วารสารเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มทร.อีสาน | Agriculture & Technology RMUTI Journal
ปีที่ 6 ฉบับที่ 1 มกราคม – เมษายน 2568 | Vol.6 No.1 January – April 2025

Received: March 27, 2024; Revised: October 29, 2024; Accepted: November 4, 2024

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดินที่มีเปลือกทุเรียน
Isolation of cellulase producing bacteria from soils containing durian husks

ปฐมาภรณ์ ทิลารักษ์[1] สุจิตรา ทิพย์ศรีราช[1] กรรณิการ์ เจริญสุข[1] พิริยาภรณ์ อันอาตม์งาม[1]
พรพนิต ศศิวัฒน์ชุติกุล[1] ยุพา บุญมี[1] และอมรรัตน์ สุวรรณโพธิ์ศรี[1*]
Patamaporn Tilarux[1], Sujitra Thipsrirach[1], Kannikar Charoensuk[1], Piriyaporn Anartngam[1],
Pronpanit Sasivatchutikool[1], Yupha Boonme[1] and Amornrat Suwanposri[1*]

[1]คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี
[1]Faculty of Agro-industrial Technology, Rajamangala University of Technology Tawan-ok, Chanthaburi campus, Chanthaburi Province
[*]Corresponding Author E-mail Address: amornrat_su@rmutto.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากตัวอย่างดินที่มีการทับถมกันของเปลือกทุเรียน จำนวน 3 จุด ในบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี เพื่อประโยชน์ในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุและผลิตปุ๋ยชีวภาพ โดยคัดเลือกแบคทีเรียตัวแทนได้ทั้งหมดจำนวน 17 ไอโซเลท และจากการวัดความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสโดยการเกิดโซนใส (Hydrolytic Capacity; HC) บนอาหารแข็ง Carboxymethyl cellulose (CMC) สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จำนวน 11 ไอโซเลท มีค่า HC อยู่ระหว่าง 1.44±0.19 ถึง 7.63±2.63 ไอโซเลท S1-5, S2-4 และ S3-3 เป็นไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายเซลลูโลสจากตัวอย่างดินแต่ละชนิดเมื่อทำการจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene พบว่าไอโซเลท S1-5 เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน ติดสีแกรมบวก คือเชื้อ *Bacillus stercoris* ไอโซเลท S2-4 และ S3-3 เซลล์มีรูปร่างเป็นเส้น ติดสีแกรมบวก คือ เชื้อ *Streptomyces osmaniensis* จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารเหลว CMC ค่าพีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าไอโซเลท S1-5 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด (0.41±0.03 ยูนิต/มิลลิลิตร) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) รองลงมาคือ S2-4 (0.19±0.02 ยูนิต/มิลลิลิตร) และ S3-3 (0.17±0.01 ยูนิต/มิลลิลิตร) ตามลำดับ ผลการศึกษาที่ได้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีศักยภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส และเป็นข้อมูลในการนำไปประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายเศษซากอินทรีย์จากพืชซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักสำหรับการผลิตปุ๋ยชีวภาพได้

คำสำคัญ: การคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย แบคทีเรียผลิตเซลลูเลส กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส เปลือกทุเรียน ปุ๋ยชีวภาพ

Abstract

The objective of this study was to isolate of cellulase producing bacteria from three soil samples underneath durian husks at Rajamangala University of Technology Tawan-ok, Chanthaburi campus, for the utilization in organic matter decomposition and biofertilizer production. The 17 isolates were selected and analysis of cellulose degradation with the Hydrolytic Capacity (HC) on carboxymethyl cellulose (CMC) agar was determined. The 11 cellulase producing isolates were obtained with HC in the range of 1.44±0.19 -

7.63±2.63. The isolate S1-5, S2-4 and S3-3 exhibited the highest cellulase-producing activity from each soil samples. Morphological characteristics and 16s rRNA gene sequencing analysis were performed. The results showed that isolate S1-5 was Gram-positive bacteria with short rod shape and identified as *Bacillus stercoris* while the isolate S2-4 and S3-3 were Gram-positive with filamentous shape and identified as *Streptomyces osmaniensis*. The production of cellulase in CMC broth pH 7 at 30°C indicated that isolate S1-5 produced the highest cellulase yield (0.41±0.03 Unit/ml) with statistical significance ($p \leq 0.05$) followed by isolate S2-4 (0.19±0.02 Unit/ml) and S3-3 (0.17±0.01 Unit/ml), respectively. From the obtained results, it was revealed that the isolated cellulase producing bacteria had the potential to degrade cellulose. These findings provide information that can be applied in the hydrolysis of organic debris from plants, which are the main component for biofertilizer production.

Keywords: Microbial isolation, Cellulase producing microorganism, Cellulase activity, Durian husk, Biofertilizer

บทนำ

ในปัจจุบันประชาชนหันมาสนใจในเรื่องของสุขภาพมากยิ่งขึ้น โดยการเลือกซื้อผลิตภัณฑ์อาหารที่ปลอดภัยและปราศจากสารเคมีที่เป็นพิษต่อร่างกาย ทำให้ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร ได้แก่ ธัญพืช ผัก และผลไม้ ที่ผลิตโดยใช้เกษตรอินทรีย์ (Organic agriculture) เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น การทำเกษตรอินทรีย์นั้นเป็นการผลิตผลผลิตทางการเกษตรที่เน้นการใช้วัสดุธรรมชาติ ไม่ใช้วัตถุดิบที่มาจากการสังเคราะห์ และพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ที่ผ่านการดัดแปรพันธุกรรม (Genetically modified microorganism) ทำให้ผลผลิตที่ได้ปราศจากสารพิษและสารเคมีตกค้าง มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2564) โดยแนวโน้มของตลาดเกษตรอินทรีย์นั้นกำลังเป็นที่นิยมของทั่วโลก ซึ่งมีมูลค่าตลาดโลกสูงถึงปีละ 3.55 ล้านล้านบาท และขยายตัวต่อเนื่องทุกปี ในปัจจุบันไทยมีมูลค่าตลาดเกษตรอินทรีย์ ประมาณ 3,000 ล้านบาท โดยเป็นการบริโภคในประเทศ 900 ล้านบาท และตลาดต่างประเทศ 2,100 ล้านบาท คิดเป็นมูลค่าส่งออกประมาณร้อยละ 0.06 ของมูลค่าตลาดโลก (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2563) จากการขยายตัวของตลาดเกษตรอินทรีย์ ส่งผลให้ปริมาณความต้องการในการใช้ปุ๋ยที่ผลิตจากวัสดุธรรมชาติ เช่น ปุ๋ยชีวภาพ (Biofertilizer) สูงขึ้น เนื่องจากเป็นปัจจัยการผลิตที่สามารถนำมาใช้ทดแทนปุ๋ยเคมีได้

