

การคัดเลือกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและประสิทธิภาพ ในการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลส

Screening of Cellulase Producing Bacteria and Efficiency of Lignocellulosic Decomposition

ชนิดาภา ธนะศรีราษฎร์¹ เพชรดา ปินใจ¹ และ พิลานี ไวถนอมสัตย์²
Chanidapa Thanasirangkul¹, Pechrada Pinjai¹ and Pilanee Vaithanomsat²

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดินบริเวณรอบรากพืชและเศษวัสดุทางการเกษตร (ใบอ้อย ชานอ้อย ฟางข้าว และทะลายปาล์ม) พร้อมทั้งศึกษาความหลากหลายและความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรีย รวมทั้งการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสในสภาวะจำลอง ผลการวิจัยสามารถแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จำนวน 100 ไอโซเลต จากการวัดความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสจากการเกิดไฮโดรไลติก (Hydrolytic capacity: (HC) value มากกว่า 3) บนอาหารแข็ง carboxy methyl cellulose (CMC) สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จำนวน 25 ไอโซเลต หลังจากจัดกลุ่มแสดงความสัมพันธ์ของแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีประสิทธิภาพสูงโดยอาศัยข้อมูลการใช้แหล่งไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และความสามารถในการต้านทานสารปฏิชีวนะ และวิเคราะห์โดย UPGMA สามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียได้เป็น 2 clusters ที่ระดับความคล้ายคลึงร้อยละ 50 ซึ่งชี้ชัดได้ว่าแบคทีเรียตัวนั้นมี ความหลากหลาย เมื่อวิเคราะห์กิจกรรมคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลสของแบคทีเรียตัวแทนทั้งหมด พบแบคทีเรียตัวแทนส่วนใหญ่มีกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสอยู่ในช่วง 0.0509-0.0702 ยูนิตต่อมิลลิเมตร โดยแบคทีเรียไอโซเลต M008 เป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์สูงสุด คือ 0.0702 $\pm$ 0.0027 ยูนิตต่อมิลลิเมตร เมื่อนำแบคทีเรียไอโซเลต M008 มาทดสอบการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสในสภาวะจำลอง พบว่าแบคทีเรียสามารถย่อยสลายทะลายปาล์มได้ดีที่สุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน รองลงมาคือ ใบอ้อย และฟางข้าว ตามลำดับ ซึ่งจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ 16S rDNA สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียได้เป็น *Enterobacter* sp. ที่ระดับความคล้ายคลึงร้อยละ 99

คำสำคัญ: ลิกโนเซลลูโลส แบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เซลลูโลส กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส

Abstract

Our main purposes were to screen cellulase producing bacteria (CPB) from sugarcane rhizospheres and agricultural waste and to investigate the diversity and ability of cellulase production of bacteria, including potential of cellulase producing bacteria on cellulose decomposition within microcosm. The results revealed that 100 isolates of bacteria were enabled cellulase production but only 25 isolates exhibited high cellulase producing activity with hydrolytic capacity (HC value > 3) testing on carboxy methyl cellulose (CMC) agar plate. The dendrogram analysis of high cellulase producing bacteria was characterized by using their nitrogen, carbon source utilization, morphology data and antibiotic resistance data and also evaluated by UPGMA analysis. The bacterial isolates could be categorized into two clusters

¹ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

²สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

with a maximum similarity value of 50%, indicated diverse bacteria. The bacterial isolates were detected cellulase activity by carboxymethylcellulase activity analysis. It was found that cellulase producing activity in the range from 0.0509-0.0702 U/ml. The bacterial isolate no.M008 showed the highest of cellulose producing activity at 0.0702 ± 0.0027 U/ml, respectively. In this case, the bacteria isolate M008 was selected to study lignocellulose decomposition within microcosm. The results indicated that oil palm empty fruit bunch is the most decomposed at 35°C for 30 days, then, sugarcane leaves and rice straw, respectively. It could be identified with DNA sequencing analysis at 16S rDNA gene as *Enterobacter* sp. at 99% similarity.

Keywords: Lignocellulose , Cellulase producing bacteria, Cellulose, Cellulase activity

คำนำ

วัสดุ lignocellulose เป็นเศษวัสดุอินทรีย์ที่ได้มาจากวัสดุหลากหลายประเภท เช่น ของเหลือใช้ทางการเกษตร อุตสาหกรรมเกษตร และป่าไม้ ซึ่งวัสดุเหล่านี้ประกอบไปด้วย เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) โดยมีสัดส่วนของแต่ละองค์ประกอบในปริมาณที่แตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดและอายุของเศษวัสดุ ทั้งนี้เซลลูโลสถือเป็นองค์ประกอบหลักที่พบในพืชและเศษวัสดุที่ได้จากพืชมากที่สุด โดยในผนังเซลล์ของพืชชั้นสูงทุกชนิดจะพบเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 40-60 และมีน้ำตาลกลูโคส (glucose) เป็นหน่วยย่อย ประมาณ 1,000-10,000 โมเลกุล ต่อกันเป็นโพลิเมอร์ (polymer) สายยาว และเชื่อมกันด้วยพันธะ β -1,4-glycosidic เรียงตัวเป็นเส้นตรง ไม่มีแขนงย่อย มีสูตรเคมีทั่วไป คือ $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$ (นคร, 2553) นอกจากนี้เซลลูโลสส่วนใหญ่อยู่รวมกันกับเฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบและหนาแน่น โดยมีลิกนินเป็นองค์ประกอบที่อยู่นอกสุดบริเวณเปลือกหรือผิวของลำต้น มีความแข็งแรงทนทานต่อการย่อยสลายทั้งในกรดและด่างแก่ และป้องกันเซลลูโลสที่อยู่ภายในลำต้น

