

ความสัมพันธ์ระหว่างประสิทธิภาพในการเข้าทำลาย
ไข่ไข่เดือนฝอยรากปม
และกิจกรรมเอนไซม์ของเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus*
Relationship Between Infection Efficiency and Enzymatic
Activity of *Paecilomyces lilacinus*

สืบศักดิ์ สนธิรัตน์¹

Suebsak Sontirat

ABSTRACT

Determination of the infection efficiency of *Paecilomyces lilacinus* and level of 5 enzyme activities during growth period of 4 high-infection isolates (100%infection), i.e., solate no. AK 3-09, AK 6-03 NK 1-14 and NK 1-15 and one low-infection isolate (66%infection), i.e., isolate NK 1-12 were assayed and compared with a saprophytic fungus, *Penicillium turbatum* (UN 3-05). Chitinase could be detected in all isolates of *P. lilacinus* but not in *Penicillium turbatum*. There was no difference in chitinase activity between the high-infection isolates and the low-infection isolate but chitinase activity of low-infection isolate was 3.3-4.0 times higher than that of high-infection isolates. Protease and glucoamylase activities of the high-infection isolates were 1.2-4.2 and 20-120 times higher than that of the low-infection isolate, respectively.

Key words : *Paecilomyces lilacinus*, enzyme activity, chitinase

บทคัดย่อ

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงในการเข้าทำลายกับ enzyme activity ของเชื้อรา *Paecilomyces lilacinus* 5 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ที่ทำลายไข่ไข่เดือนฝอย 100 เปอร์เซ็นต์ 4 สายพันธุ์ คือ

AK 3-09 AK 6-03 NK 1-14 NK 1-15 สายพันธุ์ทำลายไข่ 66.6 เปอร์เซ็นต์ คือ NK 1-12 เปรียบเทียบกับ *Penicillium turbatum* สายพันธุ์ที่ไม่ทำลายไข่เลย (UN 3-05 พบว่าเชื้อรา *P. lilacinus* ทุกสายพันธุ์สร้างเอนไซม์ chitinase ได้ แต่เชื้อรา *Penicillium turbatum* ไม่สร้างเอนไซม์นี้ เชื้อรา *P. lilacinus* สาย

¹ ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok, 10900, Thailand.

พันธุ์ที่ทำลายไข่ 100 เปอร์เซ็นต์ สร้าง chitobiotic ได้น้อยกว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ทำลายไข่ 66.6 เปอร์เซ็นต์ 3.3-4.0 เท่า แต่สร้าง protease และ glucoamylase ได้มากกว่าสายพันธุ์ทำลายไข่ 66.6 เปอร์เซ็นต์ 1.2-4.2 และ 20-120 เท่าตามลำดับ

คำนำ

เชื้อ *Paecilomyces lilacinus* เป็นเชื้อราในกลุ่ม Hyphomycetes ที่เข้าทำลายไข่และตัวไส้เดือนฝอยรากปมโดยสร้างเส้นใยบางๆ แล้วชู conidiophore หรือ synnema ผ่นเป็นชั้นสีม่วง (Samson, 1974) เส้นใยรา *P. lilacinus* เจริญเติบโตและเข้าทำลายไข่ไส้เดือนฝอยโดยการแทงเส้นใยเข้าไปในเปลือกไข่ทำให้เกิดเป็นรูเล็กจนถึงชั้น vitelline layer ไข่ที่ถูกทำลายเริ่มบวมเมื่อเส้นใยราเจริญและแทงผ่านผนัง chitin และชั้นไขมันเข้าไปในตัวอ่อนไส้เดือนฝอย แล้วเพิ่มปริมาณเส้นใยสร้าง conidiophore แทงทะลุผ่านผิวผนังไข่ ทำให้ชั้น vitelline layer แยกเป็น 3 ชั้นหนาขึ้นเล็กน้อย ชั้น chitin เปลี่ยนไปเป็น vacuole ชั้นไขมันหายไป ทำให้ไข่และตัวอ่อนถูกทำลาย (Jones et al., 1983) Paris and Ferron (1979) รายงานว่าปริมาณเอนไซม์ lipase, protease และ chitinase มีความผันแปรตามความสามารถในการเข้าทำลายซึ่งขัดแย้งกับรายงานของ Al-Aidroos and Seifert (1980) ที่แสดงให้เห็นว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์กับองค์ประกอบของผนังเซลล์ จึงยังไม่ใช่ที่ทราบแน่ชัดว่าเชื้อสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการเข้าทำลายสูงสามารถสร้างเอนไซม์ได้ดีในห้องปฏิบัติการหรือไม่ การทดลองนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเข้าทำลายและความสามารถในการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ ของเชื้อรา *P. lilacinus* ในห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการทดลองอื่นๆ ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

