การคัดแยกเชื้อราที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส ในพื้นที่ป่าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ISOLATION OF CELLULASE PRODUCING FUNGI IN PLANT GENETICS CONSERVATION PROJECT UNDER THE ROYAL INITIATION OF HER ROYAL HIGHNESS PRINCESS MAHA CHAKRI SIRINDHORN RAMBHAI BARNI RAJABHAT UNIVERSITY

เสาวภา สุราวุธ[1], ประสาน แสงไพบูลย์[1], วิญญู ภักดี[1],
เดือนเต็ม ทองเผือก[1], กาญจนา ราชสุวรรณ[1] และวิระ ศรีมาลา[2]
Saowapha Surawut[1], Prasan Sangpaiboon[1], Winyou Puckdee[1],
Dueantem Tongphueak[1], Kanjana Rachsuwan[1] and Wira Srimala[2]

[1] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จ.จันทบุรี 22000, [2] สาขาวิชาภูมิสารสนเทศ คณะวิทยาการคอมพิวเตอร์และเทคโนโลยีสารสนเทศ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จ.จันทบุรี 22000

[1]Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Rambhai Barni Rajabhat University, Chanthaburi 22000,
[2]Geoinformatics Program, Faculty of Computer Science and Information Technology, Rambhai Barni Rajabhat University, Chanthaburi 22000

<u>บทคัดย่อ</u>

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการคัดแยกเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส โดยคัดแยกจากดินในพื้นที่ป่าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จังหวัดจันทบุรี จำนวน 74 ตัวอย่าง และนำมาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเบื้องต้นบนอาหารแข็งคือ Carboxyl methyl cellulose (CMC) agar โดยการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดจากการทดสอบด้วย Gram's iodine จากนั้นนำเชื้อราที่คัดเลือกได้มาทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารเหลว CMC broth โดยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) method และวัดปริมาณโปรตีนด้วยชุดทดสอบ โดยจากการศึกษาพบว่า สามารถแยกเชื้อราได้ 298 ไอโซเลท ในจำนวนนี้มี 144 ไอโซเลทที่ให้ผลการเกิดบริเวณใส (48.32%) โดยไอโซเลทที่เกิดบริเวณใสกว้าง คือ RB85-1 (7 ± 0.1 cm), RB94-2 (6.5 ± 0 cm), RB135-2 (6.5 ± 0.1 cm), RB64-1 (6.0 ± 0.1 cm), RB89-4 (6.0 ± 0.1 cm) และ RB145-8 (6.0 ± 0.1 cm) ตามลำดับ ได้ถูกเลือกเพื่อนำมาทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารเหลว CMC broth พบว่าเชื้อราไอโซเลท RB145-8 สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงกว่าไอโซเลทอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.05) โดยมีค่า enzyme activity และ specific activity คือ 76.05 ± 5.69 U/ml และ 23.58 ± 5.44 U/ μg protein ตามลำดับ ทั้งนี้จากการระบุเชื้อรา พบว่าไอโซเลท RB145-8 คือ *Aspergillus niger*

ABSTRACT

The aim of this study was to isolate of cellulase producing fungi from 74 soil samples that collected from Plant Genetics Conservation Project's Forest, Rambhai Barni Rajabhat University, Chanthaburi. All of fungal isolates were examined for cellulase production by stain with Gram's Iodine on Carboxyl methyl cellulose (CMC) agar and then determined of reducing sugar by Dinitrosalicylic acid (DNS) method and protein concentration by Bradford Test kit in CMC broth. One hundred-forty four of 298 isolates (48.32%) showed clear zone with Gram's Iodine. The large clear zone isolates (diameter), RB85-1 (7 ± 0.1 cm), RB94-2 (6.5 ± 0 cm), RB135-2 (6.5 ± 0.1 cm), RB64-1 (6.0 ± 0.1 cm), RB89-4 (6.0 ± 0.1 cm) and RB145-8 (6.0 ± 0.1 cm) were selected to determine for cellulase production in CMC broth. The result showed that the RB145-8 was significant more cellulase production than other isolates (p-value < 0.05) with enzyme activity and specific activity were 76.05 ± 5.69 U/ml and 23.58 ± 5.44 U/ µg protein, respectively. In addition, the RB145-8 was identified as *Aspergillus niger* by morphology.