ปุ๋ยชีวภาพเป็นปุ๋ยที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เป็นประโยชน์ต่อพืชและดิน โดยปุ๋ยชีวภาพจะช่วยรักษาความอุดมสมบูรณ์ของดินทำให้ดินประกอบด้วยสารอาหารหลัก (Macro-nutrient) และสารอาหารรอง (Micro-nutrient) ผ่านการตรึงไนโตรเจน ช่วยละลายฟอสเฟตและโพแทสเซียมหรือแร่ธาตุในดิน ปลดปล่อยสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช สร้างสารปฏิชีวนะและทำให้เกิดการย่อยสลายทางชีวภาพของสารอินทรีย์ในดิน (Sinha et al., 2010) การผลิตปุ๋ยชีวภาพสามารถทำได้โดยการนำใบไม้ เศษผัก หรือเปลือกผลไม้มาหมักกับจุลินทรีย์ จากนั้นจุลินทรีย์จะย่อยวัตถุดิบเหล่านั้นให้เป็นสารที่เป็นประโยชน์ต่อพืช ซึ่งองค์ประกอบหลักของเศษอินทรีย์จากพืชที่ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพคือเซลลูโลส มีมากถึงร้อยละ 97-99 ของสารอินทรีย์ทั้งหมด สะสมอยู่ในผนังเซลล์ของพืช การย่อยสลายเซลลูโลสสามารถทำได้ 2 วิธี ได้แก่ 1) วิธีการทางเคมีซึ่งเป็นการย่อยสลายด้วยกรดภายใต้อุณหภูมิสูง มีข้อดีคือใช้เวลาสั้น แต่มีข้อเสียคือได้น้ำตาลกลูโคสในปริมาณต่ำและเกิดผลิตภัณฑ์ชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการ 2) วิธีการทางชีวภาพจะเป็นการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ ซึ่งมีข้อดีคือสามารถเกิดการย่อยสลายเซลลูโลสได้ภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง ใช้อุณหภูมิต่ำ เอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงกับเซลลูโลสมาก ทำให้ไม่เกิดการสูญเสียน้ำตาลกลูโคสในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาและไม่เกิดผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ที่ไม่ต้องการ (Fan et al., 1987) ข้อเสียใช้เวลานาน เอนไซม์เซลลูเลสเป็นกลุ่มเอนไซม์เชิงซ้อน (Complex enzyme) ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด คือ 1) เอนโด-เบต้า-1,4 กลูคาเนส (Endo-β-1,4 glucanase) ทำหน้าที่ย่อยโมเลกุลของเซลลูโลสในส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ (Amorphous) หรือย่อยอนุพันธ์ของเซลลูโลส 2) เซลโลไบโอไฮโดรเลส (Cellobiohydrolase) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสจากปลายด้านที่ไม่มีน้ำตาลรีดิวซ์ (Non-reducing sugar) รวมถึงย่อยสลายเซลลูโลสที่จัดตัวอย่างเป็นระเบียบ (Microcrystalline cellulose) ได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลเซลโลไบโอส (Cellobiose) และ 3) เบต้า-ดี-กลูโคซิเดส

(β-D-glucosidase) ทำหน้าที่ย่อยสลายน้ำตาลเซลโลไบโอสเป็นน้ำตาลกลูโคส (Juturu and Wu, 2014) ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพจะนิยมย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมีหลายชนิด ยกตัวอย่าง เช่น เชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Trichoderma* (Li et al., 2020b) เป็นต้น แบคทีเรีย ได้แก่ *Bacillus*, *Clostridium* และ *Pseudomonas* เป็นต้น (Lynd et al., 2002) และแบคทีเรียแอคติโนมัยสิท ได้แก่ *Actinoplanes, Microbispora* และ *Streptomyces* เป็นต้น (Nurkanto, 2009; Saini et al., 2015) ซึ่งเรียกจุลินทรีย์เหล่านี้ว่า จุลินทรีย์ผลิตเซลลูเลส (Cellulase producing microorganism) จากการศึกษาค้นคว้า พบว่าแบคทีเรียจะเป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับความสนใจในการนำมาศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเป็นอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา เนื่องจากหากเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดในอาหารที่ใช้วัตถุดิบชนิดเดียวกัน เชื้อแบคทีเรียจะสามารถสร้างและปลดปล่อยเอนไซม์เซลลูเลสที่มีความซับซ้อนมากกว่า ซึ่งเอนไซม์เซลลูเลสที่หลั่งออกมานั้นสามารถช่วยในการส่งเสริมประสิทธิภาพให้กับเอนไซม์ที่อยู่ในตระกูลเดียวกันทำให้สามารถย่อยเซลลูโลสได้ดีกว่า นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียนั้นมีความหลากหลาย เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีกว่า รวมถึงเอนไซม์เซลลูเลสที่หลั่งออกมาก็มีความเสถียรมากกว่า (Bilal and Iqbal, 2020) มีงานวิจัยรายงานว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จากสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย เช่น ดิน เศษวัตถุอินทรีย์ ลำไส้สุกร กระเพาะหมักและมูลของโค เป็นต้น (ชนิดาภา และคณะ, 2561; Das et al., 2010; Yang et al., 2014)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี ตั้งอยู่ในจังหวัดจันทบุรี ซึ่งเป็นจังหวัดที่มีทรัพยากรธรรมชาติอุดมสมบูรณ์และมีความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ ประชากรส่วนใหญ่นิยมประกอบอาชีพเกษตรกรรม ทำสวนผลไม้และแปรรูปผลไม้ ทุเรียนเป็นไม้ผลเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของจังหวัดจันทบุรี ซึ่งปริมาณความต้องการในการบริโภคทุเรียนทั้งในรูปของผลสดและแปรรูปนั้นเพิ่มสูงขึ้นในทุกปี โดยส่วนของเนื้อทุเรียนที่สามารถรับประทานได้คิดเป็นร้อยละ 10-30 และมีส่วนเหลือทิ้ง เช่น เปลือกร้อยละ 50-60 และเมล็ดร้อยละ 10-20 (Purnomo et al., 2016) ส่งผลให้มีส่วนของเปลือกทุเรียนเหลือทิ้งเป็นจำนวนมาก ในโรงงานอุตสาหกรรมที่ผลิตทุเรียนแปรรูป จะมีปริมาณของเหลือทิ้งจากทุเรียนสูงถึง 1,000 ตัน ต่อปี โดยวิธีการในการกำจัดส่วนใหญ่คือการนำไปถมที่หรือเผา ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม ในเรื่องของกลิ่น ควัน และแมลงรบกวน แต่อย่างไรก็ตามในเปลือกทุเรียนมีธาตุโพแทสเซียมสูง จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตพืช การติดดอกและทำให้ผลผลิตมีคุณภาพสูงขึ้น มีรายงานถึงการนำเปลือกทุเรียนไปใช้คลุมโคนต้นทุเรียนหรือผลิตเป็นปุ๋ยหมัก (กรมพัฒนาที่ดิน, 2551) โดยนำไปผสมกับมูลโคในอัตราส่วน 3:1 โดยปริมาตร เพื่อใช้ในการผลิตปุ๋ยหมัก พบว่าปุ๋ยหมักที่ได้มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ เนื่องจากคุณสมบัติปุ๋ยหมักที่ได้ส่วนใหญ่มีค่าผ่านเกณฑ์มาตรฐานปุ๋ยอินทรีย์ของกรมวิชาการเกษตร (วัชรี และคณะ, 2565) แสดงให้เห็นว่าเปลือกทุเรียนน่าจะสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตปุ๋ยชีวภาพได้ โดยผู้วิจัยคาดหวังว่าหากนำดินที่มีการทับถมกันของเปลือกทุเรียนมาใช้ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจะทำให้ได้แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสของเปลือกทุเรียนได้สูง ส่งผลให้สามารถนำเปลือกทุเรียนมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตปุ๋ยชีวภาพได้ง่ายขึ้น ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ในท้องถิ่นที่มีประสิทธิภาพสูงซึ่งสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้จากดินที่มีการทับถมกันของซากเปลือกทุเรียน เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ เป็นการช่วยลดปัญหามลพิษด้านสิ่งแวดล้อม ลดปัญหาขยะอินทรีย์ พัฒนาทรัพยากรที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ใหม่ได้ เพิ่มมูลค่าและเป็นแนวทางในการนำเปลือกผลไม้เหลือทิ้งไปใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างดิน