เตรียมอาหารเหลว modified soybean broth (SB) สูตรดัดแปลงโดยใช้ ถั่วเหลือง 100 กรัมแช่น้ำค้างคืน ประมาณ 10 ชั่วโมงบดละเอียดแล้วกรองนำมาเติม dextrose 10 กรัม asparagine 1.0 กรัม thiamine 100 ไมโครกรัม KH_2SO_4 1 กรัม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 มิลลิกรัม $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 มิลลิกรัม $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1 มิลลิกรัม $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1 มิลลิกรัม จากนั้นเติมน้ำให้ครบ 1 ลิตร แล้วปรับ pH เป็น 6.5 บรรจุอาหารเหลว SB ที่เตรียมไว้ปริมาตร 50 มิลลิลิตรใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วจึงทำการนิ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ดูดเอา conidial suspension ของเชื้อรา *P. lilacinus* ใส่ลงไปให้มีจำนวนสปอร์ 5.0×10^6 สปอร์ต่อ flask แล้วจึงนำไปเขย่าด้วยความเร็วในการเขย่า 220 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน หลังจากเพาะเลี้ยงทุก 24 ชั่วโมงสุ่มเอา อาหารเหลวที่มีการเจริญของเชื้อราจำนวน 10 มิลลิลิตรมาวัดความเป็นกรดเป็นด่าง นับจำนวนสปอร์ด้วย Bright-line Improved Neubauer Haemocytometer แล้วกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำไปอบแห้งเพื่อหาน้ำหนักแห้ง ส่วนน้ำใสที่เหลือจากการกรองเส้นใยนำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์และน้ำตาลรีดิวซ์

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

1. การวิเคราะห์กิจกรรมของ endo-chitinase

ทำการวิเคราะห์ตามวิธีการของ Reissing, et al., (1955) ซึ่งปรับปรุงใหม่โดย Coudron et al., (1984) โดยนำตัวอย่างที่ต้องวิเคราะห์เอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ผสมกับ substrate 1 มิลลิลิตร (ประกอบด้วย swollen chitin 1 กรัม ในสารละลาย 0.5 M citrate-phosphate buffer pH 6.0 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) ส่วน control ใช้ตัวอย่างที่ต้องนำไปวิเคราะห์ 1 มิลลิลิตรต้มในน้ำ

เดือด 5 นาทีก่อนที่จะผสมกับ substrate 1 มิลลิลิตร เช่นกัน แล้วจึงนำตัวอย่างและ control ทั้งหมดมาเก็บไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ดูดตัวอย่างและ control มาอย่างละ 0.5 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดสอบ ส่วน blank ใช้ น้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่าง control และ blank มาเติม 0.8 M potassium tetraborate (ประกอบด้วย $K_2B_2P_7 \cdot 4H_2O$ จำนวน 244.41 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เขย่าจนเข้ากันดีจึงนำไปต้มในน้ำเดือด 3 นาที แล้วทำให้เย็นจากนั้นเติม p-Dimethylaminobenzaldehyde (DMAB 1 กรัม ละลายใน 10M HCl 1.25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วย glacial acetic acid จนครบ 100 มิลลิลิตร) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จึงนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง Spectronic 21 D ที่ความยาวคลื่น 585 นาโนเมตร

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของ exo-chitinase

ทำการวิเคราะห์ exo-chitinase (chitinase) ตามวิธีของ Coudron, *et al.* (1984) โดยนำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เอนไซม์ 0.2 มิลลิลิตร มาผสมกับ substrate (ประกอบด้วย 10 mM p-N-actyl-glucosamine ผสมกับ 0.5 M citrate-phosphate buffer ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.6) ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร หลอด blank ใช้ น้ำกลั่น 0.2 มิลลิลิตร ผสม substrate 1.8 มิลลิลิตร ส่วน control ใช้ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.5 M glycine sodium hydroxide pH 11 จำนวน 1.8 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำหลอด ตัวอย่าง control และ blank ไปอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำหลอดทั้งหมดมาทำให้เย็นจากนั้นเติมสลับ โดยตัวอย่างและ blank ให้เติม 0.5 M glycine sodium hydroxide ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ส่วน control ให้เติม substrate ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร พร้อมทั้งทำการผสมให้เข้ากัน