ในธรรมชาติองค์ประกอบของพืชเหล่านี้สามารถถูกย่อยสลายได้โดยอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ (แบคทีเรีย รา และแอคติโนมัยซีท) ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) เรียกจุลินทรีย์เหล่านี้ว่า จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase producing microorganism) เอนไซม์เซลลูเลสเป็นกลุ่มเอนไซม์เชิงซ้อนที่ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด คือ เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) และเซลโลไบเอส (cellulobiose) (Juturu and Wu, 2014) โดยเอนไซม์เอนโดกลูคาเนสจะย่อยเซลลูโลสที่เป็นโครงสร้างผลึกให้เป็นเซลลูโลสสายโซ่ จากนั้นเอนไซม์เอกโซกลูคาเนสจะย่อยเซลลูโลสสายโซ่ให้เป็นเซลลูโลส และเอนไซม์เซลโลไบเอสจะย่อยเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวนี้จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และความเป็นกรด-ด่างในช่วงพีช 4 ถึง 8 (pH 4-8) (Lu and Mosier, 2007) โดยจุลินทรีย์จะปลดปล่อยเอนไซม์เซลลูเลสออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) เพื่อย่อยสลายองค์ประกอบของพืชให้กลายเป็นอินทรีย์วัตถุที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ และใช้อินทรีย์วัตถุเป็นแหล่งพลังงานเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ โดยปริมาณของจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นมากเมื่อเกิดการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสในสภาพที่เหมาะสม รวมทั้งมีการระบายอากาศ อุณหภูมิ และแหล่งอาหารที่เพียงพอ (พรเทพ, 2538) แบคทีเรียมีความสามารถในการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสได้เป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากมีความหลากหลายของชนิดแบคทีเรียและมีการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วในสภาวะที่มีออกซิเจน (Mawadza et al., 2000) เช่น *Cellulomonas* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Cellulomonas flavigena*., *Clostridium* sp. และ *Vibrio* sp. (พรเทพ, 2538) ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ไม่อันตรายต่อสิ่งแวดล้อม เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงในการทำปฏิกิริยาสูง ทั้งนี้สามารถพบแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จากสิ่งแวดล้อมที่

หลากหลาย ทั้งจากสิ่งมีชีวิต เศษวัสดุอินทรีย์ และในดินทั่วไป ตัวอย่างเช่น กุสุมาวดี (2557) คัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดินใต้กองผักตบชวาที่เน่าเปื่อยทับถมกัน สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ได้จำนวน 37 ไอโซเลต โดยวัฏจักรเอนไซม์ได้สูงสุด 0.209 หน่วยต่อมิลลิเมตร เช่นเดียวกับการศึกษาของ Verma *et al.* (2012) สามารถคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดินในประเทศอินเดียได้คือ *Bacillus subtilis* และวัฏจักรเอนไซม์ได้สูงสุด 20 หน่วยต่อมิลลิเมตร Yang *et al.* (2014) พบแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* BY-2 คัดแยกได้จากลำไ้หม ซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 3.56 หน่วยต่อมิลลิเมตร เช่นเดียวกับ รัชรา และคณะ (2555) พบแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจำนวน 20 ไอโซเลต จากกระเพาะวัว โดย *Bacillus subtilis* B4 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงถึง 141 หน่วยต่อมิลลิเมตร

จากความสามารถในการย่อยสลายเศษวัสดุอินทรีย์ต่างๆ ในธรรมชาติของจุลินทรีย์เหล่านี้ จะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสามารถนำมาใช้ในการลดปริมาณวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรมได้นอกจากจะเป็นการลดขยะทางการเกษตรแล้ว ยังสามารถนำมาใช้ในการเพิ่มการประโยชน์และเพิ่มมูลค่าของสิ่งเหลือใช้ต่างๆ เหล่านี้ด้วยการทำเป็นปุ๋ยอินทรีย์อีกด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีศักยภาพสูงต่อการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และนำแบคทีเรียดังกล่าวมาใช้ในการเร่งระยะเวลาในการย่อยสลายของเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตปุ๋ยหมักหรือพลังงานทดแทน เพื่อเป็นการใช้ประโยชน์เศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้อย่างมีประสิทธิภาพ ยั่งยืน และปลอดภัย

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เก็บตัวอย่างสำหรับคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดินบริเวณรอบรากอ้อยที่ระดับความลึก 1-15 เซนติเมตร และเศษวัสดุทางการเกษตรอื่นๆ (ขานอ้อย ทะลายปาล์ม และก้อนเห็ด) จากนั้นนำตัวอย่างมาคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเทคนิค Dilution plating method ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} - 10^{-5} บนอาหาร carboxyl methyl cellulose agar (CMC) (CMC 5.0 กรัม, yeast extract 1.0 กรัม, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0 กรัม และ agar 15.0 กรัม) pH 7.0 (Zucker and Hankin, 1970) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการนับจำนวนแบคทีเรียและคัดเลือกโคโลนีที่สมบูรณ์มาแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และเก็บรักษาไว้เป็น stock culture

2. การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ด้วยวิธี Congo red (Hendricks *et al.*, 1995) ทำโดยเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว CMC เขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูผลการละลายเซลล์แบคทีเรีย ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารแข็ง CMC ที่เจาะหลุมไว้แล้วด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเท Congo red ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ลงบนอาหารแข็ง CMC นาน 15 นาที ล้างสีออกด้วย NaCl ความเข้มข้น 1 นอร์มอล วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสที่ปรากฏ และคำนวณความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส (Hydrolytic capacity; HC) จากอัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เพื่อแบ่งกลุ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเบื้องต้น

3. การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

นำแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่คัดเลือกจากค่า HC มาเลี้ยงในอาหารเหลว CMC ตามสภาวะข้างต้น หลังจากนั้นนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการย้อมสีแบบแกรม (Loynachan, 2002) เพื่อศึกษารูปร่างและการติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หลังจากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียที่ได้ข้างต้น มาตรวจสอบการใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน และการต้านทานสารปฏิชีวนะ โดยนำเซลล์แบคทีเรีย ปริมาตร 160 ไมโครลิตร

ย้ายไปไว้ใน 96 well plate จากนั้นใช้ replicator pump ป้อนสารละลายเซลล์แบคทีเรียจาก 96 well plate ลงบนอาหารแข็ง basal medium (ดัดแปลงจาก Basu and Bose, 1950) ที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่างกัน (แหล่งคาร์บอน 4 ชนิด: sucrose, glucose, starch และ glycerol ; แหล่งไนโตรเจน 4 ชนิด: urea, NH_4Cl , NH_4NO_3 และ peptone) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง basal medium

สำหรับการทดสอบความสามารถการต้านทานสารปฏิชีวนะ 6 ชนิด ทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน คือ Penicillin, Streptomycin, Cycloheximide (ความเข้มข้น 5.0 และ 10.0 ppb) Tetracycline (ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 ppb) Nalidixic acid (ความเข้มข้น 1.0, 2.5 และ 5.0 ppb) และ Chloramphenicol (ความเข้มข้น 1.0, 5.0 และ 10.0 ppb) และทดสอบด้วยเทคนิค MIC (Minimum inhibitory concentration) โดยเตรียมเซลล์แบคทีเรียเช่นเดียวกับการทดสอบแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน จากนั้นนำเซลล์ตั้งต้นที่ได้มาทำการเจือจางเซลล์แบคทีเรียด้วยซีเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ให้มีระดับการเจือจางที่ 10^0 , 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} และ 10^{-8} ใน 96 well plate จากนั้นนำ replicator pump ป้อนสารละลายเซลล์แบคทีเรียลงบนอาหาร CMC agar ที่มีสารปฏิชีวนะแต่ละชนิดในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง CMC