เก็บตัวอย่างดินในบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี ตำบลพลวง อำเภอเขาคิชฌกูฏ จังหวัดจันทบุรี โดยทำการเก็บตัวอย่างดินบริเวณที่มีการทิ้งเปลือกทุเรียนไว้นาน 1 เดือน อุณหภูมิของดินประมาณ 35-40 องศาเซลเซียส กำหนดพื้นที่ของความกว้าง×ยาว×ลึก คือ 10×10×10 เซนติเมตร เก็บตัวอย่างทั้งหมด 3 จุด โดยแต่ละตัวอย่างมีระยะห่างกันที่ 10 เมตร และนำดินตัวอย่างที่ได้ไปใช้ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

2. การคัดแยกแบคทีเรียจากดินตัวอย่าง

นำตัวอย่างดินน้ำหนัก 10 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ที่ภายในบรรจุสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ทำการเจือจางสารละลายตัวอย่างให้อยู่ในช่วง 10^{-1}-10^{-8} จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการ Spread plate โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารแข็ง Nutrient agar (NA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตและนับจำนวนโคโลนีที่มีการเจริญ คัดเลือกแบคทีเรียตัวแทนที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน รวมถึงการศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการ Cross streak plate ดัดแปลงจากวรศิลป์ และคณะ (2562) และเก็บเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหาร NA slant เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

3. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยใช้วิธี Congo red นำไอโซเลทที่คัดแยกได้ไปเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการ Point inoculation technique บนอาหาร Carboxymethyl cellulose (CMC) agar ประกอบด้วยเปปโตน ร้อยละ 1.0, CMC ร้อยละ 1.0, K_2HPO_4 ร้อยละ 0.2, วุ้น ร้อยละ 1.0, $MgSO_4.7H_2O$ ร้อยละ 0.3, $(NH_4)_2SO_4$ ร้อยละ 0.5, เจลาตินร้อยละ 0.2 และปรับพีเอชให้เป็น 7.0 ซึ่งเป็นอาหารจำเพาะที่ใช้ในการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Irfan et al., 2012) จากนั้นย้อมด้วย Congo red ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 เป็นเวลา 20 นาที และล้างด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นเวลา 15 นาที สังเกตการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากขนาดของโซนใสที่เกิดขึ้นและคำนวณความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (Hydrolysis capacity; HC) ดังสมการ (Sreeja et al., 2013)

$$\text{Hydrolysis capacity (HC)} = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส (เซนติเมตร)}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (เซนติเมตร)}} \quad (1)$$

4. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว CMC นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (4000, Innova, USA) ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (4K15, Sartorius, Germany) ที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ดัดแปลงจากชนิดาภา และคณะ (2561) นำส่วนใส (Supernatant) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่เกิดขึ้นจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ผลิตได้ ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959) โดยการนำส่วนใส ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย CMC ความเข้มข้น ร้อยละ 1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่อยู่ในสารละลายโซเดียมซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ใน Water bath เป็นเวลา 5 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Libra S22, Biochrom, England) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส กำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์ เท่ากับ 1 มิลลิกรัมของกลูโคส/มิลลิลิตร

5. การจัดจำแนกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

จัดจำแนกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยการศึกษาลักษณะของโคโลนี จากนั้นจัดจำแนกถึงระดับสปีชีส์ด้วยการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rRNA โดยนำโคโลนีของไอโซเลทที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดมาทำการสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ด้วยไพรเมอร์ 27F 5’(AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3’ และ 1492R 5’ (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3’ โดยใช้ Polymerase chain reaction (PCR) จากนั้นนำ PCR product ที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) โดยใช้ไพรเมอร์ 785F 5’ (GGA TTA GAT ACC TGG TA) 3’ และ 907R 5’ (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3’ (Macrogen Inc, Korea) และผลที่ได้มาจัดเรียงด้วยโปรแกรม

BioEdit (Ibis Bioscience) เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล EZBiocloud (www.ezbiocloud.net/ identify; Yoon et al., 2017) และหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสโดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic tree) ด้วยวิธี Neighbor-joining (Saitou and Nei, 1987) โดยใช้โปรแกรม MEGA 11 software (Tamura et al., 2021)

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) การทดลองละ 3 ซ้ำ ผลการทดลองที่ได้แสดงในรูปของค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน นำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี One-way Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการวิจัย

1. การคัดแยกแบคทีเรียจากดิน

จากการศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างดินที่มีการทับถมกันของเปลือกทุเรียนที่เก็บรวบรวมได้ในบริเวณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี จำนวน 3 จุด มาแยกเชื้อบนอาหาร NA พบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียของตัวอย่างดินทั้ง 3 จุด และสามารถคัดแยกแบคทีเรียได้มากที่สุดจากตัวอย่างดินจุดที่ 2 รองลงมาคือตัวอย่างดินจุดที่ 3 และ 1 ตามลำดับ จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียตัวแทนจากดินแต่ละจุด โดยใช้ความเหมือนและความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี รูปร่างของเซลล์และการติดสีแกรม สามารถคัดแยกแบคทีเรียตัวแทนได้ทั้งหมด จำนวน 17 ไอโซเลท จากตัวอย่างดินจุดที่ 1 จำนวน 7 ไอโซเลท ดินจุดที่ 2 จำนวน 5 ไอโซเลท และดินจุดที่ 3 จำนวน 5 ไอโซเลท (ตารางที่ 1) โดยมีลักษณะดังนี้ โคโลนีมีรูปร่างกลม ไม่แน่นอน และ Rhizoid ขอบหยักหรือเรียบ ผิวมันขรุขระ สีขาวขุ่น ครีม และเหลือง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.04-0.43 เซนติเมตร