ด้วย vortex mixer แล้วจึงรีบนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectronic 21 D ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร

3. การวิเคราะห์กิจกรรมของ protease

การวิเคราะห์ protease ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Anson (1938) โดยการนำสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดสอบแล้วเติมสารละลายเคซีนเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 10 นาที) ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วจึงหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย 0.1 M Trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนสมบูรณ์ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ส่วนหลอด control ใช้สารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย TCA 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ก่อนแล้วจึงเติมสารละลายเคซีน 1 มิลลิลิตร ทำการเขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งให้ตกตะกอนสมบูรณ์ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นจึงกรองตัวอย่างและ control ด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วจึงนำส่วนใสที่กรองได้ 0.5 มิลลิลิตร มาเติม 0.4 M Na_2CO_3 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติม 1 N Folin-ciocalteu reagent (7.5 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 22.5 มิลลิลิตร) 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectronic 21 D ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ tyrosine โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ protease เท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเร่ง ปฏิกิริยาการย่อยเคซีนให้ได้ tyrosine 1 ไมโครกรัม ภายในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4. การวิเคราะห์กิจกรรมของ glucoamylase

การวิเคราะห์กิจกรรม glucoamylase คัดแปลงมาจากวิธีการของ Fisher and Stein (1961) โดยดูตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดสอบแล้วเติม 0.1 M citrate buffer ที่ pH 4.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ส่วนหลอด control ใช้สารละลายแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1 M citrate buffer pH 4.5 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และหลอดที่เป็น blank ใช้น้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เติม 0.1 M citrate buffer pH 4.5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นให้รอน้ำหลอดทั้งหมดไปบ่มใน water bath อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำหลอดทดสอบที่เป็นหลอดตัวอย่างและหลอด blank มาเติมสารละลายแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ส่วนหลอด control ให้เติม 3.5 dinitrosalicylic acid (DNS) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาดังทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส หลอดตัวอย่างและหลอด blank เติมสารละลาย DNS จำนวน 2 มิลลิลิตร หลอด control ให้เติมสารละลายแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 มิลลิลิตร จากนั้นให้รอน้ำหลอดตัวอย่าง หลอด blank และ หลอด control ไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แขนในน้ำที่เย็นจัดทันที เป็นเวลา 5 นาที วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ได้จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ตามวิธี dinitrosalicylic acid method ของ Miller (1959) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectronic 21 D ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร จากนั้นจึงนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ glucoamylase เท่ากับปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้น้ำตาลกลูโคส 1 มิลลิกรัม ในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

ผล

1. การเจริญของเชื้อราในอาหารเหลว

จากการวิเคราะห์การเจริญของเชื้อรา *P. lilacinus* ที่มีความสามารถในการทำลายไข่ไส้เดือนฝอยรากปม 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ AK 3-09 AK 6-03 NK 1-14 NK 1-15 กับเชื้อรา NK 1-12 (*P. lilacinus*) ที่ทำลายไข่ 66.6 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อรา UN 3-05 (*Penicillium turbatum*) ที่ไม่ทำลายไข่ไส้เดือนฝอยเลยเป็นตัวเปรียบเทียบ เลี้ยงในอาหารเหลว SB สูตรดัดแปลงโดยการวัดน้ำหนักแห้งและน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าระหว่างวันที่ 1 และ 2 เชื้อรามีการเจริญสูงโดยให้น้ำหนักแห้งสูงสุด หลังจากวันที่ 3 เชื้อรามีการเจริญที่ลดลงเนื่องมาจากปริมาณอาหารลดลง และสภาพอาหารมีความเป็นด่างสูงขึ้นไม่เหมาะแก่การเจริญของเชื้อรา เชื้อรา มีการสร้างสปอร์ได้สูงสุดในวันที่ 4 ยกเว้นเชื้อรา UN 3-05 ไม่สร้างสปอร์ในอาหารเหลว ส่วนผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความรุนแรงในการเข้าทำลายไข่ไส้เดือนฝอยรากปมกับกิจกรรมของเอนไซม์ พบว่ามีการสร้างเอนไซม์สูงสุดในวันที่ 3 (Table 1)

