ผลของสภาวะการเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตแมนนาเนสและไซลาเนส จากแบคทีเรียที่แยกได้จากนาข้าวอินทรีย์ จ.กาญจนบุรี

Effect of Cultural Conditions on the Production of Mannanase and Xylanase Produced by Bacteria Isolated from Kanchanaburi Organic Rice Field

นฤมล เอกวัฒน์ชัย และ สุดาทิพย์ จันทร*

Nareumon Aekkawatchai and Sudathip Chantorn*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต

Department Biotechnology, Faculty of Science and technology, Thammasat University, Rangsit centre

Received : 1 February 2019

Revised : 9 April 2019

Accepted : 29 April 2019

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ในงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาปัจจัยในเรื่องของอุณหภูมิ พีเอช และปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตแมนนาเนสและไซลาเนสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากนาข้าวอินทรีย์ก่อนการเก็บเกี่ยวผลผลิตจากจังหวัดกาญจนบุรีจำนวน 10 ไอโซเลท วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ด้วยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid: DNS) ที่มีโลคัสบีนกัมและเบิร์ชวู้ดไซแลนเป็นสับเสตรตสำหรับกิจกรรมแมนนาเนสและไซลาเนสตามลำดับ และติดตามการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ผลการศึกษาพบว่า มีแบคทีเรีย 3 ไอโซเลทได้แก่ *Paenibacillus polymyxa* BTK01, *Bacillus subtilis* BTK07 และ *Bacillus gottheilii* BTK10 ที่แสดงกิจกรรมเอนไซม์สูง โดยทั้ง 3 ไอโซเลทมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เท่ากับพีเอช 7.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของ *Pb. polymyxa* BTK01, *B. subtilis* BTK07 และ *B. gottheilii* BTK10 เท่ากับ 37, 30 และ 37 องศาเซลเซียสตามลำดับ ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของ *Pb. polymyxa* BTK01 และ *B.subtilis* BTK07 เท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และ 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สำหรับ *B.gottheilii* BTK10 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว *B.subtilis* BTK07 แสดงกิจกรรมแมนนาเนสสูงที่สุดเท่ากับ 0.698 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ *Pb. polymyxa* BTK01 แสดงกิจกรรมไซลาเนสสูงที่สุดเท่ากับ 0.419 หน่วยต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ : แมนนาเนส, ไซลาเนส, *Paenibacillus, Bacillus*, นาข้าวอินทรีย์

*Corresponding author. E-mail : sudathip@tu.ac.th

Abstract

The objective of this research was to study on the effects of temperature of cultivation, initial pH of medium and inoculum preparation for the mannanase and xylanase production from 10 isolates, collected from organic rice field pre-harvesting from Kanchanaburi Province. All 10 isolates were determined on mannanase and xylanase activities by using locust bean gum and birchwood xylan as standard, respectively by measuring reducing sugar content by 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method. Bacterial cell growth was also evaluated by reading the absorbance at 600 nm of culture broth. At the optimal pH (7.0), three 3 isolates including *Paenibacillus polymyxa* BTK01, *Bacillus subtilis* BTK07 and *Bacillus gottheilii* BTK10, exhibited high enzyme activities. The optimum temperature for growth and enzyme production of *Pb. polymyxa* BTK01, *B. subtilis* BTK07 and *B. gottheilii* BTK10 were 37, 30 and 37°C, respectively. According to optimal inoculum amount for growth and enzyme production of both *Pb. polymyxa* BTK01 and *B. subtilis* BTK07 were 1% (v/v) and 1.5% (v/v) for *B. gottheilii* BTK10. At optimum condition, *B. subtilis* BTK07 showed the highest mannanase activity (0.698 U/mL) while *Pb. polymyxa* BTK01 showed the highest xylanase activity (0.419 U/mL).

Keywords : mannanase, xylanase, *Paenibacillus, Bacillus*, organic rice field

บทนำ

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (agricultural waste) เช่น ซังข้าวโพด กากชานอ้อย และฟางข้าว เป็นสารจำพวกลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) ที่ประกอบด้วยเซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) เป็นองค์ประกอบหลัก การย่อยสลายสารกลุ่มลิกโนเซลลูโลสในธรรมชาติเป็นไปได้ยาก เนื่องจากลิกโนเซลลูโลสเป็นสารโพลิเมอร์ที่มีโครงสร้างซับซ้อนจึงจำเป็นต้องใช้เวลาในการย่อยสลายนาน เกษตรกรส่วนใหญ่จึงเลือกใช้วิธีการเผาทำลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวผลผลิต ซึ่งการเผาทำลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพอากาศซึ่งก่อให้เกิดมลพิษทางอากาศ และยังเป็นการทำลายระบบนิเวศน์ในพื้นที่เพาะปลูกอีกด้วย ดังนั้นการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยชีววิธีโดยอาศัยลิกโนเซลลูเลส (lignocellulase) ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ประกอบด้วย 3 กลุ่มเอนไซม์หลักได้แก่กลุ่มเซลลูเลส กลุ่มเฮมิเซลลูเลสและกลุ่มลิกนินเนส โดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์เป็นวิธีที่ได้รับความสนใจมากขึ้นในปัจจุบัน แหล่งผลิตลิกโนเซลลูเลสจากจุลินทรีย์พบได้ทั้งแบคทีเรีย รา ยีสต์ และแอคติโนมัยซีส ซึ่งโดยทั่วไปจุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญทางการเกษตรนั่นคือช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยการย่อยสลายอินทรีย วัตถุต่าง ๆ และช่วยเปลี่ยนรูปธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช ทำให้มีปริมาณแร่ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชในดินเพิ่มมากขึ้น จึงส่งผลให้พืชเจริญเติบโตได้เพิ่มขึ้น (El-Sobky, 2017) ดังนั้นหากในพื้นที่เพาะปลูกมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตลิกโนเซลลูเลสได้ ก็จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการเพาะปลูกมากยิ่งขึ้น นอกเหนือจากการเพิ่มแร่ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืช ยังสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวได้อีกด้วย (Malgas *et al*., 2017) แมนนาเนสและไซลาเนสเป็นเฮมิเซลลูเลสที่สำคัญในการเพิ่มแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของพืชและยังสามารถประสิทธิภาพในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรดังกล่าวอีกด้วย ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตแมนนาเนสและไซลาเนสที่คัดแยกได้จากดิน เช่น