คำสำคัญ : เซลลูเลส, ฟังไจ, โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ

Keywords : cellulase, fungi, plant genetics conservation project

*ติดต่อนักวิจัย: เสาวภา สุราวุธ (อีเมลล์: saowapha_s@yahoo.com)

*Corresponding author: Saowapha Surawut (E-mail: saowapha_s@yahoo.com)

บทนำ

วัสดุพืชทางการเกษตรจำนวนมาก เช่น ใบไม้ เปลือก ผลไม้ กิ่งไม้ ก่อให้เกิดปัญหาขยะ และมลพิษทางสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะในพื้นที่เกษตรกรรม อย่างเช่น จังหวัดจันทบุรี ซึ่งเป็นแหล่งผลิตผลไม้เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศ โดยทางเลือกหนึ่งในการใช้ประโยชน์จากขยะวัสดุทางการเกษตรเหล่านี้ก็คือการนำไปทำปุ๋ยหมัก แต่ในการย่อยสลายซากพืชเพื่อให้ได้ปุ๋ยที่มีแหล่งสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อพืชและสามารถนำไปใช้ได้โดยใช้เวลาในการหมักที่ไม่นานจนเกินไป จำเป็นต้องอาศัยจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการย่อยสลายซากพืช ซึ่งวัสดุเหล่านี้มีเซลลูโลส (cellulose) เป็นส่วนประกอบหลัก โดยเซลลูโลส เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบมากที่สุดประมาณ 45% ของสารอินทรีย์ทั้งหมดในธรรมชาติ ส่วนใหญ่สะสมอยู่ที่ผนังเซลล์ในพืชชั้นสูงทุกชนิด เซลลูโลส ประกอบด้วยกลูโคสสายยาวเรียงขนานกันและภายในโมเลกุลของเซลลูโลสยึดติดกันแน่น ทำให้เซลลูโลสทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ ได้ช้า (Fan *et al*., 1987) โดยการเพิ่มอัตราการย่อยสลายซากพืชได้ดียิ่งขึ้น จำเป็นต้องอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase activity) สูง หรือสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ได้ในปริมาณมาก

เซลลูเลส เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายเซลลูโลสให้มีขนาดโมเลกุลที่เล็กลง เช่น กลูโคส (glucose) โดยพบว่าเอนไซม์นี้สร้างได้โดยสิ่งมีชีวิตทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย และรา เป็นต้น (Klyosov, 1990) ส่วนใหญ่ถูกสร้างและหลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้สร้างโดยสิ่งแวดล้อม เนื่องจากโมเลกุลของเซลลูโลสไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ของจุลินทรีย์ได้ ดังนั้น

จุลินทรีย์จึงต้องขับเอนไซม์ออกสู่นอกเซลล์เพื่อย่อยเซลลูโลสจนได้น้ำตาลที่ละลายน้ำ จากนั้นจึงดูดซึมเข้าสู่ภายในเซลล์ เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนต่อไป (Alexander, 1967) โดยจุลินทรีย์ที่มีการศึกษาอย่างมาก ได้แก่เชื้อรา เช่น *Aspergillus niger*, *Trichoderma* sp. เป็นต้น (Dashtban *et al.,* 2009)

ป่าในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จังหวัดจันทบุรี เป็นผืนป่าซึ่งทางมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี ได้ถวายเพื่อสนองพระราชดำริ และดำเนินงานตามกรอบของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ ในพื้นที่ 50 ไร่นี้ มีสภาพพื้นที่เป็นแอ่งลุ่มต่ำ รองรับน้ำจากส่วนต่าง ๆ ของมหาวิทยาลัยฯ ทำให้ป่ามีความชื้นสูง มีน้ำซึมซับจากใต้ดินตลอดเวลา จัดเป็นป่าดิบชื้นผสมป่าพรุ

เนื่องจากในพื้นที่ป่าฯ ยังคงความอุดมสมบูรณ์ค่อนข้างมากจากการที่มีเศษซากพืชทับถมกันเป็นเวลานาน จึงน่าจะมีจุลินทรีย์ที่มีความสามารถสูงในการย่อยสลายซากพืชได้ดี และจุลินทรีย์กลุ่มนี้ยังมีความเกี่ยวข้องกับความอุดมสมบูรณ์ของดินในผืนป่าด้วยจากบทบาทการเป็นผู้ย่อยสลายที่สำคัญในธรรมชาติ โดยจุลินทรีย์กลุ่มนี้ควรได้มีการศึกษาและนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการคัดแยกเชื้อราที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้มาก โดยทำการศึกษาจากตัวอย่างดินภายในป่าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จ.จันทบุรี เพื่อเป็นฐานข้อมูลในการศึกษาวิจัยถึงความเป็นไปได้ที่จะนำเชื้อรากลุ่มนี้มาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายเศษซากพืชทางการเกษตร และนำไปประยุกต์ใช้ในด้านอื่น

