกษตรกรได้ใช้การป้องกันกำจัดโรคใบไหม้โดยใช้พันธุ์ต้านทาน การเขตกรรม รวมทั้งการใช้สารเคมีปราบเชื้อราหรือการใช้ร่วมกัน แต่ทั้งนี้พบว่าการใช้สารเคมีการป้องกันกำจัดโรคจะได้ผลดีก็ตามแต่สารเคมีก็ก่อให้เกิดปัญหาต่อสภาพแวดล้อมเป็นอย่างมาก จึงจำเป็นต้องหากรรมวิธีการป้องกันกำจัดโรคที่ได้ผลดีและไม่ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมนั่นคือการใช้เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ (antagonist microorganisms) ในการควบคุมโรค

นอกจากโรคใบไหม้และโรคกาบใบแห้ง ที่สร้างความเสียหายให้กับเกษตรกรแล้ว ยังพบโรคข้าวที่ก่อให้เกิดความเสียหายและกำลังเป็นที่สนใจ ได้แก่ โรคถอดฝักดาบสาเหตุจากเชื้อรา *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*) โรคขอบใบแห้ง สาเหตุจากเชื้อ

แบคทีเรีย *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*, โรคกาบใบเน่า สาเหตุจากเชื้อรา *Acrocyllindrium oryzae* โรคเมล็ดต่างสาเหตุจากเชื้อรา *Curvuralia lunata* และโรคใบวงสีน้ำตาลสาเหตุจากเชื้อรา *Rhynchosporium oryzae*

มีการทดลองใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* ในการป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธี โดยใช้กับผลไม้พวก peach, plum และ stone fruit (Pusey et al., 1986) 'แต่ยังไม่มีการนำ *B. subtilis* มาใช้กับการป้องกันโรคข้าว นลินีและคณะ (2534) จึงได้ทำการศึกษาป้องกันกำจัดโรคข้าวที่สำคัญโดยใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ 2 สายพันธุ์ คือ *B. subtilis* NSRS89-24 และ *B. subtilis* NSRS89-26 ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้แยกได้จากเมล็ดพันธุ์ข้าว และทดสอบความสามารถในการป้องกันกำจัดโรคข้าวในห้องปฏิบัติการ โดยทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคข้าวที่สำคัญต่างๆ คือ เชื้อรา *P. grisea*, *Cercospora oryzae*, *Thanatephorus cucumeris*, *C. lunata*, *A. oryzae*, *R. oryzae*, *Alternaria padwickii* และเชื้อแบคทีเรีย *X. campestris* pv. *oryzae* ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ *B. subtilis* NSRS89-26 สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราสาเหตุโรคข้าวทั้ง 8 ชนิดได้ ส่วน *B. subtilis* NSRS89-24 สามารถควบคุมเชื้อสาเหตุโรคข้าวได้ดี 7 ชนิดแต่ไม่สามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *T. cucumeris* การควบคุมการเกิดโรคของสายพันธุ์ *B. subtilis* NSRS89-24 เป็นแบบ antibiosis ส่วน *B. subtilis* NSRS89-26 เป็นแบบ parasitism ซึ่งสรุปได้ว่า *B. subtilis* เหมาะที่จะเป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์เนื่องจาก

1. เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบอยู่ในสภาพธรรมชาติโดยทั่วไป ไม่ก่อให้เกิดความเสียหายหรือเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ (Jacob et al., 1985)

2. มีความสามารถในการปรับตัวและทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่มีความกดดันได้โดยการสร้างสปอร์ เช่น สามารถทนต่อสภาพอากาศร้อนขึ้นได้ดี (Croke and Rishbeth, 1981)

3. สามารถแย่งธาตุอาหารได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นในสภาพแวดล้อมที่ขาดแคลน จึงสามารถนำตัวเชื้อเข้าทำลายศัตรูได้โดยตรง ทั้งยังผลิตสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด (Sinclair et al., 1989)

4. *B. subtilis* บางสายพันธุ์สามารถผลิตสารพวก toxic metabolite ที่สามารถนำมาใช้ในการกระตุ้นให้พืชสร้างความต้านทานต่อเชื้อที่เป็นสาเหตุโรคพืช (Stenzel et al., 1985)



## บทตรวจเอกสาร

### 1.1 แบคทีเรียที่ผลิตสารปฏิชีวนะ

แบคทีเรียที่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ดี ได้แก่ แบคทีเรียใน Family Bacillaceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteraceae, Vibrionaceae, Streptococcaceae และ Myxococcaceae เป็นต้น ซึ่งจุลินทรีย์ในแต่ละกลุ่มสามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด เช่น สารปฏิชีวนะที่สร้างจาก *Bacillus* spp. ที่สำคัญ ได้แก่ Bacitracin จาก *B. licheniformis* และ *B. subtilis*, Gramicidins จาก *B. brevis*, Subtilin จาก *B. subtilis*, Colistin จาก *B. cotitinus* และ Polymyxin จาก *B. polymyxa* เป็นต้น สารปฏิชีวนะที่สร้างจาก *Pseudomonas* ที่สำคัญ เช่น Pyroloitrin จาก *Pseudomonas pyrocinis*, *P. schuykilliensis*, Sulfazecin จาก *P. acidophila*, Isosulfazacin จาก *P. mesoaciolophila* และ Bactobolin จาก *Serratia marcescens* และ marine vibrio บางชนิด ได้แก่ *Vibrio garogenes* สารปฏิชีวนะ Nisin จาก *Streptococcus lactis*, As-48 จาก *S. faecalis*, Micrococcin จาก *Micrococcus* sp. และสารปฏิชีวนะจาก *Myxococcus xanthus* และ *M. coralloides* D เป็นต้น สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแบคทีเรียประมาณครึ่งหนึ่ง ผลิตโดยแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* และประมาณ 1 ใน 4 ของสารปฏิชีวนะนี้ผลิตได้โดยแบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* (Berdy, 1987)

### 1.2 สารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* spp.

*Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง แกรมบวก มีขนาด 0.5 x 1.2  $\mu\text{m}$ . จนถึง 2.5 x 10  $\mu\text{m}$ . สร้าง endospore เคลื่อนที่ได้และเจริญได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย ทดสอบกะตะเลสให้ผลบวก สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมได้ดี เจริญได้ในอาหารหลายชนิดแม้แต่ในอาหารที่มีสารอาหารเพียงเล็กน้อยก็สามารถเจริญได้ โคลิโนมีลักษณะกลม หรือบางครั้งรูปร่างไม่แน่นอน ทึบแสง มีสีครีม น้ำตาล บางชนิดมีสี แดง ส้ม ดำ ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหาร

จากสารปฏิชีวนะที่ผลิตโดยแบคทีเรียจำนวน 360 ชนิด พบว่าสารปฏิชีวนะ 168 ชนิด ผลิตโดยแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* (Berdy, 1974) และส่วนใหญ่เป็นสารพวกเปปไทด์หรือโพลีเปปไทด์ *Bacillus* บางสายพันธุ์สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด ได้แก่ *B. subtilis*

สามารถผลิตสารปฏิชีวนะเปปไทด์ได้ประมาณ 20-25 ชนิด (Katz and Demain, 1977 and Lee et al., 1985) (ตารางที่ 1)

### 1.3 คุณสมบัติของสารปฏิชีวนะเปปไทด์

จากการศึกษาของ Katz และ Demain (1977) ได้รวบรวมคุณสมบัติของสารปฏิชีวนะเปปไทด์พบว่าส่วนใหญ่มีลักษณะโครงสร้างเป็นวง (cyclic) และมีบ้างที่มีโครงสร้างเป็นเส้นตรง (linear) โดยมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในระหว่าง 270-4500 ดาลตัน ซึ่งเป็นขนาดเล็กกว่าโปรตีนทั่วไป ลักษณะโครงสร้างเป็นวงมีทั้งที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ และอาจเกิดจากการจัดตัวกันใหม่ของกรดอะมิโน เช่น Bacitracin จะมี thiazoline ring ที่เกิดจากการรวมตัวของ cysteine และ isoleucine โดย thiazoline ring นี้เป็น cyclic hexapeptide ที่มีพันธะระหว่าง  $\beta$ -carbonyl group ของ aspartic acid กับ  $\delta$ -amino group ของ lysine สารปฏิชีวนะเปปไทด์ส่วนใหญ่จาก *Bacillus* จะประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมดแต่จะมีบางชนิดที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนร่วมกับส่วนประกอบอื่น ๆ เช่น Edeine A ประกอบด้วย spermidine เป็นหลักร่วมกับกรดอะมิโนอีก 5 ชนิด Polymyxin ประกอบด้วย 6-methylactanoic acid หรือ methylheptanoic acid ซึ่งเป็นสารพวกกรดไขมัน (fatty acid) ร่วมกับกรดอะมิโน นอกจากนี้พบว่ากรดอะมิโนที่ประกอบเป็นสารปฏิชีวนะเปปไทด์ ในบางครั้งยังเป็นกรดอะมิโนที่ไม่เคยปรากฏเป็นโครงสร้างของโปรตีน ได้แก่ กรดอะมิโนที่เป็น D-amino acid หรือ basic amino acid เช่น ornithine, diaminobutyric acid,  $\beta$ -amino acid, dehydroamino acid และ sulfur-containing amino acid ซึ่งแตกต่างจากสารปฏิชีวนะเปปไทด์ที่ผลิตจากเชื้อรากลุ่ม *Actinomycetes* โดยสารปฏิชีวนะเปปไทด์จาก *Bacillus* จะไม่มี N-methylamino acid

โดยทั่วไปสารปฏิชีวนะเปปไทด์เมื่อผลิตจากจุลินทรีย์ตัวหนึ่งจะประกอบด้วยสารที่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกันมากกว่าจะเป็นสารเดี่ยว โดยที่โครงสร้างของสารปฏิชีวนะอาจจะมีกรดอะมิโนที่แตกต่างกันตั้งแต่ 1 ตัว 2-3 ตัวหรือทั้งหมด เช่น linear gramicidins (A,B และ C) และ cyclic tyrocidines (A,B และ C) จาก *B. brevis* ในขณะเดียวกัน linear gramicidins (pentadecapeptides) และ tyrocidines (decapeptides) จะมีส่วนประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด ภายในแต่ละกลุ่มจะมีการเปลี่ยนแปลงตรงหมู่ที่มาจาก aromatic amino acid ของแต่ละโมเลกุล

ตารางที่ 1 สารปฏิชีวนะบางชนิดที่ผลิตจาก *B. subtilis* (Katz and Demain, 1997 and Lee et al., 1985)

Name	Producer	General properties					Remark
		G <sup>+</sup>	G <sup>-</sup>	MY	AF	AT	
AL-Antibiotic	<i>B. subtilis</i>	+			+		
Alboleutin	<i>B. subtilis</i> AF8				+		
Bacillomycins	<i>B. subtilis</i>				+		
Bacillocin	<i>B. subtilis</i> <i>antiblasti</i>				+		
Bacilysin	<i>B. subtilis</i>	+					
Bacitracin	<i>B. subtilis</i> <i>B. licheniformis</i>	+					tropical antibiotic feed additive, chemical reagent target ; metal-ion binding, proteinase-inhibitor cell wall formation
Botrycidin	<i>B. subtilis</i> RRLB 12231				+		
Botryticidin	<i>B. subtilis</i> AS 1361				+		
BSA	<i>B. subtilis</i>						
Fluvomycin	<i>B. subtilis</i>	+	+		+		
Fungistatin	<i>B. subtilis</i>				+	+	
Fungocin	<i>B. subtilis</i>					+	
Iturins	<i>B. subtilis</i> <i>ituriensis</i>	+	+		+		dermatomycose treatment
Mccobacillin	<i>B. subtilis</i> V3					+	

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Name	Producer	General properties					Remark
		G <sup>+</sup>	G <sup>-</sup>	MY	AF	AT	
Mycosubtilin	<i>B. subtilis</i>				+		
	<i>B. subtilis niger</i>						
Pocilin	<i>B. subtilis</i>				+		
Subsporin	<i>B. subtilis</i>				+		
Subtilin	<i>B. subtilis</i>	+					feed preservative
	ATCC 6633						
Surfactin	<i>B. subtilis</i>			+			cAMP diesterase inhibitor,
	ATCC 21332						clotting inhibitor in the thronbin-fibrinogen reaction

หมายเหตุ G<sup>+</sup> = anti-gram positive, G<sup>-</sup> = anti-gram negative, MY = antimycobacterial  
AF = antifungal, AT = antitumor

ที่มา : Katz และ Demain (1977) ; Shoji (1978) ; Kleinkauf และ Dohren (1985, 1986)

นอกจากนี้ยังพบว่าสารปฏิชีวนะเปปไทด์โดยทั่วไปจะทนต่อปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของเอนไซม์ peptidase และ protease จากพืชและสัตว์ แต่ก็มีบางชนิดที่ง่ายต่อการถูกทำลายด้วยเอนไซม์อื่น เช่น Polymyxin B ถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ ficin และ papain, Edeine A และ B ถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ carboxypeptidase, Bacilysin ถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ subtilopeptidase A

#### 1.4 ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของสารปฏิชีวนะเปปไทด์

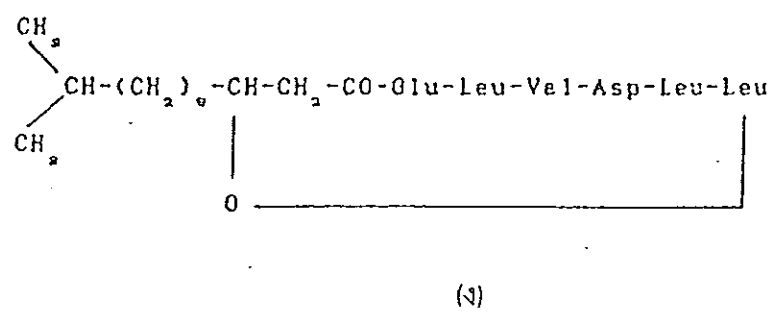
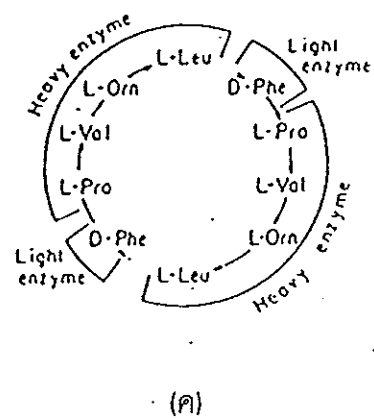
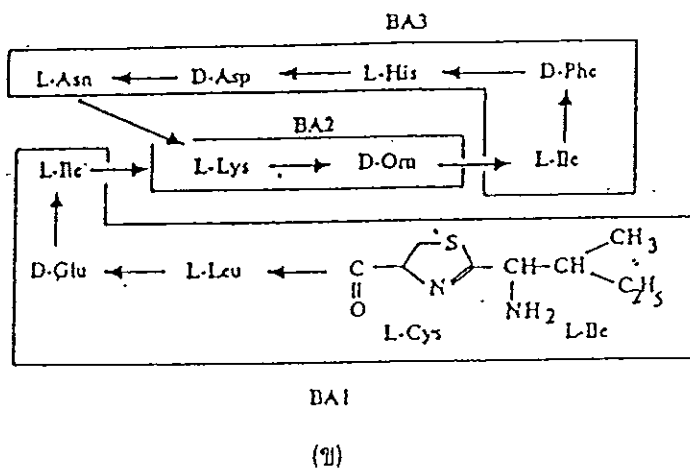
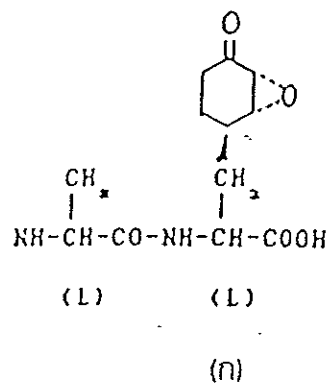
สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ (Shoji, 1978) ซึ่งในรูปที่ 1 แสดงสูตรโครงสร้างของสารปฏิชีวนะเปปไทด์บางตัวอย่าง

1. พวกที่มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นเส้น (linear peptide) ได้แก่ Bacilysin, Linear gramidins, Edeines, Cererins (A, B, C และ D) และสารปฏิชีวนะกลุ่ม Tridecaptin เช่น Tridecaptin A
2. พวกที่มีลักษณะโครงสร้างทางเคมีเป็นวง (cyclic peptide) ได้แก่ Gramicidins, Tyrocidins, Bacitracin, Mycobacillin, Iturin A, Mycosubtilin, Bacillmycin L, Polymyxins เช่น Polymyxin S1, Polymyxin F, Colistin และ Cerculin และกลุ่ม Octapeptin เช่น EM-49, 333-25, Bu-1880, TM-473, Y-8495 และ AB-1
3. พวก peptide lactone ได้แก่ Esperin, Surfactin, Brevistin, TL-119 และ 3302-A

#### 1.5 กลไกการออกฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะเปปไทด์

สามารถแบ่งสารปฏิชีวนะเปปไทด์ตามลักษณะการออกฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วยกลไกที่คล้ายคลึงกันได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้

1. สารที่ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ (cell wall) ได้แก่ พวก cyclic peptides เช่น Bacitracin มีฤทธิ์ต่อการสังเคราะห์ peptidoglycan ของ *Staphylococcus aureus* ทำให้เกิดการสะสมของ N-acetylmuramyl-pentapeptides ซึ่งเป็น peptidoglycan precursor และเข้าไปรบกวนขบวนการ dephosphorylation ที่มีไขมันเป็นพาหนะ ซึ่งเกิดการขัดขวางการขนส่งไขมันที่จะไปเชื่อมกับ UDP-muraminic-N-acetyl pentapeptide ในขบวนการสร้างผนังเซลล์ (Kleinkauf and Dohren, 1988) นอกจากนี้ยังมี Bacilysin และพวก linear peptides ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 12 อนุมูล เชื่อมอยู่กับ cyclic peptide ที่มีกรดอะมิโน 6 อนุมูล



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของสารปฏิชีวนะบางชนิดจาก *Bacillus* (Shoji, 1978)

- |               |               |
|---------------|---------------|
| ก. Bacilycin  | ข. Bacitracin |
| ค. Gramicidin | ง. Surfactin  |

2. สารที่ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน โดยออกฤทธิ์ขัดขวางกระบวนการสังเคราะห์ nucleic acid เช่น Edeines

3. สารที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง หรือหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ได้แก่พวก linear peptide หรือ cyclic peptide เช่น Tyrocidines และ Gramicidin โดยไปทำให้ส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ผิดปกติมีผลทำให้ กรดอะมิโน, ฟอสเฟต ภายในเซลล์แตกที่เรีย และอออนต่าง ๆ ที่เป็นอิเล็กโทรไลต์ที่สำคัญในขบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ เช่น  $K^+$  ไหลออกนอกเซลล์ มีผลทำให้เมตาบอลิซึมของเซลล์ผิดปกติ และการขาด  $K^+$  ของเซลล์จะทำให้ขบวนการสร้างพลังงานของเซลล์หยุดชะงักและหยุดการเจริญ (Wolin, 1979) และกลุ่ม Polymyxins ซึ่งมีกรดไขมันเป็นส่วนประกอบ โดยกรดไขมันของ Polymyxins จะแทรกเข้าไปยังชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้การเรียงตัวของส่วนไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ผิดปกติมีผลทำให้มีการรั่วไหลของเปปโตส ฟอสเฟต และสารโมเลกุลเล็ก ๆ ไหลออกนอกเซลล์ เป็นเหตุให้เมตาบอลิซึมของเซลล์ผิดปกติ (มาลินี, 2525)

นอกจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะเปปไทด์ได้เป็นส่วนใหญ่ แล้ว ยังมีผู้ทำการศึกษาพบว่า แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* สามารถผลิตสารปฏิชีวนะกลุ่มอื่นที่น่าสนใจ คือสารปฏิชีวนะกลุ่ม Aminoglycosides ได้แก่ Butirosin จาก *B. circulans* (Howell et al., 1972) Amicoumacin จาก *B. pumilus* (Itoh et al., 1982) สารปฏิชีวนะ Polyene เช่น Proticin จาก *B. licheniformis* (Nesemann et al., 1972) สารยับยั้งเชื้อราและโปรโตซัว ได้แก่ Cyclohexamide จาก *B. griseus* (มาลินี, 2532) และ 6-Aminopenicillanic acid จาก Penicillin A และ Penicillin V ที่ผลิตจาก *B. megaterium* (Vandamme, 1984) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะกลุ่ม Penicillin

## 1.6 เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส [ $\beta$ -1,3-glucan glucanohydrolase (EC 3.2.1.58 , EC 3.2.1.6 และ EC 3.2.1.39)] จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ไฮโดรเลส (hydrolases) มีความสามารถในการย่อยสลายพันธะเบต้า-1,3-กลูแคน ( $\beta$ -1,3-D-glycosidic linkage) เช่น CM pachyman (*Poria cocos*), ลามินาริน (*L. digitata*), yeast glucan จาก *Saccharomyces cerevisiae*, licinin (*Cetraria islandica*) และกลูแคนจากข้าวบาร์เลย์ (*Hordeum vulgare*) เป็นต้น แต่ไม่สามารถย่อยสลายสับสเตรตที่ไม่มีพันธะเป็นเบต้า-1,3 เช่น pustulan ซึ่งมีโครงสร้างของพันธะเป็น


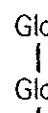
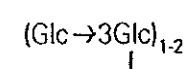

เบต้า-1,6 ดังตารางที่ 2 ซึ่งแสดงโครงสร้างของสับสเตรตแต่ละตัวและรูปที่ 2 แสดงลักษณะ  
สูตรโครงสร้างของโพลิแซ็กคาไรด์ที่มีพันธะเป็นเบต้า-1,3-กลูแคน

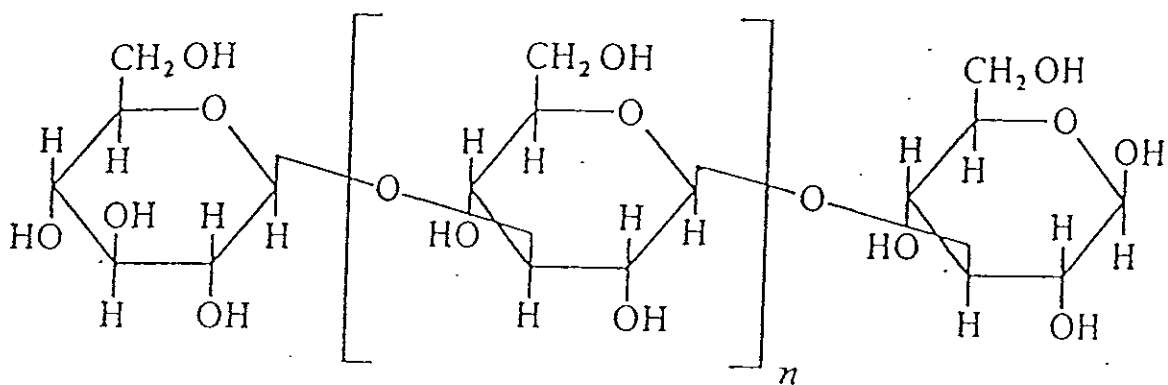
### 1.7 สับสเตรตของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงในการย่อยสลายสับ  
สเตรตที่เป็นเบต้า-ดี-กลูแคน ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาล-ดี-กลูโคส (D-glucose) ที่ต่อกันด้วย  
พันธะชนิดเบต้า-1,3 ตัวอย่างการศึกษาความจำเพาะเจาะจงในการย่อยสับสเตรตของเอน  
ไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ได้แก่ การศึกษาของ Tangarone และคณะ (1989) พบว่า เอนไซม์  
endo-(1→3)-β-D-glucanase ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากเชื้อรา *T. longibrachiatum* ที่เลี้ยงใน  
อาหารเหลวเสริมด้วยกลูโคสมีความจำเพาะเจาะจงในการย่อยสับสเตรตลามินาริน (*L.*  
*saccharina*) ที่มีกลูแคนเป็นพันธะเบต้า-1,3 และเบต้า-1,6 ผสมกันได้ดีกว่าการย่อยกลูแคนที่  
มีพันธะเบต้า-1,3 เพียงอย่างเดียว ได้แก่ pachyman และเอนไซม์ไม่สามารถย่อยสลายสับ  
สเตรตที่ไม่มีพันธะเบต้า-1,3 เป็นองค์ประกอบ ซึ่งได้แก่ xylan (Oat spelts) และ pustulan  
(*Umbilicaria papullosa*) ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกับการศึกษาของ Tsujisaka และคณะ (1981)  
พบว่าเอนไซม์เอกโซเบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ทำให้บริสุทธิ์จาก *Basidiomycete* spp. สามารถ  
ย่อยสลายลามินาริน จาก *L. hyperborea* ซึ่งมีโครงสร้างกลูแคนเป็นแบบเบต้า-1,3 เพียง  
อย่างเดียว ได้ดีกว่าการย่อยสลายสับสเตรตที่มีโครงสร้างกลูแคนเป็นแบบเบต้า-1,3 และ  
เบต้า-1,6 ผสมกัน Hrmova และ Fincher (1993) พบว่า เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ทำให้  
บริสุทธิ์จากใบอ่อนของข้าวบาร์เลย์มี 3 ไอโซไซม์ คือ GI, GII และ GIII สามารถย่อยสลาย  
เบต้า-ดี-กลูแคนที่มีลักษณะโครงสร้างเป็นเส้นตรงหรือแตกแขนงน้อย ๆ ได้ดีกว่าการย่อย  
เบต้า-ดี-กลูแคนที่แตกแขนงมากหรือมีหนุ่มแทนที่มาก ได้แก่ yeast glucan จาก *S. cerevisiae*  
และลามินารินจาก *Eisenia bicyclis* ซึ่งตรงข้ามกับการศึกษาของ Abeles และคณะ 1972  
(อ้างโดย Brimacombe, 1975) พบว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในยาสูบ (*Nicotiana*  
*glutinosa*) สามารถย่อยสลายสับสเตรตที่มีพันธะเบต้า-1,3 ของโพลิแซ็กคาไรด์ที่มีกลุ่มน้ำ  
ตาลตั้งแต่ 4-7 โมเลกุลขึ้นไป เช่น laminaritetraose, laminaripentaose เป็นต้น โดยอัตราการ  
ย่อยสลายจะสูงขึ้นเมื่อสับสเตรตมีขนาดโมเลกุลใหญ่ขึ้น



ตารางที่ 2 ตัวอย่างสับสเตรตที่เป็นเบต้า-ดี-กลูแคน ( $\beta$ -D-glucan) (Hrmova and Fincher, 1993)

$\beta$ -D-glucan (source)	ratio of linkage type	structure
Curdlan ( <i>Alcaligenes faecalis</i> ) and pachyman ( <i>P. cocos</i> )	(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$	$[-\text{Glc}1\rightarrow3\text{Glc}-]_n$
Laminarin ( <i>L. digitata</i> )	(1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ 7 : 1	$[-(\text{Glc}\rightarrow3\text{Glc})_3-1\rightarrow3\text{Glc}-]_n$ 
<i>L. hyperborea</i> Laminarin ( <i>E. bicyclis</i> )	(1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ 3 : 2	$[-\text{Glc}\rightarrow3\text{Glc}-1\rightarrow3\text{Glc}-]_n$ 
Yeast glucan ( <i>S. cerevisiae</i> )	(1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ 4 : 1	$(\text{Glc}\rightarrow3\text{Glc})_{1-2}$ $[-\text{Glc}1\rightarrow3\text{Glc}-]_n$ 
Schizophyllan ( <i>Schizophyllum commune</i> )	(1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ 3 : 1	$[-\text{Glc}1\rightarrow\text{Glc}1\rightarrow3\text{Glc}-]_n$ 
Pustulan ( <i>U. pustulata</i> )	(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$	$[-\text{Glc}1\rightarrow6\text{Glc}-]_n$
Reduced pneumococcal glucan RslII ( <i>S. pneumoniae</i> )	(1 $\rightarrow$ 3;1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ 1 : 1	$[-\text{Glc}1\rightarrow3\text{Glc}1\rightarrow4\text{Glc}-]_n$
Barley glucan ( <i>H. vulgare</i> )	(1 $\rightarrow$ 4;1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ 2.3-2.7 : 1	



รูปที่ 2 ลักษณะสูตรโครงสร้างของโพลีแซ็กคาไรด์ที่มีพันธะเป็นเบต้า-1,3-กลูแคน

(Goodwin and Mercer, 1983)

## 1.8 เอกลิโซเบต้า-1,3-กลูคาเนสและเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส

เอกลิโซเบต้า-1,3-กลูคาเนสเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายโมเลกุลของน้ำตาลที่อยู่นอกสุดของสายโพลีเมอร์ของกลูแคนจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสหรือโอลิโกแซ็กคาไรด์ ชนิดต่างๆ สามารถตรวจสอบคุณสมบัติของเอนไซม์เอกลิโซเบต้า-1,3-กลูคาเนสได้โดยใช้ p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glycoside เป็นสับสเตรต เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาของการย่อยสลายจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบ  $\delta$ -nitrophenol และน้ำตาลกลูโคสออกมาทำให้เกิดสีเหลืองในสารละลายที่มีสภาพเป็นด่าง เช่น 0.3 M NaOH หรือ 0.2 M sodium carbonate และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 nm

เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนสเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายพันธะเบต้า-1,3-กลูแคนแบบสุ่ม (random) ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์หลายชนิด ทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนสได้โดยการใช้สับสเตรตที่มีพันธะเบต้า-1,3 เป็นองค์ประกอบ เช่น ลามินาริน (*L. digitata*) หรือ pachyman (*P. cocos*) จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส และโอลิโกแซ็กคาไรด์อื่น ๆ เป็นต้น