2. กิจกรรมของเอนไซม์

2.1 กิจกรรมของ endo-chitinase

เชื้อรา *P. lilacinus* สายพันธุ์ที่ทำลายไข่ไส้เดือนฝอย 100 % คือ AK 3-09, AK 6-03, NK 1-14 และ NK 1-15 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ chitinase ได้ 0.25, 0.13, 0.11 และ 0.16 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เชื้อราสายพันธุ์ที่ทำลายไข่ 66.6 % (NK 1.15) สร้างเอนไซม์ chitinase ได้ 0.14 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเชื้อรา *Penicillium turbatum* (UN 3-05 ซึ่งไม่ทำลายไข่ไส้เดือนฝอย) ไม่สร้างเอนไซม์ chitinase (Figure 1)

2.2 กิจกรรมของ exo-chitinase

เชื้อรา *P. lilacinus* สายพันธุ์ที่ทำลายไข่ไส้

เดือนฝอย 100 % คือ AK 3-09, AK 6-03, NK 1-14 และ NK 1-15 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ chitinase ได้ 0.67, 5.71, 0.45 และ 0.54 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ขณะที่เชื้อราสายพันธุ์ที่ทำลายไข่ไก่เดือนฝอย 66.6 % (NK 1-15) สร้างเอนไซม์ chitinase ได้ 19.30 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเชื้อรา *Penicillium*

Table 1 Activities of chitinase, chitinase, protease, glucoamylase, dry weight and reducing sugar produced by 5 isolates of *Paecilomyces lilacinus* and 1 isolate of *Penicillium turbatum* cultured on modified SB broth at 31 C and 220 rpm shaking.

	Duration (hours)	pH	Dry weight (g/l.)	Reducing sugar (%)	Chitinase (unit/ml.)	Chitinase (unit/ml.)	Protease (unit/ml.)	Glucoamylase (unit/ml.)	Amount (spores/ml.)
AK3-09	0	6.45	9.1	0.93	0	0	0	0	7.77×10 ⁵
	24	5.96	15.9	0.05	0.210	0.167	7.59	0.021	1.03×10 ⁷
	48	7.29	16.5	0.06	0.223	0.497	14.04	0.015	4.76×10 ⁸
	72	8.20	11.4	0.03	0.300	0.942	18.94	0.183	3.34×10 ⁸
	96	8.58	9.9	0.04	0.257	1.070	17.37	1.070	5.54×10 ⁸
AK6-03	0	6.44	10.4	1.00	0	0	0	0	7.39×10 ⁵
	24	6.01	15.4	0.54	0.083	0.487	9.89	3.30	4.84×10 ⁶
	48	7.20	12.9	0.10	0.098	1.130	56.51	0.399	5.87×10 ⁷
	72	7.93	12.7	0.04	0.124	1.440	69.94	0.233	2.78×10 ⁸
	96	8.32	11.8	0.02	0.195	20.030	60.03	0.213	3.04×10 ⁸
NK1-14	0	6.42	11.4	1.07	0	0	0	0	1.16×10 ⁶
	24	5.93	17.4	0.625	0.140	0.040	6.69	0.591	6.36×10 ⁷
	48	7.51	16.1	0.045	0.126	0.320	22.53	0.227	6.47×10 ⁸
	72	7.84	15.2	0.037	0.085	0.590	27.11	0.471	8.49×10 ⁸
	96	8.45	12.4	0.037	0.081	0.850	27.64	0.144	2.48×10 ⁹
NK1-15	0	6.43	10.9	1.020	0	0	0	0	9.15×10 ⁶
	24	6.18	14.9	0.420	0.134	0.050	5.89	0.780	6.54×10 ⁷
	48	6.93	16.9	0.033	0.273	0.305	10.67	0.334	8.03×10 ⁸
	72	7.67	19.6	0.022	0.128	0.722	25.78	0.167	3.66×10 ⁹
	96	8.18	15.2	0.019	0.095	1.098	32.78	0.174	3.92×10 ⁹
NK1-12	0	6.46	10.5	0.962	0	0	0	0	6.67×10 ⁵
	24		6.21	14.9	0.521	0.330	2.56	0.85	03.42×10 ⁷
	48	7.31	18.8	0.181	0.039	14.45	11.04	0.003	4.70×10 ⁸
	72	8.15	15.6	1.045	0.080	23.05	18.58	0.008	9.34×10 ⁸
	96	8.60	13.9	0.039	0.120	37.27	16.18	0.004	8.37×10 ⁸
UN3-05	0	6.51	10.6	0.930	0	0	0	0	2.67×10 ⁵
	24	6.24	19.4	0.480	0	2.38	1.03	0	0
	48	6.66	12.4	0.175	0	3.14	7.01	0.008	0
	72	8.1	10.1	0.066	0	5.67	18.19	0.038	0
	96	8.54	9.6	0.087	0	3.39	19.12	0.021	0

turbatum (UN 3-05 ซึ่งไม่ทำลายไข่ไส้เดือนฝอย) สร้างเอนไซม์ chitinase ได้ 3.60 หน่วยต่อมิลลิกรัม (Figure 2)

