การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสในพื้นที่ป่าอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรี

ISOLATION OF XYLANASE-PRODUCING BACTERIA FROM PLANT GENETIC CONSERVATION FOREST, RAMBHAI BARNI RAJABHAT UNIVERSITY, CHANTHABURI PROVINCE

วันดี มาลา จิรภัทร จันทมาลี และ วิญญู ภักดี*

Wandee Mala, Jirapat Chanthamalee and Winyoo Puckdee*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี อำเภอเมือง จังหวัดจันทบุรี 22000

Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Rambhai Barni Rajabhat University, Muang, Chanthaburi 22000

บทคัดย่อ

ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ไซลาเนสจากตัวอย่างดินจำนวน 10 ตัวอย่างในป่าอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรี โดยทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่กระตุ้นให้เกิดการสร้างเอนไซม์ (selective medium) โดยมีเปลือกข้าวโพดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน พบแบคทีเรียที่ผลิตไซลาเนส จำนวน 13 ไอโซเลท และจากการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส พบว่าเชื้อที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 3 เชื้อ คือ เชื้อรหัส F1-02, F1-01 และ P1-01 ตามลำดับ โดยมีกิจกรรมเอนไซม์เป็น 0.523 ± 0.009, 0.487 ± 0.003 และ 0.435 ± 0.002 U/ml และมีกิจกรรมเอนไซม์จำเพาะเป็น 0.064 ± 0.001, 0.068 ± 0.000 และ 0.064 ± 0.001 U/mg Protein จากการตรวจสอบรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบทางชีวเคมี พบว่าเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลทจัดอยู่ในจีนัส บาซิลลัส

Abstract

Ten soil samples were collected from the Conservative Forest, Rambhai Barni Rajabhat University for isolation of xylanase producing bacteria, using the selective medium containing 1% corn hull as a sole carbon source. Thirteen isolates of bacteria were tested for xylanase activity. The F1-02, F1-01 and P1-01 isolates yield maximum xylanase activity; 0.523 ± 0.009, 0.487±0.003 and 0.435 ± 0.002 U/ml, respectively. The specific activity of these bacteria was 0.064 ± 0.001, 0.068 ± 0.000 and 0.064 ±0.001 U/mg protein. Using morphological characteristics and biochemical tests, these isolates were classified in the genus *Bacillus*.

คำสำคัญ: ไซลาเนส, แบคทีเรีย, ไซแลน

Keywords: xylanase, bacteria, xylan

*ติดต่อนักวิจัย: วิญญู ภักดี (อีเมล์ win2ku@yahoo.com)

*Corresponding author: Winyoo Puckdee (Email: win2ku@yahoo.com)

บทนำ

ไซแลนเป็นเฮทเทอโรพอลีแซคคาไรด์ที่พบในผนังเซลล์พืช มีโครงสร้างหลักเป็นน้ำตาลไซโลส และมีโซ่กิ่งเป็นน้ำตาลชนิดอื่น เช่น acetyl group, arabinosyl group และ methylglucuronic acid โดยที่ไซแลนในไม้เนื้อแข็งมีโครงสร้างเป็น *O*–acetyl–4–*O*–methygluronoxylan ส่วนในไม้เนื้ออ่อนมีโครงสร้างเป็น arabino–4–*O*–methygluronoxylan ขณะที่ไซแลนของพืชตระกูลหญ้าหรือธัญพืชมีโครงสร้างที่ซับซ้อน แต่มีขนาดสั้นกว่าไซแลนในพืชจำพวกไม้เนื้อแข็งและไม้เนื้ออ่อน โดยมีโครงสร้างเป็น *O*–acetyl–arabino–4–*O*–methygluronoxylan

ปัจจุบันมีการนำไซลาเนสมาใช้ในขั้นตอนก่อนการฟอกสีเยื่อกระดาษในระดับอุตสาหกรรม โดยเฉพาะกลุ่มประเทศในแถบสแกนดิเนเวีย อเมริกาเหนือ และญี่ปุ่น เนื่องจากการนำไซลาเนสมาใช้จะสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการกำจัดน้ำเสียที่เกิดขึ้นเมื่อไม่ใช้เอนไซม์ การใช้ไซลาเนสในกระบวนการก่อนการฟอกสีเยื่อกระดาษสามารถลดปริมาณการใช้คลอรีนที่ก่อให้เกิดสาร adsorbable organic halogen ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดมลพิษทางน้ำ และลดค่า chemical oxygen demand นอกจากนี้การใช้ไซลาเนสยังทำให้กระดาษขาวขึ้น และช่วยให้สมบัติบางอย่างของกระดาษดีขึ้น เช่น ความขาวสว่าง ความต้านแรงดึง และค่าต้านแรงฉีกขาด