อุปกรณ์และวิธีการ

1. <u>การเก็บตัวอย่างดินเพื่อนำมาแยกเชื้อรา</u> เก็บตัวอย่างดินตามจุดที่กำหนดในแผนที่ ดังภาพที่ 1 โดยใช้ Global Positioning System (GPS) นำทางและเก็บดินลึกลงไป 10 cm จากผิวดิน มาประมาณ 10 g ทำการเก็บดินจุดละ 3 ตัวอย่าง ทั้งหมด 74 จุด เก็บใส่ถุงพลาสติก ระบุรายละเอียด นำไปคัดแยกเชื้อราในห้องปฏิบัติการ

2. <u>การแยกเชื้อราจากตัวอย่างดิน</u> ชั่งตัวอย่างดินจำนวน 10 g ลงในฟลาสก์ขนาด 250 ml เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 100 ml บ่มและเขย่า (shaker) ที่ 200 rpm อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้ตะกอนดินขนาดใหญ่ตกตะกอนเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการเจือจางสารละลายดินด้วยวิธี dilution method แล้วทำการ spread plate บนอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ผสม Rose Bengal ที่ความเข้มข้น 50 mg/L บ่มจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 3-7 วัน เมื่อเชื้อราเจริญบนจานอาหารทำการแยกเชื้อราที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างดิน มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร PDA อีกครั้งเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธี point inoculation technique ทำการเก็บรักษาเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้ในหลอดอาหาร PDA ชนิดเอียงโดยการเททับด้วยน้ำมันพาราฟินเหลว (liquid paraffin)

3. <u>การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส</u>

3.1 การทดสอบเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็งตามวิธีการของ Kasana *et al.* (2008) และ Abu Bakar *et al*. (2010)

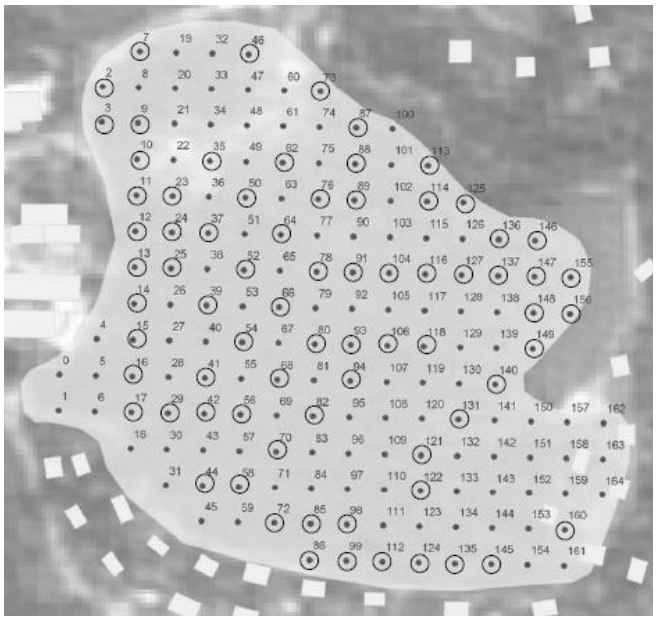
โดยเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหาร Carboxyl methyl cellulose (CMC) agar ที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 3 วัน เทสารละลาย Gram's Iodine ให้ท่วมผิวหน้าอาหารและโคโลนีเชื้อรา เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทออก

จากนั้นวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของการเกิดบริเวณใส (clear zone) ในหน่วยเซนติเมตร (cm) โดยในการทดสอบนี้ใช้เอนไซม์ cellulase จาก *Aspergillus niger* (Sigma) 10 mg/ml (2.41 Unit/ml) เป็น positive control และใช้น้ำกลั่นเป็น negative control