Bacillus licheniformis (Dyk *et al*., 2010), *Penicillium chrysogenum* (Zhang & Sang, 2015), *Bacillus subtilis* (Khanongnuch *et al*., 1998) และ *Thermomyces lanuginosus* (Puchart *et al*., 1998) ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์มีหลายปัจจัย เช่น องค์ประกอบของอาหารผลิตเอนไซม์ ตัวเหนี่ยวนำ สับสเตรต ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง อุณหภูมิ พีเอช ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น อัตราการกวนผสม และการให้อากาศ (Svastits-Ducso *et al*., 2009; Feng *et al*., 2003) เป็นต้น จากงานวิจัยของ Chunya *et al*. (2016) คัดแยกแบคทีเรียจากดินนาข้าวอินทรีย์ก่อนการเก็บเกี่ยวผลผลิตในจังหวัดกาญจนบุรีบนอาหารคัดแยกที่มีโลคัสบีนกัม และเบิร์ชวู้ดไซแลนเป็นสับเสตรต พบว่ามีแบคทีเรียที่แสดงวงใส (clear zone) บนอาหารมากกว่า 5 มิลลิเมตรจำนวน 10 ไอโซเลท ดังนั้นวัตถุประสงค์ในงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาปัจจัยของอุณหภูมิ พีเอช และปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตแมนนาเนสและไซลาเนสจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากนาข้าวอินทรีย์ก่อนการเก็บเกี่ยวผลผลิต จ.กาญจนบุรี

วิธีดำเนินการวิจัย

1.เชื้อจุลินทรีย์และการเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

1.1 เชื้อจุลินทรีย์

แบคทีเรีย 10 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากดินนาข้าวอินทรีย์ก่อนการเก็บเกี่ยวผลผลิต จ.กาญจนบุรี ได้แก่ *Paenibacillus polymyxa* BTK01, *Enterobacter cloacae* BTK02, *Paenibacillus jamilae* BTK03, *Paenibacillus pabuli* BTK04, *Paenibacillus polymyxa* BTK05, *Paenibacillus vini* BTK06, *Bacillus subtilis* BTK07, *Paenibacillus vini* BTK08, *Paenibacillus vini* BTK09 และ *Bacillus gottheilii* BTK10 เก็บในอาหาร Nutrient broth (NB) ที่มีกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.2 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์จากข้อ 1.1 ถ่ายลงในอาหาร NB 100 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาคัดแยกให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค cross streak บนอาหาร nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวมาเพาะเลี้ยงในอาหาร NB บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้นสำหรับผลิตแมนนาเนสและไซลาเนสในขั้นตอนต่อไป

2.การผลิตแมนนาเนสและไซลาเนส

นำกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากข้อ 1.2 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรให้ได้เท่ากับ 0.25 (โดยมีจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นอยู่ในช่วง 10^4 CFU/ml) ถ่ายกล้าเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรลงในอาหารสำหรับผลิตเอนไซม์ที่ดัดแปลงจาก Wongkoon *et al*. (2013) ประกอบด้วยโลคัสบีนกัม (locust bean gum) 10 กรัม เพปโตน 5 กรัม สารสกัดจากยีสต์ 1 กรัม ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 4 กรัม โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.2 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$. $7H_2O$) 1 กรัม และเฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4$. $7H_2O$) 0.02 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แยกเก็บส่วนใสหรือสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบ (crude enzyme) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ข้อ 3 ต่อไป

3. การศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตแมนนาเนสและไซลาเนส

3.1 อุณหภูมิ

ผลิตแมนนาเนสและไซลาเนสในอาหารสำหรับผลิตเอนไซม์ และกำหนดปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นตามข้อ 2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแมนนาเนสและไซลาเนสที่ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ในข้อ 4 ต่อไป

3.2 พีเอช

ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารสำหรับผลิตเอนไซม์ ตามข้อ 2 ให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 6, 7 และ 8 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม (จากผลการทดลองข้อ 3.1) นาน 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ในข้อ 4 ต่อไป

3.3 ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น

ปรับปริมาตรกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากข้อ 1.2 ด้วยอาหาร NB วัดค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 600 นาโนเมตร ให้ได้เท่ากับ 0.25 ในปริมาณเท่ากับ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ (จากผลการทดลองข้อ 3.1) ในอาหารสำหรับผลิตเอนไซม์ที่ปรับพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ (จากผลการทดลองข้อ 3.2) นาน 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ในข้อ 4 ต่อไป โดยในการศึกษาขั้นตอนนี้จะมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตรทุกการทดลอง

4.การวิเคราะห์

4.1 การวิเคราะห์การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

นำตัวอย่างสารละลายเซลล์ช่วงเวลาต่างๆ จากข้อ 3.1-3.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร บันทึกผล ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

4.2 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

นำตัวอย่างเอนไซม์สกัดหยาบจากข้อ 3.1-3.3 วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โดยการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี 3,5–dinitrosalicylic acid; DNS (Miller & Gail, 1959) ปฏิกิริยาการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ประกอบด้วยเติมสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตรลงใน 0.5 มิลลิลิตรสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอชเท่ากับ 7.0 ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรของสับสเตรต โดยมีโลคัสบีนกัม (locust bean gum) เป็นสับเสตรตสำหรับแมนนาเนส และเบิร์ชวู้ดไซแลน (birchwood xylan) เป็นสับสเตรตสำหรับไซลาเนส บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้ววัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์คือปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสับสเตรตแล้วได้ผลิตภัณฑ์ 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ โดยมีน้ำตาลแมนโนสเป็นน้ำตาลมาตรฐานสำหรับแมนนาเนส และน้ำตาลไซโลสเป็นน้ำตาลมาตรฐานสำหรับไซลาเนส