ปัจจุบันพบว่ามีจุลินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีสมบัติในการย่อยไซแลนได้ดีโดยที่ไม่ต้องผ่านกระบวนการปรับสภาพใดๆ เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้ผลิตเอนไซม์ที่มีส่วนประกอบที่สามารถยึดเกาะกับสับสเตรทที่ไม่ละลายน้ำ (ภาวิณี ศรีฉันทะมิตร, 2548) จุดประสงค์ของการทดลองครั้งนี้เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากดินบริเวณป่าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ ในมหาวิทยาลัยราช-ภัฏรำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรี

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. <u>การเก็บตัวอย่างดิน</u> ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างดิน 10 จุดในบริเวณพื้นที่ป่าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรี โดยเกลี่ยผิวหน้าดินออกเล็กน้อย ตักดินลึกจากหน้าดินประมาณ 3 -8 เซนติเมตร ใส่ในถุงพลาสติกและรัดปากถุงนำตัวอย่างที่เก็บได้ทั้งหมดไปทำการทดสอบขั้นต่อไป

2. <u>การแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตไซลาเนส</u> นำตัวอย่างดินที่เก็บมาเจือจางด้วย 0.85% normal saline จากนั้นนำ soil suspension ที่ได้ปริมาตร 0.1 ml มาทำการแยกเชื้อโดยวิธี spread plate technique ในอาหารที่มีสารกระต้นการสร้างเอนไซม์ ที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันและนำมาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์

3.<u>การผลิตเอนไซม์</u> เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์โดยใช้อาหารกระต้นการสร้างเอนไซม์มีสูตรดังนี้ Peptone 1 g, Tween 80 1 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1.4 g, KH_2PO_4 2 g, Urea 0.3 g, $MgSO_4.7H_2O$ 0.3 g, $CaCl_2$ 0.3 g, $FeSO_4.7H_2O$ 5 mg, $MnSO_4.H_2O$ 1.6 mg, $ZnSO_4.7H_2O$ 1.4 mg, $CoCl_2$ 2 mg, agar 20 g และน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยมีเปลือกข้าวโพดร้อยละ 1 (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน ปรับ pH เป็น 6.9 ด้วย Na_2CO_3 ร้อยละ 10 Inoculate เชื้อที่แยกได้จากข้อ 2 ลงในฟลาสก์ขนาด 250 ml ที่มีอาหาร 50 ml โดยใช้เชื้อตั้งต้นเท่ากับ 3 % T(Transmittance) แล้วนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที สารละลายส่วนใสที่ได้ (Supernatant) เป็น crude enzyme สำหรับใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

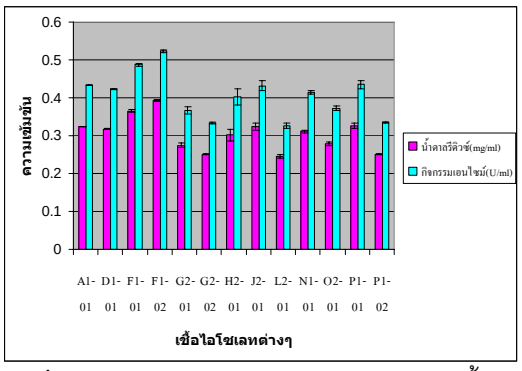
4.<u>การวัดกิจกรรมเอนไซม์โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์</u> ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยการเติม crude enzyme 0.1 ml ลงใน Oat spelt xylan ร้อยละ 1 ใน Tris-HCl บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 mM pH 7 ปริมาตร 0.5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 10 นาที แล้วตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น ที่ความยาวคลื่น 520 nm ด้วยวิธีของ Somogyi–Nelson โดยใช้ D–xylose เป็นสารมาตรฐาน

1 หน่วย (U) ของเอนไซม์ไซลาเนส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยสับสเตรทโดยให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไซโลส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

5. <u>การหาค่า Specific activity โดยการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน</u> ใช้วิธี Lowry's Method โดยนำ crude enzyme ปริมาณ 0.3 ml เติมสารละลาย reagent C 3 ml ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลาย Folin phenol reagent 0.3 ml ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm ใช้สารละลาย bovine serum albumin ในการเตรียมกราฟมาตรฐาน