3.2 การทดสอบเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว โดยนำเชื้อราที่ได้คัดเลือกจากขั้นตอนที่ 3.1 มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร Carboxyl methyl cellulose (CMC) broth ปริมาตร 50 ml ในฟลาสก์ขนาด 250 ml ที่ความเข้มข้น 10^5 spores/ml เขย่าที่ความเร็ว 150 rpm บ่มที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No. 1) เพื่อกรองเอาส่วน mycelium pellet ออก นำส่วน culture supernatant นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที นำ culture supernatant ซึ่งก็คือ เอนไซม์อย่างหยาบ (crude enzyme) ไปหาค่าการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) และค่าการทำงานจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity) โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) method ตามวิธีการของ Tabao *et al.* (2010) และหาปริมาณโปรตีนโดยชุดทดสอบ Quick Start™ Bradford Protein Assay (BIO-RAD, USA) ตามวิธีการในคู่มือ กำหนดให้ 1 Unit (U) ของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นกลูโคส 1 μmole ในเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 40°C ความดัน 1 บรรยากาศ โดยคำนวณค่า enzyme activity และ specific activity ตามหลักของ The International Union of Biochemistry เชื้อราที่ให้ผล specific activity สูงสุดจะถูกนำไปทำการจัดจำแนกเพื่อระบุเชื้อรา

4. <u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u> เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่า enzyme activity และ specific activity ด้วย one way-ANOVA และเปรียบเทียบ multiple comparison โดย Least Significant Difference (LSD)

5. <u>การระบุชนิดของเชื้อรา (Identification)</u> ทำการระบุชนิดของเชื้อรา ซึ่งอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) ของเชื้อรา โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราด้วยเทคนิค slide culture ควบคู่กับการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็งชนิด Potato dextrose agar, Malt extract agar หรือ Czapek dox agar ในจานเพาะเชื้อ ทำการตรวจวัดส่วนประกอบของโครงสร้างเชื้อราด้วยไมโครมิเตอร์ และจำแนกชนิดโดยการเปรียบเทียบกับเชื้อรามาตรฐาน และคู่มือการจำแนกชนิดของเชื้อรา (Gilman, 1957; Hawksworth *et al.,* 1995; Raper, 1965)



ภาพที่ 1 แผนที่การเก็บตัวอย่างดินภายในป่าอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ
จุดในการเก็บตัวอย่างถูกกำกับไว้ด้วยหมายเลข แต่ละจุดห่างกัน 20 เมตร
จุดที่ได้ทำการเก็บตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้คือจุดที่ได้วงกลมไว้ จำนวน 74 จุด

ผลการทดลอง

1. <u>ผลการแยกเชื้อราจากตัวอย่างดิน</u> ในการแยกเชื้อราจากดินบริเวณต่าง ๆ ในป่าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จ.จันทบุรี จำนวน 74 ตัวอย่าง พบเชื้อราที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างดิน จำนวน 298 ไอโซเลท

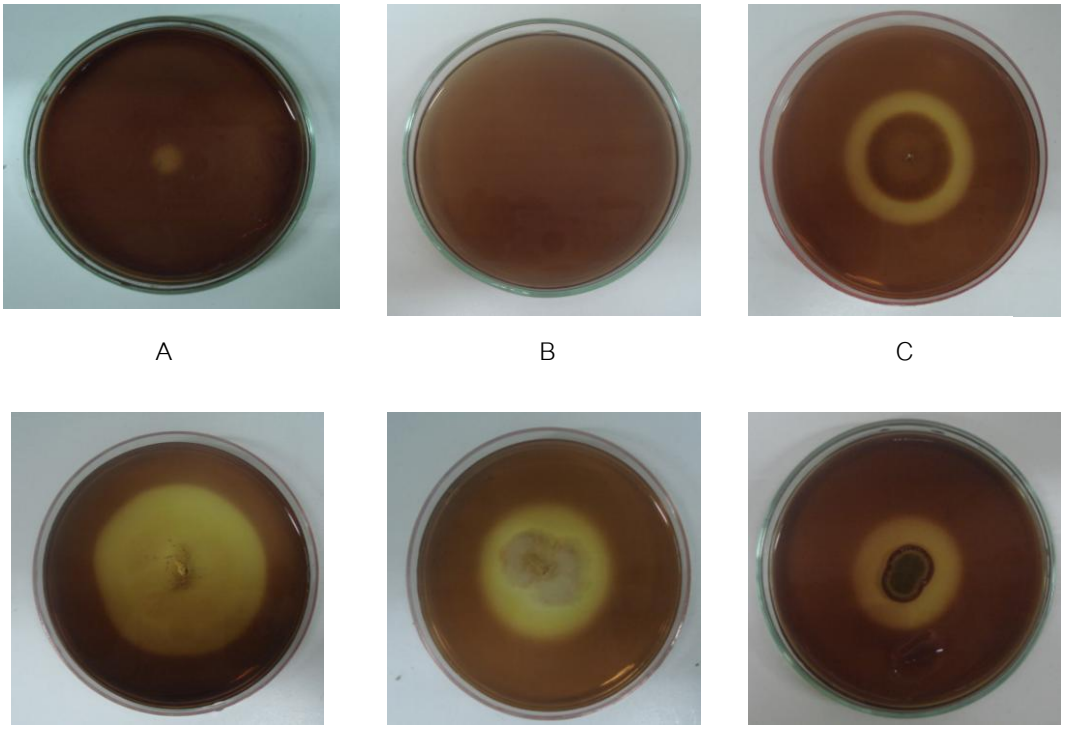
2. <u>ผลการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส</u>