ตารางที่ 1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ตัวอย่างดิน	ไอโซเลท	โคโลนี			
		สี	ขอบ	รูปร่าง	การยกตัว
1	S1-1	ขาวขุ่น	หยัก	ไม่แน่นอน	flat
	S1-2	ครีม	เรียบ	กลม	convex
	S1-3	ขาวขุ่น	เรียบ	กลม	flat
	S1-4	ขาวขุ่น	เรียบ	กลม	convex
	S1-5	ขาวขุ่น	หยัก	กลม	flat
	S1-6	ขาวขุ่น	หยัก	ไม่แน่นอน	convex
	S1-7	ครีม	เรียบ	กลม	flat
2	S2-1	ขาวขุ่น	คลื่น	ไม่แน่นอน	flat
	S2-2	ครีม	คลื่น	ไม่แน่นอน	flat
	S2-3	เหลือง	เรียบ	กลม	convex
	S2-4	ขาวขุ่น	หยัก	ไม่แน่นอน	convex
	S2-5	ครีม	คลื่น	ไม่แน่นอน	flat
3	S3-1	ขาวขุ่น	เรียบ	กลม	flat
	S3-2	ขาวขุ่น	เรียบ	กลม	convex
	S3-3	ขาวขุ่น	หยัก	ไม่แน่นอน	convex
	S3-4	เหลือง	หยัก	ไม่แน่นอน	convex
	S3-5	ครีม	หยัก	ไม่แน่นอน	convex

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ผลการตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของไอโซเลทที่คัดแยกได้บนอาหารแข็ง CMC ด้วยวิธี Congo red แสดงในตารางที่ 2 คัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จากการพบวงใสรอบโคโลนีทั้งหมดจำนวน 11 ไอโซเลท (ร้อยละ 64.71) จากดินจุดที่ 1 จำนวน 4 ไอโซเลท (S1-1, S1-2, S1-5 และ S1-7) คิดเป็นร้อยละ 23.52 มีค่า HC อยู่ระหว่าง 1.44±0.19 ถึง 7.63±2.13 ดินจุดที่ 2 จำนวน 3 ไอโซเลท (S2-2, S2-3 และ S2-4) คิดเป็นร้อยละ 17.65 มีค่า HC อยู่ในระหว่าง 1.43±0.06 ถึง 3.63±0.78 และดินจุดที่ 3 จำนวน 4 ไอโซเลท (S3-1, S3-3, S3-4 และ S3-5) คิดเป็นร้อยละ 23.52 มีค่า HC อยู่ระหว่าง 1.44±0.19 ถึง 3.04±0.86 โดยแบ่งค่า HC ออกเป็น 3 ระดับ ดังนี้ ระดับที่ 1 ประสิทธิภาพต่ำ (HC=0.01-1.49) ระดับที่ 2 ประสิทธิภาพปานกลาง (HC=1.50-2.99) และระดับที่ 3 ประสิทธิภาพสูง (HC≥3.00) พบแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ในระดับต่าง ๆ ดังนี้ ระดับสูงจำนวน 3 ไอโซเลท ระดับปานกลางจำนวน 3 ไอโซเลท และระดับต่ำจำนวน 5 ไอโซเลท ซึ่งไอโซเลท S1-5, S2-4 และ S3-3 เป็นไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในการย่อยสลายเซลลูโลสในตัวอย่างดินจุดที่ 1 จุดที่ 2 และจุดที่ 3 ตามลำดับ

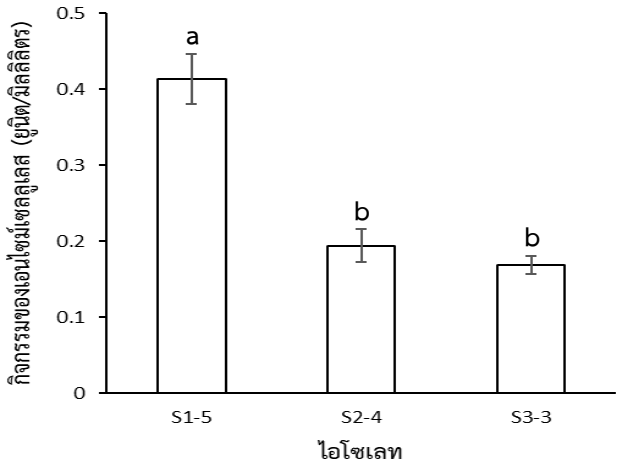
ตารางที่ 2 ความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสของไอโซเลทที่คัดแยกได้

ไอโซเลท	ขนาดของโซนใส (เซนติเมตร)	ขนาดของโคโลนี (เซนติเมตร)	Hydrolysis capacity (HC)
S1-1	0.30±0.04	0.21±0.00	1.44±0.19^{b}
S1-2	0.22±0.02	0.14±0.00	1.58±0.44^{b}
S1-3	0.00±0.00	0.15±0.03	0.00±0.00^{b}
S1-4	0.00±0.00	0.30±0.01	0.00±0.00^{b}
S1-5	3.13±0.10	0.43±0.01	7.63±2.13^{a}
S1-6	0.00±0.00	0.17±0.05	0.00±0.00^{b}
S1-7	0.35±0.05	0.25±0.00	1.44±0.19^{b}
S2-1	0.00±0.00	0.23±0.07	0.00±0.00^{c}
S2-2	0.23±0.02	0.14±0.00	1.58±0.14^{b}
S2-3	0.48±0.04	0.34±0.04	1.43±0.06^{b}
S2-4	1.18±0.04	0.33±0.07	3.63±0.78^{a}
S2-5	0.00±0.00	0.31±0.05	0.00±0.00^{c}
S3-1	0.17±0.02	0.12±0.00	1.44±0.19^{b}
S3-2	0.00±0.00	0.22±0.02	0.00±0.00^{c}
S3-3	0.46±0.04	0.16±0.05	3.04±0.86^{a}
S3-4	0.21±0.03	0.14±0.00	1.44±0.19^{b}
S3-5	0.27±0.02	0.16±0.00	1.67±0.14^{b}

หมายเหตุ: $^{a-c}$ หมายถึง ตัวอักษรในคอลัมน์ที่ต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

3. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของไอโซเลทตัวแทน

จากการนำไอโซเลทตัวแทนซึ่งคัดเลือกจากประสิทธิภาพในการย่อยสลาย (ค่า HC) สูงที่สุดของตัวอย่างดินแต่ละจุด มาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารเหลว CMC พบว่า ไอโซเลท S1-5 มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เท่ากับ 0.41±0.03 ยูนิต/มิลลิลิตร รองลงมาคือไอโซเลท S2-4 เท่ากับ 0.19±0.02 ยูนิต/มิลลิลิตร แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับไอโซเลท S3-3 ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส เท่ากับ 0.17±0.01 ยูนิต/มิลลิลิตร (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากไอโซเลทตัวแทน

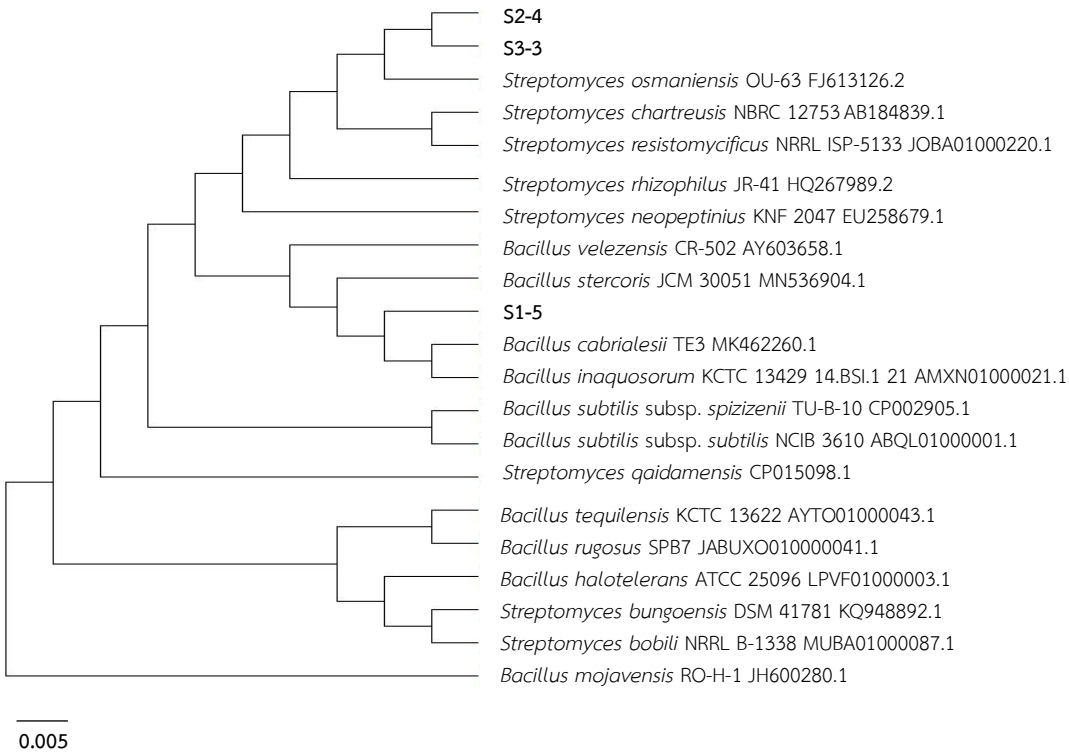
4. การจัดจำแนกไอโซเลทตัวแทนที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

จากผลการนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rRNA ของไอโซเลทตัวแทนเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล EZBiocloud พบว่า ไอโซเลท S1-5 สามารถจัดจำแนกได้เป็นกลุ่ม *Bacillus* โดยมีความคล้ายคลึงกับ *B. tequilensis*, *B. cabrialesii*, *B. inaquosorum*, *B. rugosus* และ *B. stercoris* ร้อยละ 99.93, 99.93, 99.93, 99.86 และ 99.86 ตามลำดับ และไอโซเลท S2-4 และ S3-3 สามารถจัดจำแนกได้เป็นกลุ่ม *Streptomyces* โดยไอโซเลท S2-4 มีความคล้ายคลึงกับ *S. chartreusis*, *S. osmaniensis*, *S. resistomycificus, S. rhizophilus* และ *S. neopeptinius* ร้อยละ 99.38, 99.01, 98.83, 98.83 และ 98.78 ตามลำดับ และไอโซเลท S3-3 มีความคล้ายคลึงกับ *S. chartreusis S. osmaniensis*, *S. resistomycificus*, *S. neopeptinius* และ *S. kunmingensis* ร้อยละ 99.21, 98.83, 98.79, 98.77 และ 98.72 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) จากการวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไอโซเลท S1-5, S2-4 และ S3-3 ด้วยโปรแกรม MEGA11 โดยใช้ Neighbor-Joining algorithm ผลการวิเคราะห์สนับสนุนผลการเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียกับฐานข้อมูล EZBiocloud ซึ่งแสดงความใกล้ชิดทางวิวัฒนาการของยีน 16S rRNA มากกว่าร้อยละ 99 ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าไอโซเลท S1-5 มีความใกล้ชิดมากที่สุดกับ *B. stercoris* และไอโซเลท S2-4 และไอโซเลท S3-3 ใกล้ชิดมากที่สุดกับ *S. osmaniensis* (รูปที่ 2)

ตารางที่ 4 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลทตัวแทนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล EZBiocloud

ไอโซเลท	สายพันธุ์	Accession No.	Similarity (%)
S1-5	*Bacillus tequilensis*	AYTO01000043	99.93
	Bacillus cabrialesii	MK462260	99.93
	Bacillus inaquosorum	AMXN01000021	99.93
	Bacillus rugosus	ABQL01000001	99.86
	Bacillus stercoris	JABUXO010000041	99.86
S2-4	*Streptomyces chartreusis*	AB184839.1	99.38
	Streptomyces osmaniensis	FJ613126.2	99.01
	Streptomyces resistomycificus	JOBA01000220.1	98.83
	Streptomyces rhizophilus	HQ267989.2	98.83
	Streptomyces neopeptinius	EU258679.1	98.78
S3-3	*Streptomyces chartreusis*	AB184839.1	99.21
	Streptomyces osmaniensis	FJ613126.2	98.83

Streptomyces resistomycificus	JOBA01000220.1	98.79
Streptomyces neopeptinius	EU258679.1	98.77
Streptomyces kunmingensis	AB184597.1	98.72



รูปที่ 2 แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของไอโซเลท S1-5, S2-4 และ S3-3 วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA11 โดยใช้ Neighbor-Joining algorithm

การอภิปรายผล

แบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสนั้นสามารถคัดแยกได้จากแหล่งที่หลากหลาย ได้แก่ ปุ๋ยคอก เศษใบไม้ ขอนไม้ มูลสัตว์ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งดินซึ่งเป็นแหล่งที่มีความอุดมสมบูรณ์และมีจุลินทรีย์หลากหลายชนิดที่อาศัยอยู่ในดิน ก่อนหน้านี้มีงานวิจัยหลายงานที่ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดิน (วรศิลป์ และคณะ, 2562; พรพรรณ และอุษณีย์, 2563; Inan et al., 2023) โดยการศึกษาในครั้งนี้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดินที่มีการทับถมกันของซากเปลือกทุเรียน ซึ่งเป็นพืชเศรษฐกิจหลักของจังหวัดจันทบุรี เนื่องจากต้องการนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพที่ใช้เปลือกทุเรียนและเปลือกผลไม้ต่าง ๆ เป็นวัตถุดิบ ในการคัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสจากดินทั้ง 3 จุด สามารถคัดแยกไอโซเลทตัวแทนได้ทั้งหมดจำนวน 17 ไอโซเลท โดยใช้ความเหมือนและความแตกต่างของโคโลนี ซึ่งไอโซเลทตัวแทนนั้นมีโคโลนีรูปร่างกลมและไม่แน่นอน ขอบหยักหรือเรียบ สีขาวขุ่น ครีม และเหลือง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.04-0.43 เซนติเมตร เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น รูปกลม และเส้นใยติดสีแกรมบวก สอดคล้องกับการศึกษาของ Dewiyanti et al. (2022) ที่ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสจากดินป่าชายเลนในชายฝั่งทางตอนเหนือของจังหวัดอาเจะห์ ประเทศอินโดนีเซีย โดยดินที่นำมาศึกษามี 2 ชนิดได้แก่ ดินจากป่าชายเลนที่ระบบนิเวศน์ไม่ถูกทำลายจากสึนามิในปี พ.ศ. 2547 และดินจากป่าชายเลนที่ได้รับการฟื้นฟูโดยการปลูกพืชทดแทนหลังเกิดสึนามิ สามารถคัดแยกได้แบคทีเรียที่มีลักษณะที่หลากหลาย ได้โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน รูปกลม และเป็นเส้นใย ขอบเรียบ หยัก รูปคลื่นและเป็นเส้นใย โคโลนีสีครีมและขาว ตัวเซลล์รูปท่อน รูปกลม ติดสีแกรมบวกและแกรมลบ เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสพบว่ามีทั้งหมด 11 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยจำนวนของแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูเลสซึ่งคัดแยกได้ใน