## 1.9 แหล่งของการศึกษาเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

### 1.9.1 เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในยีสต์

จากการศึกษาของ Molina และคณะ (1989) พบว่าเอนไซม์ที่ได้จากการทำให้บริสุทธิ์จากเชื้อ *Candida albicans* 1001 มีลักษณะเป็นโปรตีนสายเดี่ยว (single protein) เมื่อทำการแยกโปรตีนโดยใช้วิธี ND-PAGE จะพบแถบโปรตีนของเอนไซม์เพียงแถบเดียว แต่เมื่อนำโปรตีนมาแยกด้วยวิธี SDS-PAGE จะพบแถบโปรตีนของเอนไซม์มี 2 แถบหรือ 2 สับยูนิต นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นเอกลิโซเบต้า-1,3-กลูคาเนส เพราะให้ผลบวกกับสับสเตรต p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucoside ไอออนของโลหะที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ได้คือ  $Ag^{2+}$  และ  $Hg^{2+}$  Mrsa และคณะ (1993) ได้แยกเอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนสให้บริสุทธิ์จากเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 29 Kd ด้วยวิธี SDS-PAGE และให้ผลลบเมื่อตรวจสอบการเป็นเอกลิโซเบต้า-1,3-กลูคาเนสโดยการใช้ p-nitrophenyl เป็นสับสเตรต ผลิตภัณฑ์ที่ได้เมื่อเอนไซม์นี้ย่อยสลายสับสเตรต คือลามินาริน,

laminaritetraose, laminaritriose, laminaribiose และกลูโคสซึ่งจะเพิ่มขึ้นตามลำดับเมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยานานขึ้น เป็นการยืนยันได้ว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้มีคุณสมบัติเป็นเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส

### 1.9.2 เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในแบคทีเรีย

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ได้ทำให้บริสุทธิ์จากแบคทีเรีย *B. circulans* IAM1165 ที่เลี้ยงในอาหารเหลวเสริมด้วย pachyman (*Polyporaceae*) พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 87 Kd เมื่อหาด้วยวิธี SDS-PAGE และมีค่า pI เท่ากับ 4.3 เอนไซม์นี้จัดเป็นเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส เพราะสามารถย่อยสลายสับสเตรตเป็นแบบสุ่มผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นกลูโคส, laminaribiose, laminaritriose และโอลิโกแซกคาไรด์ อื่นๆ นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 70 °C และ pH ของสารละลายเท่ากับ 6.5 (Aono *et al.*, 1992) จากการศึกษาเอนไซม์ที่ทำให้บริสุทธิ์จากเชื้อแบคทีเรีย 'Alkalophilic *Bacillus* sp. AG-430' ที่แยกได้จากดินพบว่า เป็นเอนไซม์ชนิดเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส เพราะสามารถย่อยสลายสับสเตรตลามินารินแบบสุ่มได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส, laminaribiose, laminaritriose และโอลิโกแซกคาไรด์ชนิดต่าง ๆ เอนไซม์นี้ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60-65 °C และ pH ที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาเท่ากับ 9-10 หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE ได้เท่ากับ 35 Kd มีค่า pI ประมาณ 3.8 (Nogi and Horikoshi, 1990) สำหรับการศึกษาเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนสซึ่งทำการแยกได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. licheniformis* โดยการเติมเกลือให้ตกตะกอน (salting out) แล้วทำให้บริสุทธิ์วิธีเจลฟิลเตรชันพบว่ามีค่า pI เท่ากับ 4.7 ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิเท่ากับ 55 °C นอกจากนี้จะมีค่าความว่องไวสูงขึ้นเมื่อสภาพแวดล้อมของการทำงานมีไอออนขนาดใหญ่ เช่น SDS และ ethylene diaminetetracetate (Lioberas *et al.*, 1988) Nagata และคณะ (1990) ได้ศึกษาเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส I ที่แยกได้จาก *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae* พบว่าเป็นเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส สามารถย่อย laminarin, yeast glucan และ pachyman ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส, laminaribiose และ laminaritriose หาน้ำหนักโมเลกุลด้วยวิธี SDS-PAGE ได้เท่ากับ 27 Kd และมีค่า pI เท่ากับ 5.8 อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์มีค่าเท่ากับ 55 °C และ 5.5 ตามลำดับ

### 1.9.3 เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากเชื้อรา

จากการศึกษาของ Tangarone และคณะ (1989) พบว่าเอนไซม์เอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อของ *T. longibrachiatum* มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 70 Kd ด้วยวิธี SDS-PAGE สามารถย่อยสลายสับสเตรตที่สายโพลีแซ็กคาไรด์ประกอบด้วยพันธะเบต้า-1,3 และเบต้า-1,6 ผสมกันได้ดีกว่า การย่อยสลายสับสเตรตที่มีแต่พันธะเบต้า-1,3 หรือเบต้า-1,6 เพียงอย่างเดียว และสามารถย่อยผนังเซลล์ของเชื้อราชนิดอื่นที่มีเบต้า-1,3 เป็นองค์ประกอบ สารประกอบที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นี้ได้คือ  $HgCl_2$ ,  $MnCl_2$ ,  $KMnO_4$  และ N-bromosuccinimide เอนไซม์กลูแคนเบต้า-1,3-กลูโคไซด์เอสจากเชื้อรา *T. harzianum* ซึ่งศึกษาโดย Lorito และคณะ (1994) พบว่า เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล 72 Kd มีค่า pI เท่ากับ 4.2 และจัดเป็นเอนไซม์เอกโซเบต้า-1,3-กลูคาเนส เพราะสามารถย่อยสลายสับสเตรต p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside ได้ผลิตภัณฑ์เป็น p-nitrophenol และโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดต่างๆออกมา นอกจากนี้ยังพบว่าสำหรับเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่แยกได้จากเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ซึ่งศึกษาโดย Holten และคณะ (1972) (อ้างโดย Brimacombe, 1975) พบว่าสามารถสลายพันธะของลามินารินได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส แต่อัตราการย่อยสลายพันธะต่ำสุดเมื่อใช้สับสเตรต laminaribiose และอัตราการย่อยสลายจะค่อยๆ สูงขึ้นเมื่อใช้สับสเตรตที่มีขนาดใหญ่ขึ้น เช่น laminaritetraose, laminaripentaose และลามินาริน ถ้ามีการทำงานร่วมกับเอนไซม์กลูโคไซด์เอสที่ pH 5.0-6.0 จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นน้ำตาลกลูโคสมากขึ้น แต่ถ้ามีไอออนของโลหะพวก  $Hg^{+2}$  จะสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองได้

### 1.9.4 เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในพืช

Hrmova และ Fincher (1993) ได้ทำการแยกเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากใบอ่อนของข้าวบาร์เลย์ (*H. vulgare*) ให้บริสุทธิ์โดยผ่านขั้นตอนการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate, โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ และวิธีเจลฟิลเตรชัน ได้เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส 3 ไอโซเอนไซม์ คือ GI, GII และ GIII โดยที่ GIII จะมีความคงตัวของการทำงานที่ pH ในช่วงกว้างกว่า GI และ GII และทั้ง 3 ไอโซเอนไซม์จัดเป็นเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนส เพราะสามารถย่อยสลายสับสเตรตลามินารินรวมทั้งสับสเตรตชนิดอื่นๆ ที่มีพันธะเบต้า-1,3 เป็นองค์ประกอบ และยังสามารถย่อยสลายสับสเตรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ กันได้ Keen

และ Yoshikawa (1983) ได้ศึกษาเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากใบอ่อนของถั่วเหลือง พบว่ามี 2 ไอโซไซม์ มีค่าน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 33 Kd เมื่อศึกษาโดยวิธี SDS-PAGE และวิธีเจลฟิลเตรชัน และจัดเป็นเอนโดเบต้า-1,3-กลูคาเนสเพราะสามารถย่อยสลายสับสเตรตลามินาริน และ CM pachyman ซึ่งมีพันธะเบต้า-1,3 เป็นองค์ประกอบ และไม่สามารถย่อยสลาย  $\beta$ -nitrophenyl- $\beta$ -D-glycoside

#### 1.10 เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในแง่ของการยับยั้งเชื้อรา

โดยทั่วไปพบว่าสิ่งมีชีวิตหลายชนิดสามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสได้ โดยส่วนใหญ่สร้างขึ้นเพื่อป้องกันการรุกรานของเชื้อโรคโดยเฉพาะเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ศึกษาในพืชส่วนใหญ่มีคุณสมบัติเป็น PR โปรตีน (pathogenesis related protein) ซึ่งพืชสร้างขึ้นเพื่อป้องกันอันตรายให้กับพืชเองเมื่อมีการรุกรานจากเชื้อโรค เช่น เชื้อรา แบคทีเรีย และเชื้อไวรัส (Van loon, 1985 อ้างโดย Kombrink, 1988) หรือจากการที่พืชได้รับความกดดันจากสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ เช่น สารเคมีหรือการเกิดบาดแผล เป็นต้น (David et al., 1993) สารพวก PR โปรตีนในพืชไม่มีมาก่อนหรือมีน้อยมาก ได้แก่ สารประกอบ phenolic, phytoalexin และกลุ่มเอนไซม์อีกหลายชนิด เช่น phenylalanine ammonialyase (PAL), peroxidase, diphenyloxidase, chitinase, chitosanase, lysozyme และเบต้า-1,3-กลูคาเนส Mauch และคณะ, (1988) พบว่า ถั่วลันเตา (*Pisum sativum*) สามารถสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส G2 และ chitinase Ch1 เมื่อได้รับการรุกรานจากเชื้อรา *Fusarium solani* และ *F. phasioli* ซึ่งเป็นปฏิกิริยาตอบสนองเพื่อการต่อต้าน (defense responses) ของพืชในขณะที่เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส G1 และ chitinase Ch2 พืชสร้างขึ้นขณะที่มีการเจริญเติบโตโดยเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกันในแง่ค่าน้ำหนักโมเลกุล ค่า pI รวมทั้งค่า pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน แต่คุณสมบัติที่เหมือนกันคือสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อร่าก่อโรคและประสิทธิภาพในการยับยั้งจะสูงขึ้นเมื่อเอนไซม์ทำงานร่วมกัน ในทำนองเดียวกันกับการศึกษาของ Sela-Buurlage และคณะ (1993) พบว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสใน class I ที่แยกได้จากต้นยาสูบ (*Nicotiana tabacum*) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *F. solani* ได้และยับยั้งได้ดีขึ้นเมื่อทำงานร่วมกับเอนไซม์ chitinase ในขณะที่เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสใน class II ไม่เกิดปฏิกิริยาตอบสนองใดๆทั้งสิ้นกับเชื้อร่าก่อโรค ทำนองเดียวกับการศึกษาของ Skujins และคณะ (1965) พบว่า *Streptomyces* spp. สามารถ

ย่อยสลายเส้นใยของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* และ *F. solani* ได้โดยการทำงานร่วมกันของ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและ chitinase การศึกษาข้าวบาร์เลย์ที่งอกใหม่พบว่าจะมีการ สร้างกลูโคส, กรดอะมิโน และสารชีวโมเลกุลที่มีขนาดเล็กชนิดต่างๆสะสมไว้ภายในเอนโดสเปิร์มทำให้ง่ายต่อการถูกบุกรุกโดยจุลินทรีย์ก่อโรคข้าวได้ ซึ่งการบุกรุกของเชื้อโรคมียุทธศาสตร์ให้พืชสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพิ่มสูงขึ้นและมีหลายไอโซไซม์เพื่อจะช่วยให้ยับยั้งการบุกรุกของเชื้อราที่มีพันธะเบต้า-1,3-กลูแคนชนิดต่าง ๆ ที่เป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์เชื้อราได้ดีขึ้น (Hoji et al., 1988;1989 อ้างโดย Hrmova and Fincher, 1993) Aono และคณะ (1995) ได้ศึกษาเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจาก *B. circulans* IAM1165 พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อรา *A. oryzae* ได้ เนื่องจากผนังเซลล์ของเชื้อรามีพันธะเบต้า-1,3-กลูแคนเป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้การศึกษาของ Jutidamrongphan และคณะ (1991) พบว่าข้าวบาร์เลย์ (*H. vulgare*) ที่ถูกรุกรานจากเชื้อรา *Erysiphe graminis* f.sp *hordei* ทำให้เกิดโรคราแป้ง (powdery mildew) จะถูกกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้น และได้ทำการสกัด cDNA จากข้าวบาร์เลย์มาใช้เป็น hybridization probe เพื่อตรวจจับ ข้าวบาร์เลย์, ข้าวสาลี (*Triticum aestivum*), ข้าวเจ้า (*O. sativa*) และข้าวฟ่าง (*Sorghum saccharatum* (Linn.) Moench) ที่ได้รับการรุกรานจากเชื้อรา *Bipolaris sorokiniana* พบว่ามีการสร้างยีนของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพิ่มขึ้น ซึ่งสรุปได้ว่าเมื่อพืชได้รับการรุกรานจากเชื้อโรคพืชจะป้องกันอันตรายได้ โดยการกระตุ้นยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสให้มีการสร้างเอนไซม์ขึ้นมามากขึ้นเพื่อตอบสนองต่อการรุกรานของเชื้อโรค

นอกจากการศึกษาในพืชแล้ว Lorito และคณะ (1994) ได้ศึกษาเอนไซม์กลูแคนเบต้า-1,3-กลูโคไซด์เลส จากเชื้อรา *T. harzianum* เป็นเอนไซม์หนึ่งที่สามารถยับยั้งการงอกและการยืดยาวของสปอร์ของเชื้อรา *Botrytis cinerea* และการยับยั้งจะดีขึ้นเมื่อทำงานร่วมกับ endochitinase, chitobiosidase และ N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase ทำนองเดียวกับการศึกษาของ Leah และคณะ (1991) เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ทำให้บริสุทธิ์จากข้าวบาร์เลย์ (*H. vulgare*) ออกฤทธิ์เสริมกับ chitinase และ ribosome-inactivating protein ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *T. reesei* และ *F. sporotrichioides* เมื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการ โดยโปรตีนทั้งสามชนิดจะออกฤทธิ์ยับยั้ง *T. reesei* ได้ดีกว่า *F. sporotrichioides* Russell และคณะ (1994) ได้ทำการศึกษาเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Stachybotrys*

โปรตีนทั้งสามชนิดจะออกฤทธิ์ยับยั้ง *T. reesei* ได้ดีกว่า *F. sporotrichioides* Russell และคณะ (1994) ได้ทำการศึกษาเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ผลิตจากเชื้อ *Stachybotrys elegans* พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบแตกต่างกันจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *R. solani* ได้ต่างกัน ทั้งนี้เนื่องมาจากองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อปริมาณการผลิตเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Tilburg และ Thomas (1993) พบว่าเชื้อรา *Gliocladium virens* ซึ่งเป็นปรสิตของเชื้อราหลายชนิด (mycoparasite) สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและเอนไซม์อื่นๆ ปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำลายเชื้อราชนิดอื่น เช่น เชื้อรา *R. solani* และ *Pythium ultimum* โดยทั้งนี้ปริมาณการผลิตเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสรวมทั้งการยับยั้งเชื้อราจะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกัน

สิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ มีกลไกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคโดยการสร้างเอนไซม์ chitinase และเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เนื่องจากเชื้อราส่วนใหญ่จะมีไคตินและเบต้า-1,3-กลูแคนเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ (Bartnicki-Garcia, 1969) ทำให้สามารถถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทั้งสองได้ เชื้อราจึงไม่สามารถเจริญต่อไปได้ องค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ของเชื้อราส่วนใหญ่จะมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบประมาณ 80-90% ซึ่งเชื้อราแต่ละกลุ่มจะมีโพลีแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แตกต่างกัน (ตารางที่ 3)



ตารางที่ 3 โพลีแซกคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรากลุ่มต่าง ๆ

(ดัดแปลงจาก Bartnicki-Garcia 1969)

โพลีแซกคาไรด์	กลุ่มของเชื้อรา	ตัวอย่างของเชื้อรา
Cellulose-glycogen	Acrasiomycetes	<i>Polysphondylium, Dictyostelium</i>
Cellulose- $\beta$ -glucan	Oomycetes <sup>a</sup>	<i>Phytophthora, Pythium, Saprolegnia</i>
Cellulose-chitin	Hyphochytridiomycetes	<i>Rhizodomyces</i>
Chitin-chitosan	Zygomycetes	<i>Mucor, Phycomyces, Zygorhynchus</i>
Chitin- $\beta$ -glucan	Chytridiomycetes	<i>Allomyces, Blastocladiella</i>
		<i>Neurospora</i>
	Ascomycetes and	<i>Ajellomyces</i>
	Deuteromycetes	<i>Aspergillus</i>
	Basidiomycetes	<i>Shizophyllum, Fomes, Polyporus</i>
Mannan- $\beta$ -glucan	Ascomycetes	<i>Saccharomyces<sup>b</sup>, Candida</i>
Chitin-mannan	Basidiomycetes	<i>Sporobolomyces<sup>b</sup>, Rhodotorula</i>
Galactosamine	Trichomycetes	<i>Amoebidium</i>
Galactose polymers		

<sup>a</sup> อาจพบไคตินเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วยในผนังเซลล์ของ Oomycetes genus *Apodachyla*

<sup>b</sup> primary wall bud ของ *Saccharomyces cerevisiae* จะมีไคตินเป็นองค์ประกอบ

## วัตถุประสงค์

1. ศึกษาวิธีการแยกเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจาก *B. subtilis* NSRS89-24 ให้บริสุทธิ์
2. ศึกษาสมบัติและลักษณะทางชีวเคมีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่บริสุทธิ์
3. ศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคข้าว
4. ศึกษาการออกฤทธิ์ต้านราของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเสริมกับสารปฏิชีวนะที่แยกได้จาก *B. subtilis* NSRS89-24

## 2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

### วัสดุ

#### เชื้อแบคทีเรียปฏิบั๊กซ์

*Bacillus subtilis* NSRS89-24 ได้รับจากศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง (โดยความเชื้อเพื่อของคุณ นลินี จาริกภากร) ซึ่งแยกเชื้อได้จากเมล็ดข้าวที่สมบูรณ์และเพาะเลี้ยงใน Nutrient Agar (NA) slant เก็บที่ 4 °C ทำการถ่ายเชื้อใหม่ทุกๆ เดือน

#### เชื้อราก่อโรค

เชื้อราสาเหตุโรคใบไหม้ คือ *Pyricularia grisea* และเชื้อราสาเหตุโรคกาบใบแห้ง คือ *Rhizoctonia solani* ได้รับจากศูนย์วิจัยข้าวพัทลุง ซึ่งแยกได้จากต้นข้าวที่เกิดจากโรคนั้นๆ จากนั้นแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และเพาะเลี้ยงในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ถ่ายเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ทุกครั้งก่อนที่เชื้อราจะเจริญจนเต็มจานอาหาร

#### สารเคมี

ตารางที่ 4 สารเคมีที่ใช้

ชื่อสารเคมี	MW.	บริษัทที่ผลิต
acrylamide	71.1	Merck
ammonium sulfate	132.14	Carlo Erba
ammonium persulfate	228.7	Hopkin & Williams
Bovine Serum Albumin (BSA)	67,000	Pharmacia
Coomassie brilliant blue R-250		Sigma
3,5-dinitrosalicylic acid		BDH
glycine	75.07	Merck
laminarin ( <i>Laminaria digitata</i> )		Sigma
2-mercaptoethanol		
N,N-N',N',-tetramethylenediamine (TEMED)	116.2	Sigma

ตารางที่ 4 สารเคมีที่ใช้ (ต่อ)

ชื่อสารเคมี	MW	บริษัทที่ผลิต
nutrient broth (NB)		Difco
potassium sodium tartrate	282.23	M & B
potato dextrose agar (PDA)		Difco
potato dextrose broth (PDB)		Difco
sodium acetate	136.08	Carlo Erba
chitin		Sigma
sodium dodecyl sulfate	288.4	Merck
Tris (hydroxymethylaminomethane)	121.14	Fluka
2,3,5, triphenyltetrazolium chloride		Sigma
yeast extract		Difco
bis-acrylamide		Merck
potassium dichromate	294	Sigma
sodium hydroxide	40	Merck
glucose	194.17	BDH
glacial acetic acid	60.05	Merck
glycerol	92.09	M & B
hydrochloric acid	36.46	Merck
methanol	32.04	BDH
Sephadex G-100		Pharmacia
carbonic anhydrase	30,000	Pharmacia
ethanol		
blue dextran	$2 \times 10^6$	Sigma
bromophenol blue R-250		Sigma
sodium carbonate	105.99	FERAK

## อุปกรณ์

micropipette ของบริษัท Gilson

microtube pump MP-3 ของบริษัท EYELA

pH meter ของบริษัท Radiometer A/S รุ่น PHM 61

slab gel electrophoresis apparatus ของบริษัท ATTO

spectrophotometer ของบริษัท Shimadzu รุ่น UV-160A

กรวยกรองเชื้อของบริษัท Millipore

กล้องจุลทรรศน์ชนิด stereo zoom ของบริษัท Meiji

กล้องจุลทรรศน์ชนิด compound ของบริษัท Olympus

คอลัมน์แก้วขนาด 1.3x60 และ 2.5x25 cm.

เครื่อง homogenizer ของบริษัท Panasonic

เครื่องเก็บสารละลายแยกส่วน (Fraction collector) model 2110 จากบริษัท Biorad

เครื่องเขย่าแบบวงกลมของบริษัท Gallenkamp

เครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้าของบริษัท E-C apparatus

เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่งของบริษัท OHAUS

เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่งของบริษัท OHAUS

เครื่องเซนติฟิวจ์ของบริษัท Beckman รุ่น J2-21

จานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 14 cm

ตู้อบแห้งของบริษัท SHEL-LAB

ตู้อุ่นเชื้อของบริษัท Paton Scientific รุ่น 013422

แผ่นกรอง (รูมีขนาด 0.45  $\mu\text{m}$ )

สไลด์หลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 cm

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ของบริษัท HIRAYAMA

อ่างควบคุมอุณหภูมิของบริษัท Thermolyne รุ่น NUOVA II

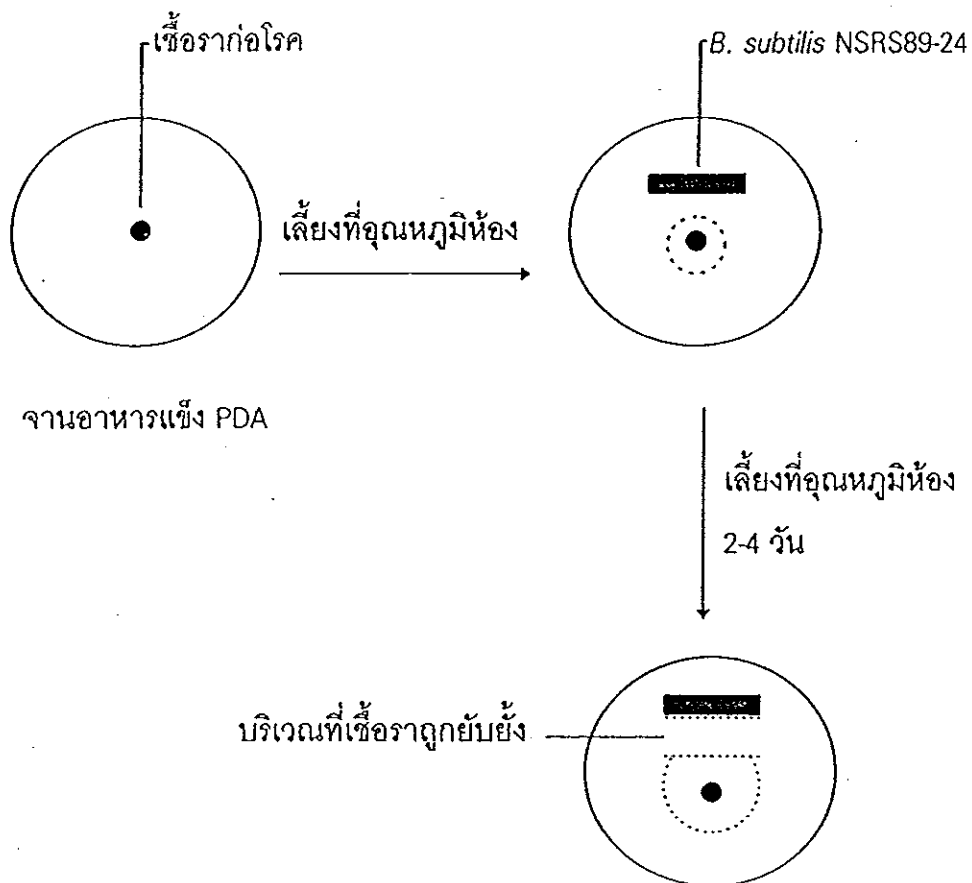
## วิธีการ

### 2.1 การศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคเบื้องต้นโดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ *B. subtilis* NSRS89-24

#### 2.1.1 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยวิธี dual-culture plate

##### วิธีการทดลอง

เลี้ยงเชื้อรา *P. grisea* และ *R. solani* บนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิห้อง ปล่อยให้เชื้อราเจริญจนมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีประมาณ 4 cm จากนั้นเชื้อ *B. subtilis* ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง NA และมีลักษณะเป็นโคโลนีเดี่ยวมาขีด (streak) ลงบนจานอาหารเชื้อราเป็นแนวเส้นตรง (รูปที่ 3) โดยให้มีระยะห่างจากเชื้อราประมาณ 0.5 cm เลี้ยงเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 และ 5 วัน ตามลำดับ สังเกตบริเวณเชื้อราที่สัมผัสกับแบคทีเรียและไม่สัมผัสกับแบคทีเรีย (บริเวณควบคุม)



รูปที่ 3 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อราแบบ dual-culture plate

## 2.1.2 การศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 ที่มีอายุต่างๆกัน

### 2.1.2.1 การเตรียมอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB)

เตรียมอาหารเหลว PDB ปริมาตร 1 ลิตร ปรับ pH ของอาหารให้อยู่ระหว่าง 6.5-7.0 ด้วย 5 N NaOH แบ่งใส่ขวดขนาด 250 ml 8 ขวดโดยใส่ขวดละ 100 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

### 2.1.2.2 การเตรียมกล้าเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24

นำ *B. subtilis* NSRS89-24 จาก stock culture มาเลี้ยงบนจานอาหารแข็ง NA อายุ 24 hr เชื้อเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ ใส่ลงในอาหารเหลว PDB ปริมาตร 50 ml ในขวดขนาด 250 ml นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีอัตราการเขย่า 170 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 hr

### 2.1.2.3 การเพาะเลี้ยง *B. subtilis* NSRS89-24

ดูดกล้าเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 ที่ได้ใส่ลงในขวด PDB ที่เตรียมไว้ในข้อ 2.1.2.1 ขวดละ 1 ml ป่มไว้บนเครื่องเขย่าที่มีอัตราการเขย่า 170 rpm อุณหภูมิ 30°C เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 0-7 วัน โดยเก็บตัวอย่างวันละ 1 ขวด จากนั้นนำมาปั่นแยกเซลล์ที่ 6,000 rpm นาน 20 นาที เก็บส่วนใสที่ได้แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งกรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูเท่ากับ 0.45  $\mu\text{m}$  อีกส่วนหนึ่งนำไปฆ่าเชื้อด้วยวิธีนึ่งความดันไอน้ำ

### 2.1.2.4 การเตรียมเชื้อรา

เชื้อเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* จาก stock culture มาเลี้ยงบนจานอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิห้องปล่อยให้เชื้อราเจริญจนเกือบเต็มจานอาหาร

### 2.1.2.5 วิธีการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

เตรียมอาหาร PDA หลอมเหลวให้มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นปกติ (double strength) ผสมกับน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 ที่เตรียมได้ทั้ง 2 ส่วนด้วยอัตราส่วนผสม 1:1 เทใส่จานอาหารขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 cm โดยแต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ ปล่อยให้วันแข็งตัว จากนั้นเจาะเชื้อราบนอาหารแข็ง PDA โดยเจาะรอบๆ โคโลนีในรัศมีเดียวกันให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 cm ถ้ายเชื้อราที่ได้วางลงตรงกลางจาน



อาหารที่ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิบักร์ เลี้ยงเชื้อรา *R. solani* ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ส่วน *P. grisea* เลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน สำหรับชุดควบคุมใช้ PDA ที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นปกติผสมกับ PDB ในอัตราส่วน 1:1 จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราสองแนวตั้งจากกันในแต่ละตัวอย่างและหาค่าเฉลี่ย นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับจานอาหารควบคุมและคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากสูตร (Gamliel *et al.*, 1989)

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของการยับยั้ง} = 100 - \left\{ \frac{R^2}{r^2} \right\} 100$$

$R$  = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนจานอาหารทดสอบ

$r$  = รัศมีเฉลี่ยของโคโลนีเชื้อราที่เจริญบนจานอาหารควบคุม

## 2.2 การศึกษาเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจาก *B. subtilis* NSRS89-24

### 2.2.1 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของลาวรี (Lowry *et al.*, 1951)

#### 2.2.1.1 การเตรียมสารละลายโปรตีน BSA มาตรฐาน

ใช้ BSA ปริมาณ 1 mg ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ml จะได้โปรตีน BSA ที่มีความเข้มข้น 1 mg/ml นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นอย่างมีลำดับแบบ 1:2 ให้ได้สารละลาย BSA ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 20, 40, 80, 160 และ 320  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ

#### 2.2.1.2 วิธีหาปริมาณโปรตีน

ใช้สารละลายตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณโปรตีนและสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA แต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100  $\mu\text{l}$  ผสมกับสารละลาย alkaline copper (ภาคผนวก) ที่เตรียมขึ้นใหม่ปริมาตร 2.5 ml วางทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย Folin (ภาคผนวก) 0.25 ml ผสมให้เข้ากัน วางทิ้งไว้อีก 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 nm นำค่าที่ได้จากสารละลายโปรตีนมาตรฐานไปเขียนกราฟมาตรฐานของโปรตีนคำนวณหาปริมาณโปรตีนของสารตัวอย่างโดยนำมาเปรียบเทียบกับกราฟของโปรตีนมาตรฐาน BSA

### 2.2.2 การตรวจสอบหาแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสโดยวิธี colorimetric (Burner, 1964)

#### 2.2.2.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ใช้น้ำตาลกลูโคสปริมาณ 1.94 g ละลายใน 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0 ปริมาตร 100 ml จะได้สารละลายของกลูโคสที่มีความเข้มข้น 0.1 M ใช้สารละลายของกลูโคสปริมาตร 100  $\mu$ l ใส่ลงในหลอดทดสอบ 6 หลอดโดยให้มีปริมาณของกลูโคสในแต่ละหลอดเท่ากับ 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5  $\mu$ moles ตามลำดับ จากนั้นเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 0.2 ml และ 0.1 M sodium acetate buffer 0.2 ml ผสมให้เข้ากันนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมน้ำกลั่นหลอดละ 0.9 ml อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

#### 2.2.2.2 วิธีการตรวจสอบแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

เตรียมสารตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบแอกติวิตีปริมาตร 10  $\mu$ l ผสมกับสับสเตรตลามินารินความเข้มข้น 5 mg/ml ปริมาตร 90  $\mu$ l เขย่าให้เข้ากันแล้วนำลงแช่และเขย่าเบาๆ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 10 นาที ครบเวลาแล้วนำมาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 0.2 ml และบัฟเฟอร์ ปริมาตร 0.2 ml ผสมให้เข้ากันดี นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดอีกครั้งเป็นเวลา 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในอ่างน้ำแข็งแล้วเติมน้ำกลั่น 0.9 ml อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm ดังแสดงในหน้า 30 นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส จากนั้นคำนวณหาแอกติวิตีของเอนไซม์โดยกำหนดให้ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ 1 unit เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ให้ 1  $\mu$ mole ของกลูโคสจากการย่อยสลายลามินารินได้ในเวลา 1 นาที

แผนภาพแสดงขั้นตอนการหาค่าแอกติวิตีของเอนไซม์  
เบต้า-1,3-กลูคาเนส

สารละลายเอนไซม์ 10  $\mu$ l + สับสเตรตลามินาริน 90  $\mu$ l  
ใน 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0



เขย่าเบาๆ ในอ่างอุณหภูมิ 40°C นาน 10 นาที



ต้มในน้ำเดือด 2 นาที



เติมสารละลาย DNS 0.2 ml + บัฟเฟอร์ 0.2 ml



ต้มในน้ำเดือด 5 นาที



เติมน้ำกลั่น 0.9 ml



อ่านค่า OD<sub>540</sub> nm

## 2.2.3 การศึกษาปริมาณโคตินที่เหมาะสมต่อการชักนำการผลิตเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสโดย *B. subtilis* NSRS89-24

เตรียมอาหารเหลว NB ปริมาตร 500 ml เติมโคตินผงลงไปปริมาณ 0-0.6% กวนให้เข้ากัน แบ่งใส่ขวดขนาด 125 ml 13 ขวด โดยใส่ขวดละ 30 ml นำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยวิธีนิ่งความดันไอน้ำ จากนั้นเชื้อเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 ลงไปแต่ละขวด เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่มีอัตราการเขย่า 170 rpm อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน นำไปปั่นแยกเซลล์ออกที่ 6,000 rpm นาน 20 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปตรวจหาแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส โดยใช้สารละลาย DNS

## 2.2.4 การศึกษาผลของระยะเวลาในการเลี้ยง *B. subtilis* NSRS89-24 ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

เตรียมอาหารเหลว NB ปริมาตร 800 ml ที่เติมโคตินผง 0.3% และ yeast extract 0.3% กวนให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 50 °C แบ่งใส่ขวดขนาด 250 ml 8 ขวด โดยใส่ขวดละ 100 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ แล้วถ่ายกล้าเชื้อ (ข้อ 2.1.2.2) ลงในอาหารเหลว NB ขวดละ 1 ml เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่มีอัตราการเขย่า 170 rpm อุณหภูมิ 30 °C เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลา 0-7 วัน โดยเก็บตัวอย่างวันละ 1 ขวด นำมาปั่นแยกเซลล์ที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสที่ได้กรองผ่านแผ่นกรอง นำส่วนที่กรองได้มาหาปริมาณโปรตีนและแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

## 2.2.5 การเตรียมสารตัวอย่างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเพื่อทำให้บริสุทธิ์

ขั้นตอนการเตรียมดังแผนภาพหน้า 34 ดังนี้

2.2.5.1 เตรียมอาหารเหลว NB ปริมาตร 1 ลิตร เติมโคติน 0.3% และ yeast extract 0.3% กวนให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 50 °C แบ่งใส่ขวดขนาด 500 ml 5 ขวด โดยใส่ขวดละ 200 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ

2.2.5.2 ถ่ายกล้าเชื้อของ *B. subtilis* NSRS89-24 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว NB อายุ 24 hr ใส่ลงในอาหารที่เตรียมไว้ในข้อ 2.2.5.1 ขวดละ 2 ml เลี้ยงเชื้อไว้บนเครื่องเขย่าที่มีอัตราการเขย่า 170 rpm อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน นำมาปั่นแยกเซลล์ที่ 6,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนด้วย ammonium sulfate ที่มีความอิ่มตัว 80% ที่ไว้ค้างคืน นำมาปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา

บัฟเฟอร์เดิมโดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์หลายครั้ง เก็บสารตัวอย่างที่ได้ไว้ที่ 4 °C

## 2.2.6 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี

### 2.2.6.1 โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุกับ DEAE-sephacel

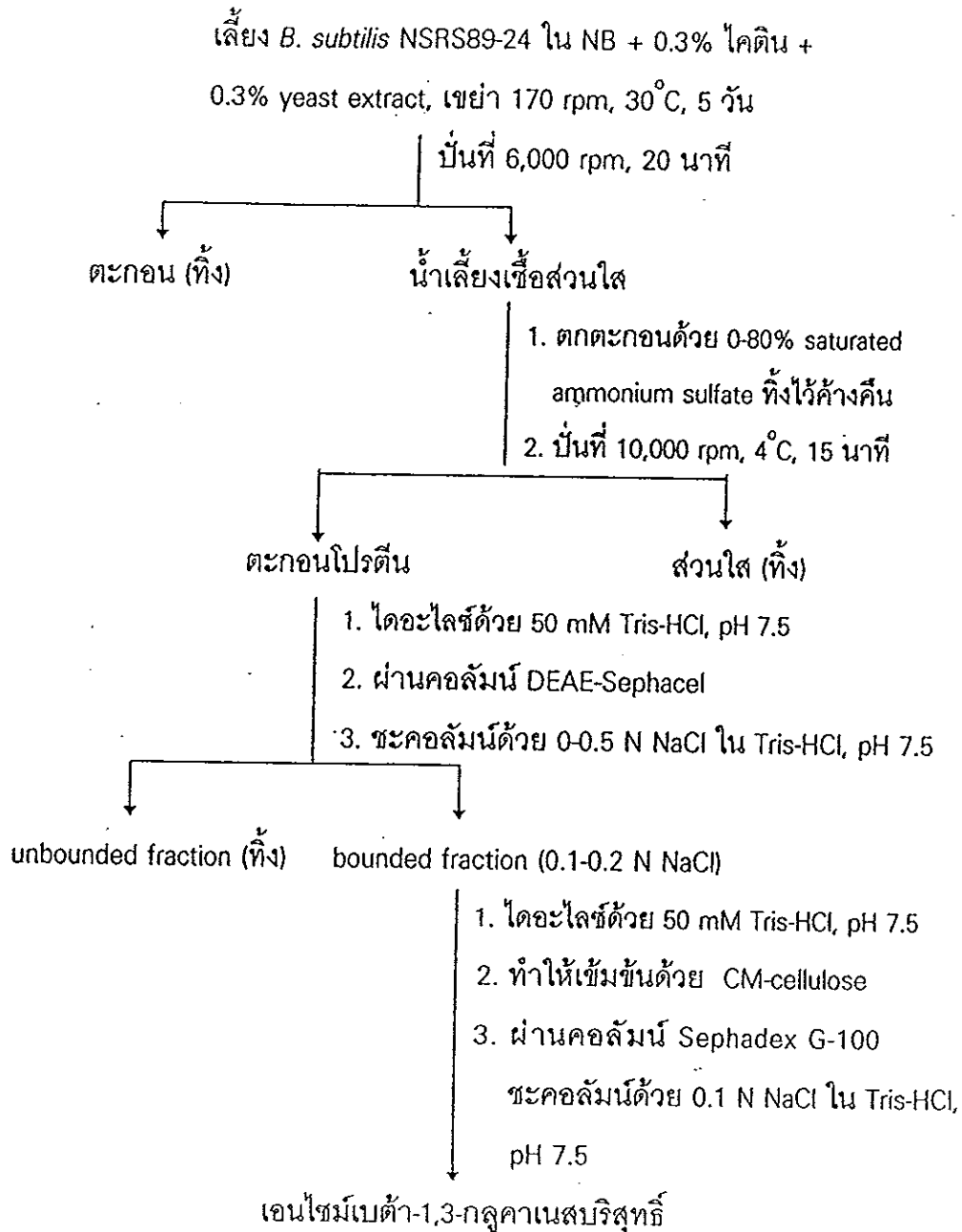
ใช้ DEAE-sephacel ปริมาตร 100 ml แช่ใน 0.1 M NaOH ปริมาตร 500 ml คนให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน เติสารละลายใส่ส่วนบนออกแล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหลายครั้งจน DEAE-sephacel มีสภาพเป็นกลาง จากนั้นเติม 0.1 M HCl ปริมาตร 500 ml คนให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอน เติสารละลายใส่ส่วนบนออกล้างด้วยน้ำกลั่นหลายครั้งจนมีสภาพเป็นกลาง จากนั้นค่อยๆ เติม 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

บรรจุ DEAE-sephacel ที่เตรียมไว้ลงในคอลัมน์ขนาด 2.5x25 cm (ปริมาตร 60 ml) ปรับคอลัมน์ให้สมดุลด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ปริมาตร 500 ml โดยปรับอัตราเร็วในการไหล (flow rate) ของบัฟเฟอร์ประมาณ 18 ml/hr จากนั้นค่อยๆ เติมสารตัวอย่างของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ปริมาตร 25 ml มีปริมาณโปรตีน 460.30 mg และมีแอกติวิตี 90 unit ลงในคอลัมน์ ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ด้วยอัตราเร็วคงเดิมเพื่อแยกเอาโปรตีนส่วนที่ไม่แลกเปลี่ยนประจุกับคอลัมน์ (unbound DEAE) เก็บสารตัวอย่างด้วยเครื่องเก็บสารละลายแยกส่วน (fraction collector) หลอดละ 3 ml นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm รอจนมีค่าเป็นศูนย์แล้วใส่สารละลาย sodium chloride ที่เข้มข้นต่อเนื่องระหว่าง 0-0.5 N ในบัฟเฟอร์ชนิดเดิม ชะเอาโปรตีนที่แลกเปลี่ยนประจุกับคอลัมน์ (bound DEAE) ออกมา นำโปรตีนแต่ละหลอดที่ได้มาตรวจหาแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จากนั้นไดอะไลซ์เอาเกลือออกผ่านถุงไดอะไลซิสโดยแช่ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 รวบรวมสารตัวอย่างแต่ละหลอดที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์เข้าด้วยกัน แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใส่ลงในถุงไดอะไลซิส ซึ่งยอมให้สารโมเลกุลเล็กกว่า 12 Kd ผ่านเข้าออกได้ โดยรอบ ๆ ถุงคลุมด้วย NaCM-cellulose (aquacide) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C รอจนสารละลายในถุงเหลือปริมาตรประมาณ 2-5 ml จึงนำออกมาทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วยวิธีเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟีต่อไป

#### 2.2.6.2 วิธีเจลฟิลเทรชันโครมาโตกราฟี

ซึ่ง Sephadex G-100 4 g แช่ลงในน้ำกลั่นปริมาตร 500 ml ต้มเป็นเวลา 5 hr คนให้เม็ดเจลพองตัวเต็มที่ ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนเศษส่วนใสทิ้งแล้วเติม 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ลงไป จากนั้นบรรจุเจลลงในคอลัมน์ขนาด 1.3x60 cm (ปริมาตร 80 ml) ปรับคอลัมน์ให้สมดุลด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ปริมาตร 500 ml ที่อุณหภูมิ 4°C เติมสารตัวอย่างเอนไซม์ที่แยกได้จาก DEAE-sephacel คอลัมน์มีปริมาณโปรตีน 8.5 mg และมีแอกติวิตี 54 unit ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์โดยปรับให้มีอัตราการไหล 6 ml/hr เก็บสารตัวอย่างด้วยเครื่องเก็บสารละลายแยกส่วนหลอดละ 1 ml นำสารละลายแต่ละหลอดไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm และหาแอกติวิตีของเอนไซม์ที่ความยาวคลื่น 540 nm ไดอะไลซ์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 รวมสารตัวอย่างแต่ละหลอดที่มีแอกติวิตีสูงเข้าด้วยกัน แล้วทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการคลุกด้วย NaCM-cellulose

## แผนภาพแสดงขั้นตอนการทำเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสให้บริสุทธิ์



## 2.2.7 การทำอิเล็กโตรฟอรีซิส

### 2.2.7.1 การเตรียมสารตัวอย่างของ ND-PAGE (ดัดแปลงจากวิธีการของ Davis, 1964)

นำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ 3 ส่วน มาเติม sample buffer สำหรับ ND-PAGE (ภาคผนวก) 1 ส่วน ผสมให้เข้ากัน หยอดลงในเจลที่เตรียมไว้

### 2.2.7.2 การเตรียมสารตัวอย่างของ SDS-PAGE (ดัดแปลงจากวิธีการของ Laemmli, 1970)

นำสารละลายตัวอย่างที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ 3 ส่วน มาเติม sample buffer สำหรับ SDS-PAGE (ภาคผนวก) 1 ส่วน ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มนาน 10 นาที หยอดลงในเจลที่เตรียมไว้

### 2.2.7.3 วิธีการทำอิเล็กโตรฟอรีซิส

แผ่นเจล (slab gel) ที่ใช้ทำอิเล็กโตรฟอรีซิสมีขนาด 8x10 cmหนา 1 mm ประกอบด้วยโพลีอะคริลลาไมด์เจล 2 ส่วนคือ stacking gel เป็นเจลชั้นบน และ separating gel หรือ resolving gel เป็นเจลชั้นล่างซึ่งใช้สำหรับการแยกโปรตีนชนิดต่างๆ ออกจากกัน ทำอิเล็กโตรฟอรีซิสที่อุณหภูมิห้องใน electrophoresis buffer สำหรับ ND-PAGE หรือ SDS-PAGE โดยใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 30 mA นาน 1.45 hr

### 2.2.7.4 การย้อมสีโปรตีน

แยกแผ่นเจลไปย้อมสีโปรตีนด้วยสารละลาย Coomassie brilliant blue R-250 นาน 4 hr ล้างสีที่ไม่ต้องการออกด้วยสารละลาย destaining จนกระทั่งเห็นแถบของโปรตีนชัดเจน

## 2.2.8 การหาแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสโดยวิธีอิเล็กโตรฟอรีซิส

### แบบไม่แปลงสภาพ (ND-PAGE) (ดัดแปลงจากวิธีการของ Davis, 1964)

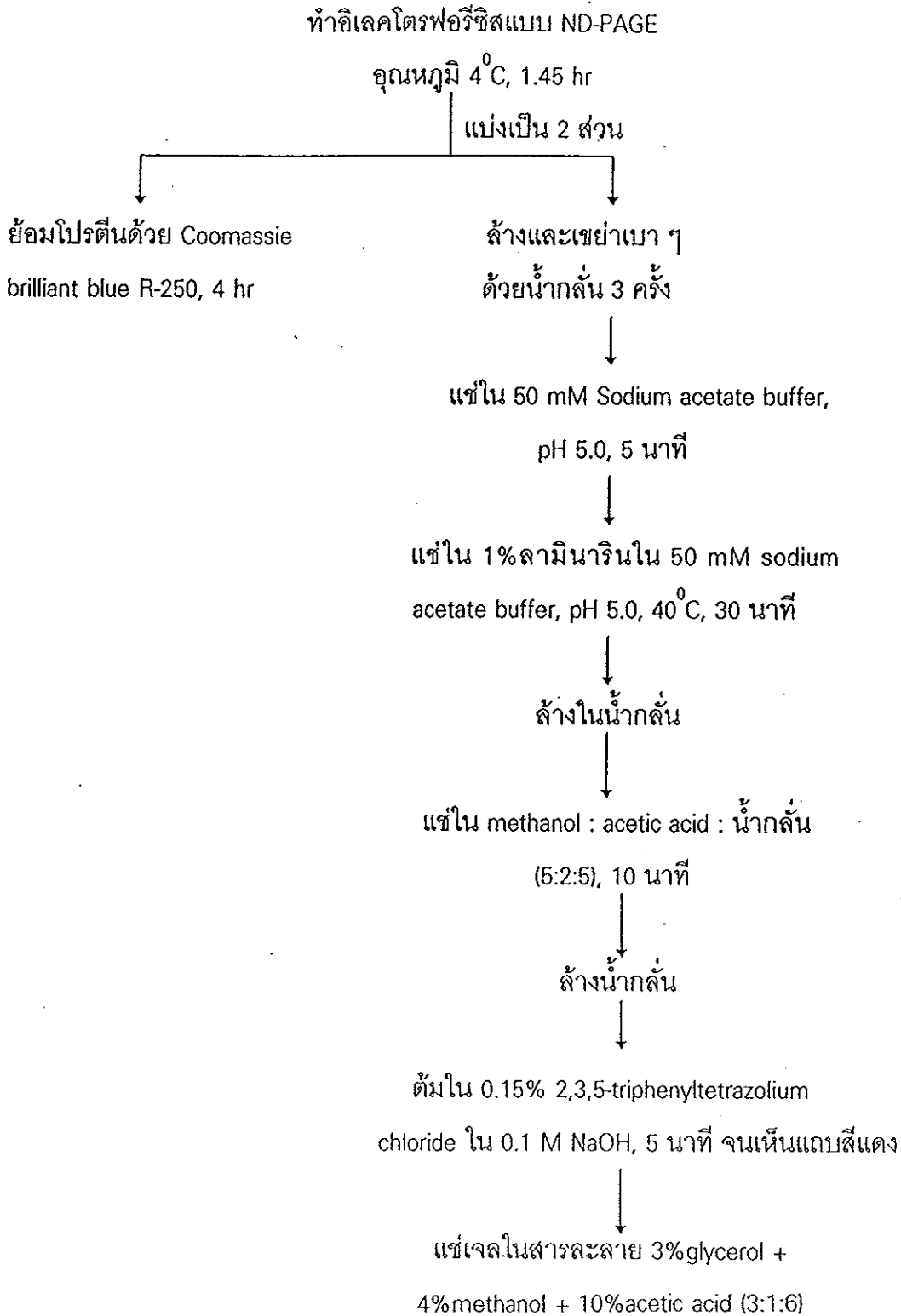
มีขั้นตอนดังแสดงในแผนภาพหน้า 37

เตรียมเจลสำหรับ ND-PAGE ที่เข้มข้นต่อเนื่อง 8-12% หยอดสารละลายตัวอย่าง 2 ชุดลงบนเจลแผ่นเดียวกันโดยแต่ละช่องมีปริมาณโปรตีน 100  $\mu$ g แล้วนำไปทำอิเล็กโตรฟอรีซิสที่อุณหภูมิ 4 °C ใช้กระแสไฟฟ้าคงที่ 30 mA นาน 1.45 hr จากนั้นแบ่งเจลออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งนำไปย้อมสีโปรตีนด้วยสารละลาย Coomassie brilliant blue R-250 นาน 4 hr ส่วนที่เหลือนำไปล้างและเขย่าเบา ๆ ในน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วแช่แผ่นเจลลงใน 50 mM sodium



acetate buffer, pH 5.0 นาน 5 นาที นำแผ่นเจลไปทำปฏิกิริยาต่อด้วยสารละลายสับสเตรต ลามินารินในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 40°C นาน 30 นาที (สารละลายสับสเตรตเตรียมจาก ลามินาริน 1 g ละลายในน้ำกลั่น 75 ml ต้มจนเดือดแล้วนำมาเติม 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 ปริมาตร 75 ml) ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่น แล้วแช่ลงในสารละลายซึ่ง ประกอบด้วย methanol : acetic acid : น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 5:2:5 นาน 5 นาที ล้างแผ่น เจลด้วยน้ำกลั่น นำแผ่นเจลไปย้อมด้วยสารละลายของ 0.15% 2,3,5 triphenyltetrazolium chloride ใน 1 N NaOH ปริมาตร 100 ml ต้มและเขย่านาน 10 นาที จนปรากฏแถบสีแดง แสดงถึงแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส นำแผ่นเจลไปแช่ในสารละลายซึ่งประกอบ ด้วย 3% glycerol : 4% methanol : 10% acetic acid ในอัตราส่วน 3:1:6 เพื่อกำจัดสีส่วนเกิน ออก

แผนภาพแสดงขั้นตอนการตรวจหาแอกติวิตีของ  
เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส โดยวิธี ND-PAGE



## 2.2.9 หาค่าน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

### 2.2.9.1 โดยวิธีเจลฟิลเตรชัน

เตรียม Sephadex G-100 คอลัมน์ (ตามข้อ 2.2.6.2) เติมสารละลาย เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและสารละลายมาตรฐาน (blue dextran, potassium dichromate, carbonic anhydrase, catalase และ BSA) ชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ซึ่งมีอัตราเร็วการไหลคงเดิม เก็บสารละลายหลอดละ 1 ml โดยใช้เครื่องเก็บสารละลายแยกส่วน หลังจากนั้นนำสารละลายแต่ละหลอดไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm เพื่อหาปริมาตรระ ของ blue dextran (M.W. 2,000 Kd) หรือ void volume ( $V_0$ ) อ่านค่าการดูดกลืนแสง 480 nm เพื่อหาปริมาตรระของ potassium dichromate (M.W. 294.17 Kd) หรือ total volume ( $V_t$ ) และอ่านค่าการดูดกลืนแสง 280 nm เพื่อหาปริมาตรระ ( $V_i$ ) ของโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งโปรตีน มาตรฐานที่ใช้ในการทดลองนี้ได้แก่ carbonic anhydrase (M.W. 30 Kd), BSA (M.W. 67 Kd) และ catalase (M.W. 232 Kd) นำค่าปริมาตรระของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส และโปรตีน มาตรฐานมาหาค่า K เพื่อหาน้ำหนักโมเลกุลจากสมการ

$$K = V_0 - V_i / V_i$$

เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า K กับค่า log molecular weight ของสารละลายมาตรฐาน คำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์จากกราฟมาตรฐาน

### 2.2.9.2 โดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบแปลงสภาพ (SDS-PAGE)

หาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในโพลีอะครีลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้นต่อ เนื้อ 8-12% จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างของเอนไซม์มาทำอิเล็กโตรโฟรีซิสพร้อมกับสาร ละลายโปรตีนมาตรฐาน ได้แก่ phosphorylase (M.W. 94 Kd), BSA (M.W. 67 Kd), ovalbumin (M.W. 45 Kd), carbonic anhydrase (M.W. 30 Kd) และ  $\alpha$ -lactalbumin (M.W. 14 Kd) ผ่าน กระแสไฟฟ้าคงที่ที่ 30 mA ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1.45 hr นำแผ่นเจลมาย้อมสี Coomassie brilliant blue R-250 แล้ววัดระยะการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่าง โปรตีนมาตรฐาน และแถบ ของ bromophenol blue คำนวณหาค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ (relative mobility,  $R_f$ ) ของสาร จากสมการ

$$\text{การเคลื่อนที่สัมพัทธ์} = \frac{\text{ระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่ไป}}{\text{ระยะทางการเคลื่อนที่ของแถบสีโบรมอฟีนอลบลู}}$$

เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า  $R_f$  กับค่า  $\log$  molecular weight ของโปรตีนมาตรฐาน  
คำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์จากกราฟมาตรฐาน

#### 2.2.10 การศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

ศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ต่อสับสเตรตลามินารินที่มี  
ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0.5, 0.7, 0.9, 1.1 และ 1.3 mg/ml โดยใส่ลามินารินแต่ละความ  
เข้มข้นปริมาตร 0.2 ml ลงในหลอดทดสอบ 10 หลอด จากนั้นเติมเอนไซม์ปริมาตร 10  $\mu$ l นำ  
ไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 40°C ที่เวลาแตกต่างกันหลอดละ 1 นาที เมื่อครบเวลา 10  
นาที นำแต่ละหลอดมาต้มในอ่างน้ำเดือดทันทีเป็นเวลา 2 นาที แล้วเติมสารละลาย DNS  
และบัฟเฟอร์อย่างละ 0.2 ml ต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่น 0.9  
ml นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm คำนวณหาค่า  $K_m$  และ  $V_{max}$  จาก  
การเขียนกราฟระหว่างค่า  $1/V$  และ  $1/[S]$  ตามวิธีการของ Michaelis-Menten

#### 2.2.11 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์

นำเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่บริสุทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24  
ใส่หลอดทดสอบ 8 หลอด ๆ ละ 10  $\mu$ l นำมาอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 20, 30, 40, 50, 60,  
70, 80 และ 90°C ตามลำดับ เป็นเวลา 30 นาที นำไปทดสอบหาแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า  
-1,3-กลูคาเนสเปรียบเทียบกับแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ  
-20°C

#### 2.2.12 การศึกษาผลของ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เบต้า-1,3- กลูคาเนส

หาแอกติวิตีของเอนไซม์ที่มีโปรตีนปริมาตร 10  $\mu$ l ผสมกับสับสเตรตลามินาริน  
90  $\mu$ l ในปฏิกิริยาที่บัฟเฟอร์มีความเข้มข้น 50 mM และมี pH แตกต่างกันระหว่าง 3.0-11.0  
โดยใช้ sodium acetate buffer, pH 3.0-6.9, Tris-HCl, pH 7.0-8.9, glycine buffer, pH 9.0-11.0  
เปรียบเทียบแอกติวิตีของเอนไซม์ที่อยู่ในสารละลายที่มี pH ต่างๆ กัน

#### 2.2.13 การหาค่า MIC (Minimum Inhibitory Concentration) และ $EC_{50}$ (Effective Concentration 50) ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจาก

*B. subtilis* NSRS89-24

##### 2.2.13.1 การเตรียมเชื้อรา

เลี้ยงเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* บนอาหาร PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องจนเชื้อราเจริญเกือบเต็มจานอาหาร จากนั้นใช้หลอดแก้วที่ปราศจากเชื้อและมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 mm เจาะเส้นใยของเชื้อราบริเวณโคโลนีขอบนอก

#### 2.2.13.2 การเตรียมสารละลายเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

นำเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์มาเจือจางอย่างมีลำดับแบบ 1:2 โดยใช้ 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 1-0.015 unit/ml กรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรู 0.45  $\mu\text{m}$

#### 2.2.13.3 การเตรียมสไลด์หลุม

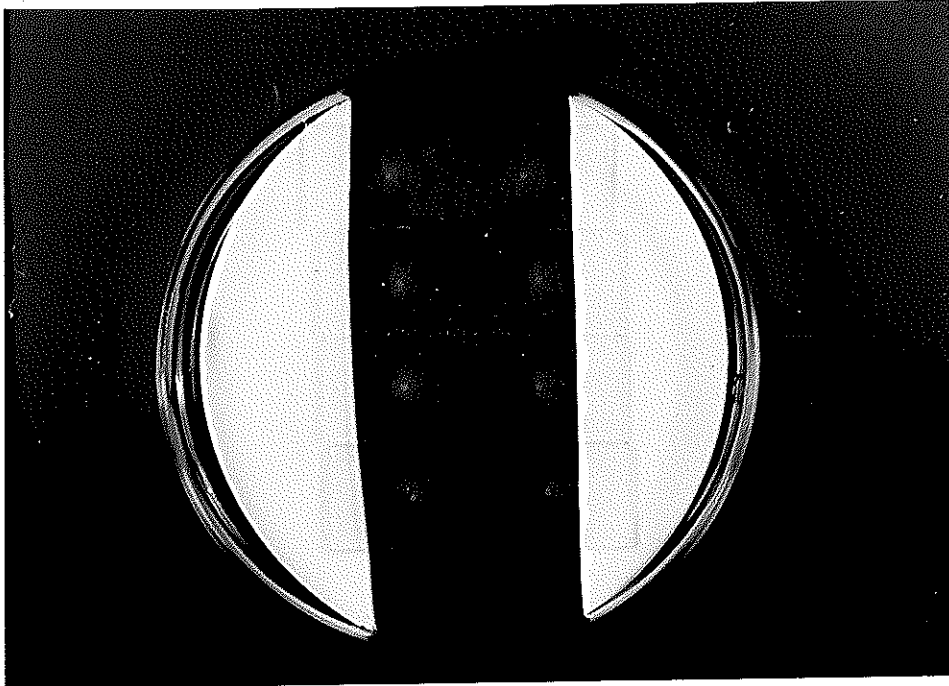
ใช้จานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 cm วางแผ่นสไลด์หลุมซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุม 1.5 cm โดยวางลงบนกระดาษกรอง (รูปที่ 4) จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ