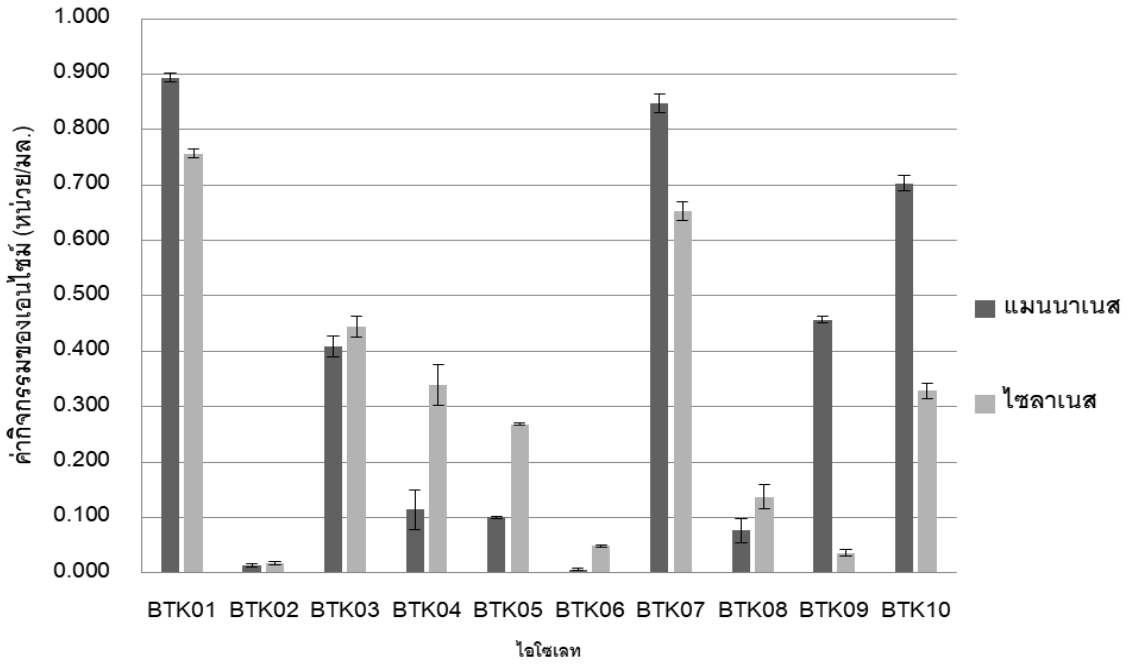
4.3 การประเมินค่าผลทางสถิติ

นำข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากการทดลองวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าทางสถิติ โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-Way ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของสภาวะเบื้องต้นและสภาวะเหมาะสมด้วยวิธี t- test และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปัจจัยการทดลองด้วยวิธี Tukey HSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

ผลการวิจัย

1. ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์

จากการศึกษาแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลทที่คัดแยกแบคทีเรียจากดินนาข้าวอินทรีย์ก่อนการเก็บเกี่ยวผลผลิตในจังหวัดกาญจนบุรีในงานวิจัยของ Chunya *et al*. (2016) มาศึกษาความสามารถในการผลิตแมนนาเนสและไซลาเนสในอาหารเหลว จากผลการศึกษาแสดงดังภาพที่ 1 พบว่า มีแบคทีเรีย 3 ไอโซเลทได้แก่ *Paenibacillus polymyxa* BTK01, *Bacillus subtilis* BTK07 และ *B. gottheilii* BTK10 ที่แสดงกิจกรรมแมนนาเนสและไซลาเนสสูงที่สุดเทียบกับแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลท โดย *Pb. polymyxa* BTK01, *B. subtilis* BTK07 และ *B. gottheilii* BTK10 แสดงกิจกรรมแมนนาเนสเท่ากับ 0.895, 0.847 และ 0.703 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และกิจกรรมไซลาเนสเท่ากับ 0.758, 0.652 และ 0.328 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดังนั้นในการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ในขั้นต่อไปในงานวิจัยนี้จึงคัดเลือก *Pb. polymyxa* BTK01, *B. subtilis* BTK07 และ *B. gottheilii* BTK10 เพื่อทำการศึกษาลำดับต่อไป



ภาพที่ 1 กิจกรรมแมนนาเนสและไซลาเนสของแบคทีเรียไอโซเลท BTK01 – BTK 10

2. ผลของอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์

ตารางที่ 1 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียสของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ผลการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญพบว่า *Pb. polymyxa* BTK01 และ *B. subtilis* BTK07 มีการเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในขณะที่ *B. gottheilii* BTK10 สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสที่ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง และเมื่อศึกษาผลของอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์พบว่า *Pb. polymyxa* BTK01 และ *Bacillus gottheilii* BTK10 สามารถผลิตแมนนาเนสและไซลาเนสได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดย *Pb. polymyxa* BTK01 แสดงค่ากิจกรรมของแมนนาเนสและไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 0.589 และ 0.340 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และ *B. gottheilii* BTK10 แสดงค่ากิจกรรมแมนนาเนสและไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 0.211 และ 0.126 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ในขณะที่ *B. subtilis* BTK07 สามารถผลิตแมนนาเนสและไซลาเนสได้สูงสุดคืออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แสดงค่ากิจกรรมแมนนาเนสและไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 0.819 และ

0.257 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับที่ระดับอย่างมีนัยสำคัญ 0.05 จากผลการศึกษาพบว่า *Pb. polymyxa* BTK01 เจริญและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิเดียวกันคือเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ในขณะที่ *B. subtilis* BTK07 เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่อุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ *B. gottheilii* BTK10 เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่อุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 1 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของ *Paenibacillus polymyxa* BTK01, *Bacillus subtilis* BTK07 และ *Bacillus gottheilii* BTK10 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปัจจัยการทดลองด้วยวิธี Tukey HSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

ไอโซเลท / อุณหภูมิ (°C)	เวลา (ชม.)	BTK01			BTK07			BTK10		
		การเจริญ (OD600)	กิจกรรมแมนนาเนส (หน่วย/มล.)	กิจกรรมไซลาเนส (หน่วย/มล.)	การเจริญ (OD600)	กิจกรรมแมนนาเนส (หน่วย/มล.)	กิจกรรมไซลาเนส (หน่วย/มล.)	การเจริญ (OD600)	กิจกรรมแมนนาเนส (หน่วย/มล.)	กิจกรรมไซลาเนส (หน่วย/มล.)
30	18	2.517^{a} (±0.032)	0.008^{c} (±0.003)	0.028^{b} (±0.010)	1.680^{c} (±0.047)	0.767^{a} (±0.009)	0.193^{b} (±0.003)	0.791^{a} (±0.013)	0.003^{b} (±0.002)	0.002^{b} (±0.001)
	24	2.380^{b} (±0.005)	0.324^{b} (±0.038)	0.313^{a} (±0.028)	2.045^{c} (±0.069)	0.819^{a} (±0.010)	0.257^{a} (±0.015)	0.759^{a} (±0.039)	0.003^{c} (±0.002)	0.007^{b} (±0.002)
37	18	2.348^{b} (±0.090)	0.501^{a} (±0.005)	0.134^{a} (±0.004)	2.010^{b} (±0.061)	0.711^{a} (±0.036)	0.130^{c} (±0.037)	0.761^{b} (±0.015)	0.056^{a} (±0.011)	0.034^{a} (±0.010)
	24	3.512^{a} (±0.047)	0.589^{a} (±0.007)	0.340^{a} (±0.002)	3.593^{a} (±0.077)	0.510^{b} (±0.118)	0.242^{a} (±0.017)	0.746^{a} (±0.028)	0.211^{a} (±0.002)	0.126^{a} (±0.013)
45	18	1.641^{c} (±0.066)	0.102^{b} (±0.011)	0.116^{a} (±0.006)	2.485^{a} (±0.005)	0.749^{a} (±0.011)	0.236^{a} (±0.001)	0.533^{c} (±0.013)	0.007^{b} (±0.003)	0.005^{b} (±0.002)
	24	1.500^{c} (±0.025)	0.421^{b} (±0.024)	0.330^{a} (±0.073)	2.793^{b} (±0.016)	0.510^{b} (±0.008)	0.026^{b} (±0.008)	0.265^{b} (±0.021)	0.061^{b} (±0.002)	0.020^{b} (±0.001)