2.1 ผลการทดสอบเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็ง โดยนำเชื้อราบริสุทธิ์ที่แยกได้ จำนวน 298 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส โดยการทดสอบด้วย Gram's Iodine พบว่า มีเชื้อรา จำนวน 144 ไอโซเลทที่ให้ผลการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อ จากนั้นวัดขนาดความกว้างเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใส พบว่าในจำนวนนี้ทำให้เกิดบริเวณใสที่มีความกว้างตั้งแต่ 1 ถึง 7 cm (ภาพที่ 2) โดยเชื้อราที่ให้ความกว้างของบริเวณใสมากที่สุด 3 อันดับแรก คือ ไอโซเลท RB85-1, RB94-2, RB135-2, RB64-1, RB89-4 และ RB145-8 ซึ่งให้บริเวณใสเป็น 7± 0.1, 6.5 ± 0, 6.5 ± 0.1, 6 ± 0.1, 6 ± 0.1 และ 6 ± 0.1 cm ตามลำดับ จะถูกเลือกเพื่อนำไปวัดการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเชิงปริมาณในอาหารเหลว

2.2 ผลการทดสอบเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลว จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหาร CMC broth แล้วนำเลี้ยงเชื้อ (culture supernatant) มาตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสด้วย DNS method และหาปริมาณโปรตีนเพื่อคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์ พบว่า ไอโซเลท RB64-1, RB85-1, RB89-4, RB94-2, RB135-2 และ RB145-8 ให้ค่า enzyme activity คือ 22.5±4.47, 27.21±4.35, 56.48±8.98, 8.20±0.59, 20.80±5.03 และ 76.05±5.69 U/ml ตามลำดับ และให้ค่า specific activity คือ 5.73±1.60, 2.44±0.29, 7.96±0.63, 1.59±0.05, 5.66±0.27 และ 23.58±5.44

U/ µg protein ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ทั้งนี้เมื่อทดสอบทางสถิติพบว่า ค่า enzyme activity และ specific activity ของไอโซเลท RB145-8 สูงกว่าไอโซตเลทอื่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.05) (ภาพที่ 3)

3. <u>ผลการระบุชนิดเชื้อราที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสสูง</u> ทำการระบุชนิดของเชื้อราโดยศึกษาจากลักษณะโคโลนีและโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยการทำ slide culture พบว่าเชื้อราไอโซเลท RB145-8 สามารถระบุได้ว่า คือ *Aspergillus niger* เมื่อเทียบกับรูปวิธาน (key) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราบนอาหาร CMC agar ด้วย Gram's Iodine

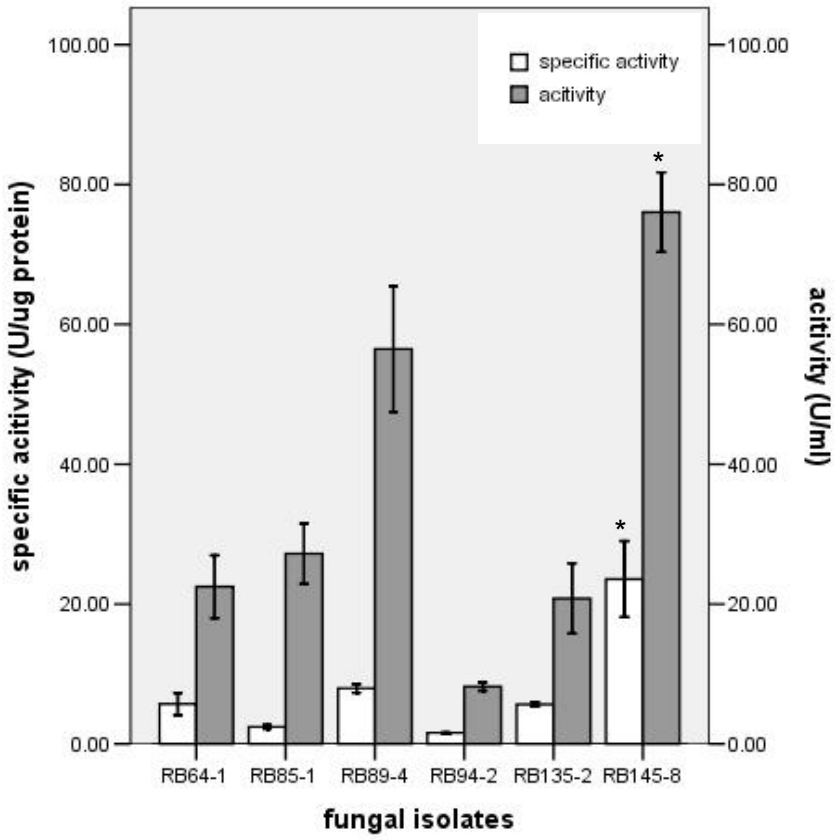
A: เอนไซม์เซลลูเลสจาก *Aspergillus niger* 10 mg/ml (2.41 Unit/ml) (Sigma, USA) เป็น positive control