#### 2.2.13.4 วิธีการทดสอบ

ทำในสไลด์หลุมตามวิธีของ Picman และคณะ (1990)

หยดน้ำปลอดเชื้อลงบนกระดาษกรองในจานที่วางสไลด์หลุมพวยขึ้น ผสมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA หลอมเหลว อุณหภูมิ 50°C ปริมาตร 0.9 ml กับเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสปริมาตร 0.1 ml ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันจนเข้ากัน ดูดใส่ในสไลด์หลุมๆ ละ 0.1 ml ทำซ้ำความเข้มข้นละ 8 หลุม สำหรับชุดควบคุมใช้ตัวทำละลายคือ 50 mM Tris-HCl แทนเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จากนั้นวางเชื้อราขนาด 1 mm ลงตรงกลางหลุมแต่ละหลุมเลี้ยงเชื้อรา *R. solani* ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 hr ส่วนเชื้อรา *P. grisea* เลี้ยงเป็นเวลา 48 hr วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราในแต่ละหลุมด้วย micrometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo zoom นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งตามวิธีในข้อ 2.1.2 คำนวณค่า MIC และ  $EC_{50}$  โดยใช้ 2-Sample T-Test ด้วยโปรแกรม Statistix (Gamliel *et al.*, 1989)

ค่า MIC ในที่นี้หมายถึง ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้โดยทำให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีชุดทดสอบแตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P < 0.05$ ) จากนั้นนำค่าเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งเชื้อราและค่าความเข้มข้นของสารมาเขียนเส้นกราฟการตอบสนอง (dosage response curve หรือ toxicity curve) เพื่อหาค่า Effective Concentration 50 ( $EC_{50}$ ) หรือค่าความเข้มข้นของสาร



รูปที่ 4 การทดสอบฤทธิ์การด้านราของสารบนสไลด์กลม ซึ่งประกอบด้วยจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 14 cm , กระจกทรงและสไลด์กลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 cm วางเชื้อราขนาด 0.5 mm ตรงกลางหลุมบนอาหารทดสอบ

ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 50% โดยการคำนวณจากกราฟ กราฟที่ได้จะถูกดัดแปลงให้เป็นกราฟเส้นตรง โดยค่าความชันของกราฟจะขึ้นอยู่กับค่า  $R^2$  ที่เหมาะสมซึ่งควรจะมีค่าอยู่ในช่วง 0.8-1 และจากกราฟที่ได้นี้สามารถคำนวณหาค่า  $EC_{50}$  ของสารได้จากสมการ linear regression

$$y = ax + b$$

โดย  $y$  = เปอร์เซนต์ของการยับยั้งเชื้อรามีค่าเท่ากับ 50

$a$  = ค่าความชันของกราฟ

$b$  = จุดตัดบนแกน  $y$

$x$  = ค่าความเข้มข้นของสาร

## 2.3 การศึกษาสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* NSRS89-24

### 2.3.1 การผลิตสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* NSRS89-24

ดัดแปลงจากวิธีการของ Mckeen และคณะ (1986) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. เตรียมอาหารเหลวสังเคราะห์ (ภาคผนวก) ปริมาตร 2 ลิตร ปรับ pH เท่ากับ 6.0-6.2 ด้วย 12 M HCl แบ่งใส่ขวดขนาด 500 ml ขวดละ 200 ml นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ

2. เตรียมกล้าเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 โดยเลี้ยงบนจานอาหาร PDA เป็นเวลา 24 hr จากนั้นเขี่ยเชื้อลงในขวดขนาด 250 ml ที่มีอาหารเหลวสังเคราะห์ 100 ml เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่มีอัตราการเขย่า 170 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 hr

3. ดูดกล้าเชื้อที่ได้ใส่ลงในอาหารเหลวที่เตรียมไว้ในข้อ 1 โดยใส่ขวดละ 2 ml เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่มีอัตราการเขย่า 170 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 3 วัน นำตัวอย่างสารละลายที่ได้มาปั่นแยกเซลล์ที่ 6,000 rpm นาน 20 นาที เก็บส่วนใสที่ได้มาปรับ pH เท่ากับ 2.5 ด้วย 12 M HCl จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปั่นแยกตะกอนด้วยความเร็ว 10,000 rpm นาน 15 นาที สกัดสารจากตะกอนที่ได้ด้วย 80% ethanol แล้วนำไปปั่นแยกด้วยความเร็วเดิมเก็บส่วนใสไว้ ส่วนตะกอนนำมาสกัดใหม่อีกครั้งด้วย 80% ethanol นำไปปั่นแยกและเก็บส่วนใสที่ได้จากการสกัดทั้ง 2 ครั้งรวมกัน นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง rotatory evaporator เพื่อนำน้ำหนักแห้งของสารปฏิชีวนะที่ได้ จากนั้นละลายสารด้วย 80% ethanol เก็บไว้ที่ 4°C

### 2.3.2 การหาค่า MIC และค่า $EC_{50}$ ของสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* NSRS 89-24 ต่อการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea*

#### 2.3.2.1 การเจือจางสารปฏิชีวนะ

นำสารปฏิชีวนะที่สกัดได้มาเตรียมเป็น stock solution ความเข้มข้น 10 mg/ml โดยละลายใน 80% ethanol กรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรู 0.45  $\mu$ m แล้วนำมาเจือจางอย่างมีลำดับแบบ 1:2 ให้ได้ความเข้มข้นในช่วง 1000-15.62  $\mu$ g/ml

สำหรับการเตรียมอาหาร PDA การเตรียมเชื้อรา และการเตรียมสไลด์หลุมวิธีการเหมือนข้อ 2.2.13.1 และ 2.2.13.3

#### 2.3.2.2 วิธีการทดสอบ

ทำนองเดียวกับข้อ 2.2.13.4 แต่ใช้สารปฏิชีวนะแทนเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและใช้ 80% ethanol แทนสารปฏิชีวนะในชุดควบคุม

### 2.4 การทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* ของเอนไซม์

เบต้า-1,3-กลูคาเนสร่วมกับสารปฏิชีวนะโดยวิธี checkerboard

(ดัดแปลงจากวิธีการของ Lorian, 1991)

#### 2.4.1 การเจือจางสารปฏิชีวนะ

เตรียมสารปฏิชีวนะให้มีความเข้มข้นเป็น 20 เท่า ของค่า MIC ต่อเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* โดยจะมีค่าเท่ากับ 31.3 และ 15.6  $\mu$ g/ml ตามลำดับ แล้วมาเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงเป็น 1/2, 1/4 และ 1/8 เท่า โดยใช้ 80% ethanol เป็นตัวทำละลาย

#### 2.4.2 การเจือจางเอนไซม์

เตรียมเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสให้มีความเข้มข้นเป็น 20 เท่า ของค่า MIC ต่อเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* โดยจะมีค่าเท่ากับ 125 และ 62.50 mU/ml ตามลำดับ แล้วมาเจือจางให้มีความเข้มข้นลดลงเป็น 1/2, 1/4 และ 1/8 เท่า โดยใช้ 50 mM Tris-HCl เป็นตัวทำละลาย

การเตรียมเชื้อรา อาหาร PDA และสไลด์หลุมทำนองเดียวกับข้อ 2.2.13

#### 2.4.3 วิธีการทดสอบ

หยดน้ำปลอดเชื้อลงบนกระดาษกรองพอชื้น ผสมอาหาร PDA หลอมเหลวที่มีอุณหภูมิ 50°C ปริมาตร 0.9 ml ผสมกับสารละลายเอนไซม์และสารละลายปฏิชีวนะที่เตรียมไว้อย่างละ 50  $\mu$ l ในแต่ละความเข้มข้นจะได้ส่วนผสมของสารปฏิชีวนะและเอนไซม์ ดังแสดง



ในรูปที่ 5 ผสมจนเข้ากัน ดูใสในสไลด์หลุม ๆ ละ 0.1 ml ทำซ้ำ 8 หลุม สำหรับสารแต่ละชุดความเข้มข้น จากนั้นวางเชื้อราขนาด 1 mm ลงตรงกลางหลุม เลี้ยงเชื้อ *R. solani* และ *P. grisea* เช่นเดียวกับข้อ 2.2.13.4

#### 2.4.4 การวิเคราะห์ผลการทดสอบโดยวิธี checkerboard

การทดสอบการทำงานร่วมกันระหว่างเอนไซม์ (B) และสารปฏิชีวนะ (A) ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราโดยวิธี checkerboard โดยประเมินผลได้จากค่า FIC (Fractional Inhibitory Concentration) index ซึ่งหาได้ดังนี้

$$\text{FIC index} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B = (A) / (\text{MIC}_A) + (B) / (\text{MIC}_B)$$

$\text{FIC}_A, \text{FIC}_B$  = Fractional Inhibitory Concentration ของสาร A หรือ B

(A), (B) = ความเข้มข้นต่ำสุดของสาร A หรือ B ในสารผสมที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

$\text{MIC}_A, \text{MIC}_B$  = ค่า MIC ของสาร A หรือสาร B เพียงสารเดียว

ถ้า  $\text{FIC index} = 1.0$  หมายถึง สาร A และสาร B แสดงฤทธิ์ร่วมกัน (additive effect)

$\text{FIC index} > 1.0$  หมายถึง สาร A และสาร B แสดงฤทธิ์ต้านกัน (antagonism)

$\text{FIC index} \leq 0.5$  หมายถึง สาร A และสาร B แสดงฤทธิ์เสริมกัน (synergism)

ผลการทดลองที่เป็นไปได้ทั้ง 3 กรณี แสดงไว้ในรูปที่ 6

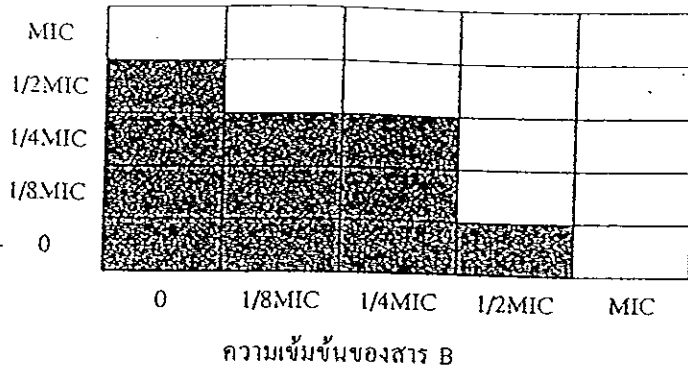
ความเข้มข้นของเอนไซม์

MIC					
1/2MIC					
1/4MIC					
1/8MIC					
0					
	0	1/8MIC	1/4MIC	1/2MIC	MIC

ความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะ

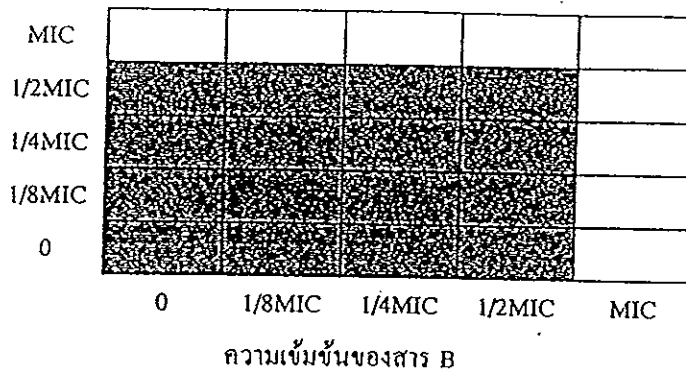
รูปที่ 5 อัตราส่วนผสมระหว่างสารปฏิชีวนะ กับเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์ ที่ถูกเจือจางให้มีความเข้มข้นเป็น 1/2, 1/4 และ 1/8 เท่าของค่า MIC ตามวิธี checkerboard

ความเข้มข้นของสาร A



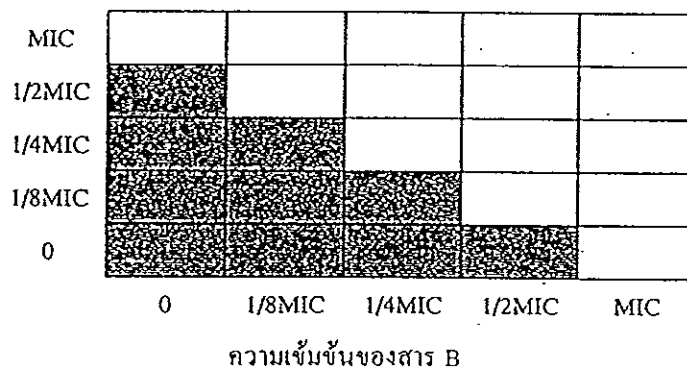
(ก)

ความเข้มข้นของสาร A



(ข)

ความเข้มข้นของสาร A



(ค)

รูปที่ 6 ตารางการประเมินผลการทำงานร่วมกันของสาร A และสาร B ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา

- ความเข้มข้นของสาร A และสาร B ที่ผสมกันแล้วสามารถยับยั้งเชื้อราได้แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ
- ความเข้มข้นของสาร A และสาร B ที่ผสมกันแล้วไม่สามารถยับยั้งเชื้อราได้แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

FIC index = 1.0 (ก), FIC index > 1.0 (ข), FIC index ≤ 0.5 (ค)

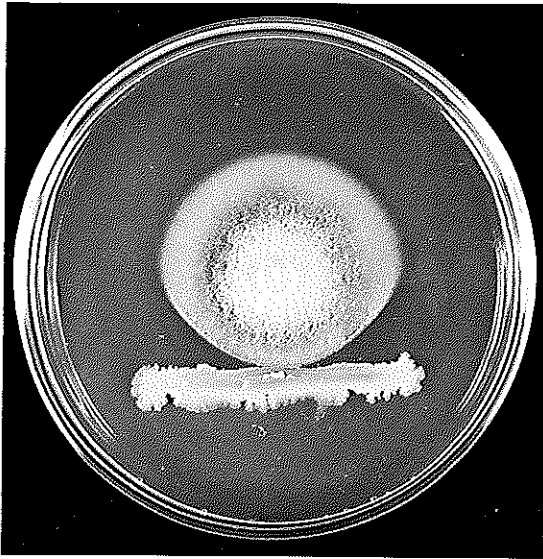
### 3 ผลการทดลอง

#### 3.1 ผลการศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อราก่อโรคเบื้องต้นโดยแบคทีเรีย ปฏิบั๊ภษ์ '*B. subtilis* NSRS89-24

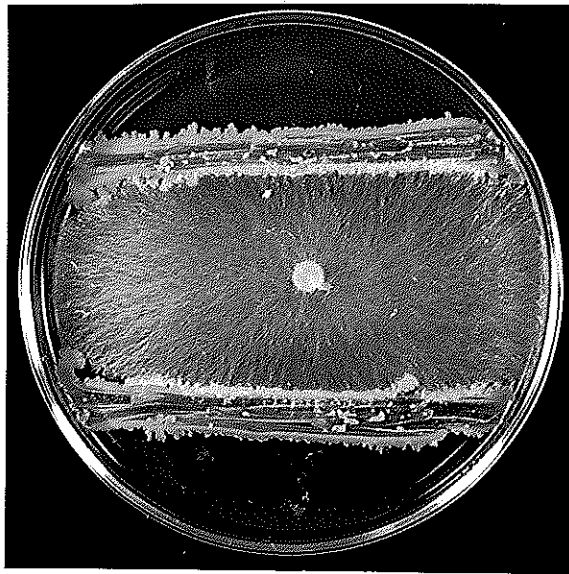
##### 3.1.1 ผลการทดสอบ *B. subtilis* NSRS89-24 ต่อการยับยั้งการเจริญของ เชื้อราโดย วิธี dual-culture plate

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* บนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิห้อง ปล่อยให้เชื้อราเจริญจนมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีกว้างประมาณ 4 cm จากนั้นเชื้อเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 ขีดลงข้างโคโลนีของเชื้อรา โดยให้มีระยะห่างจากเชื้อราประมาณ 0.5 cm เลี้ยงเชื้อ *R. solani* ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ส่วนเชื้อ *P. grisea* เลี้ยงนาน 5 วัน

จากการทดลองพบว่า *B. subtilis* NSRS89-24 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 2 ชนิดได้ สังเกตได้จากการเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ในบริเวณที่เชื้อราสัมผัสกับแบคทีเรีย ซึ่งจะมีลักษณะแตกต่างกับบริเวณควบคุมหรือบริเวณที่เชื้อราไม่ได้สัมผัสกับแบคทีเรีย (รูปที่ 7) จากผลการทดลองดังกล่าวอาจเนื่องมาจาก *B. subtilis* NSRS89-24 ได้ปล่อยสารพิษ (toxin) หรือสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราลงสู่อาหาร ทำให้เชื้อราไม่สามารถเจริญเข้ามาใกล้ได้ หรือไม่สามารถเจริญผ่านแบคทีเรียไปได้



(ก)



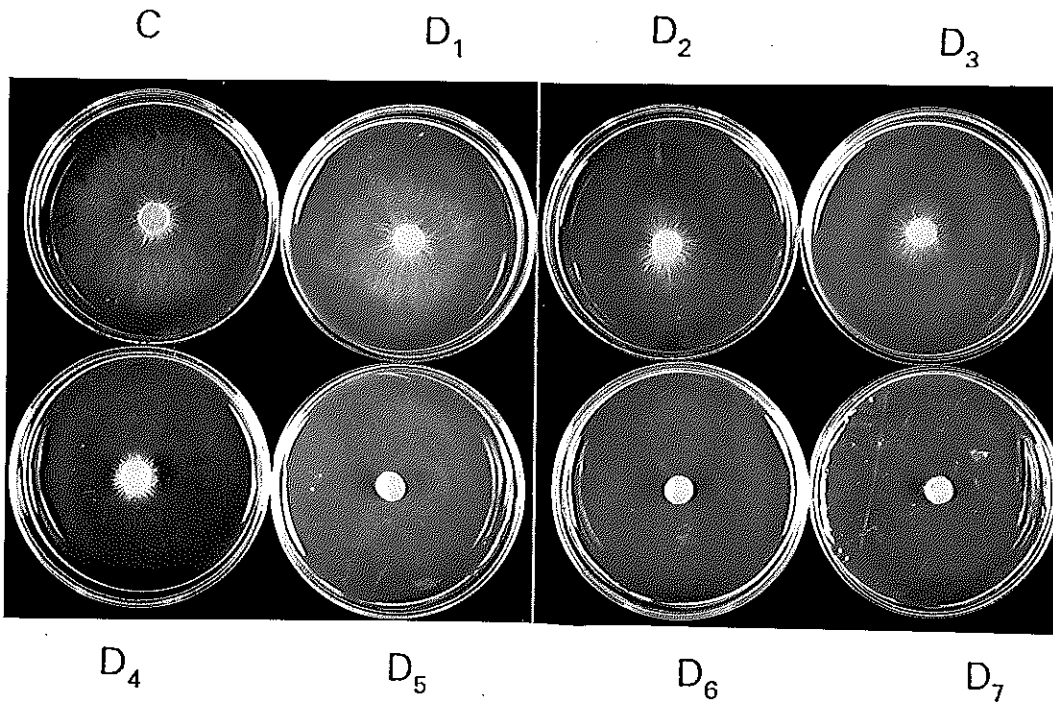
(ข)

รูปที่ 7 การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* (ก) และ *R. solani* (ข) โดยแบคทีเรีย  
ปฏิชีวนะ *B. subtilis* NSRS89-24 ด้วยวิธี dual-culture plate

3.1.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 ที่มีอายุต่างๆ กัน

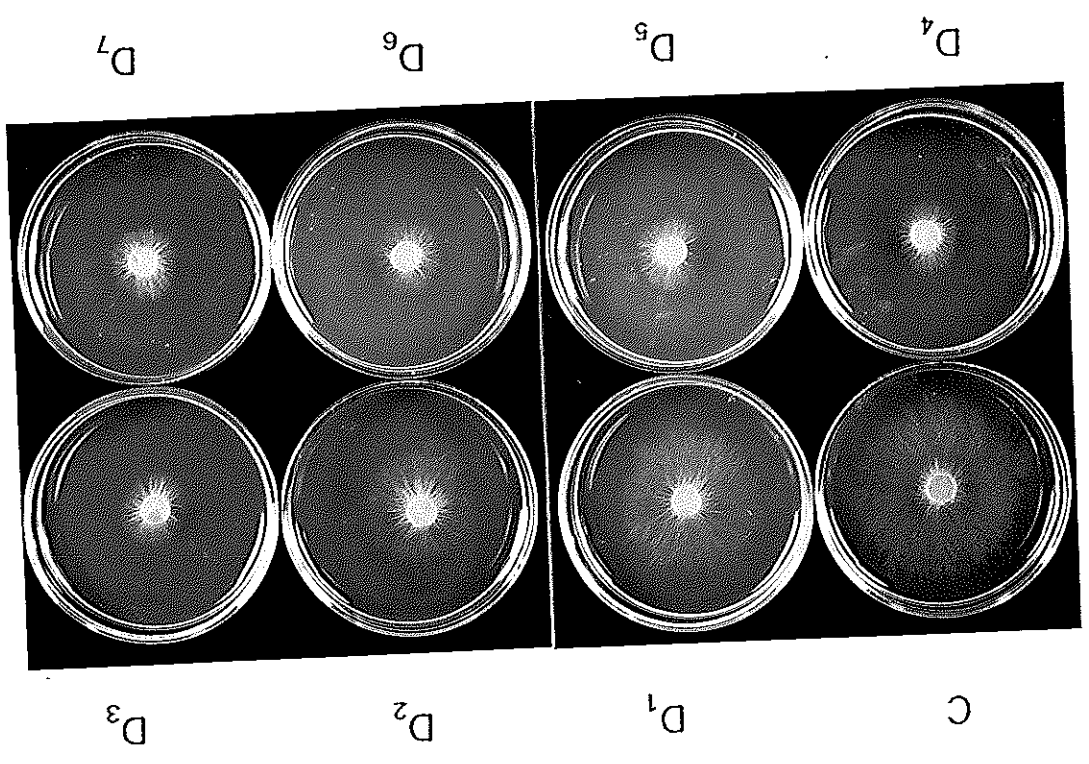
จากการทดลองเลี้ยง *B. subtilis* NSRS89-24 ในอาหารเหลว PDB เป็นเวลา 0-7 วัน ปั่นแยกเอาเซลล์ออกและแบ่งน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ (ส่วนใส) ออกเป็นสองส่วน ส่วนหนึ่งนำไปกรองด้วยแผ่นกรองส่วนที่เหลือนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ จากนั้นนำแต่ละส่วนมาผสมกับอาหาร PDA ที่เข้มข้นเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นปกติด้วยอัตราส่วน 1:1 แล้วทำการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อราบนจานอาหารปริมาตร 15 ml จะเห็นได้ว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 ตั้งแต่อายุ 1 วัน สามารถยับยั้งการเจริญของ *R. solani* และ *P. grisea* ได้ แต่เป็นการยับยั้งในระดับต่ำๆ โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ในช่วง 36-47 แต่เมื่อระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพิ่มขึ้นความสามารถในการยับยั้งเชื้อราทั้งสองก็เพิ่มขึ้นเป็นมากกว่า 80% ในวันที่ 3 และคงระดับอยู่ถึงวันที่ 7 (ตารางที่ 5, 6 และ รูปที่ 8, 9, 10, 11 และ 12) ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นชัดเจนว่า *B. subtilis* NSRS89-24 ผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ด้านราปล่อยออกมาในน้ำเลี้ยงเชื้อ

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างอาหารที่ผสมน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 ที่ผ่านการกรองและการนึ่งพบว่า น้ำเลี้ยงเชื้อที่กรองสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งสองชนิดได้ดีกว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่นึ่งอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 5 และ 6) โดยในการยับยั้ง *R. solani* นั้นจะเห็นความแตกต่างของน้ำเลี้ยงเชื้อทั้งสองส่วนตั้งแต่วันที่ 2 จนถึงวันที่ 7 ในส่วนของการยับยั้ง *P. grisea* จะเห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในน้ำเลี้ยงเชื้ออายุ 1-2 วัน หลังจากนั้นน้ำเลี้ยงเชื้อทั้งสองส่วนยับยั้ง *P. grisea* ได้ 100% ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการนึ่งน้ำเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาทีนั้น สามารถทำลายสารต้านเชื้อราบางชนิดที่ไม่ทนความร้อนจึงทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราลดลง นอกจากนี้ น้ำเลี้ยงเชื้อทั้งสองส่วนสามารถยับยั้งการเจริญของ *P. grisea* ได้ดีกว่า *R. solani* ซึ่งพิจารณาได้จากค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่มีค่าสูงกว่าตั้งแต่วันที่ 1 ได้ และน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองที่มีอายุ 2 วันขึ้นไปสามารถยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* ได้ 100% แต่น้ำเลี้ยงเชื้อที่มีอายุ 5 วันขึ้นไปจึงจะสามารถยับยั้งเชื้อรา *R. solani* ได้ 100% ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่นึ่งจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ได้สูงสุดประมาณเพียง 84%

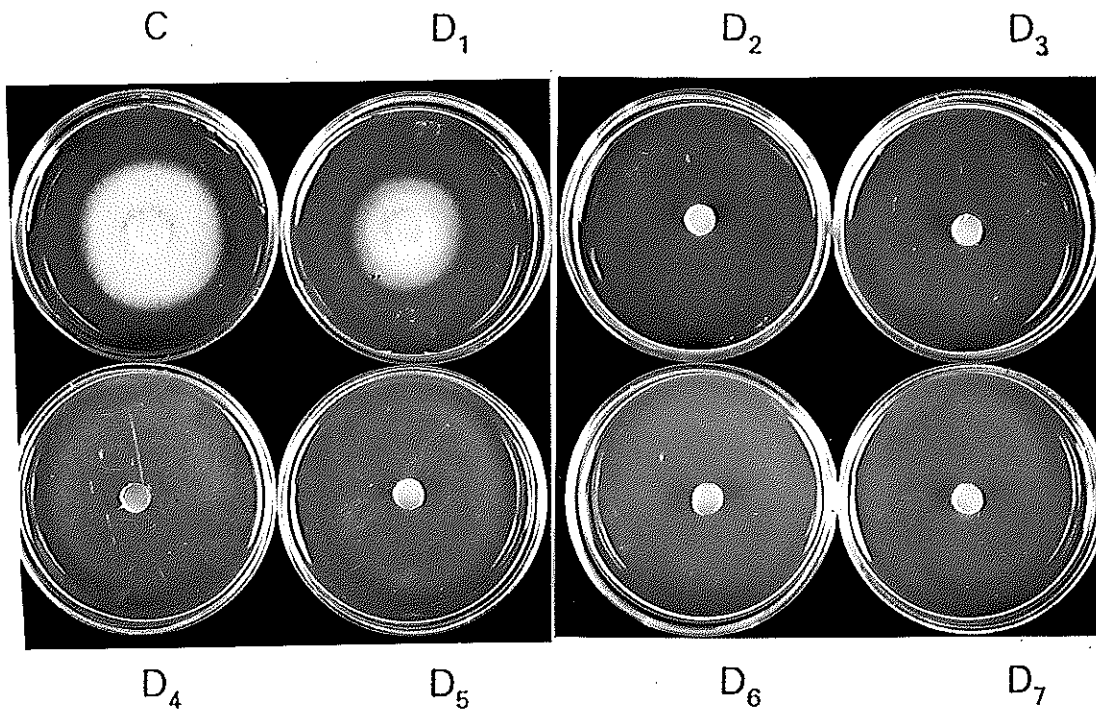


รูปที่ 8 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 ที่ผ่านการกรองและผสมกับอาหาร PDA, C หมายถึง อาหาร PDA ที่ผสมกับอาหารเหลว PDB (อาหารควบคุม), D<sub>1</sub>-D<sub>7</sub> หมายถึง อาหาร PDA ที่ผสมกับน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 ที่มีอายุ 1-7 วัน ตามลำดับ

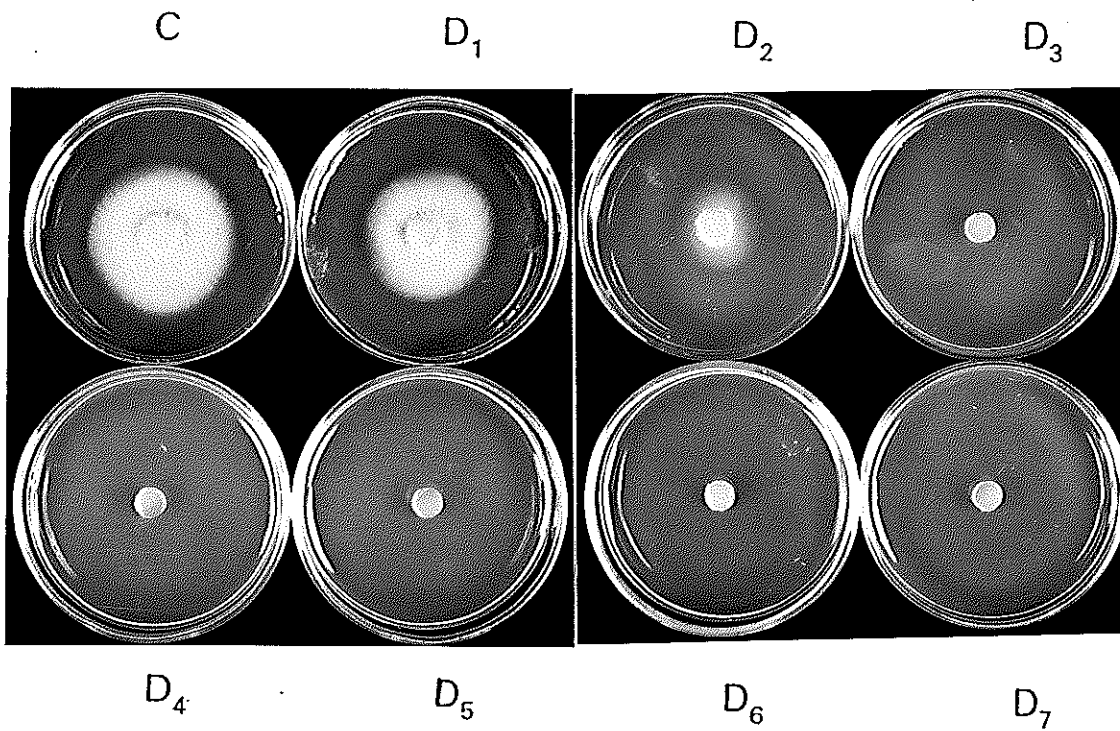
รูปที่ 9 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ของแบคทีเรีย *B. subtilis* NSRS89-24 ผ่านการนำแบคทีเรียและผสมกับอาหาร PDA, C หมายถึงอาหาร PDA ที่ผสมกับอาหารเหลว PDB (อาหารควบคุม), D<sub>1</sub>-D<sub>7</sub> หมายถึงอาหาร PDA ที่ผสมกับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* NSRS89-24 ที่อายุ 1-7 วัน ตามลำดับ