3.ผลของอิทธิพลของพีเอชต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์

ตารางที่ 2 แสดงผลการศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ที่พีเอชเท่ากับ 6, 7และ 8 พบว่า *Pb. polymyxa* BTK01 และ *B. gottheilii* BTK10 เจริญได้ดีที่พีเอชเท่ากับ 7.0 ในขณะที่ *B. subtilis* BTK07 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่พีเอชเท่ากับ 8.0 ที่ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง และเมื่อศึกษาผลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์พบว่า แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทสามารถผลิตเอนไซม์สูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 7.0 โดย *Pb. polymyxa* BTK01 แสดงค่ากิจกรรมแมนนาเนสและไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 0.902 และ 0.366 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 18 ชั่วโมง และ *B. subtilis* BTK07 สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 7.0 แสดงค่ากิจกรรมแมนนาเนสและไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 0.641 และ 0.243 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ที่ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 18 ชั่วโมง ซึ่งการผลิตเอนไซม์จาก *Pb. polymyxa* BTK01 และ *B. subtilis* BTK07 ในอาหารผลิตเอนไซม์ที่มีการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารจะได้ปริมาณเอนไซม์สูงที่สุดในเวลาเพียง 18 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดสั้นกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงและผลิตเอนไซม์ในอาหารที่ยังไม่มีการปรับพีเอชเริ่มต้น นอกจากนั้น *B. gottheilii* BTK10 แสดงค่ากิจกรรมแมนนาเนสและ

ไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 0.315 และ 0.403 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับที่ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมงที่ระดับอย่างมีนัยสำคัญ 0.05 เมื่อพิจารณาอิทธิพลของพีเอชต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลทพบว่า *Pb. polymyxa* BTK01 และ *B. gottheilii* BTK10 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่พีเอชเดียวกันนั่นคือ 7.0 ในขณะที่ *B. subtilis* BTK07 มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญทีพีเอชเท่ากับ 8.0 แต่มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 7.0

ตารางที่ 2 อิทธิพลของพีเอชต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของ *Paenibacillus polymyxa* BTK01, *Bacillus subtilis* BTK07 และ *Bacillus gottheilii* BTK10 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปัจจัยการทดลองด้วยวิธี Tukey HSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

ไอโซเลท / pH	เวลา (ชม.)	BTK01			BTK07			BTK10		
		การเจริญ (OD600)	กิจกรรมแมนนาเนส (หน่วย/มล.)	กิจกรรมไซลาเนส (หน่วย/มล.)	การเจริญ (OD600)	กิจกรรมแมนนาเนส (หน่วย/มล.)	กิจกรรมไซลาเนส (หน่วย/มล.)	การเจริญ (OD600)	กิจกรรมแมนนาเนส (หน่วย/มล.)	กิจกรรมไซลาเนส (หน่วย/มล.)
6	18	1.057^{b} (±0.085)	0.021^{c} (±0.015)	0.052^{c} (±0.006)	1.349^{c} (±0.032)	0.598^{b} (±0.002)	0.211^{b} (±0.008)	0.265^{b} (±0.002)	0.006^{b} (±0.003)	0.005^{b} (±0.004)
	24	2.385^{b} (±0.039)	0.234^{c} (±0.076)	0.080^{c} (±0.010)	2.362^{c} (±0.010)	0.453^{c} (±0.038)	0.203^{a} (±0.027)	0.351^{b} (±0.036)	0.017^{b} (±0.003)	0.018^{b} (±0.003)
7	18	1.673^{a} (±0.023)	0.902^{a} (±0.013)	0.366^{a} (±0.004)	1.826^{b} (±0.063)	0.641^{a} (±0.009)	0.243^{a} (±0.009)	0.928^{a} (±0.002)	0.209^{a} (±0.012)	0.302^{a} (±0.021)
	24	2.539^{a} (±0.036)	0.819^{a} (±0.048)	0.343^{a} (±0.030)	2.753^{b} (±0.028)	0.596^{a} (±0.024)	0.088^{c} (±0.035)	1.100^{a} (±0.118)	0.315^{a} (±0.043)	0.403^{a} (±0.005)
8	18	0.489^{c} (±0.026)	0.755^{b} (±0.020)	0.145^{b} (±0.016)	2.073^{a} (±0.073)	0.556^{c} (±0.005)	0.217^{b} (±0.001)	0.887^{a} (±0.037)	0.013^{b} (±0.002)	0.009^{b} (±0.001)
	24	0.332^{c} (±0.005)	0.615^{b} (±0.042)	0.100^{b} (±0.006)	3.063^{a} (±0.113)	0.540^{b} (±0.001)	0.147^{b} (±0.055)	0.943^{a} (±0.036)	0.018^{b} (±0.006)	0.010^{b} (±0.003)

4. ผลของอิทธิพลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์

ตารางที่ 3 แสดงผลการศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ที่ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ผลการศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญพบว่า *Pb. polymyxa* BTK01 และ *B. subtilis* BTK07 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 18 และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ ในขณะที่ *B. gottheilii* BTK10 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ผลการศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์พบว่า ที่ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร *Pb. polymyxa* BTK01 แสดงค่ากิจกรรมแมนนาเนสและไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 0.653 และ 0.419 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ *B. subtilis* BTK07 แสดงค่ากิจกรรมแมนนาเนสและไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 0.698 และ 0.261 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ในขณะที่ *B. gottheilii* BTK10 สามารถผลิตแมนนาเนสและไซลาเนสได้สูงสุดที่ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ซึ่งเป็นปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตเช่นกัน โดยแสดงค่ากิจกรรมแมนนาเนสและไซลาเนสสูงสุดเท่ากับ 0.296 และ 0.072 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ที่ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมงที่ระดับอย่างมีนัยสำคัญ 0.05