2.3 กิจกรรมของ protease

เชื้อรา *P. lilacinus* สายพันธุ์ที่ทำลายไข่ไส้เดือนฝอย 100 % คือ AK 3-09, AK 6-03, NK 1-14 และ NK 1-15 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ protease ได้ 14.18, 49.09, 45.90 และ 18.70 หน่วยต่อมิลลิกรัมตามลำดับ ขณะที่เชื้อราสายพันธุ์ที่ทำลายไข่ไส้เดือนฝอย 66.6 % (NK 1-15) สร้างเอนไซม์ protease ได้ 11.66 หน่วยต่อมิลลิกรัม และเชื้อรา *Penicillium turbatum* (UN 3-05 ซึ่งไม่ทำลายไข่ไส้เดือนฝอย) สร้างเอนไซม์ protease ได้ 11.33 หน่วยต่อมิลลิกรัม (Figure 3)

2.4 กิจกรรมของ glucoamylase

เชื้อรา *P. lilacinus* สายพันธุ์ที่ทำลายไข่ไส้เดือนฝอย 100 % คือ AK 3-09, AK 6-03, NK 1-14 และ NK 1-15 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ glucoamylase ได้ 0.061, 0.293, 0.350 และ 0.360 หน่วยต่อมิลลิกรัมตามลำดับ ขณะที่เชื้อราสายพันธุ์ที่ทำลายไข่ไส้เดือนฝอย 66.6 % (NK 1-15) สร้างเอนไซม์ glucoamylase ได้ 0.003 หน่วยต่อมิลลิกรัม และเชื้อรา *Penicillium turbatum* (UN 3-05 ซึ่งไม่ทำลายไข่ไส้เดือนฝอย) สร้างเอนไซม์ glucoamylase ได้ 0.016 หน่วยต่อมิลลิกรัม (Figure 4)

วิจารณ์

เนื่องจากผนังไข่ไส้เดือนฝอยมี chitin เป็นองค์ประกอบ ดังนั้น El-sayed et al. (1989) จึงตั้งสมมติฐานว่าความรุนแรงในการทำลายมีความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเข้าทำลายกับ กิจกรรมเอนไซม์ ของเชื้อรา *P. lilacinus* สายพันธุ์ที่ทำลายไข่ไส้เดือนฝอยรากปมได้ 100 % จำนวน 4 สายพันธุ์

สายพันธุ์ที่ทำลายไข่ได้ 66.6 % 1 สายพันธุ์และเชื้อราที่ไม่ทำลายไข่ไส้เดือนฝอย (*Penicillium turbatum*) 1 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหาร SB ดัดแปลง พบว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ทำลายไข่ไส้เดือนฝอย 100 % สร้างเอนไซม์ chitinase ได้ 0.11-0.25 หน่วยต่อมิลลิกรัม สร้าง chitinase ได้ 0.45-5.71 หน่วยต่อมิลลิกรัม สายพันธุ์ที่ทำลายไข่ 66.6 เปอร์เซ็นต์ สร้างเอนไซม์ chitinase ได้ 0.14 หน่วยต่อมิลลิกรัม สร้าง chitinase ได้ 19.30 หน่วยต่อมิลลิกรัมตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่าการที่เชื้อราที่มีความสามารถในการทำลายไข่ไส้เดือนฝอยสามารถสร้างเอนไซม์ chitinase ได้ เชื้อราที่ไม่ทำลายไข่ไม่สร้างเอนไซม์ chitinase แต่สร้างเอนไซม์ chitinase ได้เล็กน้อย 3.60 หน่วยต่อมิลลิกรัม แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการเข้าทำลายของเชื้อรา *P. lilacinus* อาจไม่มีความสัมพันธ์กับ chitinolytic activity ซึ่ง Samson et al. (1988) กล่าวว่าไว้วางกลไกการเข้าทำลายของเชื้อราคือสร้าง chitinase ในปริมาณที่เพียงพอในการย่อยทะลุผ่านผนัง cuticle ไม่จำเป็นต้องสร้างเอนไซม์สูง เพราะเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์ chitinase สูงไม่จำเป็นต้องมีประสิทธิภาพการเข้าทำลายสูง ส่วนความสามารถในการสร้างเอนไซม์ protease ของเชื้อรา *P. lilacinus* พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ทำลายไข่ 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถสร้างเอนไซม์ protease ได้ 14.48-49.00 หน่วยต่อมิลลิกรัม สูงกว่าทั้งสายพันธุ์ที่ทำลายไข่ 66.6 เปอร์เซ็นต์ (11.66 หน่วยต่อมิลลิกรัม) และเชื้อราที่ไม่ทำลายไข่ (11.33 หน่วยต่อมิลลิกรัม) ซึ่งเป็นจุดที่น่าสนใจเพราะในไข่ไส้เดือนฝอยมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ เมื่อเชื้อราแทงผ่าน cuticle ของไข่ไส้เดือนฝอยแล้วสามารถสร้าง protease มาย่อยสารโปรตีนดังกล่าวก็ย่อมช่วยให้ทำลายไข่ไส้เดือนฝอยได้ดียิ่งขึ้น อย่างไรก็ตาม Parker et al. (1988) ศึกษาเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* sp. สายพันธุ์ที่มี chitinolytic activity สูงและมี proteolytic activity ต่ำ พบว่าไม่สามารถทำลายไข่ และสายพันธุ์ที่มี