รูปที่ 10 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 ที่ผ่านการกรองและผสมกับอาหาร PDA, C หมายถึง อาหาร PDA ที่ผสม กับอาหารเหลว PDB (อาหารควบคุม), D<sub>1</sub>-D<sub>7</sub> หมายถึง อาหาร PDA ที่ผสม กับน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 ที่มีอายุ 1-7 วัน ตามลำดับ



รูปที่ 11 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* ของน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 ที่ผ่านการนึ่งและผสมกับอาหาร PDA, C หมายถึง อาหาร PDA ที่ผสม กับอาหารเหลว PDB (อาหารควบคุม), D<sub>1</sub>-D<sub>7</sub> หมายถึง อาหาร PDA ที่ผสม กับน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 ที่มีอายุ 1-7 วัน ตามลำดับ

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 อายุ 1-7 วัน ที่ทำให้สะอาดด้วยวิธีการนึ่งและกรอง

อายุน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B. subtilis</i> NSRS89-24 (วัน)	รัศมีของโคโลนีเชื้อรา <i>R. solani</i> $\pm$ SD (mm)	
	นึ่ง	กรอง
0 (ชุดควบคุม)	16.5 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>	16.5 $\pm$ 0.30 <sup>a</sup>
1	13.00 $\pm$ 0.33 (37.86) <sup>b</sup>	12.6 $\pm$ 0.22 (41.63) <sup>b</sup>
2	9.60 $\pm$ 0.08 (65.94) <sup>c</sup>	8.30 $\pm$ 0.25 (74.21) <sup>d</sup>
3	6.50 $\pm$ 0.21 (84.46) <sup>e</sup>	4.60 $\pm$ 0.21 (92.14) <sup>f</sup>
4	6.80 $\pm$ 0.21 (83.24) <sup>e</sup>	3.30 $\pm$ 0.21 (95.99) <sup>f</sup>
5	6.80 $\pm$ 0.29 (83.24) <sup>e</sup>	2.50 $\pm$ 0 (100) <sup>g</sup>
6	6.30 $\pm$ 0.33 (85.95) <sup>e</sup>	2.50 $\pm$ 0 (100) <sup>g</sup>
7	6.50 $\pm$ 0.21 (84.46) <sup>e</sup>	2.50 $\pm$ 0 (100) <sup>g</sup>

หมายเหตุ 1 ขนาดรัศมีของ inoculum เท่ากับ 2.5 mm

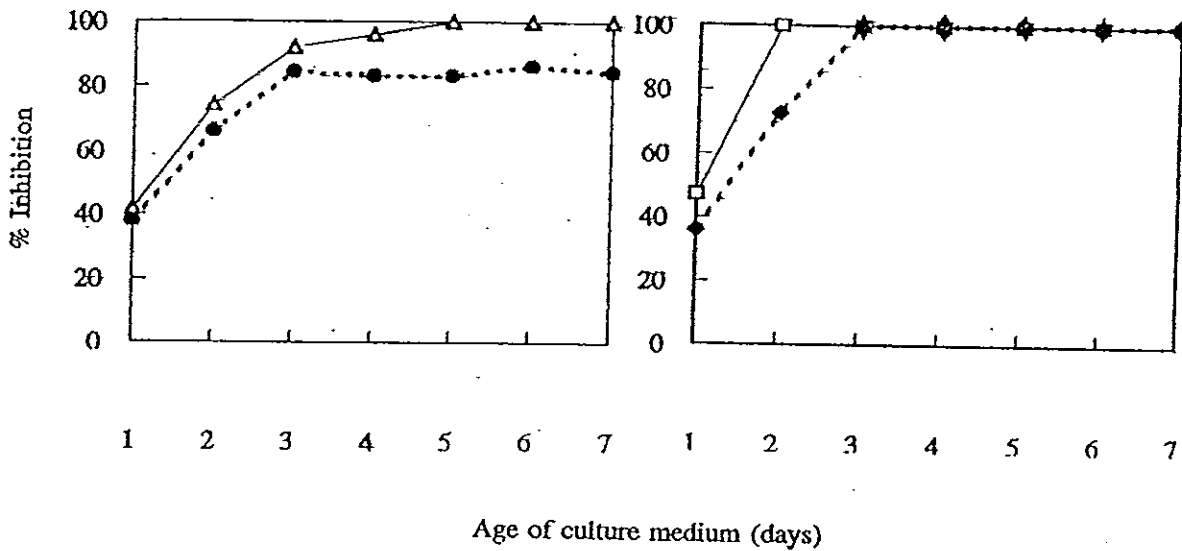
2 ตัวเลขที่มีอักษรกำกับ (a, b, ..., g) เหมือนกัน แสดงความไม่แตกต่างกันทางสถิติที่มีนัยสำคัญ และตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันแสดงความแตกต่างกันทางสถิติที่มีนัยสำคัญ

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 มีอายุ 1-7 วัน ที่ทำให้สะอาดด้วยวิธีการนึ่งและกรอง

อายุน้ำเลี้ยงเชื้อ <i>B. subtilis</i> NSRS89-24 (วัน)	รัศมีของโคโลนีเชื้อรา <i>P. grisea</i> $\pm$ SD (mm) (%การยับยั้ง)	
	นึ่ง	กรอง
0 (ชุดควบคุม)	14.40 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>	14.40 $\pm$ 0.40 <sup>a</sup>
1	11.50 $\pm$ 0.40 (36.11) <sup>b</sup>	10.50 $\pm$ 0.30(46.99) <sup>c</sup>
2	7.60 $\pm$ 0.40 (72.83) <sup>d</sup>	2.50 $\pm$ 0 (100) <sup>e</sup>
3	2.50 $\pm$ 0 (100) <sup>e</sup>	2.50 $\pm$ 0 (100) <sup>e</sup>
4	2.50 $\pm$ 0 (100) <sup>e</sup>	2.50 $\pm$ 0 (100) <sup>e</sup>
5	2.50 $\pm$ 0 (100) <sup>e</sup>	2.50 $\pm$ 0 (100) <sup>e</sup>
6	2.50 $\pm$ 0 (100) <sup>e</sup>	2.50 $\pm$ 0 (100) <sup>e</sup>
7	2.50 $\pm$ 0 (100) <sup>e</sup>	2.50 $\pm$ 0 (100) <sup>e</sup>

หมายเหตุ 1 ขนาดรัศมีของ inoculum เท่ากับ 2.5 mm

2 ตัวเลขที่มีอักษรกำกับ (a, b,..., e) เหมือนกันแสดงความไม่แตกต่างกันทางสถิติที่มีนัยสำคัญ และตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติที่มีนัยสำคัญ

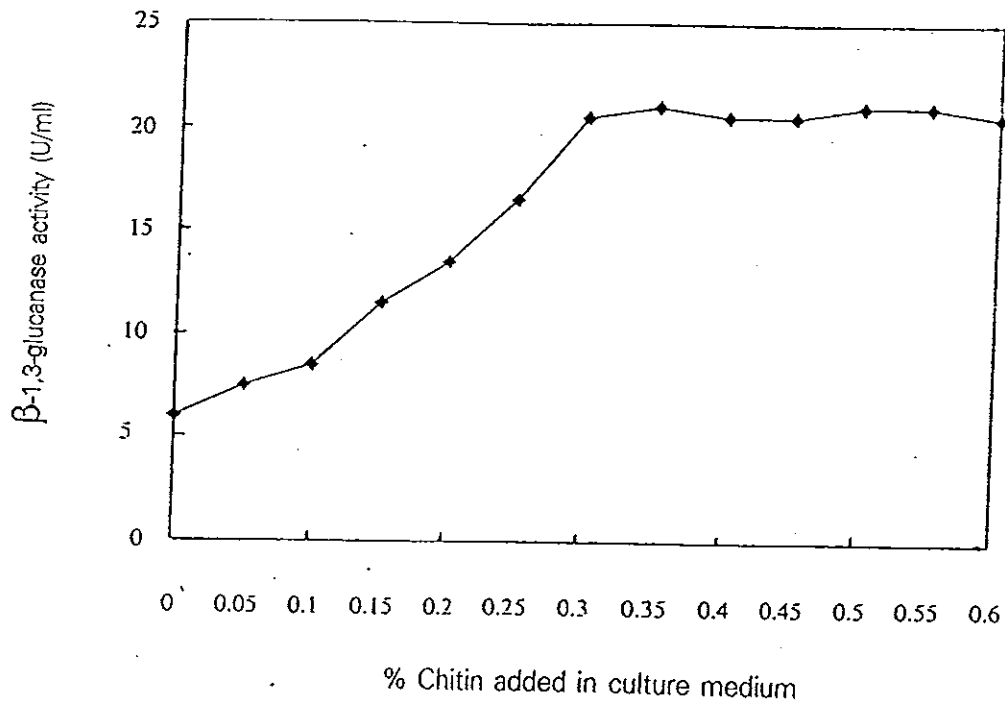


รูปที่ 12 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* โดยน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 อายุต่างๆ กันที่ผ่านการกรองและการนึ่ง (—△—) เปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรอง, (---●---) เปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่ง, (—□—) เปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่ง, (---◆---) เปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* ของน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรอง,

### 3.2 การศึกษาเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจาก *B. subtilis* NSRS89-24

#### 3.2.1 ผลการศึกษาปริมาณโคตินที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสโดย *B. subtilis* NSRS89-24

จากการทดลองนำโคตินมาบดให้เป็นผงละเอียด เติมน้ำลงในอาหารเหลว NB ในปริมาณ 0.1-0.6% แล้วนำมาเลี้ยง *B. subtilis* NSRS89-24 บนเครื่องเขย่าที่มีอัตราความเร็ว 170 rpm อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำไปปั่นที่ 6,000 rpm นาน 20 นาที นำส่วนใสที่ได้มาตรวจหาแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสโดยวิธี colorimetric จากผลการทดลองพบว่าโคตินสามารถชักนำให้มีการผลิตเอนไซม์มากขึ้น โดยแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อมีความเข้มข้นของโคตินในน้ำเลี้ยงเชื้อตั้งแต่ 0.05-0.25% จนมีแอกติวิตีของเอนไซม์สูงสุดและคงที่เมื่อโคตินมีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.3% เป็นต้นไป ซึ่งแสดงถึงปริมาณโคตินความเข้มข้น 0.3% เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการชักนำให้ *B. subtilis* NSRS89-24 สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในปริมาณสูงสุด (รูปที่ 13)

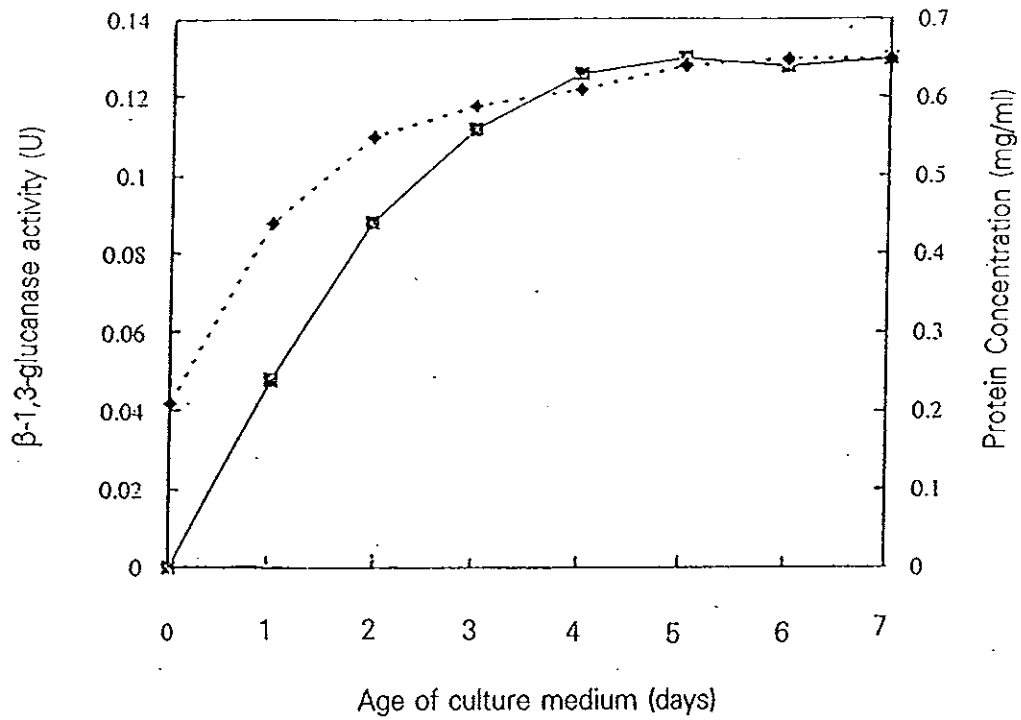


รูปที่ 13 ปริมาณไคตินในน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 ที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูควเนส

### 3.2.2 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้า-1,3- กลูคาเนสจาก *B. subtilis* NSRS89-24

ในการศึกษาเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเลี้ยง *B. subtilis* NSRS89-24 ให้ได้เอนไซม์ในปริมาณสูงสุด โดยทำการทดลองโดยเลี้ยง *B. subtilis* NSRS89-24 ในอาหารเหลว NB ที่เสริมด้วยโคติน 0.3% จำนวน 7 ขวด นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีอัตราการเขย่า 170 rpm อุณหภูมิ 30°C จากนั้นจึงทำการเก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อวันละ 1 ขวดจนครบ 7 วัน นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อของแต่ละวันมาตรวจหาแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส และปริมาณโปรตีนพบว่า ระยะเวลา 5 วันเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส โดย *B. subtilis* NSRS89-24 มีการสร้างโปรตีนปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 และวันที่ 2 ซึ่งสอดคล้องกับค่าแอกติวิตีของเอนไซม์ซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 1. และ 2 และจะค่อย ๆ สร้างเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตั้งแต่วันที่ 3 เป็นต้นไป และปริมาณโปรตีนเริ่มคงที่ตั้งแต่วันที่ 5 ในขณะที่เดียวกันแบคทีเรียมีการสร้างเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 1-4 และเริ่มสร้างในปริมาณคงที่ตั้งแต่วันที่ 5 เป็นต้นไป (รูปที่ 14)





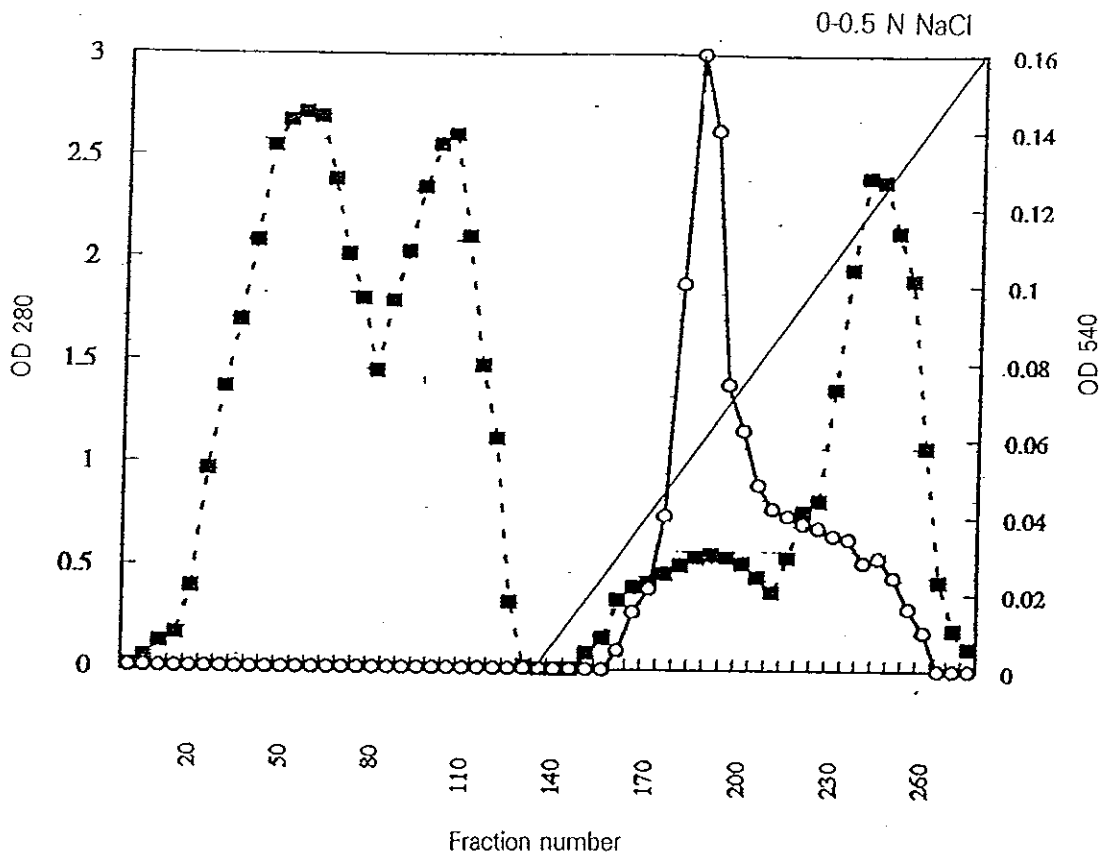
รูปที่ 14 แอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส และความเข้มข้นของโปรตีนในน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. subtilis* NSRS89-24 อายุต่าง ๆ กัน, (—■—) แอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส, (—◆—) ความเข้มข้นของโปรตีน

### 3.2.3 ผลการทำเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสให้บริสุทธิ์

#### 3.2.3.1 การทำโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุกับ DEAE-sephacel

จากการนำน้ำเลี้ยงเชื้อของ *B. subtilis* NSRS89-24 อายุ 5 วัน ผ่านการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate ที่มีความอิ่มตัว 80% มีแอกติวิตีของเอนไซม์ 90 unit มีปริมาณโปรตีน 460.31 mg ทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยแลกเปลี่ยนประจุกับ DEAE-sephacel ในคอลัมน์ขนาด 2.5x25 cm (ปริมาตร 60 ml) ซึ่งสมดุลย์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ให้อัตราไหลของสารละลายตัวอย่างและบัฟเฟอร์เท่ากับ 18 ml/hr เก็บสารละลายตัวอย่างด้วยเครื่องเก็บสารละลายแยกส่วนหลอดละ 3 ml จากนั้นใช้บัฟเฟอร์ล้างส่วนที่ไม่แลกเปลี่ยนประจุกับ DEAE-sephacel ออก และชะเอาสารตัวอย่างที่แลกเปลี่ยนประจุกับ DEAE-sephacel โดยใช้ sodium chloride ที่มีความเข้มข้นต่อเนื่อง 0-0.5 N ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 พบว่ามีแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในสารละลายตัวอย่างในช่วงความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 0.1-0.2 N จึงทำการรวบรวมสารตัวอย่างแต่ละหลอดเข้าด้วยกันเพื่อหาแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและปริมาณโปรตีนโดยรวม (รูปที่ 15)

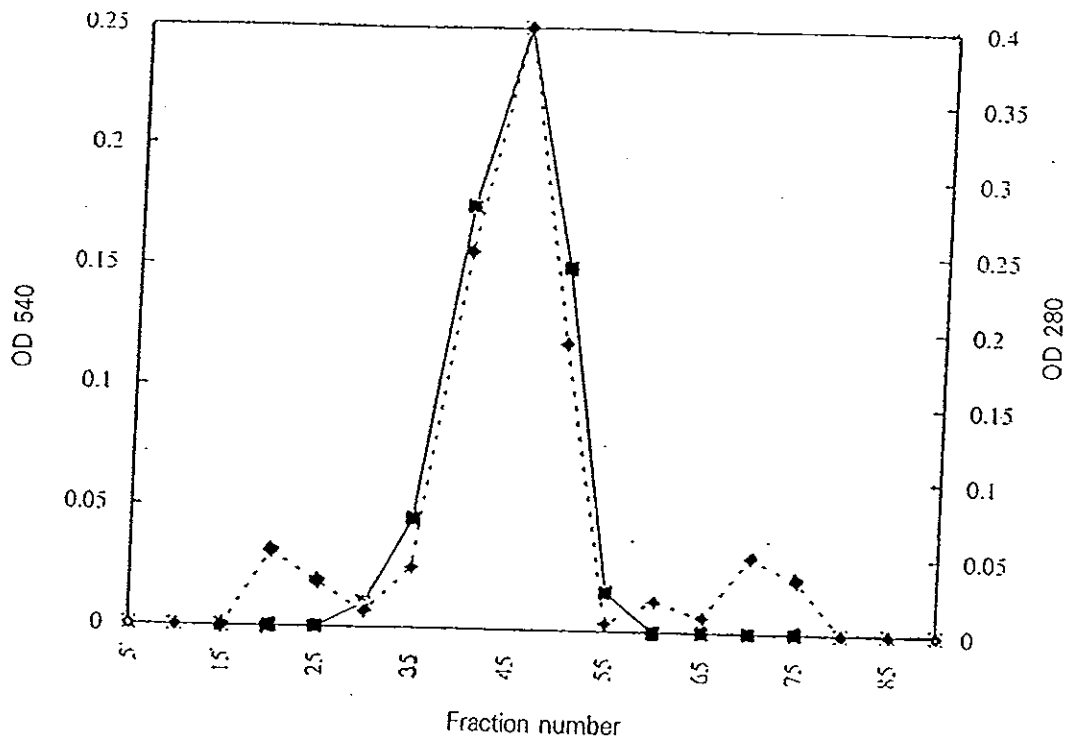
รวมสารละลายตัวอย่างจากหลอดที่ 40-75 ได้ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างทั้งหมด 105 ml มีแอกติวิตีรวม (total activity) ของเอนไซม์เท่ากับ 50 unit มีปริมาณโปรตีน 8.46 mg คิดเป็นแอกติวิตีจำเพาะ (specific activity) 5.9 unit/mg prot. ได้ปริมาณสุทธิ (yield) ของเอนไซม์ 39.37% และค่าความบริสุทธิ์ (purification fold) เท่ากับ 34.76 เท่า ดังแสดงในตารางที่ 7



รูปที่ 15 การทำเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคานเนสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 ให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุกับ DEAE-sephacel, (---■---) ปริมาณโปรตีนที่ OD<sub>280</sub>, (—○—) แอคติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคานเนสเมื่อชะด้วย 0-0.5 N NaCl ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.5

### 3.2.3.2 ผลการทำเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี

นำสารละลายเอนไซม์ที่แยกได้จากการทำคอลัมน์ DEAE-sephacel (รูปที่ 16) ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 8.46 mg มีแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส 54 unit มาแยกด้วยคอลัมน์ Sephadex G-100 พบว่าจะมีโปรตีนถูกชะออกมา 3 พีค รวบรวมโปรตีนในแต่ละพีค นำมาหาปริมาณโปรตีนและแอกติวิตีของเอนไซม์พบว่า โปรตีนพีคแรกและพีคที่ 3 ไม่มีแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ส่วนในพีคที่ 2 พบว่ามีแอกติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 35 unit มีปริมาณโปรตีน 5.62 mg คิดเป็นแอกติวิตีจำเพาะ 6.22 unit/mg prot และได้ปริมาณสุทธิของเอนไซม์ 27.56% ค่าความบริสุทธิ์ของเอนไซม์เท่ากับ 36.58 เท่า (ตารางที่ 7)



รูปที่ 16 การแยกเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสด้วยคอลัมน์ Sephadex G-100 ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, (---◆---) ปริมาณโปรตีนที่ OD<sub>280</sub>, (—■—) แอคติวิตีของ เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

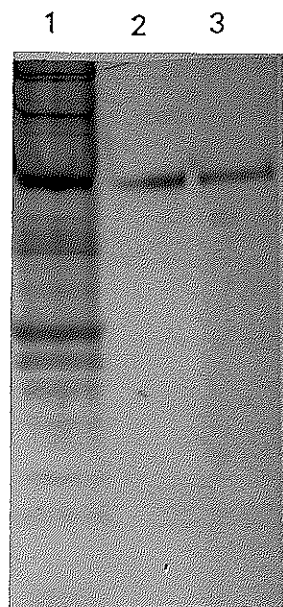
ตารางที่ 7 ขั้นตอนการทำเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสให้บริสุทธิ์จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis*  
NSRS89-24

ขั้นตอน	โปรตีน (mg)	แอกติวิตีของ เบต้า-1,3-กลู คาเนส (U)	แอกติวิตี จำเพาะ (U/mg prot)	ค่า ความ บริสุทธิ์ (เท่า)	ปริมาณ สุทธิ (%)
1. น้ำเลี้ยงเชื้อ	743	127	0.16	-	100
2. ตกตะกอนด้วย ammonium sulfate ที่มีความอิ่มตัว 80%	491	96	0.19	1.12	75.59
3. คอลัมน์ DEAE-sephacel	8.46	50	5.90	34.76	39.37
4. คอลัมน์ Sephadex G-100	5.62	35	6.22	36.58	27.56

### 3.2.4 การตรวจหาแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสโดยวิธี ND-PAGE (activity staining)

จากการทดลองเปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่อยู่ในน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีแลกเปลี่ยนประจุกับ DEAE-sephacel และวิธีเจลฟิเลตรชัน ตามลำดับ นำมาทำอิเล็กโตรโฟรีซิส แบบ ND-PAGE ที่เจลมีเข็มชั้นต่อเนื่อง 8-12% แบ่งเจลออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 ย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R-250 (รูปที่ 17) และส่วนที่ 2 แสงเจลในสับสเตรท 1% ลามินาริน ก่อนแล้วจึงย้อมด้วย 0.15% 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (รูปที่ 18)

จากรูปที่ 17 จะเห็นแถบโปรตีนในช่องที่ 2 และ 3 ย้อมติดสีน้ำเงินเพียงแถบเดียว ซึ่งเป็นตำแหน่งเดียวกันกับโปรตีนที่ย้อมติดสีแดงอมส้มในช่องที่ 1, 2 และ 3 ในรูปที่ 18 ซึ่งเป็นการยืนยันว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในน้ำเลี้ยงเชื้อ และเอนไซม์ที่แยกได้ด้วยคอลัมน์ DEAE-sephacel และ Sephadex G-100 เป็นเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเช่นเดียวกัน



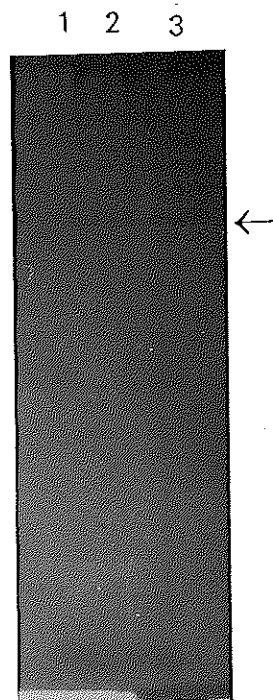
รูปที่ 17 แถบโปรตีนบน ND-PAGE ย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R-250

ช่องที่ 1 โปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 ปริมาณ 30  $\mu\text{g}$

ช่องที่ 2 เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ผ่านคอลัมน์ DEAE-sephacel ปริมาณ 10  $\mu\text{g}$

ช่องที่ 3 เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 ปริมาณ 10  $\mu\text{g}$





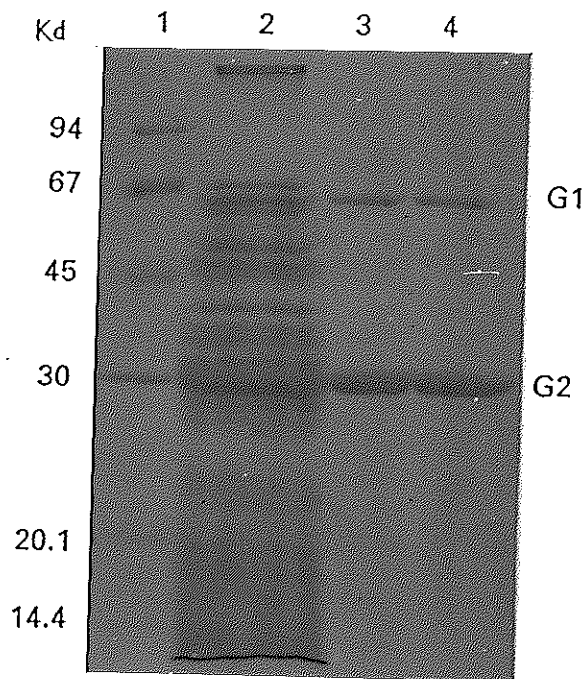
รูปที่ 18 แถบเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสบน ND-PAGE ที่ย่อยสับสเตรทลามินารินและ  
ย้อมสีด้วย 0.15% 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride  
ช่องที่ 1 สารตัวอย่างจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 มีปริมาณโปรตีน  
100  $\mu$ g  
ช่องที่ 2 สารตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ DEAE-sephacel มีปริมาณโปรตีน 100  $\mu$ g  
ช่องที่ 3 สารตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ Sephadex G-100 มีปริมาณโปรตีน 100  $\mu$ g