ตารางที่ 3 อิทธิพลของปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของ *Paenibacillus polymyxa* BTK01, *Bacillus subtilis* BTK07 และ *Bacillus gottheilii* BTK10 เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปัจจัยการทดลองด้วยวิธี Tukey HSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

ไอโซเลท / ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น (%)	เวลา (ชม.)	BTK01			BTK07			BTK10		
		การเจริญ (OD600)	กิจกรรมแมนนาเนส (หน่วย/มล.)	กิจกรรมไซลาเนส (หน่วย/มล.)	การเจริญ (OD600)	กิจกรรมแมนนาเนส (หน่วย/มล.)	กิจกรรมไซลาเนส (หน่วย/มล.)	การเจริญ (OD600)	กิจกรรมแมนนาเนส (หน่วย/มล.)	กิจกรรมไซลาเนส (หน่วย/มล.)
0.5	18	1.170^{a} (±0.040)	0.396^{a} (±0.010)	0.170^{b} (±0.005)	1.534^{c} (±0.020)	0.645^{a} (±0.015)	0.204^{a} (±0.041)	0.457^{b} (±0.037)	0.015^{b} (±0.006)	0.005^{b} (±0.001)
	24	0.950^{b} (±0.027)	0.565^{b} (±0.015)	0.204^{d} (±0.001)	3.277^{b} (±0.008)	0.580^{b} (±0.005)	0.228^{a} (±0.014)	0.469^{b} (±0.023)	0.017^{c} (±0.002)	0.009^{c} (±0.002)
1.0	18	1.175^{a} (±0.071)	0.425^{a} (±0.013)	0.253^{a} (±0.002)	2.219^{a} (±0.041)	0.607^{a} (±0.010)	0.215^{a} (±0.019)	1.056^{a} (±0.081)	0.252^{a} (±0.004)	0.062^{a} (±0.010)
	24	1.066^{a} (±0.039)	0.653^{a} (±0.006)	0.419^{a} (±0.002)	3.405^{a} (±0.039)	0.698^{a} (±0.025)	0.261^{a} (±0.005)	0.483^{b} (±0.015)	0.165^{b} (±0.004)	0.064^{a,b} (±0.003)
1.5	18	1.082^{b} (±0.023)	0.362^{a} (±0.028)	0.155^{c} (±0.001)	2.217^{a} (±0.026)	0.496^{b} (±0.015)	0.076^{b} (±0.035)	0.475^{b} (±0.017)	0.212^{a} (±0.020)	0.031^{b} (±0.039)
	24	0.714^{c} (±0.007)	0.459^{c} (±0.014)	0.344^{b} (±0.005)	3.315^{b} (±0.046)	0.594^{b} (±0.005)	0.241^{a} (±0.018)	0.749^{a} (±0.017)	0.296^{a} (±0.036)	0.072^{a} (±0.011)
2.0	18	0.693^{c} (±0.007)	0.204^{b} (±0.026)	0.057^{d} (±0.003)	2.022^{b} (±0.069)	0.614^{a} (±0.036)	0.235^{a} (±0.047)	0.381^{b} (±0.031)	0.021^{b} (±0.001)	0.012^{b,c} (±0.012)
	24	0.625^{d} (±0.006)	0.336^{d} (±0.039)	0.245^{c} (±0.005)	3.217^{c} (±0.063)	0.585^{b} (±0.007)	0.235^{a} (±0.037)	0.698^{a} (±0.057)	0.059^{c} (±0.046)	0.038^{b} (±0.038)

เมื่อวิเคราะห์ผลการทดลองที่สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท เปรียบเทียบกับการเจริญและการผลิตเอนไซม์ในเบื้องต้น พบว่า เอนไซม์ที่ผลิตได้จากทั้ง 3 ไอโซเลทมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้นทั้งกิจกรรมของแมนนาเนสและไซลาเนสดังแสดงในตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่าผลของอุณหภูมิ พีเอช และปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ได้เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทที่แท้จริง อย่างไรก็ตามกิจกรรมของไซลาเนสที่ผลิตจาก *B. gottheilii* BTK10 ที่ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมงลดลงจาก 0.126 U/ml เป็น 0.072 U/ml ทั้งนี้อาจเกิดจากการเจริญเติบโตของ *B. gottheilii* BTK10 เปลี่ยนแปลงไปคือเจริญเติบโตได้ช้าลง ซึ่งมักเกิดขึ้นบ่อยในแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากธรรมชาติ

ตารางที่ 4 กิจกรรมของแมนนาเนสและไซลาเนสของ *Paenibacillus polymyxa* BTK01, *Bacillus subtilis* BTK07 และ *Bacillus gottheilii* BTK10 ในสภาวะเบื้องต้น และสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปัจจัยการทดลองด้วยวิธี t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

เอนไซม์ (U/ml)	BTK01		BTK07		BTK10	
	สภาวะเบื้องต้น	สภาวะที่เหมาะสม	สภาวะเบื้องต้น	สภาวะที่เหมาะสม	สภาวะเบื้องต้น	สภาวะที่เหมาะสม
แมนนาเนส	0.589[b]	0.653[a]	0.510[b]	0.698[a]	0.211[b]	0.296[a]
ไซลาเนส	0.340[b]	0.419[a]	0.242[a]	0.261[a]	0.126[a]	0.072[b]

วิจารณ์ผลการวิจัย

แบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลทที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้ เป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการแสดงวงใสในอาหารแข็งที่มีความจำเพาะต่อไซลาเนสและแมนนาเนส และเมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลทมาศึกษาหากิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวในอาหารเหลวพบว่า มีแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลทที่แสดงกิจกรรมแมนนาเนสและไซลาเนสสูงที่สุดได้แก่ *Pb. polymyxa* BTK01, *B. subtilis* BTK07 และ *B. gottheilii* BTK10 แสดงให้เห็นว่าวิธีการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็งที่มีสับสเตรตที่จำเพาะต่อการทำงานของเอนไซม์เป็นวิธีที่น่าเชื่อถือทำให้สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ที่สนใจได้อย่างจำเพาะเจาะจง จากงานวิจัยของ Phothichitto *et al*. (2006) ที่ได้คัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตแมนนาเนส จากดินพบว่า *B. circulans* NT6.7 สามารถผลิตแมนนาเนสได้สูงที่สุด ในขณะที่ Titapoka *et al*. (2008) สามารถคัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตแมนนาเนสจากดินได้ 2 ชนิด คือ *Klebsiella oxytoca* CW2-3 และ *Acinetobacter* sp. ST1-1 เมื่อใช้กากมะพร้าวเป็นสับสเตรต แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของแบคทีเรีย วิธีการคัดแยก และชนิดของสับสเตรตเป็นสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิดของแบคทีเรียที่แตกต่างกันส่งผลให้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แตกต่างกัน