B: น้ำกลั่น เป็น negative control

C - F: บริเวณใส (clear zone) ที่เกิดจากเอนไซม์เซลลูเลสที่เชื้อราสร้างขึ้น เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร CMC agar เป็นเวลา 3 วัน

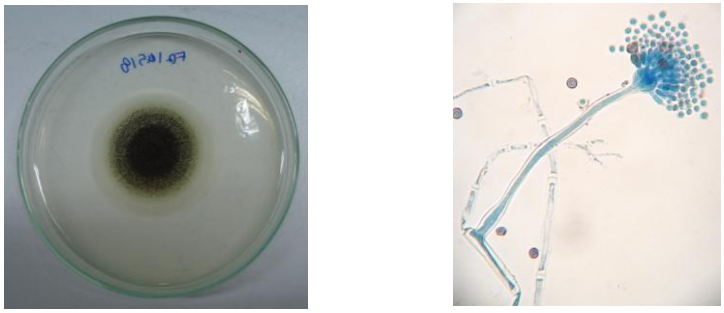
ตารางที่ 1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราจำนวน 6 ไอโซเลท ในอาหาร CMC broth

ไอโซเลท	บริเวณใส (cm.)	enzyme activity (U/ml)	protein (µg/ml)	specific activity (U/ µg protein)
RB64-1	6 ± 0.1	22.5 ± 4.47	3.97± 0.33	5.73 ±1.60
RB85-1	7± 0.1	27.21 ± 4.35	11.11± 0.48	2.44 ±0.29
RB89-4	6 ± 0.1	56.48 ± 8.98	7.08 ±0.57	7.96± 0.63
RB94-2	6.5 ± 0	8.20 ± 0.59	5.17 ±0.54	1.59 ±0.05
RB135-2	6.5 ± 0.1	20.80 ± 5.03	3.66± 0.71	5.66 ±0.27
RB145-8	6 ± 0.1	76.05 ± 5.69	3.29 ±0.52	23.58 ±5.44



ภาพที่ 3 specific activity และ enzyme activity ของเอนไซม์เซลลูเลสที่สร้างจากเชื้อราแต่ละไอโซเลท

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับทุกไอโซเลท (p-value < 0.05); ค่าที่ปรากฏคือค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



A B

ภาพที่ 4 เชื้อราไอโซเลท RB145-8 (*Aspergillus niger*)
A: ลักษณะโคโลนี เมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหาร Czapek dox agar เป็นเวลา 3 วัน
B: โครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยกเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลส จากดินจำนวน 74 ตัวอย่าง ภายในพื้นที่ป่าโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี จ.จันทบุรี พบว่าแยกเชื้อราได้จำนวน 298 ไอโซเลท โดยการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ การคัดกรองเบื้องต้นบนอาหารแข็ง Carboxyl methyl cellulose (CMC) agar จากนั้นจึงนำไปทำการทดสอบในอาหารเหลว CMC broth อีกครั้ง

ในการคัดกรองความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราและจุลินทรีย์อื่น (จาตุรงค์ และสุพรรนี, 2550; ศศิธร, 2550) นิยมทำโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหาร CMC agar จากนั้นจึงย้อมสีอาหารด้วย congo red แต่เนื่องจาก congo red มีราคาแพงและมีรายงานว่าเป็นสารก่อมะเร็ง (Lamb *et al.,* 2005; Tanaka *et al.,* 1981) จึงได้มีการคิดค้นวิธีการอื่น โดย Kasana *et al.,* (2008) ได้ใช้ Gram's Iodine ย้อมสีอาหาร CMC agar แทน congo red เนื่องจากประกอบด้วยสารเคมีราคาถูก สามารถอ่านผลได้รวดเร็วกว่า เห็นขอบเขตของบริเวณใสชัดเจนกว่า และ

ไม่มีรายงานว่าเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต (Kasana *et al.,* 2008) โดยหลักการอ่านผลด้วยวิธีนี้คือ Gram's Iodine จะไปจับกับโครงสร้างของ CMC ทำให้เกิดสีน้ำตาล ดังนั้นบริเวณที่ CMC ถูกย่อยโดยเอนไซม์เซลลูเลสที่เชื้อราสร้างขึ้น ก็จะปรากฏเป็นบริเวณใส (clear zone)

ในจำนวนเชื้อราที่แยกได้ทั้งหมด พบเชื้อราที่ให้ผลการเกิดบริเวณใส จำนวน 144 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 48.32 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าดินในผืนป่าแห่งนี้มีซากพืชสูง โดยซากพืชในดินได้เหนี่ยวนำให้เชื้อราสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อย่อยสลายเซลลูโลสในดินให้เป็นแหล่งอาหารของเชื้อรา อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างดินที่นำมาแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจะพบจำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันตามตัวอย่างดินในแต่ละพื้นที่ด้วย (จาตุรงค์ และสุพรรนี, 2550) จากจำนวนเชื้อราที่ให้ผลการเกิดบริเวณใสบนอาหาร CMC agar พบว่าไอโซเลท RB85-1 (7 ± 0.1

cm) มีเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสกว้างที่สุด รองลงมาคือ RB94-2 (6.5 ± 0 cm), RB135-2 (6.5 ± 0.1 cm), RB64-1 (6.0 ± 0.1 cm), RB89-4 (6.0 ± 0.1 cm) และ RB145-8 (6.0 ± 0.1 cm) ตามลำดับ ทั้งนี้ พบว่าเชื้อราจำนวนมากที่แยกได้จากการศึกษาครั้งนี้ให้เส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสมากกว่าเชื้อราที่แยกได้ในรายงานของ Abu Bakar, *et al.* (2010) คือเชื้อราสายพันธุ์ SK1, SK3 และ SK5 ซึ่งให้เส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสคือ 4.1, 4.5 และ 2.4 cm ตามลำดับ โดยใช้ Gram's Iodine เป็นตัวทดสอบเช่นเดียวกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อราที่แยกได้จากการศึกษาครั้งนี้มีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้มากกว่าเชื้อราจากรายงานการศึกษาอื่น

ในการทดสอบเพื่อคัดเลือกเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดในอาหารเหลว โดยการเพาะเลี้ยงใน CMC broth จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อ (culture supernatant) มาวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) method และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ทั้งนี้หลักการของ DNS method คือ การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ที่เกิดจากการย่อยสลายเซลลูโลสในอาหารเหลวโดยเอนไซม์เซลลูเลสที่เชื้อราสร้างขึ้น ซึ่งสารตั้งต้นที่นิยมใช้คือ CMC เมื่อทำการวัดปริมาณเอนไซม์เซลลูเลสโดยการบ่มเอนไซม์หยาบ (crude enzyme) หรือน้ำเลี้ยงเชื้อกับสารตั้งต้น จากการทดสอบพบว่าเชื้อราไอโซเลท RB145-8 สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงกว่าไอโซเลทอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.05) โดยมีค่า enzyme activity และ specific activity คือ 76.05 ± 5.69 U/ml และ 23.58 ± 5.44 U/ µg protein ตามลำดับ

โดยข้อสังเกตจากทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา พบว่า ไอโซเลท RB145-8 ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใส (6.0 ± 0.1 cm) ใกล้เคียงกับไอโซเลท RB85-1 (7 ± 0.1 cm) แต่เมื่อทำการทดสอบในอาหารเหลว CMC broth พบว่า RB145-8 มีค่า enzyme activity และ specific activity สูงกว่า RB85-1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value < 0.05) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็งโดย Gram's Iodine นั้น เป็นเพียงการตรวจสอบเบื้องต้นเช่นเดียวกับการทดสอบด้วย congo red จึงจำเป็นต้องมีการตรวจค่าการทำงานของเอนไซม์โดยวิธีอื่นร่วมด้วย ดังเช่นการทดสอบในอาหารเหลว CMC broth ด้วยวิธี DNS method เป็นต้น (Prasertsan *et. al.,* 1992)