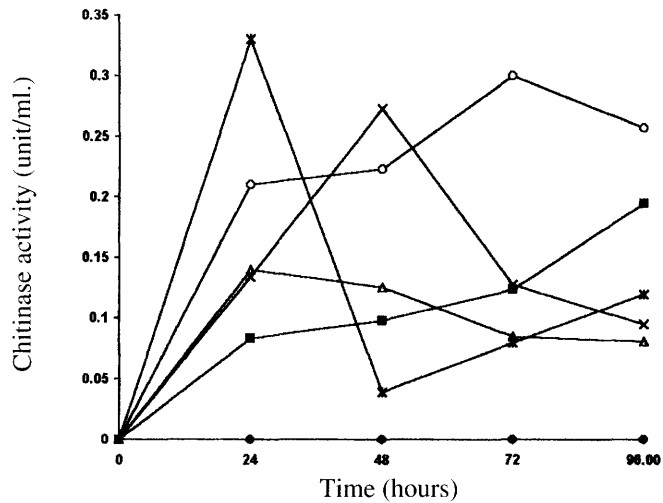


Figure 1 Chitinase production of 5 isolates of *Paecilomyces lilacinus* and *Penicillium turbatum* cultured on modified SB at pH 6.5, 31 °C and 220 rpm shaking.

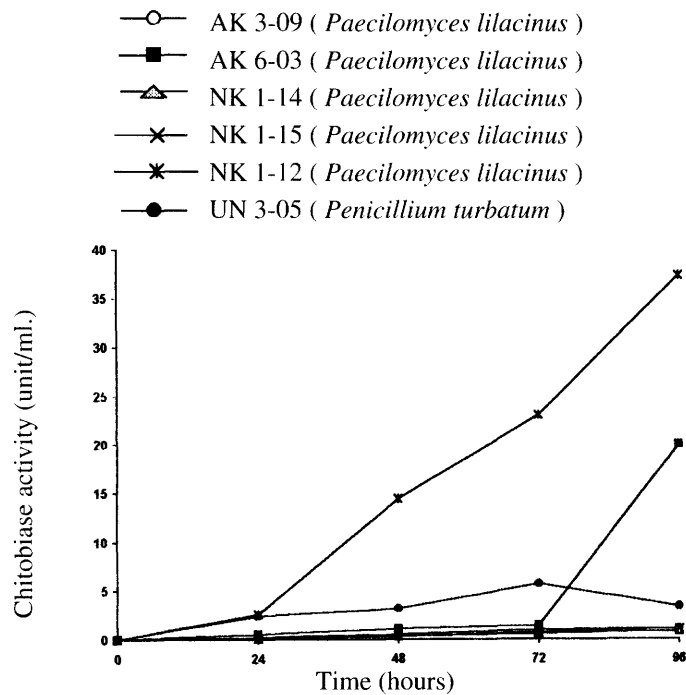


Figure 2 Chitinase production of 5 isolates of *Paecilomyces lilacinus* and *Penicillium turbatum* cultured on modified SB at pH 6.5, 31 °C and 220 rpm shaking.