ปัจจัยแรกที่ศึกษาคืออุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทพบว่า *Pb. polymyxa* BTK01 และ *B. subtilis* BTK07 มีการเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับ *Pb. pabuli* strain P7S และ *Pb. glucanolyticus* ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส (Trinh *et al*., 2018; Mathews *et al*., 2016) ในขณะที่ *B. gottheilii* BTK10 สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen *et al*. (2018) ที่รายงานว่า *B. wiedmannii* MSM และ *B. subtilis* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับ *B.licheniformis* (Abarike *et al*., 2018) ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตเท่ากับ 30 องศาเซลเซียสเช่นกัน นอกจากนั้น *B. subtilis* BTK07 เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่อุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และ *B.gottheilii* BTK10 เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดที่อุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์อาจแตกต่างกันได้ไม่จำเป็นต้องเป็นอุณหภูมิเดียวกัน (Krier *et al*., 1998) ซึ่งปัจจัยเรื่องของอุณหภูมิมีความสำคัญต่อกิจกรรมเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะมีการเจริญเติบโตและผลิตสารเมตาบอไลต์ต่าง ๆ ที่สำคัญในสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อ

การเจริญของจุลินทรีย์นั้น ๆ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Heck *et al*. (2005) ซึ่งรายงานว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *B. circulan* BL53 คือที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่ *B. circulan* BL53 สามารถผลิตไซลาเนสได้สูงที่สุด โดยที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่โปรติเอสไม่สามารถทำงานได้ดี หรือมีกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำ จึงทำให้พบปริมาณการผลิตไซลาเนสสูงเนื่องจากไม่ถูกทำลายด้วยโปรติเอสที่เชื้อผลิตขึ้นนั่นเอง อย่างไรก็ตามข้อสันนิษฐานดังกล่าวขัดแย้งกับผลการทดลองของ Sa-Pereira *et al*. (2002) ซึ่งพบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 50 องศาเซลเซียสเป็น 55 องศาเซลเซียสในการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีน้ำตาลทีฮาโลสเป็นแหล่งคาร์บอนจะทำให้การผลิตไซลาเนสเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์ต่างชนิดกันก็อาจจะเหมือนหรือแตกต่างกันได้ โดยอุณหภูมิที่สูงเกินไปอาจส่งผลให้การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ลดลง เพราะเซลล์ไม่สามารถควบคุมเมตาบอลิซึมภายในได้ และยังทำให้โครงสร้างโปรตีนเสียสภาพส่งผลให้การผลิตเอนไซม์ได้น้อยลง นอกจากนี้เนื่องจากอิทธิพลจากปัจจัยอื่น ๆ เช่นพีเอช แหล่งอาหาร สภาวะการกวนหรือการให้อากาศเป็นต้น ที่ส่งผลต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ด้วยนั่นเอง

อิทธิพลของพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Pb. polymyxa* BTK01 และ *B. gottheilii* BTK10 มีพีเอชเท่ากับ 7.0 สอดคล้องกับงานวิจัย Mathews *et al*. (2016) ที่รายงานว่า *B. wiedmannii* MSM และ *Pb.glucanolyticus* (Chen *et al*., 2018) มีพีเอชเริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตเท่ากับพีเอช 7.0 ในขณะที่ *B. subtilis* BTK07 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่พีเอชเท่ากับ 8.0 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Utami *et al*. (2016) รายงานว่า *B. subtilis* MAN511 มีความสามารถในการผลิตแมนนาเนสสูงที่สุดที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 7.0 เช่นเดียวกับ Fatokun *et al*. (2017) ที่รายงานว่าบาซิลลัสที่คัดแยกได้จากตะกอนจากหาดนาฮูน (Nahoon beach) สามารถผลิตแมนนาเนสสูงที่สุดที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารเพาะเลี้ยงเท่ากับ 7.0 เช่นกัน นอกจากนั้น Siddiqui *et al*. (2016) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลาเนสจาก *Paenibacillus* sp. พบว่าในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตไซลาเนสที่มีพีเอชเท่ากับ 7.0 *Paenibacillus* sp. สามารถผลิตไซลาเนสได้สูงที่สุด นอกจากนั้น *Pb. polymyxa* BTK01 และ *B. gottheilii* BTK10 มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่พีเอชเดียวกันนั่นคือ 7.0 ในขณะที่ *B. subtilis* BTK07 มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญทีพีเอชเท่ากับ 8.0 แต่มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เท่ากับ 7.0 ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Raja *et al*. (2018) ที่พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์จาก *B. licheniformis* มีความแตกต่างกันนั่นคือ พีเอชที่เหมาะสมต่อเจริญเติบโตอยู่ในช่วงพีเอชเท่ากับ 8.0 แต่สามารถผลิตไซลาเนสได้สูงสุดที่พีเอชเท่ากับ 9.0 ซึ่งพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไประหว่างกระบวนการผลิตส่งผลต่อโครงสร้างของผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์ของไอโซเลททั้ง 3 อยู่ในช่วงพีเอชที่เป็นกลาง จึงสามารถนำเอนไซม์ที่ผลิตได้จากทั้ง 3 ไอโซเลทไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้เช่น อุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมแปรรูปอาหารเป็นต้น อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องศึกษาปัจจัยอื่นในกระบวนการผลิตเอนไซม์เช่น องค์ประกอบของอาหารเพื่อผลิตเอนไซม์ และศึกษาสมบัติของเอนไซม์ประกอบด้วย

ปัจจัยสุดท้ายที่ศึกษาคือปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์จากแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลท ผลการศึกษาพบว่า *Pb. polymyxa* BTK01 และ *B. subtilis* BTK07 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 1.0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wongsiridetchai *et al*. (2018) ที่รายงานว่า *Bacillus* sp. GA2(1) มีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในขณะที่ *B. gottheilii* BTK10 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ต่างจากงานวิจัยของ Mihajlovski *et al*. (2018) รายงานว่า *Pb.chitinolyticus* CKS1 มีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม

ต่อการเจริญเท่ากับ 3.84 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ผลการศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์พบว่า ที่ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร *Pb. polymyxa* BTK01 และ *B. subtilis* BTK07 แสดงค่ากิจกรรมแมนนาเนสและไซลาเนสสูงสุด ในขณะที่ *B.gottheilii* BTK10 สามารถผลิตแมนนาเนสและไซลาเนสได้สูงสุดที่ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรซึ่งเป็นปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตเช่นกัน ที่ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ต่างจากงานวิจัยของ Phangsri & Phangsri (2017) ศึกษากิจกรรมแมนนาเนสจาก *B. subtilis* P2-5 โดยศึกษาปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 1, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรพบว่า ที่ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรสามารถผลิตแมนนาเนสได้สูงสุดเท่ากับ 0.80 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับที่ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง นอกจากนั้นผลการศึกษายังพบว่าเมื่อปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นสูงเกินไป จะส่งผลให้การเจริญและการผลิตเอนไซม์ของแบคทีเรียลดลง (Koutsoumanis & Sofos, 2005; Chauhan *et al*., 2014) อย่างไรก็ตามปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมจะทำให้แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากมีความสมดุลระหว่างปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นและเอนไซม์ที่ผลิตได้ ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากนาข้าวอินทรีย์ก่อนการเก็บเกี่ยวผลผลิตในจังหวัดกาญจนบุรี มีปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ในเรื่องของอุณหภูมิ พีเอช และปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่แตกต่างกัน จึงส่งผลให้แบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลทมีความน่าสนใจที่จะนำไปศึกษาต่อเพื่อประยุกต์ใช้ในงานที่หลากหลายทั้งทางด้านการเกษตรเพื่อช่วยในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่าง ๆ หรือทางด้านอุตสาหกรรมเช่นอุตสาหกรรมอาหารคนและอาหารสัตว์เป็นต้น

สรุปผลการวิจัย

ผลการคัดเลือกแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากนาข้าวอินทรีย์ก่อนการเก็บเกี่ยวผลผลิตในจังหวัดกาญจนบุรีจำนวน 10 ไอโซเลท มีแบคทีเรีย 3 ไอโซเลทได้แก่ *Pb. polymyxa* BTK01, *B. subtilis* BTK07 และ *B. gottheilii* BTK10 ที่แสดงกิจกรรมแมนนาเนสและไซลาเนสสูง โดยปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของ *Pb. polymyxa* BTK01 เท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 ในขณะที่ปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของ *B. subtilis* BTK07 เท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์คือที่อุณหภูมิ 37 และ 30 องศาเซลเซียสตามลำดับ และมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์เท่ากับพีเอช 8.0 และ 7.0 ตามลำดับ นอกจากนั้นปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของ *B. gottheilii* BTK10 เท่ากับ 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตเอนไซม์ที่พีเอชเท่ากับ 7.0 และที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียสตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว *B. subtilis* BTK07 แสดงกิจกรรมแมนนาเนสสูงที่สุดเท่ากับ .0698 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ *Pb. polymyxa* BTK01 แสดงกิจกรรมไซลาเนสสูงที่สุดเท่ากับ 0.4199 หน่วยต่อมิลลิลิตร ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *Pb. polymyxa* BTK01, *B. subtilis* BTK07 และ *B.gottheilii* BTK10 สามารถผลิตได้ทั้งแมนนาเนสและไซลาเนส โดยผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณใกล้เคียงกัน ภายในเวลาเพียง 18 ชั่วโมงซึ่งใช้ระยะเวลาในการผลิตสั้นกว่าในการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการปรับพีเอชเริ่มต้น ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลทมีศักยภาพที่จะนำไปประยุกต์ใช้เพื่อย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยเฉพาะอย่างยิ่งย่อยสลายฟางข้าว และตอซังข้าวซึ่งมีโครงสร้างของไซแลนและแมนแนน ทั้งนี้เนื่องจากการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรให้สมบูรณ์และมีประสิทธิภาพจำเป็นต้องใช้การทำงานร่วมกันของเอนไซม์หลายชนิด เนื่องมาจากโครงสร้างของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นโพลิเมอร์ที่มีความซับซ้อนดังที่ได้กล่าวแล้วข้างต้นนั่นเอง ปัจจุบันมีการนำแมนนาเนสและไซลาเนสไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมายเช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ และอุตสาหกรรมฟอกสีเยื่อกระดาษ

เป็นต้น (Dhawan and kaur, 2007; Chakdar *et al*., 2016) ตัวอย่างของแมนนาเนสในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ โดยนำแมนนาเนสย่อยสลายสารประกอบแมนแนนได้ผลิตภัณฑ์แมนโนโอลิโกแซกคาไรด์เป็นสารพรีไบโอติก ซึ่งจุลินทรีย์ในลำไส้สัตว์กระเพาะเดี่ยวสามารถย่อยสลายและนำไปใช้ประโยชน์ได้ (Ariandi *et al*., 2015)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120 และขอขอบคุณทุนบัณฑิตเรียนดีเพื่อศึกษาต่อระดับบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประจำปีงบประมาณ 2561 (ตามบันทึกข้อตกลงเลขที่ ทบ. 08/2560)

เอกสารอ้างอิง

Abarike, E.D., Cai, J., Lu, Y., Yu, H., Chen, L., Jian, J., Tang, J., Jun, L., & Kuebutornye, F.K.A. (2018). Effects of a commercial probiotic BS containing *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on growth, immune response and disease resistance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus. Fish and Shellfish Immunology Journal*, *82*, 229-238.

Ariandi, Yopi, & Meryangi A. 2015. Enzymatic hydrolysis of copra meal by mannanase from *Streptomyces* sp. BF3.1 for the production of mannooligosacharides. *Hayati Journal of Biosciences*. *22*,79-86.

Chakdar, H., Kumar, M., Pandiyan, K., Singh, A., Nanjappan, K., Kashyap, L.M., & Srivastava, K.A. 2016. *Bacterial xylanases: biology to biotechnology*. *3 Biotech*, *6*, 150-155.

Chauhan, S.P., Bharadwaj, A., Puri, N., & Gupta, N. (2014). Optimization of medium composition for alkali-thermostable mannanase production by *Bacillus nealsonii* PN-11 in submerged fermentation. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *3*(10), 1033-1045.

Chen, Y., Chen, Y., Wu, J., & Zhang, J. (2018). The effect of biotic and abiotic environmental factors on Pd(II) adsorption and reduction by *Bacillus wiedmannii* MSM. *Ecotoxicology and Environmental Safety Journal*, *162*, 546-553.

Chunya, P., Phetsawi, C., Khumphai, P., & Chantorn, S. (2016). Isolation and screening of lignocellulolytic bacteria from organic rice field in Kanchanaburi Loei and Surin provinces Thailand. In *The 28th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference* November 28-30, 2016.

Dhawan, S. & Kaur, J. 2007. Microbial mannanases: an overview of production and applications. *Critical Reviews in Biotechnol*, *27*,197-216.