ครั้งนี้ใกล้เคียงกับรายงานของ Ahmed et al. (2018) ที่คัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดินใต้ต้นไม้ที่มีการเน่าเปื่อยของซากพืชในพื้นที่เขตเกษตรกรรมของเมือง Mafikeng ประเทศแอฟริกาใต้ ได้จำนวน 10 ไอโซเลท ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Irfan et al. (2012) ที่ทำการคัดแยกจากดินในประเทศปากีสถาน ได้จำนวน 7 ไอโซเลท และพรพรรณ และอุษณีย์ (2563) ที่คัดแยกจากดินนาข้าวในจังหวัดอยุธยาได้จำนวน 4 ไอโซเลท อาจเป็นผลเนื่องมาตัวอย่างดินที่ใช้ในการศึกษามีสมบัติและองค์ประกอบที่แตกต่างกัน เช่น ชนิดของดิน โครงสร้างของดิน ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณการใช้สารเคมีและสภาพแวดล้อม ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อจำนวนและชนิดของแบคทีเรีย ทำให้จำนวนของแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่คัดแยกได้นั้นมีความแตกต่างกันด้วย (จรินทร์, 2557)

การศึกษาในครั้งนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีค่า HC ที่ต่างกัน บางไอโซเลทมีค่า HC ที่ต่ำแต่บางไอโซเลทมีค่า HC ที่สูง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาหรือแหล่งที่มาของดิน โดยสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่มีค่า HC สูงสุดเท่ากับ 7.63 ซึ่งแตกต่างจากการคัดแยกของ Bamrungpanichtavorn et al. (2023) ที่มีค่า HC สูงสุดเท่ากับ 3.55 และการคัดแยกแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากกากน้ำมันปาล์มที่มีค่า HC สูงสุดเท่ากับ 4.14 (Khianngam et. al., 2014) การที่มีค่า HC แตกต่างกันนั้นเนื่องจากความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสนั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย จากการศึกษาของชณัฐ และสิรินภา (2562) รายงานว่าค่า HC มีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส หากมีค่า HC สูง ประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสก็จะสูงตามด้วย ดังนั้นจึงได้คัดเลือกไอโซเลท S1-5, S2-4 และ S3-3 ซึ่งเป็นไอโซเลทที่ให้ค่า HC สูงในตัวอย่างดินแต่ละจุดเป็นไอโซเลทตัวแทนสำหรับนำไปใช้ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในอาหารเหลว และพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ตรวจพบนั้นมีความสัมพันธ์กับค่า HC มีค่าอยู่ในช่วง 0.17 ถึง 0.41 ยูนิต/มิลลิลิตร โดยกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสนั้นสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสอยู่ในช่วง 0.22 ถึง 0.37 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งคัดแยกจากดิน (ทิพย์นภา และคณะ, 2556; วรศิลป์ และคณะ, 2562) แต่แตกต่างจากการศึกษาของ Li et al. (2020a) ที่คัดแยกแบคทีเรียจากสุกรมิน (Min pig) ซึ่งเป็นสุกรพันธุ์พื้นเมืองของประเทศจีน พบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ค่อนข้างสูง อยู่ในช่วง 24.06-33.03 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีค่าแตกต่างกันนั้น เนื่องจากความแตกต่างของแหล่งที่มา ชนิดของอาหารที่ใช้ในการคัดแยก สภาวะที่ใช้ในการบ่มเชื้อ ได้แก่ พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ปริมาณของหัวเชื้อเริ่มต้น การให้อากาศ ตัวกระตุ้น และปัจจัยอื่น ๆ รวมถึงสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ หากต้องการทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อที่คัดแยกได้สูงขึ้น สามารถทำได้โดยการหาสภาวะที่เหมาะในการเจริญและการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นที่สามารถทำให้ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ในปริมาณสูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำไปใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรม ช่วยลดการใช้พลังงานและเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต Bhagat and Kokitkar (2021) รายงานว่าในการหาสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ และแหล่งคาร์บอน ของการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของไอโซเลทที่คัดแยกได้จากดินจำนวน 7 ไอโซเลท ซึ่งทั้งหมดระบุเป็น *Bacillus* sp. นั้นพบว่าทุกไอโซเลทเป็นจุลินทรีย์กลุ่ม Mesophile พีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6.0-8.0 และสารพอลิเมอร์ เช่น แป้ง และ CMC นั้นทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงขึ้น Zhang et al. (2023) คัดแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่ทนกรดได้จากดินและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ ระยะเวลาในการหมัก 3.1 วัน อุณหภูมิ 29.9 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 4.1 ความเข้มข้นของหัวเชื้อร้อยละ 1.50 ในสภาวะนี้ทำให้ไอโซเลทที่คัดแยกได้มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสสูงถึง 13.503 ยูนิต/มิลลิลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าร้อยละ 140 เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนที่ยังไม่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในสภาวะที่เหมาะสม

จากรายงานการวิจัยหลายงานก่อนหน้านี้ที่ศึกษาแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญจำนวน 22 สายพันธุ์ ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลส พบว่าสามารถแบ่งออกเป็นทั้งหมด 10 สกุล ได้แก่ *Burkholderia* (ร้อยละ 36.36), *Bacillus* (ร้อยละ 13.65), *Citrobacter* (ร้อยละ 13.65), *Arthrobacter* (ร้อยละ 9.10), *Enterobacter* (ร้อยละ 4.54), *Chryseobacterium* (ร้อยละ 4.54), *Pandoraea* (ร้อยละ 4.54), *Paenibacillus* (ร้อยละ 4.54), *Dyella* (ร้อยละ 4.54) และ *Pseudomonas* (ร้อยละ 4.54) (Liang et al., 2014) ซึ่งไอโซเลทที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่คัดแยกได้ในครั้งนี้ พบว่าไอโซเลท S1-5 มีความใกล้ชิดมากที่สุดกับ *B. stercoris* โดยแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* sp. เป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพสูงในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส Biswas et al. (2020) ศึกษาการคัดแยกและจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดินในป่าชายเลนของประเทศบังคลาเทศ พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้และมีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงสุดคือ *Bacillus* sp. เช่นเดียวกับ Kognou et al. (2022) คัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสจากดินทั้งหมด 6 สายพันธุ์ ซึ่งจัดอยู่ในสกุล *Bacillus*, *Hymenobacter*, *Chryseobacterium*, *Paenarthrobacter*, *Mycobacterium*

