

แบบการจัดทำบทความ(manuscript)

ชุดโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ประจำปี พ.ศ. 2555

ชื่อโครงการ(ภาษาไทย): การคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีท์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดิน
เพื่อผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

(ภาษาอังกฤษ): Screening of cellulolytic actinomycetes from soil for producing sugar
from agricultural residues

นันทวัน ฤทธิเดช* และณัฐพล ชามาม

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

*corresponding author: nunrid@kku.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีท์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยจะทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ซึ่งสามารถย่อยสลายโครงสร้างของเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคสและนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพเช่น เอทานอล จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีท์ในครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างจากพื้นที่แปลงทดลองเขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ จำนวน 4 แปลง แปลงทดลองละ 16 ตัวอย่าง คัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 190 ไอโซเลท แล้วทดสอบความสามารถในการย่อยเซลลูโลสบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ CMC agar พบว่า ไอโซเลท CDF₂L₁D₁₃ มีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุดซึ่งพบค่าอัตราส่วนระหว่างขนาดเคลียร์โซนกับขนาดโคโลนี เท่ากับ 14.02 จากนั้นได้นำเชื้อไอโซเลทนี้มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ในอาหาร CMC broth ที่มีการแปลผันแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน พบว่าไอโซเลท CDF₂L₁D₁₃ มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 2.639 U/ml ในแหล่งคาร์บอนที่ได้จากฟางข้าว ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่ให้ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส สูงสุดคือ เปปโตน ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ 5.443 U/ml. นอกจากนี้ยังมีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของเชื้อไอโซเลท CDF₂L₁D₁₃ พบว่ามีรูปร่างของสปอร์มีวนเป็นวงกลม ลักษณะคล้าย loop คาดว่าน่าจะอยู่ใน genus *Streptosporangium*.

Abstract

The aim of this study was to isolate cellulolytic actinomycetes from soil for sugar production by using agricultural residues as substrate. Enzyme β glucosidase can degrade cellulose to glucose and use glucose as a carbon source in the process of biofuel production. Seventy-two Soil samples were collected from the plots Chulabhorn Dam for screening cellulolytic microorganisms. Actinomycetes 190 isolates were obtained. Isolate that has highest ability to degrade carboxymethylcellulose on the agar plate was Actinomycetes isolate CDF2L1D13 which showed HC value was 14.02. β glucosidase activity was 2.639 U / ml. when used rice straw as carbon sources. The optimum nitrogen source for producing β glucosidase was peptone and the enzyme activity was 5.443 U / ml. The morphology of isolate CDF2L1D13 was studied. It was found that the shape of spores resembled circular loop coil and it expected to be in the genus *Streptosporangium*.

Keywords: Actinomycetes, agricultural residues, β glucosidase

บทนำ

แอกติโนมัยซีทเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะการเจริญคล้ายเชื้อรา สามารถสร้าง สปอร์ อับสปอร์ substrate mycelium และ aerial mycelium นอกจากนี้แบคทีเรียในกลุ่มแอกติโนมัยซีทมีประโยชน์ต่อสภาพแวดล้อมในด้านการสร้างเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการย่อยสลายซากพืช ซากสัตว์ ที่มีปริมาณมากในธรรมชาติ เป็นผลทำให้ดินมีความอุดมสมบูรณ์มีปริมาณธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของพืชและสัตว์ สำหรับเอนไซม์แบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีทผลิตออกมาเพื่อใช้ในการย่อยสลายซากพืช ได้แก่ เอนไซม์ในกลุ่ม cellulase เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบมากในเซลล์พืช รวมทั้งยังเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการศึกษาวิจัยและทดลองเกี่ยวกับความสามารถของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีทในหลายด้าน เช่น ด้านการแพทย์ได้มีการศึกษาการสร้างสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค และด้านการเกษตรได้มีการนำเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีทมาใช้ในการทำปุ๋ยชีวภาพ เป็นต้น จากข้อมูลทางการวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นจึงทำให้มีการวิจัยการคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีทที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดินเพื่อผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรขึ้น

1. เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินในพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ
2. เพื่อทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสของแบคทีเรียกลุ่มแอกติโนมัยซีทบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Carboxymethylcellulose (CMC) agar

3. เพื่อหาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อใช้ผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

4. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซิส เช่นลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และลักษณะโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีการดำเนินงาน

การวิจัยครั้งนี้เป็นการวิจัยขั้นพื้นฐาน โดยทำการคัดแยกจุลินทรีย์ในพื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ด้วยวิธี Spread plate technique บนอาหาร carboxy methyl cellulose agar จากนั้นนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มาทดสอบการย่อยสลายเซลลูโลสเบื้องต้นบนจานอาหารดังกล่าว โดยการวาดด้วยสารละลายแกรมไอโอดีน แล้วทำการวัดค่า Hydrolysis capacity value (HC value) ซึ่งเป็นเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสรวมโคโลนี ต่อเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี จากนั้นตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์บีต้า-กลูโคซิเดส พร้อมทั้งหาแหล่งคาร์บอนเช่นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ และแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม และการศึกษาขั้นสุดท้ายในการทดลองนี้ได้ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อและภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลการทดลอง

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซิส

ผลจากการคัดแยกแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซิสจากตัวอย่างดินบริเวณแปลงตัวอย่าง พื้นที่เขื่อนจุฬาภรณ์ จังหวัดชัยภูมิ สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซิสได้จำนวน 190 ไอโซเลท ซึ่งแต่ละไอโซเลทจะถูกทำการคัดแยกบนอาหาร starch casein agar เพื่อคัดเลือกลักษณะโคโลนีของเชื้อแอคติโนมัยซิส เพื่อที่จะนำไปใช้ในการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสต่อไป

การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสของแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซิสบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Carboxymethylcellulose (CMC) agar

การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ Carboxymethylcellulose (CMC) agar จากเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดจำนวน 190 ไอโซเลท แล้วทำการทดสอบโดยใช้เทคนิค point inoculation บ่มที่ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน แล้ววัดค่าอัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง clear zone กับ colony diameter ด้วยวิธีการวาดแกรมไอโอดีนในหน่วยวัดที่เป็นมิลลิเมตร พบว่าเชื้อไอโซเลท CDF₂L₁D₁₃ มีค่าอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของ clear zone กับ colony diameter เท่ากับ 14.02 ซึ่งเป็นค่าที่สูงที่สุดที่วัดได้จากการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อบน CMC agar

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อใช้ผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยการแปรผันแหล่งคาร์บอนในอาหาร CMC broth

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส โดยจะทำการศึกษาไปที่เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Hydrolase มีหน้าที่ในการเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายโมเลกุลของ cellobiose ได้เป็นน้ำตาล glucose ซึ่งจะตรวจวัดด้วยวิธี DNS method ในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ ผลจากการตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสของเชื้อไอโซเลท CDF₂L₁D₁₃ พบว่าในแหล่งคาร์บอนที่เป็นฟางข้าว CDF₂L₁D₁₃ มีกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส สูงสุดเท่ากับ 2.639 U/ml ในวันที่ 15 ของการบ่ม ส่วนแหล่งคาร์บอนที่เป็นรำจะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสูงสุดเท่ากับ 2.480 U/ml

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อใช้ผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยการแปรผันแหล่งไนโตรเจนในอาหาร CMC broth

จากการแปรผันแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงเชื้อ พบว่าแหล่งไนโตรเจนมีส่วนช่วยเพิ่มอัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส และอัตราเร็วในการเจริญเติบโตของเชื้อ โดยการเจริญในแหล่งไนโตรเจนที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต จะส่งเสริมการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดอยู่ที่ 5.337 U/ml และแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ peptone จะให้ปริมาณกิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส สูงสุดเท่ากับ 5.443 U/ml ในวันที่ 5 ของการบ่ม จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าแหล่งไนโตรเจนมีส่วนช่วยในการทำให้เชื้อที่ซื้ทดสอบ มีการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้เร็วขึ้น

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลท CDF₂L₁D₁₃

จากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อไอโซเลท CDF₂L₁D₁₃ ซึ่งทำการศึกษาลักษณะของโคโลนีบนจานอาหารและลักษณะสายโซ่สปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า CDF₂L₁D₁₃ มีลักษณะโคโลนีเจริญตามรอย streak ขนาดเล็ก ขอบหยัก สร้าง substrate mycelium สีขาว aerial mycelium สีขาว สร้างสปอร์สีดำมีลักษณะคล้ายผงถ่าน และสายโซ่สปอร์ม้วนเป็นวงกลมคล้าย loop สายโซ่สปอร์มีลักษณะเรียงต่อกันเป็นท่อนๆ ภายใต้เส้นใย คาดว่าน่าจะอยู่ใน genus Streptosporangium

เอกสารอ้างอิง

- Al-tai, A.M. et al. (1989). Cellulase production from actinomycetes isolated from Iraqisoil : characterization of a cellulolytic *streptomyces* sp. Stain AT7. Journal of Islamic Acedemy, 109-112
- Day, D.F. and Workman, W.E. (1982). Purification and Properties of β -Glucosidase from *Aspergillus terreus*. Amaran Society for Microbiology, 1289-1295
- Ibrahim, A. and El-diwany, A. (2007). Isolation and Identification of New Cellulases Producing Thermophilic Bacteria from an Egyptian Hot Spring and some Properties of the Crude Enzyme. Australian Journal of basic and applied Science, 1(4), 473-478

- Jonjeen, J. and Akio, S. (2007). **Screening and Identification of Thermophilic Cellulolytic Fungi from Soil.** *Agricultural Sci. J.* 38(6) (Suppl.): 291-294.
- Peela, S. and Kurada, B. (2005). **Studies on Antagonistic marine actinomycetes from the Bay of Bengal.** *World Journal of Microbiology*, 21:583-585
- Saadoun, I. et.al., (2008). **Influence of Culture Conditions on Cellulase Production by *Streptomyces* sp. (Strain J2).** *Jordan Journal of microbiological Science*, 1(4), 141-146
- Saadoun, I. et.al., (2008). **Recovery of soil streptomycetes from arid habitats in Jordan and their potential to inhibit multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* pathogens.** *World J Microbiol Biotechnol.* 1(24), 157-162
- Tako, M. et.al. (2009). **Production of cellulolytic enzymes on agricultural waste by different *Zygomycetes*.** Department of Microbiology faculty of Science and Informatic, University of Szeged