บันทึกข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา การใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน และการต้านทานสารปฏิชีวนะเป็นตัวเลขทางคณิตศาสตร์เพื่อทำการวิเคราะห์ความหลากหลายและจัดกลุ่มแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วย Bionumeric program โดยการวิเคราะห์ UPGMA simple matching binary coefficient

4. การศึกษากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสประสิทธิภาพสูง

นำแบคทีเรียตัวแทนมาเลี้ยงในอาหารเหลว CMC เซย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใส (supernatant) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับซีเดียมซีเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (pH 4.8) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร และนำกระดาษกรอง Whatman no.1 ขนาด 1×6 เซนติเมตร ใส่ลงหลอดทดลองทันที บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที (Gupta *et al.*, 2012) จากนั้นวัดกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสที่เกิดขึ้นจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ ด้วยวิธี Dinitrosalicylic Acid Method (DNS method) (Miller, 1959) โดยเติมสารละลาย Dinitrosalicylic acid (DNS) ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการแช่น้ำแข็ง เป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าความดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น T60 ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร และคำนวณกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส โดยหน่วยกิจกรรมเอนไซม์ Filter paper unit (FPU) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยกระดาษกรอง Whatman no.1 แล้วปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่ง 1 ไมโครโมลของกลูโคส ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด ทำการระบุชนิดของแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสประสิทธิภาพสูงด้วยวิธี DNA Sequencing โดยเตรียมโคลนเดี่ยวของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง NA และนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ Macrogen (Seoul, Korea) จากนั้นนำผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูลของ Genbank ด้วยโปรแกรม Blast search (Basic Local Alignment Search Tools) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

5. การย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสโดยแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสประสิทธิภาพสูง

ทดสอบการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสของแบคทีเรียตัวแทนที่คัดเลือกมาโดยวิธีการหมักแบบแห้งที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วัน เตรียมวัสดุลิกโนเซลลูโลส (ทะลายปาล์ม ใบอ้อย และฟางข้าว) โดยการสับเป็นชิ้นขนาด 3 – 4 เซนติเมตร นำเศษวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่เตรียมใส่ลงขวดปากกว้างปริมาตร 30 กรัม จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) จำนวน 2 ครั้ง และทิ้งไว้ให้เย็น นำเซลล์แบคทีเรียตัวแทน ($\text{OD}_{600} = 1.0$)

ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มเหียงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำตะกอนเซลล์มาเจือจางด้วยไซโตเมตริกซ์เทรฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ให้ได้เซลล์แบคทีเรียจำนวน 10^7 CFU ต่อ มิลลิลิตร นำแบคทีเรียที่เตรียมได้ไปคลุกเคล้ากับเศษวัสดุที่เตรียมไว้ข้างต้น ใส่ในขวดและปิดฝาด้วยผ้าขาวบาง บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 เดือน เก็บตัวอย่างเศษวัสดุทุกสัปดาห์เพื่อวิเคราะห์อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่แบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสตัวแทน

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

คัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง CMC จากเศษวัสดุต่างๆ ได้จำนวนแบคทีเรียแตกต่างกัน โดยชานอ้อยเป็นเศษวัสดุที่มีจำนวนแบคทีเรียมากที่สุด คือ 21.2×10^6 CFU/g รองลงมาคือ ก้อนเห็ด ดิน และปาล์มน้ำมัน พบจำนวน 15.3×10^5 , 70.3×10^4 และ 40.5×10^4 CFU/g ตามลำดับ ทั้งนี้ อาจเป็นผลมาจากเศษวัสดุประเภทชานอ้อยที่นำมาใช้ในการคัดแยกนี้เป็นเศษวัสดุที่ผ่านการหมักมาแล้ว โดยมีลักษณะวัสดุค่อนข้างเปียกชุ่มจนเกือบเป็นผงละเอียด แสดงให้เห็นว่าชานอ้อยที่นำมาใช้ในการคัดแยกเป็นเศษวัสดุที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนในสัดส่วนที่จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้อย่างเหมาะสม โดยอัตราส่วน C/N ที่เพียงพอกับความต้องการของจุลินทรีย์เพื่อเป็นแหล่งพลังงานและใช้สำหรับการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ อยู่ในช่วงประมาณ 20/1 ถึง 30/1 (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2555) ดังนั้นจึงทำให้พบจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้จากชานอ้อยเป็นจำนวนมาก และส่งผลต่อการย่อยสลายที่เกิดขึ้นอีกด้วย ในขณะที่เศษวัสดุทางการเกษตรอื่นๆ ที่นำมาใช้ในการคัดแยกนั้นเป็นเศษวัสดุที่ผ่านกระบวนการหมักเป็นระยะเวลาสั้นและยังคงมองเห็นลักษณะเดิมอยู่ จึงน่าจะมีอัตราส่วน C/N ที่มากกว่า 30/1 ซึ่งเป็นผลจากการมีองค์ประกอบที่ย่อยสลายยากสูง ทำให้พบจำนวนแบคทีเรียในปริมาณที่น้อย และมีเพียงแบคทีเรียบางกลุ่มที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลาย ส่งผลต่ออัตราการย่อยสลายที่เป็นไปอย่างช้าๆ (พรเทพ, 2538) ทั้งนี้อัตราส่วน C/N เป็นดัชนีชี้บ่งอัตราการย่อยสลายของอินทรีย์วัตถุของแบคทีเรีย สอดคล้องกับการศึกษาของ Juturu and Wu (2014) ที่รายงานว่าแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสทั่วไปจะเจริญเติบโตบนอินทรีย์วัตถุ (Organic matter) หรือเศษซากพืชที่ตายและย่อยสลายแล้ว อย่างไรก็ตามความสามารถในการย่อยสลายเศษวัสดุนั้นไม่ได้ขึ้นกับจำนวนของแบคทีเรียเพียงอย่างเดียวแต่ยังขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพการทำงานของแบคทีเรียและชนิดด้วย ทั้งนี้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่คัดแยกได้ข้างต้นจะนำไปทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสอีกครั้ง โดยพิจารณาคัดเลือกแบคทีเรียจากลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีลักษณะของโคโลนีที่สมบูรณ์และแตกต่างกันได้ทั้งหมด 100 ไอโซเลต

2. การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยวิธี Congo red

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จำนวน 100 ไอโซเลต มาทดสอบการย่อยสลายเซลลูเลสด้วยวิธี Congo red สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่ปรากฏไฮโดรไลติกโคโลนีหรือมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จำนวน 73 ไอโซเลต โดยแบ่งออกเป็น 3 ระดับ ตามประสิทธิภาพในการย่อยสลายโดยพิจารณาจากค่า HC (Hydrolytic capacity) คือ ระดับที่ 1 ประสิทธิภาพต่ำ (HC 0-1.4) ระดับที่ 2 ประสิทธิภาพปานกลาง (HC 1.5-2.9) และระดับที่ 3 ประสิทธิภาพสูง (HC ≥ 3) โดยพบแบคทีเรียจำนวน 39, 36 และ 25 ไอโซเลต ตามลำดับ (คิดเป็นร้อยละ 39, 36 และ 25 ของแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่คัดเลือกได้ทั้งหมด) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ ทิพย์นา และคณะ (2556) ที่คัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดิน พิลเดอร์เค้ก และน้ำกากส่าด้วยวิธี Congo red และพบแบคทีเรียที่มีค่า HC มากกว่า 2.5 จำนวน 26 ไอโซเลต และ สัมฤทธิ์ (2554) คัดแยกแบคทีเรียจากดินบริเวณรอบบ่อน้ำทิ้งของโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม พบแบคทีเรียทั้งหมด 66 ไอโซเลต ซึ่งคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงมีค่า HC มากกว่า 2.5 ได้จำนวน 13 ไอโซเลต ทั้งนี้การวัดประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสด้วยวิธี Congo red และคำนวณ

เป็นประสิทธิภาพการย่อยสลาย (HC) ของแบคทีเรียนี้เป็นวิธีที่สามารถช่วยในการคัดเลือกแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็วและราคาไม่แพง เนื่องจากสามารถสังเกตการเกิดโซนใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งเป็นผลมาจากสาร CMC ในอาหารแข็งสามารถทำปฏิกิริยากับสี Congo red ที่ใช้ในการทดสอบ ซึ่งสาร CMC จะดูดซึมสีแดงของ Congo red ทำให้บริเวณที่มีสาร CMC ปรากฏเป็นสีแดง ส่วนบริเวณที่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสนั้น สาร CMC จะถูกย่อยและทำให้บริเวณดังกล่าวนี้ไม่เกิดการดูดซึมสีของ Congo red จึงปรากฏเห็นเป็นโซนใส (Hanne and Krause, 2014) จะเห็นได้ว่าการประเมินด้วยวิธี Congo red เป็นเทคนิคที่สามารถใช้ในการวัดประสิทธิภาพของแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้อย่างเหมาะสม

3. การศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เมื่อนำแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่คัดเลือกได้จำนวน 100 ไอโซเลต มาศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย พบแบคทีเรียส่วนใหญ่ร้อยละ 96 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก และรูปร่างท่อนร้อยละ 86 โดยแบคทีเรียเหล่านี้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนได้ต่างกัน กล่าวคือแบคทีเรียมากกว่าร้อยละ 60 สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ทั้ง 4 ชนิด (sucrose, glucose, starch และ glycerol) ทั้งนี้ starch เป็นแหล่งคาร์บอนที่แบคทีเรียสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานได้มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 79 ในขณะที่การใช้แหล่งไนโตรเจนของแบคทีเรียส่วนใหญ่จะสามารถใช้ peptone ได้มากกว่าร้อยละ 81 แต่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนอื่นๆ ที่ทดสอบ (urea, NH_4Cl และ NH_4NO_3) ได้เพียงแค่น้อยกว่าร้อยละ 40 ทั้งนี้แบคทีเรียแต่ละชนิดสามารถใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนได้ต่างกันซึ่งสามารถใช้เป็นส่วนหนึ่งในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วย เช่น *Pediodoccus* sp. R16 สามารถใช้กลูโคสและเพปโตเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน (ธิดา, 2557) *Pseudomonas fluorescens* P-6 สามารถใช้สารสกัดจากยีสต์และซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน และสารสกัดจากมอลต์และยูเรียแหล่งไนโตรเจนได้ (Peigham et al., 2007) นอกจากนี้ *Rhodopseudomonas palustris* และ *Rhodobacter capsulatus* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้จากทางนม และใช้แหล่งไนโตรเจนได้จาก กลูตามีน ซัลเฟต และสารสกัดจากยีสต์ได้อีกด้วย (Oliveira et al., 2014)

สำหรับความสามารถในการต้านทานสารปฏิชีวนะ พบแบคทีเรียที่ทดสอบสามารถต้านทานสารปฏิชีวนะได้ทั้ง 6 ชนิด (Penicillin, Streptomycin, Tetracycline, Nalidixic acid, Cycloheximide และ Chloramphenicol) โดยระดับความเจือจางของเซลล์แบคทีเรียที่ต่างกันมีผลต่อระดับความสามารถในการต้านทานสารปฏิชีวนะ กล่าวคือระดับความเจือจางของแบคทีเรียที่เพิ่มมากขึ้นจะทำให้ความสามารถในการต้านทานสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียลดลง จากการทดสอบพบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ร้อยละ 88 สามารถต้านทานสารปฏิชีวนะสูงสุดที่ระดับความเจือจาง 100 เท่า โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่มากกว่าร้อยละ 60 สามารถต้านทานสารปฏิชีวนะได้ดีในกลุ่ม Streptomycin ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด 10.0 ppb ต้านทาน Chloramphenicol และ Cycloheximide ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด 5.0 ppb และต้านทาน Tetracycline และ Nalidixic acid ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด 1.0 ppb สำหรับ Penicillin ที่ระดับความเข้มข้น 10.0 ppb แบคทีเรียสามารถต้านทานได้น้อยเพียงร้อยละ 49 ทั้งนี้สารปฏิชีวนะแต่ละชนิดมีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันซึ่งมีผลต่อความสามารถในการต้านทานของแบคทีเรียที่ต่างกันยกตัวอย่างเช่น Tetracycline มีผลต่อการสังเคราะห์โปรตีนหรือเอนไซม์ของเซลล์แบคทีเรีย โดยจับที่ S4 และ S8 ของหน่วยย่อยเล็ก (30S Subunit) ของไรโบโซมทำให้ไม่มีการสร้างโปรตีนและยับยั้งการเจริญเติบโต (มลินี, 2541) ในขณะที่ Penicillin สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก โดยยับยั้งการสร้างสารเปปติโดไกลแคนซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้การสร้างผนังเซลล์ในแบคทีเรียหยุดชะงัก และไม่สามารถเจริญเติบโตหรือแพร่พันธุ์ได้ (วีรวรรณ, 2549)

4. การคัดเลือกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสตัวแทน

การคัดเลือกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสตัวแทนที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสระดับที่ 3 ($\text{HC} > 3$) จำนวน 25 ไอโซเลต และสร้าง Dendrogram (แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์) จากข้อมูลลักษณะ

สัณฐานวิทยา และชีวเคมี (แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และความสามารถในการต้านทานสารปฏิชีวนะ) จากการวิเคราะห์แผนภูมิสามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียได้ 2 clusters (Figure 1) คือ cluster I เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโตได้น้อยกว่าหรือเท่ากับ 3 แหล่ง และสามารถต้านทานสารปฏิชีวนะได้น้อยหรือไม่มีความสามารถในการต้านทานสารปฏิชีวนะได้

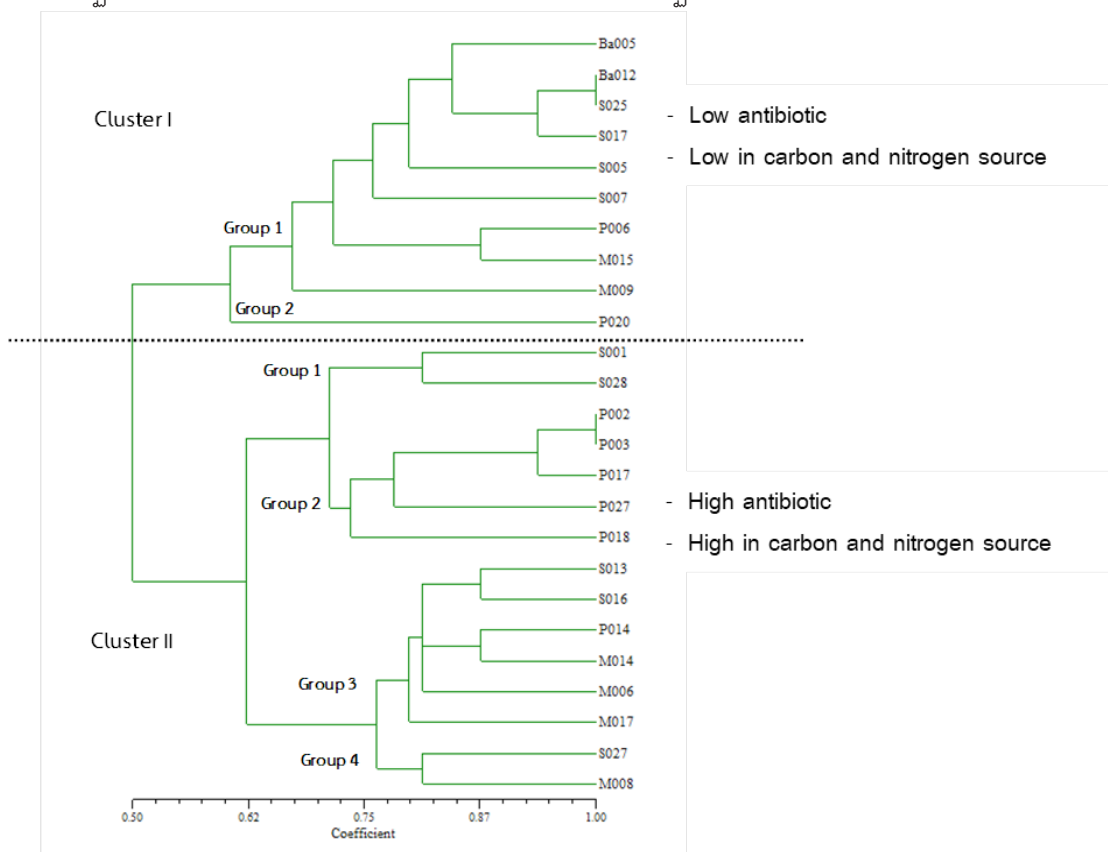


Figure 1 Dendrogram analysis showing the relatedness of cellulase producing bacteria by morphology, biochemistry and antibiotic-resistant data.

โดยมีแบคทีเรียจำนวน 10 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 40 ของแบคทีเรียตัวแทนทั้งหมด (25 ไอโซเลต) สามารถแบ่งกลุ่มย่อยได้ 3 กลุ่ม ดังนี้

Group 1 เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนได้ และไม่มีความสามารถต้านทานสารปฏิชีวนะ

Group 2 เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ 1 แหล่ง คือ Starch และแหล่งไนโตรเจนได้ 2 แหล่ง คือ NH_4Cl และ Peptone โดยสามารถต้านทาน Penicillin เพียงชนิดเดียว

Group 3 เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้อย่างน้อย 3 ชนิด และแหล่งไนโตรเจนอย่างน้อย 1 ชนิด และไม่มีความสามารถในการต้านทานสารปฏิชีวนะ

ในขณะที่ cluster II เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโตได้มากกว่าหรือเท่ากับ 3 แหล่ง และสามารถต้านทานสารปฏิชีวนะได้มาก โดยมีแบคทีเรียจำนวน 15 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 60 ของแบคทีเรียตัวแทนทั้งหมด (25 ไอโซเลต) ซึ่งแบ่งกลุ่มย่อยได้ 4 กลุ่ม ดังนี้

Group 1 เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนได้มากกว่า 3 แหล่ง และมีความสามารถต้านทานสารปฏิชีวนะ 3 ชนิด คือ Chloramphenicol Tetracycline และ Cycloheximide

Group 2 เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนได้ทุกแหล่ง และมีความสามารถในการต้านทานสารปฏิชีวนะได้อย่างน้อย 3 ชนิด

Group 3 เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ทุกแหล่ง สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้อย่างน้อย 3 แหล่ง และมีความสามารถในการต้านทานสารปฏิชีวนะได้ 2 ชนิด

Group 4 เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้ทุกแหล่ง สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนได้อย่างน้อย 3 แหล่ง และมีความสามารถในการต้านทานสารปฏิชีวนะได้มากกว่า 2 ชนิด

จากผลการจัดกลุ่ม Dendrogram (แผนภูมิแสดงความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์) ทำให้สามารถคัดเลือกแบคทีเรียตัวแทนจากการจัดกลุ่มดังกล่าวนี้ได้จำนวน 23 ไอโซเลต

5. การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสตัวแทน

การวัดกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียตัวแทนจำนวน 23 ไอโซเลต มีกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส อยู่ในช่วง 0.0702-0.0274 ยูนิตต่อมิลลิเมตร (Figure 2) โดยแบคทีเรียมากกว่าร้อยละ 83 (18 ไอโซเลต) มีกิจกรรมเอนไซม์ต่ำกว่า 0.04 ยูนิตต่อมิลลิเมตร มีเพียง 5 ไอโซเลต หรือคิดเป็นร้อยละ 17 ที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงกว่า 0.04 ยูนิตต่อมิลลิเมตร ประกอบด้วย P027, M006, M008, M015 และ M017 โดยไอโซเลต M008 เป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์สูงสุด คือ 0.0702 ± 0.0027 ยูนิตต่อมิลลิเมตร รองลงมา คือ ไอโซเลต M017 มีกิจกรรมเอนไซม์ 0.0565 ± 0.0065 ยูนิตต่อมิลลิเมตร ส่วนไอโซเลต P027 และ M015 มีกิจกรรมเอนไซม์ใกล้เคียงกัน คือ 0.0542 ± 0.0193 และ 0.0509 ± 0.0040 ยูนิตต่อมิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งกิจกรรมเอนไซม์ที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Saptarini and Indriyati (2014) ที่คัดแยกแบคทีเรียจากซังข้าวโพด พบกิจกรรมเอนไซม์ 0.021 ยูนิตต่อมิลลิเมตร และงานวิจัยของ Ariffin *et al.* (2006) คัดแยกแบคทีเรียจากทะเลสาบปาล์ม พบกิจกรรมเอนไซม์ที่ 0.079 ยูนิตต่อมิลลิเมตร อย่างไรก็ตาม การวัดกิจกรรมของเอนไซม์จากการทดลองข้างต้นเห็นได้ว่ากิจกรรมเอนไซม์ที่วิเคราะห์ได้มีเพียงแค่ 0.070 ยูนิตต่อมิลลิเมตร ซึ่งถือว่ากิจกรรมเอนไซม์อยู่ในระดับต่ำเมื่อเทียบกับงานวิจัยอื่น เช่น Sreedevi *et al.* (2014) คัดแยกแบคทีเรียจากซากพืชบริเวณใกล้แหล่งน้ำได้แบคทีเรียที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงจำนวน 3 สายพันธุ์ คือ *Achromobacter xylosoxidans* BSS4, *Bacillus* sp. BSS3 และ *Pseudomonas* sp. BSS2 โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ 68.37, 104.68 และ 91.28 ยูนิตต่อมิลลิเมตร ตามลำดับ Shajahan *et al.* (2016) พบกิจกรรมเอนไซม์ของ *Bacillus licheniformis* มีกิจกรรมสูงสุด 42.99 ยูนิตต่อมิลลิเมตร ทั้งนี้กิจกรรมเอนไซม์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้นั้นอาจต่างกันตามชนิดและสภาพแวดล้อมดั้งเดิมของแหล่งที่มาของแบคทีเรียที่คัดแยก เนื่องจากแหล่งที่มาหรือชนิดของเศษวัสดุที่ทำการคัดแยกแบคทีเรียย่อมมีผลต่อการดำรงชีวิตของแบคทีเรีย กล่าวคือแหล่งที่มาเป็นทั้งที่อยู่อาศัย แหล่งอาหารและแหล่งพลังงานของแบคทีเรีย อีกทั้งสภาพแวดล้อมของแบคทีเรียที่ดำรงชีวิตขณะนั้นย่อมมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแต่ละชนิดที่ต่างกัน จึงส่งผลต่อการคัดแยกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพได้ต่างกัน นอกจากนี้อาหารที่ใช้สำหรับการคัดแยกและสภาวะในการบ่มเชื้อ ได้แก่ พีเอช อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน และอื่นๆ สามารถส่งผลต่อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่คัดแยกได้ เช่น พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมของแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสส่วนใหญ่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในอาหารที่มีพีเอชในช่วงกว้างที่พีเอช 4.8-8.0 และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงต่างกันขึ้นอยู่กัชนิด และสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ทั้งนี้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์เซลลูเลสสามารถทำงานได้ดี (Lu and Mosier, 2007) ตัวอย่างเช่น Nandimath *et al.* (2016) คัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดินสวนประเทศอินเดีย ได้แบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลส 2 สายพันธุ์ คือ *Pseudomonas* sp. และ *Bacillus* sp. โดยอาหารพีเอช 5.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส นอกจากนี้ Fatokun *et al.* (2016) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจาก *Streptomyces*

พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีในอาหารพีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

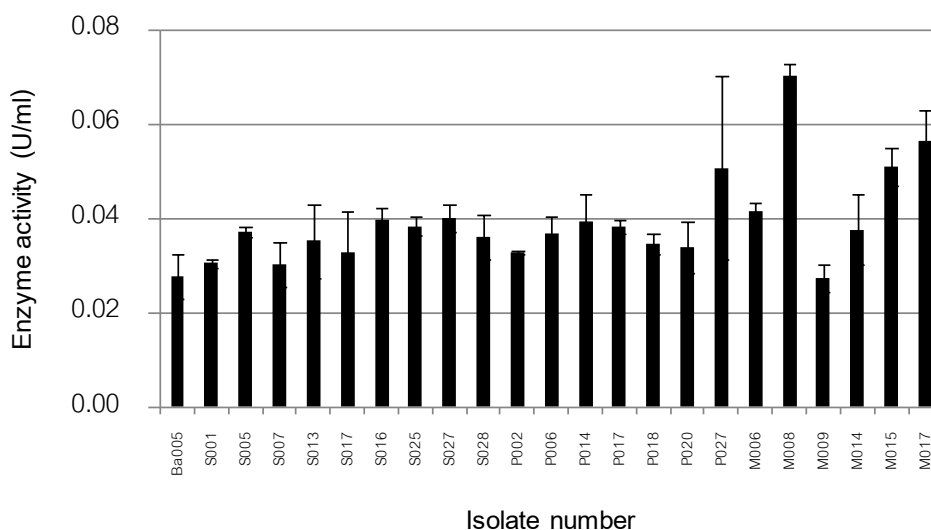


Figure 2 Cellulase enzymes activity of bacteria at 35 °C and pH 7.0.