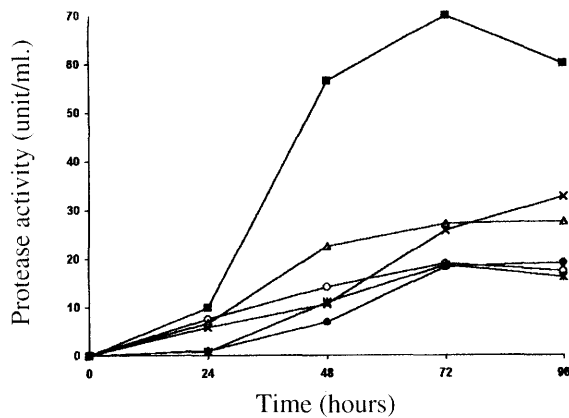


Figure 3 Protease production of 5 isolates of *Paecilomyces lilacinus* and *Penicillium turbatum* cultured on modified SB at pH 6.5, 31 °C and 220 rpm shaking.

- AK 3-09 (*Paecilomyces lilacinus*)
- AK 6-03 (*Paecilomyces lilacinus*)
- △ NK 1-14 (*Paecilomyces lilacinus*)
- × NK 1-15 (*Paecilomyces lilacinus*)
- * NK 1-12 (*Paecilomyces lilacinus*)
- UN 3-05 (*Penicillium turbatum*)

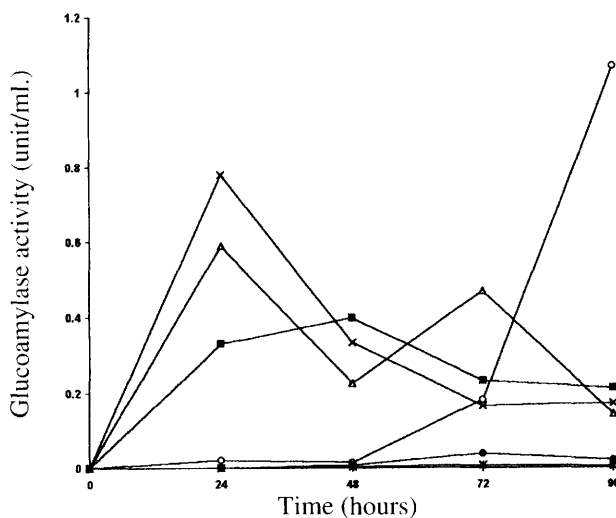


Figure 4 Glucoamylase production of 5 isolates of *Paecilomyces lilacinus* and *Penicillium turbatum* cultured on modified SB at pH 6.5, 31 °C and 220 rpm shaking.

- AK 3-09 (*Paecilomyces lilacinus*)
- AK 6-03 (*Paecilomyces lilacinus*)
- △ NK 1-14 (*Paecilomyces lilacinus*)
- × NK 1-15 (*Paecilomyces lilacinus*)
- * NK 1-12 (*Paecilomyces lilacinus*)
- UN 3-05 (*Penicillium turbatum*)

chitinolytic activity สูง proteolytic activity สูงก็ไม่สามารถทำลายไข่เช่นกัน และการศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์ glucoamylase ของเชื้อรา *P. lilacinus* ในการทดลองนี้พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ทำลายไข่ 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถสร้างเอนไซม์ glucoamylase ได้ 0.061 ถึง 0.360 หน่วยต่อมิลลิตร สูงกว่าทั้งสายพันธุ์ทำลายไข่ 66.6 เปอร์เซ็นต์ (0.003 หน่วยต่อมิลลิตร) และเชื้อราที่ไม่ทำลายไข่ (0.016 หน่วยต่อมิลลิตร) ที่ให้เห็นว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่ทำลายไข่ 100 เปอร์เซ็นต์มีความสามารถในการย่อยแป้งได้ดี

โดยทั่วไปยังไม่อาจสรุปได้ว่าความสามารถในการเข้าทำลายเป็นผลเนื่องจาก กิจกรรมของเอนไซม์ที่สูง สอดคล้องกับงานทดลองของ Parker *et al.* (1988) ที่ศึกษาเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* สายพันธุ์ที่มี chitinolytic activity สูง proteolytic activity ต่ำ ไม่สามารถทำลายไข่ได้เดือนฝอย สายพันธุ์ที่มี chitinolytic activity และ proteolytic activity สูงก็ไม่สามารถทำลายไข่ได้เดือนฝอย เช่นเดียวกับรายงานของ Latge *et al.* (1984) ที่กล่าวไว้ว่าเชื้อราสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ได้ดีในห้องปฏิบัติการมิได้เป็นเชื้อสายพันธุ์รุนแรง