### 3.2.5 การหาน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

#### 3.2.5.1 โดยวิธี SDS-PAGE

เตรียมเจลให้มีความเข้มข้นต่อเนื่อง 8-12% ตามวิธีการในภาคผนวก ทำอิเล็กโตรฟอรีซิสเป็นเวลา 1.45 hr ย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R-250 เปรียบเทียบแบบแผนโปรตีนของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *B. subtilis* NSRS89-24 ที่มีอายุ 5 วัน กับแบบแผนโปรตีนที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ต่างๆ พบว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ได้มี 2 สับยูนิต (G1 และ G2) โดยจะปรากฏแถบโปรตีน 2 แถบ (รูปที่ 19)

สามารถคำนวณหาค่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ได้ โดยพิจารณาจากค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์ ( $R_f$ ) เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (ตารางที่ 8, รูปที่ 20) พบว่า เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสทั้ง 2 สับยูนิตมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 64.57 Kd (G1) และ 32.36 Kd (G2) ตามลำดับ



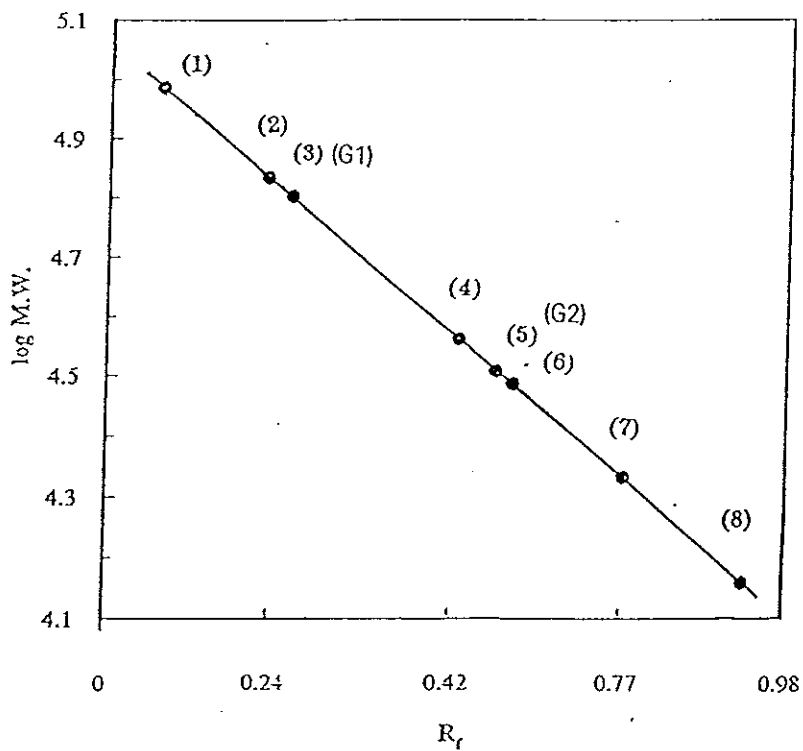
รูปที่ 19 แสดงแถบโปรตีนบน SDS-PAGE และย้อมสีด้วย Coomassie brilliant blue R-250

ช่องที่ 1 โปรตีนมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลคือ  $\alpha$ -lactalbumin (14.4 Kd) soybean trypsin inhibitor (20.1 Kd), carbonic anhydrase (30 Kd), ovalbumin (45 Kd), BSA (67 Kd) และ phosphorylase (94 Kd)

ช่องที่ 2 โปรตีนจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B.subtilis* NSRS89-24 ปริมาณ 30  $\mu$ g

ช่องที่ 3 โปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ DEAE-sephacel ปริมาณ 10  $\mu$ g

ช่องที่ 4 โปรตีนที่ผ่านคอลัมน์ sephadex G-100 ปริมาณ 10  $\mu$ g



รูปที่ 20 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า log molecular weight และค่า  $R_f$  เพื่อคำนวณค่า น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส (G1 และ G2) โดยวิธี SDS-PAGE เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานคือ phosphorylase (1), BSA (2), G1 (3), ovalbumin (4), G2 (5) carbonic anhydrase (6), soybean trypsin inhibitor (7),  $\alpha$ -lactoalbumin (8)

ตารางที่ 8 ค่าน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส (G1 และ G2) และ  
โปรตีนมาตรฐาน

สารตัวอย่าง	ระยะทางที่ เคลื่อนที่ได้ (cm)	M.W. (Kd)	log M.W.	ค่า $R_f$
tracking dye	7.10	-	-	-
$\alpha$ -lactalbumin	6.55	14.40	4.16	0.92
soybean trypsin inhibitor	5.48	20.10	4.30	0.77
carbonic anhydrase	4.20	30.00	4.48	0.59
ovalbumin	3.00	45.00	4.65	0.42
BSA	1.73	67.00	4.82	0.24
phosphorylase	0.64	94.00	4.97	0.09
G1	4.75	64.57	4.81	0.26
G2	2.30	32.36	4.51	0.56

### 3.2.5.2 โดยวิธีเจลฟิลเตรชัน

สามารถหาน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ได้โดยวิธีเจลฟิลเตรชัน โดยใช้สารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลและสารละลายของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ผ่านลงในคอลัมน์ Sephadex G-100 ขนาดคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 คำนวณหาปริมาตรชะ ( $V_e$ ) ของโปรตีนแต่ละชนิดเพื่อนำมาหาค่า K ได้จากสูตร

$$K = \frac{V_e - V_o}{V_i} = \frac{V_e - V_o}{V_i - V_o}$$

เมื่อ K = สัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตร

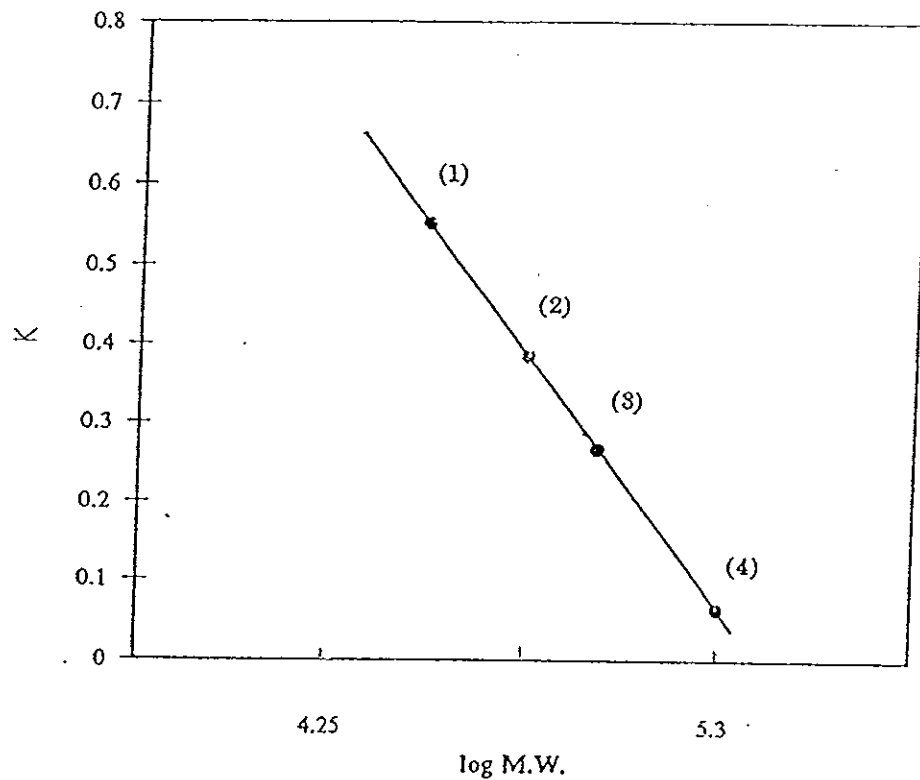
$V_e$  = ปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ชะโปรตีนแต่ละชนิดออกมาจากคอลัมน์

$V_o$  = ปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ชะ blue dextran

$V_i$  = ปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ชะ potassium dichromate

$V_i = V_i - V_o$

จากการทดลองพบว่าค่า  $V_e$  และ  $V_o$  ที่ได้มีค่าเท่ากับ 81.5 และ 18.5 ml ตามลำดับ นำมาหาคำนวณค่า K โดยการเขียนกราฟระหว่างค่า K กับค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานแต่ละตัว สามารถหาคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสได้ ซึ่งพบว่ามีค่าเท่ากับ 95.49 Kd (รูปที่ 21, ตารางที่ 9)



รูปที่ 21 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า log molecular weight กับค่า K ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสโดยวิธีเจลฟิลเตรชัน โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ คือ carbonic anhydrase (M.W. 30 Kd) (1), BSA (M.W. 67 Kd) (2), และ catalase (M.W. 23.2 Kd) (4) จากกราฟนี้ น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส (3) มีค่าเท่ากับ 95.49 Kd

ตารางที่ 9 ค่า K ที่คำนวณได้จากปริมาตรระ (V<sub>e</sub>) ของโปรตีนและสารตัวอย่างแต่ละชนิด  
ของคอลัมน์ Sephadex G-100

สารตัวอย่าง ที่ผ่านคอลัมน์	M.W. (Kd)	log M.W.	K	V <sub>e</sub> (ml)
blue dextran	2,000	6.3	-	18.5
catalase	232	5.3	0.063	22.5
BSA	67	4.82	0.37	42.0
carbonic anhydrase	30	4.48	0.56	53.5
potassium dichromate	0.29	2.47	-	81.5
β-1,3-glucanase	95.49	4.98	0.269	35.5

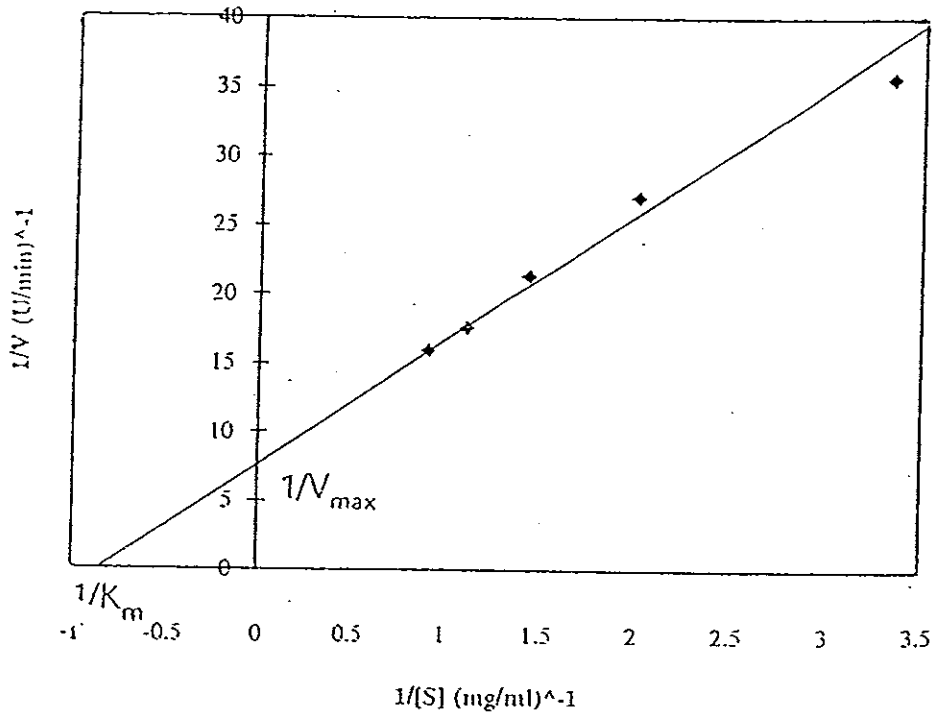


### 3.2.6 ผลการศึกษาจลนศาสตร์ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

จากการศึกษาอัตราเร็วของปฏิกิริยา (V) ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์ ต่อสับสเตรตลามินาริน [S] ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันระหว่าง 0.3-1.1 mg/ml จากนั้นเขียนกราฟมาตรฐานระหว่าง  $1/V$  กับ  $1/[S]$  สามารถหาค่า  $K_m$  ได้เท่ากับ 1.18 mg/ml และ  $V_{max}$  เท่ากับ 1.33 unit (ตารางที่ 10, รูปที่ 23)

ตารางที่ 10 แสดงแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส เมื่อใช้สับสเตรตลามินารินที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน

[S] (mg/ml)	1/[S] (mg/ml) <sup>-1</sup>	V (unit)	1/V (unit) <sup>-1</sup>
0.30	3.33	0.028	35.70
0.50	2.00	0.037	27.00
0.70	1.43	0.047	21.27
0.90	1.11	0.057	17.54
1.10	0.91	0.063	15.87



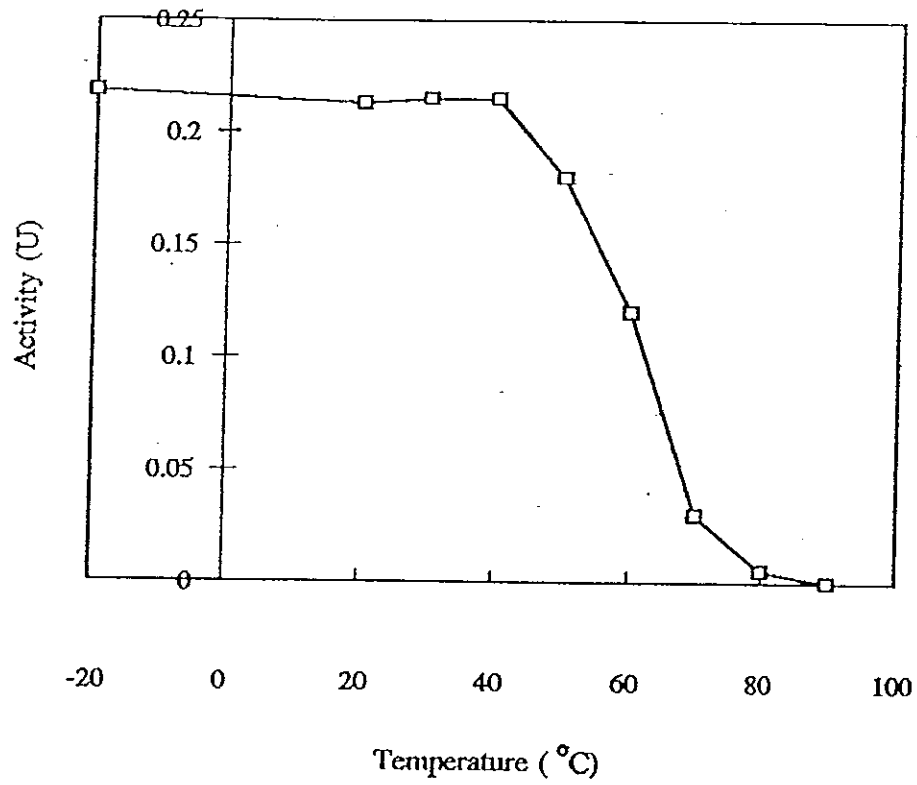
รูปที่ 22 กราฟแสดงการหาค่า  $K_m$  และ  $V_{max}$  ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24

$$-1/K_m = 1/0.85, K_m = 1.18 \text{ mg/ml}$$

$$1/V_{max} = 1/0.75, V_{max} = 1.33 \text{ unit}$$

### 3.2.7 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ที่เตรียมได้จาก *B. subtilis* NSRS89-24 หลังจากผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ต่าง ๆ นำมาอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว นำมาตรวจสอบแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส พบว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จาก *B. subtilis* NSRS89-24 สามารถทนอุณหภูมิในช่วง 20-40°C ได้ดี โดยหาค่าแอกติวิตีได้ใกล้เคียงกับเอนไซม์ที่เก็บไว้ที่ -20°C หลังจากนั้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นแอกติวิตีของเอนไซม์จะค่อย ๆ ลดลงและมีค่าเป็น 0 ที่อุณหภูมิ 90°C (รูปที่ 23)

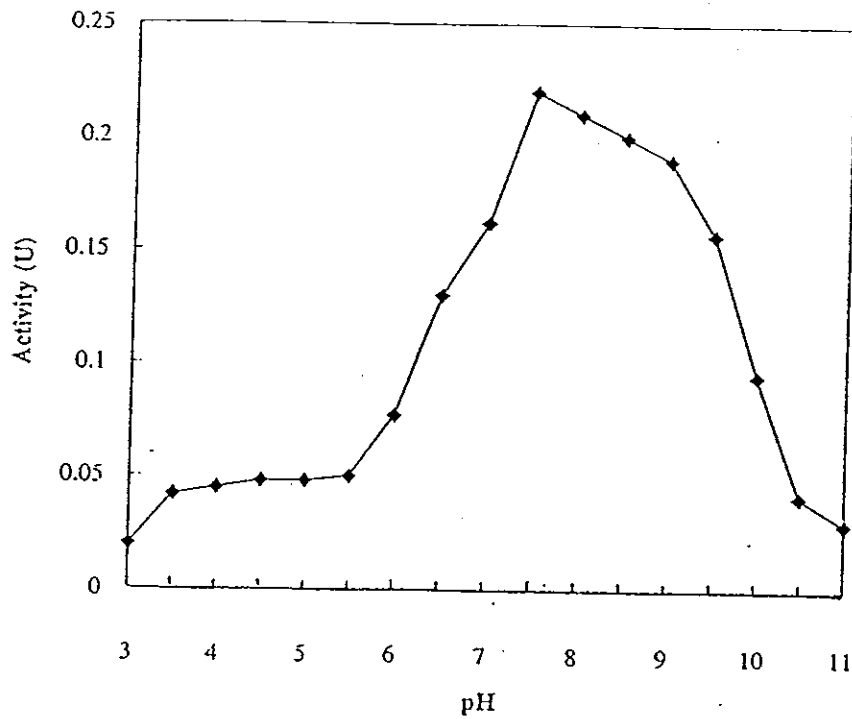


รูปที่ 23 ความเสถียรต่ออุณหภูมิของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อ

*B. subtilis* NSRS89-24

### 3.2.8 ผลของ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

จากการนำเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาหาแอกติวิตีในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH อยู่ระหว่าง 3-11 พบว่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วง 7.5-8.0 และมีแอกติวิตีสูงสุดที่ pH 7.5 และเมื่อสารละลายบัฟเฟอร์มีค่า pH มากกว่า 8.0 แอกติวิตีของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วจนมีค่าแอกติวิตีต่ำสุดที่ pH 11.0 (รูปที่ 24)



รูปที่ 24 ค่าแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ในปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยบัฟเฟอร์  
ที่มี pH แตกต่างกันในช่วง 3-11 โดยใช้ sodium acetate buffer pH 3.0-6.9,  
Tris-HCl pH 7-8.9 และ glycine buffer pH 9-11

### 3.3 ผลการศึกษาสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* NSRS89-24

#### 3.3.1 การผลิตสารปฏิชีวนะ

จากการทดลองผลิตสารปฏิชีวนะโดย *B. subtilis* NSRS89-24 โดยการเลี้ยงในอาหารเหลวสังเคราะห์ Mckeen ที่เสริมด้วย 0.1% glutamic acid ปริมาตร 2 ลิตร จากนั้นเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่มีอัตราการเขย่า 170 rpm อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาปั่นแยกเซลล์ที่ 6,000 rpm นาน 20 นาที นำส่วนใสที่ได้มาสกัดสารปฏิชีวนะตามวิธีการของ Mckeen และคณะ (1986) พบว่าสารปฏิชีวนะที่ได้มีลักษณะแห้งเหนียว สีน้ำตาลอมชมพู และมีน้ำหนักรวม 333.56 mg จากนั้นละลายกลับด้วย 80% ethanol เก็บไว้ที่ 4 °C เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

#### 3.3.2 ผลการหาค่า MIC และ EC<sub>50</sub> ของสารปฏิชีวนะและเอนไซม์เบต้า-1,3-

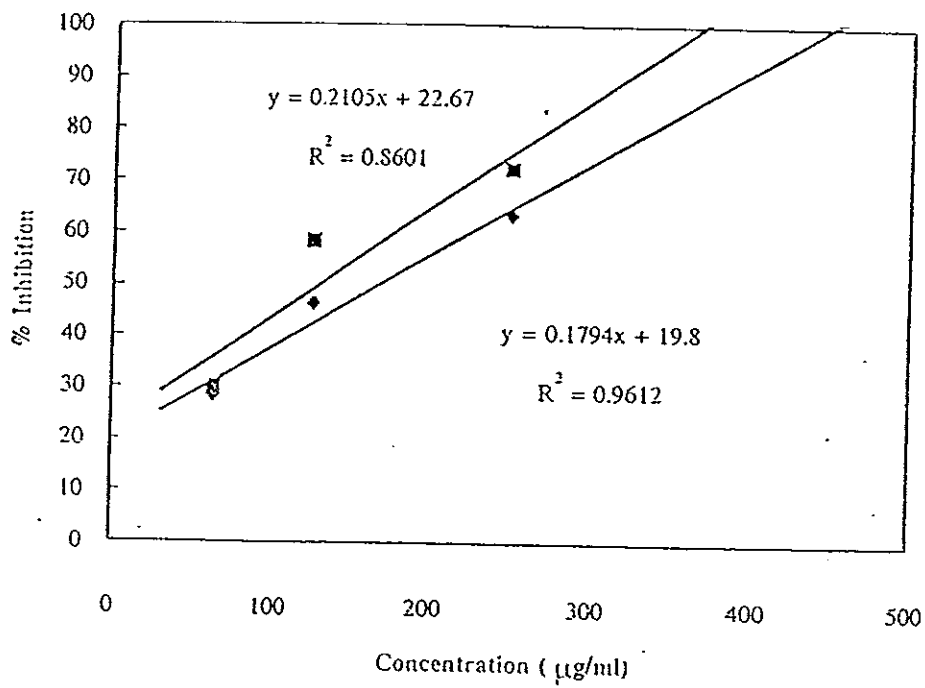
กลูคาเนสในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea*

จากการทดลองหาค่า MIC โดยการเจือจางสารปฏิชีวนะอย่างมีลำดับแบบ 1:2 โดยใช้ 80% ethanol เป็นตัวทำละลายจะได้ความเข้มข้นของสารเท่ากับ 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062, 0.031, 0.015 และ 0.007 mg/ml จากนั้นผสมกับอาหาร PDA ในอัตราส่วน 1:10 จะได้สารออกฤทธิ์ที่ถูกเจือจางลง 10 เท่า นำไปเลี้ยงเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* บนสไลด์หลุมที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดความกว้างของโคโลนีเชื้อราด้วยกล้อง stereo zoom หาค่าเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งเชื้อราของสารปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน เปรียบเทียบกับหลุมควบคุม แล้วนำมาวิเคราะห์หาค่า MIC ด้วยโปรแกรม Statistix จากผลการทดลองพบว่าค่า MIC ต่อเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* มีค่าเท่ากับ 3.13 และ 1.56 µg/ml ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าสารปฏิชีวนะที่ได้จาก *B. subtilis* NSRS89-24 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* ได้ไม่แตกต่างกับการยับยั้ง *R. solani* ดังจะเห็นได้จากค่า MIC ที่มีค่าแตกต่างกันเพียง 1 ลำดับ สำหรับเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสให้ผลการทดลองทำนองเดียวกับสารปฏิชีวนะโดยมีค่า MIC ต่อเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* เท่ากับ 12.50 และ 6.25 mU/ml ตามลำดับ

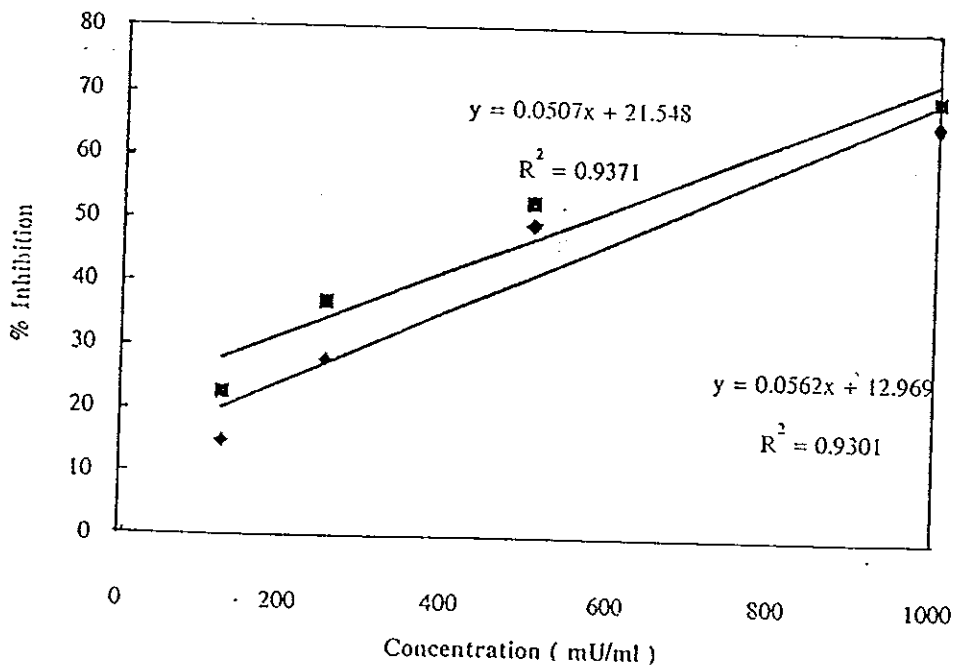
จากการนำค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราของสารปฏิชีวนะและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสกับค่าความเข้มข้นของสารมาเขียนกราฟการตอบสนอง (รูปที่ 25 และ 26) และคำนวณค่า EC<sub>50</sub> พบว่าสารปฏิชีวนะมีค่า EC<sub>50</sub> ต่อเชื้อรา *P. grisea* เท่ากับ 129.83 µg/ml ซึ่งน้อยกว่าค่า EC<sub>50</sub> ต่อเชื้อรา *R. solani* (168.34 µg/ml) และเมื่อพิจารณาความชันของกราฟทั้งสองเส้นจะเห็นว่ากราฟมีความชันใกล้เคียงกันและค่า EC<sub>50</sub> ที่ได้ก็ไม่แตกต่างกัน

มากนัก ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพของสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งสองชนิดได้ใกล้เคียงกัน ทำนองเดียวกับเฮนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* ได้ใกล้เคียงกับการยับยั้ง *R. solani* โดยมีค่า EC<sub>50</sub> เท่ากับ 561.18 และ 658.90 mU/ml ในการยับยั้ง *P. grisea* และ *R. solani* ตามลำดับ (ตารางที่ 11)





รูปที่ 25 กราฟการตอบสนอง (dosage response curve) ของสารปฏิชีวนะในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* (—■—) และ *P. grisea* (—◆—)



รูปที่ 26 กราฟการตอบสนอง (dosage response curve) ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* (—◆—) และ *P. grisea* (—■—)

ตารางที่ 11 ค่า MIC และ  $EC_{50}$  ของสารปฏิชีวนะและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* และ *R. solani* (วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Statistix (Gamliel *et al.*, 1989))

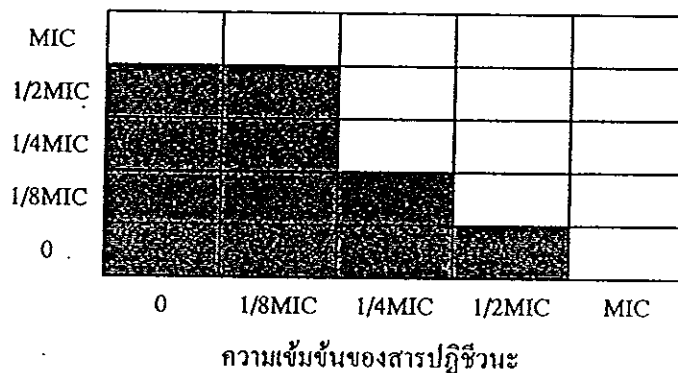
สารยับยั้ง เชื้อรา	เชื้อรา	MIC	$EC_{50}$	regression equation	$R^2$
สารปฏิชีวนะ	<i>R. solani</i>	3.13	168.34	$y = 0.1794x + 19.8$	0.9612
	<i>P. grisea</i>	1.56	129.83	$y = 0.2105x + 22.67$	0.8601
เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส	<i>R. solani</i>	12.50	658.90	$y = 0.0562x + 12.969$	0.9301
	<i>P. grisea</i>	6.25	561.18	$y = 0.0507x + 21.548$	0.9371

หมายเหตุ \* ค่า MIC และค่า  $EC_{50}$  ของสารปฏิชีวนะมีหน่วยความเข้มข้นเป็น  $\mu\text{g/ml}$  ส่วนค่า MIC และค่า  $EC_{50}$  ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสมีหน่วยความเข้มข้นเป็น  $\text{mU/ml}$

3.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านรา่วมกันของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส และสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* NSRS89-24 ในการยับยั้งการเจริญของ *R. solani* และ *P. grisea* โดยวิธี checkerboard

จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* ของและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสร่วมกับสารปฏิชีวนะโดยวิธี checkerboard โดยผสมสารแต่ละความเข้มข้นเข้ากับ PDA ในอัตราส่วน 1:20 ที่อุณหภูมิ 50°C ดูดใส่สไลด์หลุมๆ ละ 0.1 ml นำมาเลี้ยง *R. solani* ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 hr ส่วน *P. grisea* เลี้ยงนาน 24 hr วัดความกว้างของโคโลนีเชื้อราเปรียบเทียบกับหลุมควบคุม ได้ผลดังรูปที่ 27, 28 จากผลการทดลองพบว่าการทดสอบการยับยั้งเชื้อราทั้งสองชนิดด้วยวิธี checkerboard จะให้ผลการทดสอบแตกต่างกันเล็กน้อยเมื่อพิจารณาค่า FIC index ของสารทั้งสองที่อัตราส่วนผสม 1/4 : 1/4 MIC พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.5 แสดงว่าสารทั้งสองชนิดมีฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งเชื้อรา