6. การย่อยสลายวัสดุกลไกในเซลลูโลสโดยแบคทีเรีย

จากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ข้างต้นจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียไฮโซเลต M008 น่าจะเป็นตัวแทนที่มีความเหมาะสมสำหรับการทดสอบการย่อยสลายเศษวัสดุอินทรีย์นี้ โดยเมื่อระบุชนิดของแบคทีเรียจากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Blast search เพื่อบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียในระบบฐานข้อมูล GeneBank พบว่าแบคทีเรียไฮโซเลต M008 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับลำดับ *Enterobacter* sp. BAB-3164 ที่ระดับความคล้ายคลึงร้อยละ 99 ซึ่งหลังจากทดสอบการย่อยสลายวัสดุกลไกในเซลลูโลสด้วยแบคทีเรียไฮโซเลต M008 พบว่าสามารถย่อยสลายฟางข้าว ใบอ้อย และทะลายปาล์ม ได้ต่างกันโดยพิจารณาจากลักษณะทางกายภาพของวัสดุกลไกในเซลลูโลสหลังการย่อยสลายเป็นเวลา 1 เดือน จะเห็นได้ว่าเศษวัสดุทุกชนิดจะมีสีเข้มขึ้นเป็นสีน้ำตาลเข้มหรือน้ำตาลเข้มปนดำ และวัสดุมีความอ่อนนุ่ม เปื่อยยุ่ย ขาดง่าย เมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุก่อนการย่อยสลาย โดยเมื่อพิจารณาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) ซึ่งเป็นดัชนีบ่งชี้อัตราการย่อยสลายของอินทรีย์วัตถุต่างๆ (คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2555) พบว่าฟางข้าว ใบอ้อย และทะลายปาล์ม ก่อนการย่อยสลายมีอัตราส่วน C/N เท่ากับ 88/1, 107/1 และ 122/1 ตามลำดับ และหลังการย่อยสลายด้วยแบคทีเรียไฮโซเลต M008 เป็นเวลา 1 เดือน อัตราส่วน C/N จะลดลงอยู่ที่ 63/1, 50/1 และ 38/1 ตามลำดับ (Table 1) ซึ่งวัสดุกลไกในเซลลูโลสทุกชนิดหลังการย่อยสลายจะมีอัตราส่วน C/N แคลลง ซึ่งเป็นผลมาจากแบคทีเรียมีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสที่อยู่ในองค์ประกอบของพืช อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าทะลายปาล์มเป็นเศษวัสดุที่มีอัตราส่วน C/N แคลบที่สุด เนื่องจากทะลายปาล์มที่นำมาทดลองมีเส้นใยปาล์มขนาดเล็กเรียงตัวกันจำนวนมากเป็นองค์ประกอบอยู่ภายใต้เปลือกของทะลายปาล์มจึงสามารถย่อยสลายได้รวดเร็วแม้ว่าจะมีอัตราส่วน C/N สูงสุด ในขณะที่ใบอ้อยและฟางข้าวมีขนาด 3-4 เซนติเมตร จึงย่อยสลายได้ช้ากว่า และเมื่อประเมินเป็นประสิทธิภาพการย่อยสลายด้วยแบคทีเรียไฮโซเลต M008 จากอัตราส่วน C/N ของวัสดุกลไกในเซลลูโลสทุกชนิด จะเห็นได้ว่าทะลายปาล์มสามารถย่อยสลายได้ดีสุด รองลงมาคือ

ใบอ้อย และฟางข้าว คิดเป็นร้อยละของอัตราส่วน C/N ที่ลดลงเท่ากับ 65, 47 และ 28 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเศษวัสดุควบคุมที่ไม่ใส่แบคทีเรียไฮโซเลต M008 อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลส เช่น อุณหภูมิ ความชื้น พีเอช เป็นต้น อาจช่วยเพิ่มอัตราเร็วของการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสได้ ตัวอย่างเช่นการศึกษาของ ภัทรา และคณะ (2552) ศึกษาการย่อยสลายเศษใบพืชสีเขียวและใบพืชที่แห้งแล้ว (สัปปะรด) จากใบไม้และเศษผักเหลือทิ้งจากตลาด ในสัดส่วน 4 ต่อ 1 โดยใช้กากน้ำตาลในการปรับความชื้น และใช้เวลาในการย่อยสลาย 30 วัน พบว่าอุณหภูมิการย่อยสลายสูงขึ้นจาก 30 ถึง 56 องศาเซลเซียส ความชื้นร้อยละ 60 พีเอชเท่ากับ 7.9 และสามารถลดอัตราส่วน C/N ได้เท่ากับ 15/1

Table 1 Ratio of carbon to nitrogen from lignocellulose material before/after decomposition.

Lignocellulose	C/N ratio		
	Before	After	
		control	innoculation
Rice straw	88/1	88/1	63/1
Sugarcane leaves	107/1	94/1	50/1
Oil palm empty fruit bunches	122/1	106/1	38/1

สรุปผลการทดลอง

การคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดินบริเวณรอบรากอ้อยและเศษวัสดุทางการเกษตร (ใบอ้อย ชานอ้อย ฟางข้าว และทะลายปาล์ม) สามารถคัดแยกแบคทีเรียได้จำนวน 100 ไฮโซเลต และมีแบคทีเรียจำนวน 25 ไฮโซเลตที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงเมื่อพิจารณาจากโซนไฮโดรไลติกและค่า HC มากกว่า 3 โดยแบคทีเรียตัวหนึ่งที่คัดเลือกได้มีความหลากหลายสูง สามารถใช้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนได้หลากหลาย แต่ส่วนใหญ่ใช้ starch เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ peptone เป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้แบคทีเรียมากกว่าร้อยละ 50 สามารถต้านทานสารปฏิชีวนะได้ทุกชนิดที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทำการทดสอบ โดยความสามารถในการต้านทานจะลดลงเมื่อระดับการเจือจางของเซลล์แบคทีเรียเพิ่มขึ้น และเมื่อวัดประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์พบไฮโซเลต M008 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 0.0702 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งระบุชนิดได้เป็น *Enterobacter* sp. ซึ่งถึงแม้จะวัดกิจกรรมเอนไซม์ได้ไม่สูงมากนัก แต่แบคทีเรีย M008 ก็สามารถย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสได้ทุกประเภทที่ทำการศึกษาในสภาวะที่ทดสอบ โดยสามารถย่อยสลายทะลายปาล์มได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ใบอ้อย และฟางข้าว ตามลำดับ ทั้งนี้หากมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียเพื่อใช้สำหรับการย่อยสลายก็น่าจะช่วยเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสให้สูงขึ้นและเร่งอัตราการย่อยสลายของวัสดุได้ซึ่งทำให้สามารถลดระยะเวลาในการย่อยสลายเศษวัสดุได้มากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สวพ. มก.) ประจำปีงบประมาณ 2559