และ *Stenotrophomonas* หลังจากที่ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อทั้งหมด พบว่า *Bacillus* เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด Pengproh et al. (2023) รายงาน *B. stercoris* สายพันธุ์ B.PNR1 ซึ่งคัดแยกได้จากดินภูเขาไฟของประเทศไทย พบว่ามีความสามารถในการผลิตกรดอินโดลอะซิติก เอนไซม์ละลายฟอสเฟต เอนไซม์อะไมเลส และเอนไซม์เซลลูเลส และให้ผลบวกต่อการควบคุมทางชีวภาพต้านการเหี่ยวเฉาเนื่องจาก *Fusarium* ในมะเขือเทศ นอกจากนี้ยังแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการผลิต Indole-3 acetic acid (IAA) และการละลายฟอสเฟตซึ่งมีส่วนทำให้พืชเจริญเติบโตได้ดี นอกจากนี้ยังสามารถคัดแยกแอคติโนมัยสิทได้จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท S2-4 และ S3-3 มีความใกล้ชิดมากที่สุดกับ *S. osmaniensis* ซึ่ง Herrera et al. (2021) ได้ทำการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสิท *Streptomyces* sp. สายพันธุ์ CC48 ได้จากสภาพแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของไนเตรต เหล็ก ฟอสเฟต และคาร์บอนต่ำมาก (Oligotrophic environment) ซึ่งให้กิจกรรมของการย่อยสลายเซลลูโลสที่สูงเท่ากับ 0.76 ยูนิต/มิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเสริมด้วยคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส พีเอช 7.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบกับ *Streptomyces* สายพันธุ์อื่น ๆ การเติมแมกนีเซียมไอออนช่วยเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสให้สูงขึ้นร้อยละ 23 นอกจากนี้ยัง พบว่าเชื้อที่คัดแยกได้มีความสามารถในการย่อยข้าวโพดและข้าวสาลี ซึ่งแสดงให้เห็นถึงจุลินทรีย์ทั้ง 3 ไอโซเลทที่คัดแยกและจำแนกได้จากงานวิจัยนี้มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ที่ต้องการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่มีประสิทธิภาพสูงจากดินที่มีการทับถมกันของเปลือกทุเรียนเพื่อประโยชน์ในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุและผลิตปุ๋ยชีวภาพ และข้อมูลที่ได้นี้ สามารถนำไปใช้ในการพัฒนากลยุทธ์เป้าหมายสำหรับการเกษตรแบบยั่งยืนได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่น การผลิตปุ๋ยชีวภาพ การกำจัดขยะอินทรีย์ หรือการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลาย

บทสรุป

การศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากดินที่มีการทับถมกันของเปลือกทุเรียนเพื่อใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ ได้ทั้งหมดจำนวน 11 ไอโซเลท จากตัวอย่างดิน 3 จุด เมื่อนำไอโซเลทตัวแทนที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุดในตัวอย่างดินแต่ละชนิดมาจัดจำแนก พบว่าเป็นแบคทีเรียและแอคติโนมัยสิทในสกุล *Bacillus* (ไอโซเลท S1-5) และ *Streptomyces* (ไอโซเลท S2-4 และ S3-3) ตามลำดับ โดยพบว่าไอโซเลท S1-5 ซึ่งมีความใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus stercoris* มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดีที่สุด เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้สูงที่สุด (0.41±0.03 ยูนิต/มิลลิลิตร) โดยสามารถนำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ไปประยุกต์ใช้ในการย่อยสลายเศษอินทรีย์จากพืช เช่น เศษผัก ใบไม้ และเปลือกผลไม้เพื่อการผลิตปุ๋ยชีวภาพได้ ผลจากการศึกษาที่ได้สามารถช่วยลดปริมาณขยะอินทรีย์และมีศักยภาพในการพัฒนาปุ๋ยชีวภาพเพื่อเกษตรอินทรีย์อย่างยั่งยืน รวมถึงการนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไปพัฒนาในอุตสาหกรรมผลิตปุ๋ยชีวภาพหรือการนำไปทดลองในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันเพื่อให้ได้เอนไซม์เซลลูเลสที่มีประสิทธิภาพสูงมากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืชและภูมิทัศน์ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตจันทบุรี จังหวัดจันทบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ในการปฏิบัติการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาที่ดิน. (2551). คู่มือการจัดการอินทรียวัตถุเพื่อปรับปรุงบำรุงดินและเพื่อเพิ่มความอุดมสมบูรณ์ของดิน. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์: กรุงเทพฯ.

จรินทร์ พูดงาม. (2557). การแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยสีทที่สามารถย่อยสลายสารประกอบลิกโนเซลลูโลสได้จากดินบริเวณอุทยานแห่งชาติน้ำตกโยง. วารสารวิชาการ มทร. สุวรรณภูมิ. 2(2): 109-120.

ชณัฐ วงษ์ชีวะสกุล และสิรินภา ช่วงโอภาส. (2562). การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกากมันสำปะหลังและกากตะกอนเยื่อกระดาษ. วารสารดินและปุ๋ย. 41(1): 14-23.

ชนิดาภา ธนะศรีรางกูร, เพชรดา ปินใจ และพิลานี ไวถนอมสัตย์. (2561). การคัดเลือกแบคทีเรียผลิตเซลลูเลสและประสิทธิภาพในการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลส. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 36(3): 1-12.

ทิพย์นภา วงษ์คูณ, โสภณ บุญลือ และนันทวัน ฤทธิ์เดช. (2556). การคัดแยกจุลินทรีย์ย่อยสลายเซลลูโลสเพื่อกระตุ้นการงอกของเมล็ดพันธุ์ข้าว (*Oryza sativa* L.) และข้าวโพดหวาน (*Zea mays* L. var. *saccharata*). วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 41(4): 954-966.

พรพรรณ รัตนะสัจจะ และอุษณีย์ ทองดี. (2563). การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเซลลูเลสจากตัวอย่างดินนาข้าวในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา. วารสารวิชาการ มทร. สุวรรณภูมิ. 8(2): 165-175.

วรศิลป์ มาลัยทอง, ดุจดาว คนยัง, พิชิตร์ วรรณคา, มรกต วงศ์หน่อ, ศุกรี อยู่สุข, สุรพงษ์ ทองเรือง และอภิรดี เสียงสืบชาติ. (2562). การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยชังข้าวโพดเพื่อผลิตเป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์. วารสารวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมการเกษตร. 50(1): 426-431.

วัชรี รวยรื่น, นรานันท์ ขำมณี และพงษ์ศักดิ์ นพรัตน์. (2565). การผลิตและคุณสมบัติของปุ๋ยหมักจากเศษวัสดุเหลือทิ้งในสวนวนเกษตร. Science, Technology, and Social Sciences Procedia. 2022(4): rspg028.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. (2564). คู่มือความรู้และแนวทางตามมาตรฐานเกษตรอินทรีย์. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ: กรุงเทพฯ.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2563). ผลักดันเกษตรอินทรีย์ไทย ยืนหนึ่งอาเซียน เดินหน้าแผนปฏิบัติการขยายพื้นที่เกษตรอินทรีย์ 1.3 ล้านไร่ ในปี 65. ค้นเมื่อ 12 มีนาคม 2566. https://www.oae.go.th/view/1.