ความเข้มข้นของเอนไซม์



รูปที่ 27 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* ของสารผสมระหว่าง

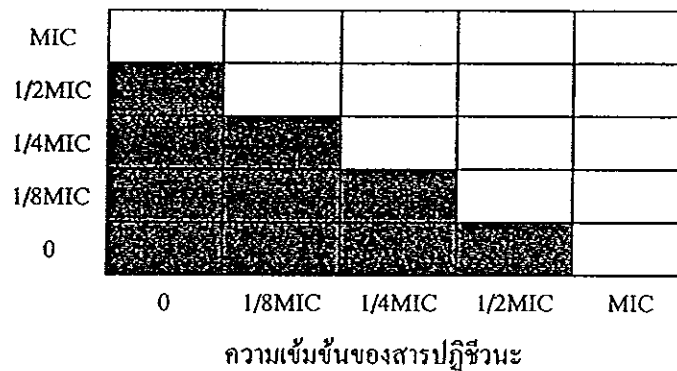
เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและสารปฏิชีวนะที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

- แสดงการเจริญของเชื้อราชุดทดสอบที่แตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ
- แสดงการเจริญของเชื้อราชุดทดสอบแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างไม่มีนัยสำคัญ

จากผลการทดสอบดังรูปสามารถคำนวณหาค่า FIC index ของสารผสมในอัตราส่วน 1:1 ได้จาก

$$\begin{aligned}
 \text{FIC index} &= \text{FIC}_{\text{เอนไซม์}} + \text{FIC}_{\text{สารปฏิชีวนะ}} \\
 &= (0.25)(12.5)/12.5 + (0.25)(3.1)/3.1 \\
 &= 0.5
 \end{aligned}$$

ความเข้มข้นของเอนไซม์



รูปที่ 28 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* ของสารผสมระหว่าง เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสและสารปฏิชีวนะที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน

- แสดงการเจริญของเชื้อราชุดทดสอบแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ
  - แสดงการเจริญของเชื้อราชุดทดสอบแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างไม่มีนัยสำคัญ
- จากผลการทดสอบดังรูปสามารถคำนวณหาค่า FIC index ของสารผสมในอัตราส่วน 1:1 ได้จาก

$$\begin{aligned}
 \text{FIC index} &= \text{FIC}_{\text{เอนไซม์}} + \text{FIC}_{\text{สารปฏิชีวนะ}} \\
 &= (0.25)(6.25)/6.25 + (0.25)(1.56)/1.56 \\
 &= 0.5
 \end{aligned}$$

## 4. วิจัยรณ

### 4.1 การศึษาฤทธีต่านราเบ้องต้นของ *B. subtilis* NSRS89-24 ด้วยวิธี dual-culture plate

จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* ด้วยแบคทีเรียปฏิบักรษ์ *B. subtilis* NSRS89-24 โดยการชีดแบคทีเรียลงข้างๆ โคลนีของเชื้อรา จะเห็นว่าเชื้อราไม่สามารถเจริญเข้าใกล้แบคทีเรียปฏิบักรษ์ แต่จะเจริญออกไปด้านข้างหรือด้านตรงข้ามแทน (บริเวณควบคุม) ในกรณีของการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* ซึ่งจะสังเกตเห็นบริเวณยับยั้ง (clear zone) อย่างชัดเจน ส่วนกรณีของเชื้อรา *R. solani* ซึ่งสามารถเจริญเข้าไปชิดแบคทีเรียปฏิบักรษ์แต่ก็ยังไม่สามารถเจริญผ่านไปได้

ปกติสายราจะมีการเจริญทางปลายยอด (apical growth) ส่วนที่กำลังเจริญคือส่วนปลายของสายรา (hyphal tip) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการสังเคราะห์สารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตโดยเฉพาะไคติน ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์ที่ทำให้สายรายืดยาวออกไปได้ ดังนั้นส่วน hyphal tip นี้จึงเป็นส่วนที่ไวต่อสารเคมีต่างๆ ที่มีฤทธีต่านราจะเห็นได้ชัดในเชื้อ *P. grisea* ส่วนของปลายสายราที่ได้รับอิทธิพลจากสารที่ *B. subtilis* NSRS89-24 ปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถยับยั้งการยืดยาวของสายราได้ ในขณะที่สายราบริเวณควบคุมจะมีการยืดยาวตามปกติ จากการทดลองนี้เป็นการชี้ให้เห็นว่า *B. subtilis* NSRS89-24 สามารถผลิตสารที่มีฤทธีต่านราที่มีคุณสมบัติในการละลายน้ำปล่อยลงสู่ฐานอาหาร โดยสารต่านเชื้อราเหล่านั้นอาจเป็นสารปฏิชีวนะหรือเอนไซม์ สารปฏิชีวนะบางชนิดที่ผลิตขึ้นโดย *B. subtilis* เช่น Bacitracin, Fungistatin และ Iturins เป็นต้น และเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นโดยแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* เช่น chitinase, glucanase เป็นต้น

### 4.2 ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อราของน้ำเลี้ยงเชื้อจาก *B. subtilis* NSRS89-24 ที่มีอายุต่างๆ กัน

สุชล (2539) ได้ทำการศึษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อความสามารถในการผลิตสารปฏิชีวนะของ *B. subtilis* NSRS89-24 โดยเลี้ยงในอาหารต่างๆ กันคือ PDB, CDB และ NB เพราะเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่า อุณหภูมิ 30°C นาน 4 วัน นำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มาเลี้ยงเชื้อรา *P. grisea* พบว่า อาหาร PDB สามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีที่สุด รองลงมาคืออาหาร CDB

และ NB ตามลำดับ โดยอาหาร PDB และ CDB มีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 87.29 และ 32.11 ตามลำดับ ส่วน NB ไม่มีผลต่อการเจริญของ *P. grisea* ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหาร PDB นาน 1-7 วัน เพื่อเปรียบเทียบการยับยั้งเชื้อราของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะที่มีอายุต่างๆ กันพบว่า ในวันแรกน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสามารถยับยั้งเชื้อราทั้งสองชนิดได้ไม่ดีนักและค่อยๆยับยั้งได้ดีขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป และในที่สุดการยับยั้งมีค่าคงที่ที่ระยะเวลาหนึ่ง ซึ่งการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า *B. subtilis* NSRS89-24 มีการสร้างสารต้านเชื้อราสะสมมากขึ้นเมื่อมีอายุสูงขึ้น การสร้างสารในวันที่สองถึงสามจะมีค่าสูงสุดเนื่องจากในวันแรกของการเจริญของแบคทีเรียปฏิชีวนะ *B. subtilis* NSRS89-24 จะมีการแบ่งเซลล์และเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วเมื่อมีอาหารอย่างสมบูรณ์ จนกระทั่งเมื่อแบคทีเรียมีความหนาแน่นสูงขึ้นส่งผลให้เกิดภาวะการขาดแคลนอาหาร มีการตายเกิดขึ้นทำให้จำนวนประชากรของแบคทีเรียลดลงแต่กลับมาอยู่ในสภาพสปอร์ ซึ่งสังเกตได้ว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อราก็ถูกสร้างขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากเซลล์ของแบคทีเรียอยู่ในสภาพสปอร์

#### 4.3 การผลิตสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* NSRS89-24

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านราเบื้องต้นโดยวิธี dual-culture plate จะเห็นได้ว่า *B. subtilis* NSRS89-24 สร้างสารต้านเชื้อราปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* และเมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาผสมกับ PDA แล้วทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อราทั้งสองชนิดก็ปรากฏผลการยับยั้งอย่างชัดเจนโดยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งมีค่ามากกว่า 60 ตั้งแต่วันที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อเป็นต้นไป จึงได้ทำการสกัดสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* NSRS89-24 (วิธีการสกัดดัดแปลงจากวิธีการของ Mckeen และคณะ, 1986) โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวสังเคราะห์ที่เสริมด้วย 1% glutamic acid ซึ่ง glutamic acid จัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่สำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อเพราะการผลิตสารปฏิชีวนะสามารถถูกควบคุมด้วย nitrogen metabolite นอกจากนี้แหล่งไนโตรเจนที่จุลินทรีย์ใช้ได้เร็วสามารถยับยั้งการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะได้ เช่น การผลิต chloramphenicol จาก *Streptomyces venezuelae* โดยเลี้ยงในอาหารที่มี ammonium และ proline เป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่าแบคทีเรียสามารถผลิต chloramphenicol ได้มากในอาหารที่มี proline และจะผลิตได้น้อยในอาหารที่มี ammonium เนื่องจากแบคทีเรียสามารถใช้ ammonium ได้เร็วกว่า



การใช้ proline (Aharonowitz, 1960) นอกจากนี้สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อคือแหล่งคาร์บอนซึ่งจากการทดลองได้ใช้กลูโคสซึ่งโดยปกติทั่วไปพบว่ากลูโคสเป็นแหล่งพลังงานที่ดีที่สุดแต่ขณะเดียวกันก็อาจทำให้เกิด catabolite repression ของการผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิดได้ ดังนั้นอาจมีการแก้ไขได้โดยการใช้คาร์บอนจากแหล่งอื่นที่เหมาะสมต่อการผลิตสารปฏิชีวนะหรืออาจมีการปรับปรุงกระบวนการเลี้ยงเชื้อโดยการเติมแหล่งคาร์บอนเป็นระยะๆ (Martin and Demain, 1980) อีออนของโลหะ (trace element) ก็มีความสำคัญต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของสิ่งมีชีวิต จากการเลี้ยง *B. subtilis* NSRS89-24 ในอาหารเหลวสังเคราะห์ที่มี  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  และ  $Fe^{2+}$  เป็นองค์ประกอบ โดยอีออนของโลหะเหล่านี้จะทำหน้าที่เป็น co-factor ช่วยให้เอนไซม์ในปฏิกิริยาต่างๆ ที่เกิดขึ้นสามารถทำงานได้ดังเช่น การศึกษาการผลิต Bacilycin จาก *B. subtilis* ให้ได้ปริมาณสูงสุดพบว่าต้องเติม  $Mn^{2+}$  ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีความเข้มข้น  $0.6 \mu M$  (Ozcengiz et al., 1990) เป็นต้น

สารปฏิชีวนะจัดเป็นสารที่ไม่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่อาจเป็นประโยชน์ต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะผลิตสารปฏิชีวนะไปยับยั้งการเจริญเติบโตหรือทำลายจุลินทรีย์อื่นทำให้เป็นการเพิ่มโอกาสการอยู่รอดของตนเองโดยเฉพาะในธรรมชาติที่มีอาหารสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทุกชนิดอยู่อย่างจำกัด แต่ในที่ที่มีอาหารอยู่อย่างสมบูรณ์ การผลิตสารปฏิชีวนะของจุลินทรีย์ก็ไม่ใช่สิ่งจำเป็นต่อการอยู่รอดของจุลินทรีย์ (Gittieb, 1976) การผลิตสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* NSRS89-24 จะเริ่มเกิดขึ้นหลังจากแบคทีเรียผ่านเข้าสู่การเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว (rapid growth phase) (Katz and Demain, 1977) จากการเพิ่มจำนวนประชากรอย่างรวดเร็วนี้เองทำให้เกิดภาวะการขาดสารอาหารของแบคทีเรียแบคทีเรียจะมีการปรับตัวเพื่อการอยู่รอดโดยการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (differentiation) ก็คือการสร้างสปอร์ เนื่องจากการผลิตสารปฏิชีวนะบางชนิดอาจเป็นตัวทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเหล่านั้นกล่าวคือ สารปฏิชีวนะอาจมีความจำเป็นสำหรับการสร้างสปอร์หรือเกี่ยวข้องกับการอยู่รอดของแบคทีเรียในช่วงที่มีการงอกของสปอร์ จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 บนอาหาร PDA พบว่าแบคทีเรียจะมีการสร้างสปอร์เมื่อเลี้ยงเชื่อนาน 18 hr ดังจะเห็นการยับยั้งการเจริญของเชื้อราเริ่มเกิดขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 เป็นเวลา 1 วัน ซึ่งเป็นระยะแรกของกระบวนการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียกลุ่ม *Bacillaceae* และเรียกสารปฏิชีวนะนี้ว่าเป็น sporulation-associated product

(Schaeffer, 1969 ; Sadoff, 1972) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า การผลิตสารปฏิชีวนะไม่มีความสัมพันธ์กับการสร้างสปอร์ เช่น การศึกษาสายพันธุ์กลายของ *B. brevis* ที่ไม่สามารถผลิตสารปฏิชีวนะแต่สามารถสร้างสปอร์ได้ (Piret and Demain, 1983) และการผลิต Bacillomycin L จาก *B. subtilis* (Chevanet et al, 1986)

เนื่องจากการผลิตสารปฏิชีวนะหลายชนิดจาก *B. subtilis* เป็นปฏิกิริยาแบบ feed back inhibition ดังนั้นสามารถหลีกเลี่ยงการยับยั้งการผลิตสารปฏิชีวนะได้โดยการเติมสารที่ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในกระบวนการส่งถ่ายรหัสแต่ไม่ยับยั้งการสังเคราะห์สารปฏิชีวนะ เช่น การเติม chloramphenicol เพื่อเพิ่มการผลิต Polymyxin นอกจากนี้ยังมีการเติมสารชักนำ (inducer) ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ membrane permeability ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ทำนองเดียวกับการเติม lauric acid ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Streptomyces noboritocasis* เพื่อให้มีการผลิต elasinin เพิ่มมากขึ้น (Ohno et al., 1980) ดังนั้นถ้าต้องการผลิตสารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* NSRS89-24 ให้ได้ปริมาณมากจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความต้องการสารอาหารชนิดต่างๆ

#### 4.4 ความเข้มข้นของโคตินและอายุของ *B. subtilis* NSRS89-24 ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

Cruz และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากเชื้อรา *T. harzianum* พบว่าเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสได้เมื่อในอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย โคติน, laminarin, pustulan หรือผนังเซลล์ของเชื้อรากล่อโรค ซึ่งผลการทดลองพบว่าแหล่งคาร์บอนดังกล่าวสามารถมีการชักนำให้เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณเพิ่มขึ้น แต่ไม่แตกต่างกันมากนักในแต่ละแหล่งคาร์บอนดังกล่าวซึ่งบทบาทโดยตรงที่สำคัญของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการเจริญของเชื้อรากล่อโรค จากการทดลองเลี้ยง *B. subtilis* NSRS89-24 ในอาหารเหลว NB ที่เสริมด้วยโคตินที่มีความเข้มข้นต่างๆ กันตั้งแต่ 0-0.6% เพื่อเป็นการชักนำให้แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสได้ในปริมาณมาก ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้นเมื่อมีการเติมโคตินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสมีคุณสมบัติเป็น inducible enzyme ซึ่งจะพบปริมาณน้อยมากในภาวะการเลี้ยงเชื้อปกติแต่ปริมาณของ

เอนไซม์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อมี inducer อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยแบคทีเรียจะใช้โคตินเป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ของแบคทีเรีย

นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมที่ทำให้ *B. subtilis* NSRS89-24 ที่เลี้ยงในอาหารที่เสริมด้วยโคตินสามารถผลิตเอนไซม์ได้มีปริมาณสูงสุด จึงได้ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว NB ที่มีโคติน 0.3% ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-7 วันพบว่าในช่วงเวลา 1-4 วันแรก เชื้อจะมีการผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและจะมีปริมาณคงที่ตั้งแต่วันที่ 5 เป็นต้นไป โดยมีแอกติวิตีที่คงที่ประมาณ 20 unit/ml และแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ได้ปริมาณน้อยเมื่อไม่มีโคตินเป็นองค์ประกอบของอาหาร โดยมีแอกติวิตีเท่ากับ 6 unit/ml ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสสามารถถูกชักนำให้มีการสร้างเพิ่มขึ้นได้

#### 4.5 การทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส

จากการนำส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 มาตรวจสอบแอกติวิตี (ดัดแปลงจากวิธีการของ Burner, 1964) จากนั้นนำมาตกตะกอนด้วย ammonium sulfate ที่มีความอิ่มตัว 0-60% แล้วจึงนำส่วนใสที่ได้มาทำการตกตะกอนต่อด้วย ammonium sulfate ที่มีความอิ่มตัว 60-80% พบว่าปริมาณโปรตีนที่ตกออกมาทั้ง 2 ครั้งมีปริมาณแตกต่างกันแต่มีค่า specific activity ของเอนไซม์ใกล้เคียงกัน ดังนั้นในการทดลองต่อมาจึงทำการตกตะกอนโปรตีนเพียงครั้งเดียวด้วย ammonium sulfate ที่มีความอิ่มตัว 0-80% ได้ปริมาณโปรตีน 743 mg มีแอกติวิตีของเอนไซม์ 127 unit จากนั้นนำโปรตีนที่ได้ทั้งหมดมาผ่านคอลัมน์แบบแลกเปลี่ยนประจุกับ DEAE-sephacel ล้างคอลัมน์ด้วย 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกจากคอลัมน์ 2 พีคใหญ่และไม่พบแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ต่อมาชะคอลัมน์ด้วย 0-0.5 N NaCl ใน 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 พบว่ามีโปรตีนถูกชะออกมา 2 พีค พีคแรกมี specific activity ของเอนไซม์ 5.9 unit/mg prot พีคที่ 2 ไม่พบแอกติวิตีของเอนไซม์ จากผลการทดลองจะเห็นว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 สามารถจับกับ DEAE ได้เป็นอย่างดีและจะถูกชะออกมาได้เมื่อใช้ NaCl ที่มีความแรงของประจุบวกมากกว่าจึงสามารถแย่งจับกับ DEAE ได้ โดยเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสสามารถถูกชะออกจากคอลัมน์ได้ด้วย NaCl ที่มีความเข้มข้นประมาณ 0.2-0.3 N จากนั้นนำโปรตีนในพีคที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์สูงมาทำให้บริสุทธิ์ขึ้น ด้วยเทคนิคเจลฟิล

เตรนโครมาโตกราฟีด้วยคอลัมน์ Sephadex G-100 ซึ่งเป็นวิธีการแยกโปรตีนที่อาศัยความแตกต่างของขนาดโมเลกุลของสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 4-150 Kd

จากขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ที่ผ่านมาจะเห็นได้ว่าขั้นตอนการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate จะเป็นขั้นตอนที่ช่วยลดปริมาณของน้ำเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เหมาะสมสำหรับการทำคอลัมน์โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุกับ DEAE-sephacel เท่านั้น โดยไม่ทำให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ส่วนขั้นตอนการทำเจลฟิลเตรชันด้วยคอลัมน์ Sephadex G-100 อาจไม่จำเป็นสำหรับการทดลองครั้งนี้เนื่องจากไม่ช่วยให้เอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากขึ้น ดังนั้นเมื่อผ่านขั้นตอนการตกตะกอนแล้วอาจตามด้วยคอลัมน์ DEAE-sephacel เพียงขั้นตอนเดียว

#### 4.6 คุณสมบัติทางกายภาพของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจาก *B. subtilis* NSRS 89-24

เมื่อผ่านทำการเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยขั้นตอนต่างๆ แล้วสามารถตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้อะคริลาไมด์เจลที่ความเข้มข้นต่อเนื้อ 8-12% แล้วทำอิเลคโตรฟอริซิสเป็นเวลา 1.45 hr ย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R-250 จากผลการทดลองจะเห็นแถบของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสมี 2 แถบหรือ 2 สับยูนิต (เมื่อนำไปทำอิเลคโตรฟอริซิสแบบ ND-PAGE จะมีแถบเดียว) สามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของแต่ละแถบได้จากการเขียนกราฟระหว่างค่า  $R_f$  กับค่า  $\log$  molecular weight เปรียบเทียบกับแถบโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งแต่ละแถบ (G1 และ G2) จะมีค่า  $R_f$  เท่ากับ 0.26 และ 0.56 และมีค่าน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 96.93 Kd นอกจากนี้ในการหาน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบเจลฟิลเตรชันด้วยคอลัมน์ Sephadex G-100 เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน catalase (M.W. 232 Kd), BSA (M.W. 67 Kd) และ carbonic anhydrase (M.W. 30 Kd) พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 95.49 Kd ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่หาได้โดยวิธี SDS-PAGE

ในการศึกษาคุณสมบัติของ *B. circulan* IAM1165 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* โดยการหลั่งเอนไซม์ออกมาอย่างอ่อนแอของเชื้อรา Aono และคณะ (1995) ได้ทำการแยกเอนไซม์ย่อยสลายออกมาพบว่า *B. circulan* IAM1165 จะหลั่งเอนไซม์

เบต้า-1,3-กลูคาเนสออกมา 3 ไอโซไซม์ ลงสู่อาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างที่เซลล์อยู่ในระยะ stationary phase และเมื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยวิธี SDS-PAGE จะพบแถบของเอนไซม์ 3 แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 28, 42, และ 91 Kd

จากการทดลองย้อมสีแสดงลักษณะเฉพาะของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วเปรียบเทียบกับเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ยังไม่บริสุทธิ์ (ดัดแปลงจากวิธีการของ Pan และคณะ (1989) โดยใช้สีย้อมที่มีความจำเพาะคือ 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride ซึ่งจะเห็นเป็นแถบสีแดงเข้มเพียงแถบเดียวและมีค่า  $R_f$  ใกล้เคียงกันในแต่ละช่อง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีนบริสุทธิ์ที่แยกได้เป็นเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส และเนื่องจากในการย้อมสีจำเพาะของเอนไซม์นี้ต้องผ่านการทำ ND-PAGE มาก่อน ดังนั้นถ้าทำการทำอิเล็กโตรฟอรีซิสที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 1.45 hr จะทำให้เจลเกิดความร้อนอันเนื่องมาจากการให้กระแสไฟฟ้าจนมีผลให้เอนไซม์เกิดการเสียสภาพธรรมชาติทำให้เห็นแถบสีแดงของเอนไซม์ไม่ชัดเจน ดังนั้นจึงได้ทำการทำอิเล็กโตรฟอรีซิสในตู้เย็นที่ 4°C ด้วยเวลาเท่าเดิม ซึ่งจะทำให้สังเกตเห็นแถบสีแดงของเอนไซม์ได้ชัดเจนกว่า นอกจากนี้ความชัดเจนของแถบของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของอะครีลาไมด์เจลที่ใช้ โดยเจลที่มีความเข้มข้นแบบต่อเนื่อง 8-12% จะให้แถบของเอนไซม์ที่คมชัดกว่าการใช้อะครีลาไมด์เจลที่มีความเข้มข้นคงตัว 10% หลังจากนั้นการย้อมสีด้วย 0.15% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 90°C แล้วควรมีการกำจัดสีส่วนเกินออกทันทีโดยการแช่เจลลงใน 3% glycerol + 4% methanol + 10% acetic acid เพราะในการย้อมสีนานเกินไปจะมีผลทำให้การกำจัดสีส่วนเกินออกทำได้ยากมากและทำให้ไม่สามารถมองเห็นแถบของเอนไซม์ได้ชัดเจน จากการศึกษาการย้อมสีแสดงลักษณะจำเพาะของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสโดย Shimoni (1994) ซึ่งมีวิธีการที่คล้ายคลึงกับวิธีการของ Pan และคณะ (1989) เป็นการที่ให้เห็นว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่มาจากแหล่งต่างกันจะมีสภาวะที่เหมาะสมในการย้อมสีด้วย 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride ได้แตกต่างกัน ดังนั้นควรจะต้องมีการปรับสภาวะในการย้อมสีบางประการ เช่น ความเข้มข้นของอะครีลาไมด์เจล อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเจล และชนิดของบัฟเฟอร์ เป็นต้น นอกจากนี้แหล่งที่มาของเอนไซม์แล้วยังควรคำนึงถึงลักษณะทางกายภาพของเอนไซม์ที่แตกต่างกันอีกด้วยดังจะเห็นจากการศึกษาของ อารรณ์ (1995) แสดงให้

เห็นว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสบริสุทธิ์ ที่แยกได้จากบีชีรัมของยางพาราจะมีสภาพเป็น basic protien จึงต้องใช้วิธีการทำอิเลคโตรฟอริซิสแบบกลับหัว

#### 4.7 การศึกษาการยับยั้งเชื้อราของสารปฏิชีวนะ และเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส จากน้ำเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* NSRS89-24

จากการทดลองการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* โดยใช้สารปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นอย่างมีลำดับแบบ 1:2 พบว่าค่า MIC ของสารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งเชื้อรา *R. solani* มีค่าเท่ากับ 3.13  $\mu\text{g/ml}$  และ MIC ในการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* มีค่าเท่ากับ 1.56  $\mu\text{g/ml}$  จะเห็นว่าได้สารปฏิชีวนะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* ได้ดีกว่าการยับยั้ง *R. solani* เล็กน้อยอาจเนื่องมาจากการที่ *R. solani* เจริญได้รวดเร็วกว่า *P. grisea* สังเกตได้จากการเลี้ยง *R. solani* ใช้เวลาเพียง 2 วันก็เจริญเต็มจานอาหารส่วน *P. grisea* ใช้เวลาถึง 7 วันขึ้นไปจึงจะเจริญเต็มจานอาหาร นอกจากนี้ผนังเซลล์ของเชื้อราอาจมีองค์ประกอบทางเคมีที่คล้ายคลึงกันทำให้มีคุณสมบัติในการต้านฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะได้แตกต่างกันไม่มากนัก Tilburg และ Thomas (1993) และ Bartnicki-Garcia (1969) พบว่าองค์ประกอบหลักทางเคมีของผนังเซลล์ของเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* จะเป็นกลูแคนและไคติน

จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อราทั้ง 2 ชนิดโดยใช้สารปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้นอย่างมีลำดับแบบ 1:2 นำค่าเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งที่ได้มาสร้างเส้นกราฟการตอบสนอง (dosage response curve) เพื่อการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ 50% ( $EC_{50}$ ) จากการทดลองจะเห็นว่าค่า  $EC_{50}$  ของสารปฏิชีวนะและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสให้ผลทำนองเดียวกันคือ ค่า  $EC_{50}$  ต่อเชื้อรา *R. solani* มีค่าสูงกว่าค่า  $EC_{50}$  ต่อเชื้อรา *P. grisea* ซึ่งเป็นการชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาณสารยับยั้งเชื้อราทั้งสองชนิดที่ระดับหนึ่งจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* ดีกว่า *R. solani* และสอดคล้องกับการทดลองที่ 2.2 ที่น้ำเลี้ยงเชื้อจากจาก *B. subtilis* NSRS89-24 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. grisea* ได้ดีกว่า *R. solani*

นอกจากนี้สารปฏิชีวนะจาก *B. subtilis* NSRS89-24 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้งสองชนิดได้ดีกว่าเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสที่ได้จาก *B. subtilis* NSRS89-24 ซึ่งความสามารถในการยับยั้งเชื้อราของสารแต่ละชนิดอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น องค์

ประกอบของผนังเซลล์เชื้อรา กลไกการเข้าทำลายเชื้อ สภาวะแวดล้อม เป็นต้น จากการศึกษานี้ของ Pietro และคณะ (1992) ได้ทำการศึกษายับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Pythium ultimum* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเน่าคอดิน (damping-off) ของพืชโดยใช้แบคทีเรีย *Chaetomium globosum* พบว่าสารพิษ (toxic metabolite) ที่เชื้อ *C. globosum* สร้างขึ้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *P. ultimum* ได้โดยมีค่า MIC เท่ากับ 2.5  $\mu\text{g/ml}$  และเมื่อเปรียบเทียบกับสารยับยั้งเชื้อราชนิดอื่น เช่น Gliotosin และ Metalaxyl พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 10 และ 1  $\mu\text{g/ml}$  แสดงให้เห็นว่าสาร Chaetomin จากเชื้อ *C. globosum* มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา *P. ultimum* ได้ดีกว่า Gliotosin แต่ยับยั้งได้น้อยกว่า Metalaxyl นอกจากนี้ประสิทธิภาพของสารในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราแต่ละชนิดยังพิจารณาได้จากความชันของกราฟที่ได้ ซึ่งกราฟที่มีความชันสูงจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่า ซึ่งจากการทดลองพบว่าเส้นกราฟตอบสนองของเชื้อรา *P. grisea* จะมีความชันมากกว่าเส้นกราฟตอบสนองของเชื้อรา *R. solani* เล็กน้อยแสดงให้เห็นว่าสารปฏิชีวนะสามารถยับยั้งเชื้อราทั้งสองชนิดได้ไม่แตกต่างกันมากนัก และการเพิ่มความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะในปริมาณที่เท่ากันจะทำให้ประสิทธิภาพของการยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* จะสูงขึ้นกว่าการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* เพียงเล็กน้อย ทำนองเดียวกับเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ซึ่งเส้นกราฟตอบสนองต่อเชื้อรา *P. grisea* มีความชันมากกว่าเส้นกราฟการตอบสนองของเชื้อรา *R. solani* เล็กน้อย

#### 4.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านราเสริมกันระหว่างสารปฏิชีวนะและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจาก *B. subtilis* NSRS89-24