อย่างไรก็ตาม การสร้างเอนไซม์ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดขึ้นกับหลายปัจจัย ได้แก่ ปริมาณเชื้อ แหล่งคาร์บอน pH อุณหภูมิ การมีตัวชักนำ (inducer) และหรือตัวยับยั้ง (inhibitor) ขนาดของการเพาะเลี้ยง และการให้อากาศ (Ali *et al*., 1991) ดังนั้นความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราในอาหารเหลว CMC broth จึงขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยดังกล่าวข้างต้น ซึ่งมีความแตกต่างกันไปในเชื้อราแต่ละชนิด

โดยเชื้อราที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดจากการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการระบุชนิดโดยการศึกษาลักษณะโคโลนี และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เทียบกับรูปวิธาน (key) และเทียบกับเชื้อราอ้างอิง พบว่าไอโซเลท RB145-8 คือ *Aspergillus niger* ซึ่งมีรายงานจำนวนมากพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูง (Dashtban *et al*., 2009) โดยเชื้อรา *A. niger* RB145-8 ที่มีความสามารถสูงในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสที่แยกได้จากการศึกษาครั้งนี้ นับว่าเป็นฐานข้อมูลที่สำคัญในการศึกษาวิจัยต่อไป ถึงความเป็นไปได้ที่จะนำเชื้อรานี้มาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยสลายเศษซากพืชทาง

การเกษตร และนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในด้านอื่น

คำนิยม

งานวิจัยนี้เป็นงานสนองพระราชดำริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ และ ได้รับการสนับสนุนจากกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี ประจำปีงบประมาณ 2553

เอกสารอ้างอิง

จาตุรงค์ จงจีน และสุพรรนี อะโอกิ. 2550. การคัดแยกและจำแนกเชื้อราทนร้อนที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดิน. **Agricultural Sci. J**. 38: 291-294.

ศศิธร ไกรฤทธิชัย และนฤมล ทองไว. 2550. การแยกและการคัดกรองแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส. **34th Congress on Science and Technology of Thailand**.

Abu baker NK, Abd-Azia S, Hassan MA, Ghazali FM. 2010. Isolation and selection of appropriate cellulolytic mixed microbial cultures for cellulases production from oil palm empty fruit bunch. **Biotechnology**. 9 (1): 73-78.

Alexander M. 1967. **Introduction to soil microbiology**. Toppan Printing Co(S) Pte. Ltd. Singapore:169-181.

Ali S, Sayed A, Sarker TI, Alam R. 1991. Factors affecting cellulase production by *Aspergillus terreus* using water hyacinth. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 43:518-520.

Dashtban M, Schraft H, Qin W. 2009. Fungal Bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspective. **Int. J. Biol. Sci**. 5: 578-595.

Fan LT, Gharpuray MM, Lee Y-H. 1987. **Cellulose hydrolysis**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. London.

Gilman JC. 1957. **Manual of soil fungi**. Ames; Iowa State College; 450 p.

Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN. 1995. **Dictionary of the fungi**, 8thed. AB international, New York, USA.

Kasana RC, Salwan R, Dhar H, Dutt S, Gulati A. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's Iodine. **Curr Microbiol**. 57: 503-50.

Klyosov AA. 1990. Trends in biochemistry and enzymology of cellulase degradation. **Biochemistry**. 29:10577-10585

Lamb J, Loy T. 2005. Seeing red: The use of Congo Red dye to identify cooked and damaged starch grains in archaeological residues. **J Archaeol Sci** 32: 1433–40

Prasertsan P, Kittikul H A, Chitmanee B. 1992. Isolation and selection of cellulolytic fungi from palm oil mill effluent. **World Journal Microbiology and Biotechnology**. 8:614-617.

Raper KB, Fennell DI. 1965. **The genus *Aspergillus***. Williams&Wilkins Baltimore USA.

Tabao Nik SC, Monsalud RG. 2010. Screening and optimization of celluase production of *Bacillus* strains isolated from Philippine mangroves. **Phillippines Journal of systematic biology**. 4. 79-87

Tanaka K, Mii T, Marui S, Matsubara I, Igaki H. 1981. Mutagenicity of urinary metabolites of benzidine and benzidine-based azo dyes. **Int Arch Occup Environ Health** 49: 177–85