Dyk, J.Sv., Sakka, M., Sakka, K., & Pletschke, B.I. (2010). Identification of endoglucanases, xylanases, pectinases and mannanases in the multi-enzyme complex of *Bacillus licheniformis* SVD1. *Enzyme and Microbial Technology Journal*, *47*, 112-118.

El-Sobky, E.EA. (2017). Effect of burned rice straw, phosphorus and nitrogen fertilization on wheat (*Triticum aestivum* L.). *Annals of Agricultural Science Journal*, *62*, 113-120.

Fatokun, E.N., Nwodo, U.U., Olaniran, A.O., & Okoh, A.I. (2017). Optimization of process conditions for the production of holocellulase by a *Bacillus* species isolated from nahoon beach sediments. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, *13*(2), 70.80, DOI: 10.3844/ajbbsp.2017.70.80

Feng, Y., He, Z., Ong, S.L., Hu, J., Zhang, Z., & Ng, W.J. (2003). Optimization of agitation, aeration, and temperature conditions for maximum-mannanase production. *Enzyme and Microbial Technology Journal*, *32*, 282–289.

Heck, J.X., Soares, L.H.D.B., & Ayub, M.A.Z. (2005). Optimization of xylanase and mannanase production by *Bacillus circulans* strain BL53 on solid-state cultivation. *Enzyme and Microbial Technology Journal*, *37*(4), 417-423.

Koutsoumanis, K.P., & Sofos, J.N. (2005). Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and aw limits for growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, *104*, 83-91.

Khanongnuch, C., Asada, K., Tsuruga, H., Ooi, T., Kinoshita, S., & Lumyong, S. (1998). Mannanase and xylanase of *Bacillus subtilis* 5H Active for Bleaching of Crude Pulp. *Fermentation and Bioengineering Journal*,*86*(5), 461-466.

Krier, F., Revol-Junelles, A. M., & Germain, P. (1998). Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. Mesenteroides FR52 during batch fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology Journal*, *50*(3), 59-63.

Malgasa. S., Thoresena, M., Susan van Dykb, J., & Pletschke, B. I. (2017). Time dependence of enzyme synergism during the degradation of model and natural lignocellulosic substrates. *Enzyme and Microbial Technology Journal*, *103*, 1-11.

Mathews, S.L., Grunden, A.M., & Pawlak, J. (2016). Degradation of lignocellulose and lignin by *Paenibacillus glucanolyticus*. *International Biodeterioration and Biodegradation Journal*, *110*, 79-86.

Mihajlovski, K., Radovanovic, Z., Carevic, M., & Dimitrijevic-Brankovic, S. (2018). Valorization of damaged rice grains: Optimization of bioethanol production by waste brewer's yeast using an amylolytic potential from the *Paenibacillus chitinolyticus* CKS1. *Fuel Journal*, *224*, 591-599.

Miller & Gail. (1959). Use of dinitosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, *31*(3), 426-428.

Phangsri, P., & Phangsri, P. (2017). Mannanase enzyme from *Bacillus subtilis* P2-5 with waste management. *Energy Procedia Journal*, *318*,343-347.

Phothichitto, K., Nitisinprasert, S., & Keawsompong, S. (2006). Isolation, screening and identification of mannanase producing microorganisms. *Kasetsart Journal*. (Nat. Sci.), *40* (Suppl.), 26 – 38.

Puchart, V., Katapodis, P., Biely, P., Kremnicky, L., Christakopoulos, P., Vrsanska, M., Kekos, D., Macris, B.J., & Bhat, M.K. (1998). Production of xylanases, mannanases, and pectinases by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Enzyme and Microbial Technology Journal*, *24*, 355–361.

Raja, A., Kumar, S., Singh, S.K., & Prakash, J. (2018). Production and purification of xylanase from alkaliphilic *Bacillus licheniformis* and its pretreatment of eucalyptus kraft pulp. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Journal*, *15*, 199-209.

Sá-Pereira, P., Costa-Ferreira, M., & Aires-Barros, M. R. (2002). Enzymatic properties of a neutral endo-1,3(4)-xylanase Xyl II from *Bacillus subtilis*. *Journal of Biotechnology*, *94*, 265-275.

Siddiqui, M.A.H., Biswas, M., Faruk, M.O., Roy, M., Asaduzzaman, A.K.M., Sharma, S.C.D., Biswas, T., & Roy, N. (2016). Optimization, isolation and characterization of cellulase-free thermostable xylanase from *Paenibacillus* sp. *American Journal of Life Sciences*, *4*(4), 93-98.

Svastits-Ducso, L., Nguyen, Q.D., Lefler, D.D., & Rezessy-Szabo, J.M. (2009). Effects of galactomannan as carbon source on production of **α**-galactosidase by *Thermomyces lanuginosus*: Fermentation, purification and partial characterization. *Enzyme and Microbial Technology Journal*, *45*(5), 367-371

Titapoka, S., Keawsompong, S., Haltrich, D., & Nitisinprasert, S. (2008). Selection and characterization of mannanase-producing bacteria useful for the formation of prebiotic manno-oligosaccharides from copra meal. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24*, 1425-1433.

Trinh, C.S., Jeong, C.Y., Lee, W.J., Truong, H.A., Chung, N., Han, J., Hong, S.W., & Lee, H. (2018). *Paenibacillus pabuli* strain P7S promotes plant growth and induces anthocyanin accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry Journal, 129,* 264-272.

Utami, D.R., Sutrisno, A., & Kusnadi, J. (2016). Isolation, purification and characterization of mannanase from *Bacillus subtilis* MAN-511. *International Journal of Science Technology & Engineering*, *2*(11), 83-87.

Wongkoon., T., Boonlue., S., & Ritdech., N. (2013). Screening of cellulolytic microorganisms for stimulating of rice (*Oryza sativa* L.) and sweet corn (*Zea mays* L. var. saccharata) seed germination. *KKU Science Journal*, *41*(4)954-966.

Wongsiridetchai, C., Chiangkham, W., Khlaihiran, N., Sawangwan, T., Wongwathanarat, P. Charoenrat, T., & Chantorn, S. (2018). Alkaline pretreatment of spent coffee grounds for oligosaccharides production by mannanase from *Bacillus* sp. GA2(1). *Agriculture and Natural Resources Journal*, *52*, 222-227.

Zhang, H., & Sang, Q. (2015). Production and extraction optimization of xylanase and Mannanase by *Penicillium chrysogenum* QML-2 and primary application in saccharification of corn cob. *Biochemical Engineering Journal*, *97*, 101-110.