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านราเสริมกันระหว่างสารปฏิชีวนะและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสจาก *B. subtilis* NSRS89-24 โดยวิธี checkerboard จากผลการทดสอบจะเห็นว่า สารทั้งสองชนิดสามารถออกฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้ง *R. solani* และ *P. grisea* โดยมีค่า FIC index เท่ากับ 0.5 แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้ง *P. grisea* จะดีกว่าการยับยั้ง *R. solani* เล็กน้อยเมื่อความเข้มข้นของสารปฏิชีวนะเท่ากับ 1/4 MIC และความเข้มข้นของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเท่ากับ 1/2 MIC ซึ่งที่ความเข้มข้นของสารทั้งสองนี้ไม่สามารถยับยั้ง *R. solani* ได้แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการกรองสามารถยับยั้งเชื้อราได้ดีกว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่หนึ่ง ซึ่งเป็นไปได้ว่าในน้ำเลี้ยงเชื้อซึ่งมีทั้งสาร

ปฏิชีวนะและเอนไซม์ที่ไม่ทนความร้อนถูกทำลายได้ด้วยการนึ่ง แต่น้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองยังมีสารอยู่ครบสมบูรณ์

ถึงแม้ว่าเอนไซม์จะออกฤทธิ์ได้ไม่ดีเท่ากับสารปฏิชีวนะก็ตาม แต่การศึกษาค้นคว้านี้แสดงให้เห็นว่ากลไกการออกฤทธิ์ต้านเชื้อราของ *B. subtilis* NSRS89-24 นี้ต้องมีการเสริมกันระหว่างสารที่แบคทีเรียสร้างและปล่อยออกมา แต่ทั้งนี้ในบางเชื้อโรคเอนไซม์อาจจะมีผลออกฤทธิ์ได้ดีกว่าสารปฏิชีวนะก็เป็นได้ อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าสารทั้งสองชนิดจะสามารถออกฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งเชื้อราในห้องปฏิบัติการ แต่ในแง่ของการนำไปประยุกต์ใช้ภาคสนามเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุดแล้วสิ่งที่ต้องคำนึงถึงคือ

1. ขั้นตอนในการแยกหรือสกัดสารทั้งสองชนิดว่ามีความยุ่งยากเพียงใดรวมทั้งค่าใช้จ่ายตลอดขั้นตอนในการแยกว่าคุ้มค่ากับผลผลิตที่ได้หรือไม่ โดยเฉพาะเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส ซึ่งจะเห็นว่าต้องอาศัยหลายขั้นตอนในการแยก

2. ความคงตัวของสารทั้งสองชนิดเมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติซึ่งจากการทดลองที่ 2.1.2 จะเห็นว่าสารปฏิชีวนะบางชนิดสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิที่  $121^{\circ}\text{C}$  นาน 15 นาทีได้ โดยยังคงความสามารถในการยับยั้งเชื้อราไว้ได้ ในขณะที่เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ  $40^{\circ}\text{C}$  และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นประสิทธิภาพในการทำงานจะค่อยๆ ลดลง และไม่สามารถทำงานได้เลยที่อุณหภูมิ  $90^{\circ}\text{C}$

3. ผลกระทบต่อระบบนิเวศวิทยา ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสมดุลย์ทางธรรมชาติ เช่น การเพิ่มขึ้นหรือลดลงของสารบางชนิดอาจทำให้จำนวนประชากรของสิ่งมีชีวิตบางชนิดเพิ่มขึ้นหรือลดลงได้

ดังนั้นการเลือกวิธีการควบคุมโรคข้าวอาจขึ้นอยู่กับจุดประสงค์และระยะเวลาการเกิดโรค (การระบาด) หากพบว่ามีภาวะระบาดของโรคอย่างรุนแรงจำเป็นต้องใช้สารออกฤทธิ์ซึ่งเตรียมได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อของจุลินทรีย์ปฏิปักษ์จึงจะยับยั้งโรคได้ แต่การป้องกันในระยะยาวหรือเมื่อยังไม่มีอาการของโรคก็สามารถใช้เฉพาะตัวเชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ซึ่งสามารถเตรียมง่ายกว่าและการออกฤทธิ์จะมีลักษณะแบบยั่งยืนทนนานกว่าการใช้สารเคมี แต่ทั้งนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความอยู่รอดของเชื้อในธรรมชาติ รูปแบบ หรือสูตรที่จะใช้ในการฉีดหรือพ่นเชื้อตลอดจนสภาวะในธรรมชาติว่าจะเอื้ออำนวยให้เชื้อสามารถผลิตสารทั้งสองออกมาป้องกันเชื้อราได้หรือไม่ แต่ขณะเดียวกันควรมีการติดตามการเปลี่ยนแปลงของระบบสมดุลทางธรรมชาติไปพร้อมๆ กันด้วย



## 5. สรุป

1. *B. subtilis* NSRS89-24 ที่แยกได้จากสภาพท้องถิ่นสามารถยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* ได้ดีเมื่อทดสอบด้วยวิธี dual-culture plate
2. น้ำเลี้ยงเชื้อจาก *B. subtilis* NSRS89-24 ที่เลี้ยงในอาหาร PDA และมีอายุต่างๆ กันทั้งที่ผ่านการกรองและการนึ่งสามารถยับยั้งเชื้อรา *P. grisea* ได้ดีกว่า *R. solani* และน้ำเลี้ยงเชื้อที่กรองสามารถยับยั้งเชื้อราทั้งสองชนิดได้ดีกว่าน้ำเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการนึ่ง
3. โคตินสามารถเหนี่ยวนำการผลิตของเอนไซม์ โดยปริมาณที่เหมาะสมที่ใช้เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อคือ 0.3%
4. เอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสเมื่อทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านขั้นตอนการแลกเปลี่ยนประจุกับ DEAE-sephacel และวิธีเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟีผ่าน Sephadex G-100 ตามลำดับหาน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณด้วยวิธี SDS-PAGE ได้เท่ากับ 96.93 Kd (โดย GI และ GII มีน้ำหนักโมเลกุล 64.57 และ 32.36 Kd ตามลำดับ) และเมื่อหาด้วยวิธีเจลฟิลเตรชันได้น้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณเท่ากับ 95.49 Kd ค่า  $K_m$  และ  $V_{max}$  เท่ากับ 1.18 mg/ml และ 1.33 unit ตามลำดับ และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสอยู่ในช่วง 30-40°C รวมทั้ง pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานคือช่วง 7.5-8.0 และดีที่สุดที่ pH 7.5
5. การยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* ของสารปฏิชีวนะมีค่า MIC เท่ากับ 3.13 และ 1.56  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ ส่วนค่า MIC ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสต่อการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* มีค่าเท่ากับ 12.50 และ 6.25 mU/ml ตามลำดับและค่า  $EC_{50}$  ของสารปฏิชีวนะในการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* มีค่าเท่ากับ 168.34 และ 129.83  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ ส่วนค่า  $EC_{50}$  ของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสในการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* มีค่าเท่ากับ 658.90 และ 561.18 mU/ml ตามลำดับ
6. สารปฏิชีวนะและเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนสสามารถออกฤทธิ์เสริมกันในการยับยั้งเชื้อรา *R. solani* และ *P. grisea* เมื่อทดสอบโดยวิธี checkerboard โดยใช้สารทั้งสองชนิดที่มีความเข้มข้นเป็น 1/4 MIC ก็สามารถยับยั้งเชื้อราได้แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

## เอกสารอ้างอิง

- เกษม สร้อยทอง 2532. การใช้รา *Chaetonium cupreum* ในการควบคุมโรคไหม้ของข้าวโดยชีววิธี วารสารโรคพืชสมาคมนักโรคพืชแห่งประเทศไทย หน้า 29-33.
- จิระเดช แจ่มสว่าง, จินตนา ชะนะ, ปราโมทย์ ศิริโรจน์, กณิษฐา สังคะนะ, วิชชุพร ว่องสุวรรณเลิศ และวรรณวิไล เกษนรา 2536. ประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* พันธุ์กลายที่ต่อต้านเบนโนมิลในการควบคุมโรคเน่าของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii*. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการเรื่องเทคนิคของวิธีการทางวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ หน้า 34 (บทคัดย่อ)
- นลินี จาริกภากร พาณี หนูนิ่ม บุญมี วารินสะอาด พิรุณ จันทนกุล และมณญญ เอณกชัย 2534. การศึกษากิจกรรมของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนผิวใบและเมล็ดข้าวเป็นโรคขอบใบแห้ง เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการข้าวภาคใต้ หน้า 1-5
- มาลินี ล้อมโกคา 2525. ยาด้านจุลชีพในสัตว์ (ยาปฏิชีวนะ, ยาฆ่าพยาธิและสารปฏิชีวนะ) โรงพิมพ์จรัญสนิทวงศ์ กรุงเทพฯ หน้า 45-48.
- มาลิน จุลศิริ 2532. ยาด้านจุลชีพ : ความรู้พื้นฐานและการประยุกต์การใช้นอกวงการแพทย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล หน้า 121-129.
- สมคิด ดิสถาพร 2537. การป้องกันกำจัดโรคพืชโดยชีววิธีในประเทศไทย กรมวิชาการเกษตร หน้า 106-107.
- อาภรณ์ สันตะโร 2538. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- สุชล แก้วพรหม 2539. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- Aharonowitz, Y. 1960. "Nitrogen metabolite regulation of antibiotic synthesis." *Ann. Rev. Microbiol.* 34 : 209-233.
- Allen, G. R., Reichelt, J. L., Goodson, R. and Hunter, J. 1983. "Influence of environmental factors and medium composition on *Vibrio gazogenus* growth and prodigiosin production." *Appl. Environ. Microbiol.* 45 : 1723-1727.

- Aono, R., Hammura, M., Yamamoto, M. and Asano, T. 1995. "Isolation of extracellular 28 and 42-kilodalton  $\beta$ -1,3-glucanase and comparison of three  $\beta$ -1,3-glucanase produced by *Bacillus circulans* IAM1165." *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1) : 122-129.
- Aono, R., Sati, M., Yamamoto, M. and Horikoshi, K. 1992. "Isolation and partial characterization of an 87-kilodalton  $\beta$ -1,3-glucanase from *Bacillus circulans* IAM1165." *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (2) : 520-524.
- Baker, C. J., Stavely, J. R. and Mock, N. 1985. "Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions" *Plant Dis.* 69(9) : 770-772.
- Baker, K.F 1987. "Evolving concepts of biological control of plant pathogens." *Ann. Rev. Phytopathol.* 25 : 67-85.
- Bartnicki-Garcia, S. 1966. "Chemistry of hyphal walls of *Phytophthora*." *J. Gen. Microbiol.* 42 : 57-69.
- Bartnicki-Garcia, S. 1969. "Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi." *Ann. Rev. Microbiol.* 22 : 87-108.
- Berdy, J. 1974. "Recent development of antibiotic research and classification of antibiotic according to chemical structure." *Adv. Appl. Microbiol.* 18 : 309-406
- Brimacombe, J. S. 1975. "Carbohydrate chemistry " The Chemical Society. Burlington House, London. 8 : 282-293.
- Buchnan, R.E., and Gibbons, N.E. 1974. "Bergey's manual of determinative." *Bacteriology.* 8 th ed. The Willium and Wilkens Co., Baltimer, USA
- Burner, R. L. 1964. "Determination of reducing sugar value 3,5-dinitrosalicylic acid method." *Method in Carbohyd. Chem.* 4 : 67-71.
- Chevanet, C., Besson, F. and Michel, G. 1986. "Effect of various growth conditions on spore formation and bacillomycin L production in *Bacillus subtilis*." *Can. J. Microbiol.* 32 : 254-258.

- Aono, R., Hammura, M., Yamamoto, M. and Asano, T. 1995. "Isolation of extracellular 28 and 42-kilodalton  $\beta$ -1,3-glucanase and comparison of three  $\beta$ -1,3-glucanase produced by *Bacillus circulans* IAM1165." *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1) : 122-129.
- Aono, R., Sati, M., Yamamoto, M. and Horikoshi, K. 1992. "Isolation and partial characterization of an 87-kilodalton  $\beta$ -1,3-glucanase from *Bacillus circulans* IAM1165." *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (2) : 520-524.
- Baker, C. J., Stavely, J. R. and Mock, N. 1985. "Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions" *Plant Dis.* 69(9) : 770-772.
- Baker, K.F 1987. "Evolving concepts of biological control of plant pathogens." *Ann. Rev. Phytopathol.* 25 : 67-85.
- Bartnicki-Garcia, S. 1966. "Chemistry of hyphal walls of *Phytophthora*." *J. Gen. Microbiol.* 42 : 57-69.
- Bartnicki-Garcia, S. 1969. "Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi." *Ann. Rev. Microbiol.* 22 : 87-108.
- Berdy, J. 1974. "Recent development of antibiotic research and classification of antibiotic according to chemical structure." *Adv. Appl. Microbiol.* 18 : 309-406
- Brimacombe, J. S. 1975. "Carbohydrate chemistry " The Chemical Society. Burlington House, London. 8 : 282-293.
- Buchnan, R.E., and Gibbons, N.E. 1974. "Bergey' s manual of determinative." *Bacteriology.* 8 th ed. The Willium and Wilkens Co., Baltimer, USA
- Burner, R. L.1964. "Determination of reducing sugar value 3,5-dinitrosalicylic acid method." *Method in Carbohyd. Chem.* 4 : 67-71.
- Chevanet, C., Besson, F. and Michel, G. 1986. "Effect of various growth conditions on spore formation and bacillomycin L production in *Bacillus subtilis*." *Can. J. Microbiol.* 32 : 254-258.

- Hrmova, M. and Fincher, G. B. 1993. "Purification and properties of three (1,3)- $\beta$ -glucanase isozymes from young leaves of barley (*Hordeum vulgare*). " Biochem. J. 289 : 453-461.
- Howell, J. D., Anderson, L. E., Coffey, G. L., Senos, G. D., Underhil, M. A., Volger, D. L. and Ehrlich, J. 1972. "Butirosin, a new aminoglycoside antibiotic complex : bacterial origin and some microbiological properties." Antimicrob. Agents. Chemother. 2 : 79-83.
- Itoh, J., Omoto, S., Nishizava, N., Kodama, Y. and Inonye. 1982. "Chemical structure of amicoucins produced by *Bacillus pumilus*." Agr. Biol. Chem. 46 : 25-59.
- Iwai, Y. and Omura, S. 1982. "Culture conditions for screening of new antibiotic." J. Antibiotics. 35 (2) : 123-141.
- Jacob, M. J., Bugbee, W. M. and Gabrielson, D. A. 1985. "Enumeration location and characterization of endophytic bacteria within sugar beet beta-vulgaris roots." Can J. Bot.. 63 (7) : 1262-1265.
- Jutidamrongphan, W., Andersen, J. B., Mackinnon, G., Manners, J. M., Simpson, R. S. and Scott, K. J. 1991. "Induction of  $\beta$ -1,3-glucanase in barley in response to infection by fungal pathogens." Mol. Plant-Microbe Internat. 4 : 234-238.
- Katz, E. and A. L. Demain. 1977. "The peptide antibiotic of *Bacillus* : chemistry, biogenesis and possible functions." Bacterial Rev. 41 : 449-474.
- Keen, N. T. and Yoshikawa, M. 1983. " $\beta$ -1,3-endoglucanase from soybean releases elicitor-active carbohydrates from fungus cell walls." Plant Physiol. 71 : 460-465.
- Kleinkauf, H. and Dohren, H. V. 1985. "Peptide antibiotics." Agricultural and Medicine 3 : 95-135.
- Kleinkauf, H. and Dohren, H. V. 1986. "Peptide antibiotics" Biotechnol. 4 : 283-307.
- Kleinkauf, H. 1988. "Peptide antibiotics,  $\beta$ -lactams, and related compound. " Critical Rev. Biotechnol. CRC. 8 : 1-32.

- Kombrink, E. 1988. "Several " pathogenesis-related " proteins in potato are 1,3- $\beta$ -D-glucanases and chitinases." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85 : 782-786.
- Kommedahl, T. and Mew, T.W. 1975. "Biocontrol of corn root infection in the field by seed treatment by antagonist.." Phytopathol. 65 : 296-300.
- Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteria phage T4" Nature (London) 227 : 680-685.
- Leah, R., Tommerup, H., Svendsen, I and Mundy, J. 1991. "Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties" J. Biol. Chem. 266 : 1564-1573.
- Lee, A. B., James, Jr. and Hoch, A. 1985. "Biology of the Bacilli. " Biology of Industrial Microorganism : Biotechnology series. pp. 57-78
- Lioberas, J., Guerd, E. and Berneus, J. 1988. "Purification and characterization of endo  $\beta$ -(1,3-1,4)-D-glucanase activity from *Bacillus licheniformis*." Appl. Microbiol. Biotechnol. 29 (1) : 32-38.
- Lorian, M. D. 1991. "Antibiotics in laboratory medicine." third edition. Williams & Wilkins. Baltimore. pp. 432-440.
- Lorito, M., Hayes, C. K., Pietro, A. D., Woo, S. L. and Harman, G. E. 1994. "Purification characterization and synergistic activity of a glucan-1,3-B-glucosidase an N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*." Mol. Plant Pathol. 84 (4) : 398-405.
- Lowry, P. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. "Protein measurement with the folin phenol reagent.." J. Biol. Chem. 193 : 265-275.
- Manibrushanrao, K. and P.R. Day. 1972. "Low night temperature and blast development on rice." Phytopathol. 62 : 1005-1007.
- Martin, J. F. and Demain, A. L. 1980. "Control of antibiotic synthesis." Microbiol. Rev. 44 : 230-251.
- Mauch, F., Hadwiger, L. A. and Boller, T. 1988. "Purification and Characterization of two

- chitinase and two  $\beta$ -1,3-glucanases differentially regulated during development and in response to fungal." *Plant Physiol.* 87 : 325-333.
- Mckeen, C. D., Reilly, C. C. and Pusey, P. I. 1986. "Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructuicola* from *Bacillus subtilis*." *Ecology and Epidemiology* 76 (2) : 136-139.
- Molina, M., Cenamor, R., Sanchez, M. and Nombela, C. 1989. "Purification and some properties of *Candida albicans* exo- $\beta$ -1,3-glucanase." *J. General Microbiol.* 135 (2) : 309-314.
- Mrsa, V., Klebl, F. and Tanner, W. 1993. "Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae*. BGL 2 gene product, a cell wall exo- $\beta$ -1,3-glucanase." *J. Bacteriol.* 175 : 2102-2106.
- Nagata, S., Sawatani, M., Kuriyama, M., Misono, H. and Nagasaki, S. 1990. "Purification and characterization of nonlytic endo- $\beta$ -1,3-glucanase I from *Flavobacterium dormitator* var. *glucanolyticae*." *Agric. Biol. Chem.* 54 (8) : 2107-2114.
- Neseman, G., Prave, P., Sukatch, D. and Vertesy, L. 1972. "Polyene antibiotic from bacteria." *Natural Science* 59 : 81-82.
- Noji, Y., Horikoshi, K. 1990. "A thermostable alkaline beta-1,3-glucanase produced by alkalophilic *Bacillus* sp. AG-430." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32 : 704-707.
- Ohno, H., Yoshida, M., Yakahashi, Y and Omura, S 1980. "Improvement of the productivity of elasnin, a specific elastase inhibitor, by *Streptococcus noboritoensis* KM-2573." *J. Antibiotics* 33 : 474-479.
- Ozcengiz, G., Alaeddinoglu, N. G. and Demain, A. L. 1990. "Regulation of biosynthesis of Bacilycin by *Bacillus subtilis*." *J. Indust. Microbiol.* 6 : 91-100.
- Okamura, K., Koki, A., Mutho, Y., Shimeuchi, Y. and Lshikura, T. 1977. "Fermentative production of Deltamycin and Deacyldeltamycin." *J. Ferment. Technol.* 55 : 347-355.
- Pan, S. Q., Ye, X. S. and Kuc, J. 1989. "Direct detection of  $\beta$ -1,3-glucanase isozymes

- on polyacrylamide electrophoresis and isoelectrofocusing gels." *Anal. Biochem.* 182 : 136-140.
- Picman, A. K., Schneider, E. F. and Gershenzon, J. 1990. "Antifungal activities of sunflower terpenoid." *Biochem. Sys. Ecol.* 18 : 325-328.
- Pietro, A., Gut-Aella, M., Pachlatko, J. P. and Schwinn, F. J. 1992. "Role of antibiotics produced by *Chaetomium globosum* in biocontrol of *Pythium ultimum*, a causal agent of damping-off." *Amer. Phytopathol. Soc.* 82 (2) :131-135.
- Pusey, P.L., Wilson, C.L., Hotchkise, M.W., and Franklin, J.D. 1986. "Compatibility of *Bacillus subtilis* for post harvest control of peach brown rot with commercial fruit waxes, dicloran, and cold-storage conditions." *Plant Dis.* 70 (6) : 587-590.
- Sela-Buurlage, M. B., Postein, A. S., Bress-Vloemans. S. A., Melchers, L. S., Van den Elzen, P. J. M. and Cornelissen, L. S. 1993. "Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases exhibit antifungal activity." *Plant Physiol.* 101 : 857-863.
- Sinclair, J.B., Agnihotri, P.V., Singh, N., Chaute, H.S., Singh, U.S. and Dwivedi, T. Seds. 1989. "*Bacillus subtilis* as a biocontrol agent for plant disease." *Perspectives in Phytopathol.* pp. 367-374.
- Shaeffer, P. 1969. "Sporulation and the production of antibiotics, exoenzymes and exotoxins." *Bacteriol. Rev.* 33 : 48-71.
- Sadoff, H. L. 1972. "The antibiotics of *Bacillus* sp. : Their possible roles in sporulation." *Process indust. Microbiol.* 11 : 3-25.
- Shoji, J. 1978. "Recent chemical studies on peptide antibiotic from the genus *Bacillus*." *Adv. Appl. Microbiol.* 24 : 187-214.
- Shimoni, M. 1994. "A method for activity staining peroxidases and  $\beta$ -1,3-glucanase isozymes in polyacrylamide electrophresis gels." *Anal. Biochem.* 220 : 36-38.



- Stenzel, K., Steiner, U., and Schoenbeck, F. 1985. "Effect of induced resistance on the efficiency of powdery mildew haustoria in weed and barley." *Physiol. Plant Pathol.* 27 (3) : 357-367.
- Skujins, J. J., Potgieter, H. J. and Alexander, M. 1965. "Dissolution of fungal cell walls by a Streptomycete chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase." *Archives Biochem. Biophys.* 111 : 358-364.
- Tangarone, B., Royer, J. C. and Nakes, J. P. 1989. "Purification and characterization of endo-1,3- $\beta$ -D-glucanase from *Trichoderma longibrachiatum*." *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (1) : 177-184.
- Tilburg, A. U. B. and Thomas, M. D. 1993. "Production of extracellular proteins by the biocontrol fungus *Gliocladium virens*" *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1) : 236-242.
- Tsujiyama, Y., Hamada, N. and Kobayashi, R. 1981. "Purification and some properties of an exo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Basidiomycete* species." *Biol. Chem.* 45 (5) : 1201-1208.
- Tweddell, R. J., Jabaji-Hare, S. H. and Charest, P. M. 1994. "Production of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase by *Stachybotrys elegans*, a mycoparasite of *Rhizoctonia solani*." *Appl. Environ. Microbiol.* 60 (2) : 489-495.
- Vandamme, E. J. 1984. "Antibiotic search and production " *Biotechnology of industrial Antibiotic.* pp. 3-31.
- Wolin, V 1979. "Physical agents, bactericidal substances, and chemotherapeutic drugs" *Microbiol.* 21 : 121-156. .

## ภาคผนวก

### อาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

#### 1. อาหาร PDA

ชั่งอาหาร PDA 34 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร กวนให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 70°C นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

#### 2. อาหาร PDB

ชั่งอาหาร PDB 34 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร กวนให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 70°C นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

#### 3. อาหารเหลวสังเคราะห์

ชั่ง Dextrose 10 g, DL-glutamic acid 10 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.02 g,  $K_2HPO_4$  1.0 g, KCL 1.0 g และ trace element solution 1 ml (ประกอบด้วย  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.25 g,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  8 g และ  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.0075 g ในน้ำกลั่น 50 ml) ปรับ pH ของอาหารเท่ากับ 6.0-6.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

#### 4. อาหาร NB

ชั่ง NB 9 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร กวนให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 70°C นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

### การเตรียมสารเคมีสำหรับการหาปริมาณโปรตีน

#### สารละลาย alkaline copper

สารละลาย alkaline copper ประกอบด้วย 4% ของสารละลาย sodium carbonate ใน 0.2 M sodium hydroxide ปริมาตร 98 ml เติม 1% ของสารละลาย copper sulfate ในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ml และเติม 2% ของสารละลาย sodium potassium tartrate ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ml ผสมให้เข้ากันเตรียมแล้วใช้ทันที

#### สารละลาย Folin

ใช้สารละลาย Folin ความเข้มข้น 2.0 M ผสมในน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วน 1:2 จะได้สารละลายโฟลินที่มีความเข้มข้น 1.0 M เตรียมแล้วใช้ทันที

### โปรตีนมาตรฐาน BSA

ใช้ BSA ปริมาณ 1 mg ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ml จะได้โปรตีน BSA ที่มีความเข้มข้น 1 mg/ml นำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นอย่างมีลำดับแบบ 1:2 จะได้ปริมาณ BSA ที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 20, 40, 80, 160 และ 320  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ

### การเตรียมสารเคมีสำหรับตรวจสอบหาแอกติวิตีของเอนไซม์เบต้า-1,3-กลูคาเนส บัฟเฟอร์

ซึ่ง sodium acetate จำนวน 1.36 g ละลายในน้ำกลั่น 80 ml ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปรับ pH เท่ากับ 5 โดยใช้ acetic acid เข้มข้น เติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 100 ml จะได้ sodium acetate buffer มีความเข้มข้น 0.1 M pH 5.0 เก็บไว้ที่ 4°C

### สารสับสเตรต

ซึ่ง laminarin จำนวน 0.125 g ละลายใน 0.1 M sodium acetate buffer pH 5.0 ปริมาตร 25 ml จะได้สารละลาย laminarin ที่มีความเข้มข้น 5 mg/ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

### สารละลาย DNS

ซึ่ง DNS จำนวน 5 g ละลาย 2.0 N NaOH ปริมาตร 100 ml ที่อุณหภูมิ 80-90°C แล้วเติมสารละลาย sodium potassium tartrate จำนวน 5 g ที่ละลายอยู่ในน้ำกลั่นปริมาตร 250 ml ผสมให้เข้ากันขณะที่ยังร้อนอยู่ ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 ml ในขวดวัดปริมาตร จากนั้นถ่ายลงขวดสีชาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

### สารเคมีที่ใช้และวิธีการเตรียมสารสำหรับการทำอิลคโตรโฟรีซิส

◆ 30% acrylamide solution : ผสม acrylamide 30 g กับ N,N'-methylene bisacrylamide 0.8 g ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml กรองด้วยกระดาษกรอง เก็บไว้ในขวดสีชาอุณหภูมิ 4°C

◆ 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 : ซึ่ง Tris 6 g ละลายในน้ำกลั่นปรับ pH เท่ากับ 6.8 ด้วย HCl เข้มข้น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

◆ 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 : ซึ่ง Tris 18 g ละลายในน้ำกลั่นปรับ pH เท่ากับ 8.8 ด้วย HCl เข้มข้น ปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

- ◆ 10% SDS : ชั่ง SDS 10 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง
- ◆ 10% ammonium persulfate : ชั่ง ammonium persulfate 0.1 g ละลายในน้ำกลั่น 1 ml เก็บไว้ที่ 4°C ไม่ควรเก็บไว้นานเกินไป
- ◆ TEMED เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C
- ◆ Sample buffer : สำหรับ SDS-PAGE ประกอบด้วย Tris 1.42 g, SDS 4 g, glycerol 20 ml, mercaptoethanol 10 ml และ bromophenol blue 0.02 g ละลายในน้ำกลั่นปรับ pH เท่ากับ 6.8 และปรับปริมาตรให้ครบ 100 ml ในน้ำกลั่นทำนองเดียวกับการเตรียม sample buffer สำหรับ ND-PAGE แต่ต่างกันที่ไม่มี SDS และ mercaptoethanol
- ◆ อิเล็กโตรฟอเรซิส บัฟเฟอร์ : สำหรับ SDS-PAGE ประกอบด้วย Tris 3.03 g, glycine 14.4 g และ SDS 1 g ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH เท่ากับ 8.3 ด้วย HCl เข้มข้น ปรับปริมาตรครบ 1 ลิตร ทำนองเดียวกับการเตรียมสำหรับ ND-PAGE แต่ต่างกันที่ไม่มี SDS
- ◆ staining solution : ชั่ง Coomassie brilliant blue R-250 2.5 g ละลายในน้ำกลั่น 100 ml จากนั้นเติม acetic acid 50 ml และ methanol 200 ml ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 500 ml
- ◆ destaining solution : ประกอบด้วยอัตราส่วนผสมของ น้ำกลั่น : methanol : acetic acid เท่ากับ 5:4:1

ส่วนประกอบของเจลที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน (ดัดแปลงจาก Laemmli (1970))

composition	separating gel				stacking gel	
	non-SDS		SDS		non-SDS	SDS
	8%	12%	8%	12%	3%	3%
water (ml)	2.3	1.6	2.3	1.6	2.1	2.1
30% acrylamide (ml)	1.3	2.0	1.3	2.0	0.5	0.5
1.0 M Tris-HCl, pH 6.8 (ml)	-	-	-	-	0.38	0.38
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8 (ml)	1.3	1.3	1.3	1.3	-	-
10% SDS (ml)	-	-	0.05	0.05	-	0.03
10% ammonium persulfate (ml)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.03	0.03
TEMED (ml)	0.003	0.002	0.003	0.002	0.003	0.003
total volume (ml)	5	5	5	5	3	3

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางปรานอม คิวนันท์สกุล	
วัน เดือน ปี เกิด	16 ธันวาคม 2510	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2534