Ahmed A.A.O., Babalola O.O. and McKay T. (2018). Cellulase-and xylanase-producing bacterial isolates with the ability to saccharify wheat straw and their potential use in the production of pharmaceuticals and chemicals from lignocellulosic materials. Waste and Biomass Valorization. 9: 765-775.

Bhagat S.A. and Kokitkar S.S. (2021). Isolation and identification of bacteria with cellulose-degrading potential from soil and optimization of cellulase production. Journal of Applied Biology and Biotechnology. 9(6): 154-161.

Bilal M. and Iqbal H.M. (2020). State-of-the-art strategies and applied perspectives of enzyme biocatalysis in food sector-current status and future trends. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 60(12): 2052-2066.

Biswas S., Saber M.A., Tripty I.A., Karim M.A., Islam M.A., Hasan M.S., Alam A.S.M.R., Jahid M.I.K. and Hasan M.N. (2020). Molecular characterization of cellulolytic (endo-and exoglucanase) bacteria from the largest mangrove forest (Sundarbans), Bangladesh. Annals of Microbiology. 70: 1-11.

Bamrungpanichtavorn T., Ungwiwatkul S., Boontanom P. and Chantarasiri A. (2023). Diversity and cellulolytic activity of cellulase-producing bacteria isolated from the soils of two mangrove forests in Eastern Thailand. Biodiversitas Journal of Biological Diversity. 24(7): 3891-3902.

Das A., Bhattacharya S. and Murali L. (2010). Production of cellulase from a thermophilic *Bacillus* sp. isolated from cow dung. American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences. 8: 685-691.

Dewiyanti I., Darmawi D., Muchlisin Z.A., Helmi T.Z., Arisa I.I., Rahmiati R., Destri E. and Fanisha S. (2022). Characteristic and activity of cellulolytic bacteria isolated from mangrove soil in Northern coast of Aceh Province, Indonesia. Biodiversitas Journal of Biological Diversity. 23(12): 6587-6599.

Fan L.T., Gharpuray M.M. and Lee Y.H. (1987). Cellulose hydrolysis. Biotechnology monographs. Volume 3. Springer Science & Business Media: Germany.

Herrera C.S., Vázquez C.L.E., Vazquez V.I., Gómez B.F. and Corona B.J.E. (2021). A cellulolytic *Streptomyces* sp. isolated from a highly oligotrophic niche shows potential for hydrolyzing agricultural wastes. BioEnergy Research. 14: 333-343.

Inan B.K., Nalcaoğlu A., Ceylan E., Colak D.N., Caglar P., Agirman S., Sivri N.S., Gunes S., Kaya A., Canakci S. and Belduz A.O. (2023). Isolation and characterization of detergent-compatible amylase-, protease-, lipase-, and cellulase-producing bacteria. Brazilian Journal of Microbiology. 54(2): 725-737.

Irfan M., Safdar A., Syed Q. and Nadeem A. (2012). Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production and activity. Turkish Journal of Biochemistry. 37(3): 287-293.

Juturu V. and Wu J.C. (2014). Microbial cellulases: Engineering, production and applications. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 33: 188-203.

Khianngam S., Pootaeng-on Y., Techakriengkrai T. and Tanasupawat S. (2014). Screening and identification of cellulase producing bacteria isolated from oil palm meal. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 4(4): 090-096.

Kognou A.L.M., Chio C., Khatiwada J.R., Shrestha S., Chen X., Han S., Li H., Jiang Z.H., Xu C.C. and Qin W. (2022). Characterization of cellulose-degrading bacteria isolated from soil and the optimization of their culture conditions for cellulase production. Applied Biochemistry and Biotechnology. 194(11): 5060-5082.

Li F., Xie Y., Gao X., Shan M., Sun C., Niu Y.D. and Shan A. (2020a). Screening of cellulose degradation bacteria from Min pigs and optimization of its cellulase production. Electronic Journal of Biotechnology. 48: 29-35.

Li J.X., Zhang F., Wang W. and Zhao X.Q. (2020b). Diversity of cellulase-producing filamentous fungi from Tibet and transcriptomic analysis of a superior cellulase producer *Trichoderma harzianum* LZ117. Frontiers in Microbiology. 11: 1-15.

Liang Y.L., Zhang Z., Wu M., Wu Y. and Feng J.X. (2014). Isolation, screening, and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of China and optimization of cellulase production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. BioMed Research International. Article ID 512497. http://dx.doi.org/10.1155/2014/512497.

Lynd L.R., Weimer P.J., Van Z.W.H. and Pretorius I.S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 66(3): 506-577.

Miller G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31(3): 426-429.

Nurkanto A. (2009). Cellulolytic activities of actinomycetes isolated from soil rhizosphere of Waigeo, Raja Ampat, West Papua. Journal of Tropical Soils. 14(3): 239-244.

Pengproh R., Thanyasiriwat T., Sangdee K., Saengprajak J., Kawicha P. and Sangdee A. (2023). Evaluation and genome mining of *Bacillus stercoris* Isolate B.PNR1 as potential agent for *Fusarium* wilt control and growth promotion of tomato. The Plant Pathology Journal. 39(5):430-448.

Purnomo A., Yudiantoro Y.A.W., Putro J.N., Nugraha A.T., Irawaty W. and Ismadji S. (2016). Subcritical water hydrolysis of durian seeds waste for bioethanol production. International Journal of Industrial Chemistry. 7: 29-37.

Saini A., Aggarwal N.K., Sharma A. and Yadav A. (2015). Actinomycetes: a source of lignocellulolytic enzymes. Enzyme Research. 1: 279381.

Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution. 4(4): 406-425.

Sinha R.K., Valani D., Chauhan K. and Agarwal S. (2010). Embarking on a second green revolution for sustainable agriculture by vermiculture biotechnology using earthworms: reviving the dreams of Sir Charles Darwin. Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development. 2(7): 113-128.

Sreeja S.J., Jeba M.P.W., Sharmila J.F.R., Steffi T., Immanuel G. and Palavesam A. (2013). Optimization of cellulase production by *Bacillus altitudinis* APS MSU and *Bacillus licheniformis* APS2 MSU, gut isolates of fish *Etroplus suratensis*. International Journal of Advanced Research and Technology. 2(4): 401-406.

Tamura K., Stecher G. and Kumar S. (2021). MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. Molecular Biology and Evolution. 38(7): 3022-3027.

Yang W., Meng F., Peng J., Han P., Fang F., Ma L. and Cao B. (2014). Isolation and identification of a cellulolytic bacterium from the Tibetan pig's intestine and investigation of its cellulase production. Electronic Journal of Biotechnology. 17(6): 262-267.

Yoon S.H., Ha S.M., Kwon S., Lim J., Kim Y., Seo H. and Chun J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 67(5): 1613-1617.

Zhang S., Wang Z., Shen J., Chen X. and Zhang J. (2023). Isolation of an acidophilic cellulolytic bacterial strain and its cellulase production characteristics. Agriculture. 13(7): 1290-1309.