6.<u>จัดจำแนกเชื้อที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด</u> นำเชื้อแบคทีเรียที่ให้กิจกรรมสูง 3 ไอโซเลท มาตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบทางชีวเคมี

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง



รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์กับกิจกรรมเอนไซม์

จากการทดลองสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากตัวอย่างดิน 10 ตัวอย่างในป่าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏ-รำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรี โดยใช้อาหารที่กระตุ้นการสร้างเอนไซม์ไซลาเนส (selective medium)ที่มีเปลือกข้าวโพดร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้ได้เชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 13 ไอโซเลท จากนั้นนำเชื้อทั้ง 13 ไอโซเลทมาตรวจหากิจกรรมเอนไซม์และค่าแอคติวิตี้จำเพาะ ซึ่งพบว่าเชื้อที่ให้กิจกรรมเอนไซม์สูงมี 3 ไอโซเลท คือเชื้อ F1-02 รองลงมาคือเชื้อ F1-01 และรองลงมาคือเชื้อ P1-01 โดยมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เป็น 0.435 ± 0.002, 0.487 ± 0.003 และ 0.523 ± 0.009 U/ml และมีค่าแอคติวิตี้จำเพาะเป็น 0.064 ± 0.001, 0.068 ± 0.000 และ 0.064 ± 0.00 U/mg protein. ซึ่งจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบทางชีวเคมีทำให้ทราบว่าเชื้อรหัส F1-02, F1-01 และ P1-01 เป็นเชื้อสายพันธ์ *Bacillus* sp.

เนื่องจากเอนไซม์ไซลาเนสมีความเกี่ยวข้องในการย่อยสลาย xylan polymer ซึ่งในธรรมชาติไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืชและมีปริมาณมากกว่า 30% ของน้ำหนักเซลล์แห้งของพืช และได้มี

การศึกษาเกี่ยวกับสมบัติของเอนไซม์ โดยเฉพาะจากเชื้อ *Aspergillus niger*, *Trichoderma resii*, *T. harzianum, T. koningii* และ *T. lignorum* เป็นต้น (Erikson, et al., อ้างถึงโดย นคร หน่อแก้ว, 2544)

ดังนั้นในการศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตไซลาเนสจากตัวอย่างดิน ทำให้ได้เชื้อทั้งหมด 13 ไอโซเลท ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่ติดสีแกรมบวกซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Heck *et al*. (2545) ซึ่งได้ศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนส โดยแยกได้จากแม่น้ำอะเมซอนโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาพของแข็งซึ่งใช้กากถั่วเหลืองที่เหลือจากโรงงานอุตสาหกรรม ได้เชื้อ 5 สายพันธุ์ 87 ไอโซเลท และจากการศึกษาพบว่าสายพันธุ์ที่ BL 62 เป็น *Bacillus subtilis*

คำขอบคุณ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี ศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี และ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

ภาวิณี ศรีฉันทะมิตร และ คณะ. 2548. การทำงานร่วมกันระหว่างไซลาเนสจาก *Bacillus firmus* K-1 และ *Bacillus halodurans* C-1 ต่อการย่อยไซแลนและปลดปล่อย chromophore จากเยื่อกระดาษคราฟท์. วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ. 28(3): 345-358.

นคร หน่อแก้ว. 2544. การหาลักษณะ เฉพาะบางประการของไซลาเนสจากเอนโดไฟติกฟังไจและการทำให้บริสุทธิ์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัย เชียงใหม่.

เสาวนีย์ ธรรมสถิติ. 2546. การทดลองการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์. โรงพิมพ์สถาบันพัฒนาการสาธารณสุขอาเซียน มหาวิทยาลัยมหิดล: กรุงเทพฯ.

Duarte, M.C.T., Pellegrino, A.C.A., Portugal., E.P. *et al*. 2000. Characterization of alkaline xylanases from *Bacillus pumilus*. Braz. J. Microbiol. 31(2): 90-94.

Heck, J.X., Hertz, P.F. and Ayub, M.A.Z. 2002. Cellulase and xylanase productions by isolated Amazon Bacillus strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. Braz. J. Microbiol. 33(3): 213-218.

Somogyi, M. 1945. A New Reagent for Determination of Sugar. Journal of Biological Chemistry. 160: 61-68.