สรุป

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการเข้าทำลายกับกิจกรรมของเอนไซม์ของเชื้อรา *P. lilacinus* สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการเข้าทำลายไข่ได้เดือนฝอยรากปม 100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ AK 3-09, AK 6-03, NK 1-14 NK 1-15 และ สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการเข้าทำลาย 66.6 เปอร์เซ็นต์ (NK 1-12) พบว่าความรุนแรงในการเข้าทำลายอาจไม่มีความสัมพันธ์กับกิจกรรมเอนไซม์ แต่การที่เชื้อรามีการสร้างเอนไซม์น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการที่เชื้อราจะเข้าไปในไข่ได้ (infection) โดยเชื้อราที่มีความสามารถในการเข้าทำลายไข่ได้เดือนฝอย (*P. lilacinus* ทุกสายพันธุ์) สามารถสร้างเอนไซม์ chitinase

ได้ แต่เชื้อราที่ไม่สามารถในการเข้าทำลายไข่เดือนฝอยไม่สร้างเอนไซม์นี้ ขณะเดียวกันเชื้อรา *P. lilacinus* สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการเข้าทำลาย 100 เปอร์เซ็นต์ สร้างเอนไซม์ chitinase ได้น้อยกว่าเชื้อสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการเข้าทำลาย 66.6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความสามารถในการสร้างเอนไซม์ protease และ glucoamylase ของเชื้อรา *P. lilacinus* พบว่าสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการเข้าทำลาย 100 เปอร์เซ็นต์ สามารถสร้างเอนไซม์ดังกล่าวสูงกว่าของเชื้อราสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการเข้าทำลาย 66.6 เปอร์เซ็นต์

คำขอบคุณ

งานวิจัยส่วนนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัย ซึ่งได้รับการสนับสนุนด้านการเงินจาก ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ซึ่งผู้เขียนขอขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

- Al-Aidroos, K. and A. M. Seifert. 1980. Polysaccharide and protein degradation, germination and virulence against mosquitoes in the entomopathogenic fungus *Metarrhizium anisopliae*. J. Invert. Pathol. 36: 29-34.
- Anson, M. L. 1938. The estimation of papain, tyrosin, papain and cathepsin with haemoglobin. J. Gen. Physiol. 22: 79-89.
- Coudron, T. A., M. J. Kroha, and C. M. Ignoffo. 1984. Levels of chitinolytic activity during development of three entomopathogenic fungi. Comp. Biochem. Physiol. 79: 339-348.
- El-sayed, G. N., T. A. Coudron, C. M. Ignoffo, and G. Riba. 1989. Chitinolytic activity and virulence

- associated with native and mutant isolates of and entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. J. Invert. Pathol. 54: 394-403.
- Fisher, E. H. and E. A. Stein. 1961. α amylase from human saliva. Biochem. Prep. 8: 12-18.
- Jones, G. M., J. F. White, and R. R. Kabana. 1983. Phytonematode pathology: Ultrastructural studies II. Parasitism of *Meloidogyne arenaria* eggs and larvae by *Paecilomyces lilacinus*. Nematropica 14: 57-71.
- Latge, J. P., L. Sampedro, and R. Hall. 1984. Aggressive de *Conidiobolus obacurus* vis a vis du puceron du pois du pois III. Activites enzymatiques exocellulaires. Entomophaga 29: 185-201.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-428.
- Paris, S. and P. Ferron. 1979. Study of the virulence of some mutants of *Beauveria brongniartii*. J. Invert. Pathol. 34: 71-77.
- Parker, N., A. C. Hayward, and G. R. Stirling. 1988. Effect of chitinolytic soil bacteria on root-knot nematode eggs, p. 157. In Proceeding of the 5th International Congress of Plant Pathology. Kyoto, Japan.
- Reissing, J. L., J. L. Strominger, and L. F. Leloir. 1955. A Modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. J. Biol. Microbiol. 217: 959-966.
- Samson, R. A. 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn. 119 p.
- Samson, R. A., H. C. Evans, and J. P. Latge. 1988. Atlas of Entomopathogenic fungi. Springer-Verlag, Heidelberg. 187 p.