เอกสารอ้างอิง

- กุสุมาวดี สุวานเจริญ. 2557. การใช้ประโยชน์จากผักตบชวาในการผลิตเซลลูโลสจากแบคทีเรียทนร้อน และการนำมาผลิตไบโอเอทานอล. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 11: 159-166.
- คณาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2555. คู่มือปฏิบัติการปฐพีวิทยาเบื้องต้นและวิทยาศาสตร์ทางดิน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 124 น.
- ทิพย์นา วรชัญญ์ โสภณ บุญสืบ และ นันทวัน ฤทธิ์เดช. 2556. การคัดแยกจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อกระตุ้นการงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L.) และข้าวโพดหวาน (*Zea mays* L. var. *saccharata*). วารสารวิทยาศาสตร์ มช. 41: 954-966.
- ธิดา ไชวงศ์ศรี. 2557. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตเบต้ากลูโคซิเดสจากอาหารหมักดอง. วารสารนเรศวรพะเยา. 7: 29-41.
- นคร ทิพย์วงศ์. 2553. วารสารเทคโนโลยีการแปลงสภาพชีวมวล. พิมพ์ครั้งที่ 1. สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี (ไทย-ญี่ปุ่น). กรุงเทพฯ. 240 น.
- ปราณี พัฒนพิพิธไศส. 2556. เอนไซม์เทคโนโลยี. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 271 น.
- พรเทพ ถนอมแก้ว. 2558. ภาวะเหมาะสมของการผลิตเซลลูโลสจากเชื้อราที่คัดแยกจากบริเวณปลูกปศุนาไรย์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 173 น.
- ภทวาร วงษ์พณธมมยุทธนา มานะกิจ และ อาณัฐ สาทันตะ. 2552. รายงานการวิจัยการหมักทำปุ๋ยชีวภาพจากกากน้ำตาล. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ภาคพายัพ. 54 น.
- มาลินี ลิ้มโคคา. 2541. การใช้ยาด้านจุลชีพในสัตว์ : สัตว์บกและสัตว์น้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 5. สำนักพิมพ์เจริญสินทวงศ์, กรุงเทพฯ. 680 น.
- รัชรา กาละวงศ์ สมบูรณ์ อนันตลาโภชัย และ มาโมรุ วากายามา. 2557. การทำให้บริสุทธิ์และสมบัติของเอนไซม์เซลลูโลสของแบคทีเรียที่แยกจากกระเพาะหมักของวัว. วารสารวิจัย มช. (ฉบับบัณฑิตศึกษา). 14: 34-46.
- วาทีณี คุณเผือก. 2554. การคัดแยก ศึกษาสมบัติและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสจากแบคทีเรียชอบความร้อนสูงในดิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 122 น.
- วีรวรรณ ลูวีระ. 2549. การดื้อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย. วารสารสงขลานครินทร์เวชสาร. 24: 453-459.
- สัญญา ศินจัญญ์ศักดิ์. 2554. การผลิตเอนไซม์เซลลูโลสและไซลันเนสโดยเชื้อ *Bacillus subtilis* และการใช้ประโยชน์ในการแยกน้ำมันจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 120 น.
- สุทธิศน์ ชัยกุล และภาวีย์ พวงจันทร์. 2559. ผลของจุลินทรีย์เร่งการย่อยสลายต่อสมบัติทางกายภาพ เคมี และการย่อยสลายที่สมบูรณ์ของปุ๋ยหมักจากใบลำไย. การประชุมวิชาการระดับชาติในเรศวรวิจัย ครั้งที่ 12: วิจัยและนวัตกรรมกับการพัฒนาประเทศ. มหาวิทยาลัยนเรศวร. หน้า 489-499.
- Anita, S., K.N. Aggarwal and A. Yadav. 2017. Isolation and screening of cellulose hydrolyzing bacteria from different ecological niches. J. Biosci Bioeng. 5: 7-13.
- Ariffin, H., N. Abdullah, M.S. Kalsom, Y. Shirai and M.A. Hassan. 2006. Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. International Journal of Engineering and Technology. 3: 47-53.
- Arusha, P.N., R.K. Kharat, G.S. Gupta and S.A. Kharat. 2016. Optimization of cellulase production for *Bacillus* sp. and *Pseudomonas* sp. soil isolates. Journal of Microbiology Research. 10: 410-419.
- Basu, S.N. and R.G. Bose. 1950. Factors affecting the fruiting of *Chaetomium* species. J. Gen Microbiol. 4: 132-140.
- Evelyn, N.F., U. Uchechukwu, N. wodo and I.A. Okoh. 2016. Classical optimization of cellulase and xylanase production by a marine *Streptomyces* sp. Journal of Fundamental and Applied Sciences. 286; doi:10.3390/app6100286.
- Ghose, T.K. 1987. Measurement of cellulase activities. Pure and applied chemistry. 59: 257-268.
- Guo, H., H. Chen, F. Lu, L. Andrew, B. Zheng, D. Jiang and W. Qin. 2017. Enzymes produced by biomass-degrading bacteria can efficiently hydrolyze algal cell walls and facilitate lipid extraction. Renewable Energy. 109: 195-210.
- Hanne R.J. and K. Krause. 2014. Cellulase activity screening using pure carboxymethylcellulose: Application to soluble cellulolytic samples and to plant tissue prints. Int J Mol Sci. 15: 830-838.
- Hendricks, C.W., J.D. Doyle and B. Hugley. 1995. A new solid medium for enumerating cellulose-utilizing bacteria in soil. Appl Environ Microbiol. 61: 2016-2019.
- Loynachan, T.E. 2002. Laboratory manual for agronomy: Soil microbial ecology. Iowa State University.
- Lu, Y. and N.S. Mosier. 2007. Biomimetic catalysis for hemicellulose hydrolysis in corn stover. Biotechnol Prog. 23: 116-23.

- Mawadza, C., H. Rahni, R. Zvauya and M. Bo. 2000. Purification and characterization of cellulases produced by two *Bacillus* strains. *Journal of Biotechnology*. 83: 177-187.
- Miller, G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Analytical Chemistry*. 31: 426-429.
- Nyi, S. and I. Wiwiek. 2014. Isolation of cellulolytic bacteria from termites with cellulose of cone cobs as carbon source. *Int J Pharm Pharm Sci*. 6: 0975-1491.
- Peighamy-Ashnaei S, A. Sharifi-Tehrani, M. Ahmadzadeh and K. Behboudi. 2007. Effect of carbon and nitrogen sources on growth and biological efficacy of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* against *Rhizoctonia solani*, the causal agent of bean damping-off. *Commun Agric Appl Biol Sci*. 72: 951-956.
- Pratima, G., S. Kalpana and S. Avinash. 2012. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *Int J Microbiol*. 10: 1155-1160.
- Thamayne V.O., O.B. Lidiiane, S.O. Felipe, S.F. Juliana, R.X. Batista Fabiana and L.C. Vicelma. 2014. Insights into the effect of carbon and nitrogen source on hydrogen production by photosynthetic bacteria. *Chemical Engineering Science*. 38: 367-372.
- Theather, R.M. and P.J. Wood. 1982. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol*. 43: 777-780.
- Juturu, V. and J.C Wu. 2014. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 33: 188-203.