Isolation of *Actinomycetes* and xylanase production by using sugarcane bagasse as a carbon source

การคัดแยกเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยใช้ชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน

Received 15 Apr 20
Reviewed 7 May 20
Revised 9 Jun 20
Accepted 12 Jun 20

Saovanee Choojit* and Utain Chanlabut
เสาวณีย์ ชูจิต* และ อุเทน จันละบุตร
Bachelor of Education program in General Science, Faculty of Science and Technology, Muban Chom Bueng Rajabhat University, Ratchaburi
สาขาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏหมู่บ้านจอมบึง ราชบุรี

*Corresponding Author, Tel. +6691-8495963, E-mail: saovaneecho@mcru.ac.th
*ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทรศัพท์. 091-8495963 อีเมล: saovaneecho@mcru.ac.th

Abstract

Xylanases, a repertoire of hydrolytic enzymes which have commercial application in agriculture, industry and human food production. *Actinomycetes* are highly suitable for producing thermostable xylanase at industrial scale. The purposes of this study were to select and identify of high xylanase activity producing *Actinomycetes* and to investigate of its potential to produce xylanase utilizing sugarcane bagasse as a carbon source. The *Actinomycetes* strains were selected from soil-sediment around wastewater pond from sugar production mills and soil in sugarcane fields, Ratchaburi province. All selected strains were cultivated in basal medium supplementing sugarcane bagasse powder for 20 g/L and the crude enzyme was determined for xylanase activity. Three dominant-isolates were MCRU1 MCRU4 and MCRU19 exhibited high xylanase activity with 88.6±3.82 118.4±3.25 and 97.8±2.24 U/mL, respectively. Analysis of 16S rDNA sequencing of those isolates showed that they belong to member of the *Streptomyces* family including *Streptomyces misionensis*, *Streptomyces scabiei* and *Streptomyces* sp. at 99, 98 and 100 percent identity, respectively. The MCRU4 strain was selected for study the potential to produce enzyme by using sugarcane bagasse powder as a substrate. The result showed that the xylanase activity and cell-protein were dramatically increased and the highest activity was at 96 h with 118.4±3.25 U/mL and was at 48 h with 0.25±0.12 g/L, respectively.

Keywords: Xylanase, *Actinomycetes*, *Streptomyces*, Sugarcane bagasse

บทคัดย่อ

เอนไซม์ไซลาเนสจัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรไลติกที่มีการนำมาประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์ด้านอุตสาหกรรมการเกษตรและการผลิตอาหาร โดยเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทเป็นแหล่งที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาผลิตเอนไซม์ไซลาเนสทนร้อนระดับอุตสาหกรรม ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสโดยใช้ชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน โดยการคัดแยกเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทจากดินบริเวณบ่อน้ำทิ้งโรงงานผลิตน้ำตาลและดินในไร่อ้อยในจังหวัดราชบุรี นำเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลวพื้นฐานที่มีการเติมชานอ้อยบดละเอียด 20 กรัมต่อลิตร และนำส่วนใสไปทดสอบหากิจกรรมเอนไซม์ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ 3 สายพันธุ์ คือ MCRU1 MCRU4 และ MCRU19 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูง 88.6±3.82 118.4±3.25 และ 97.8±2.24 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อจำแนกสายพันธุ์ระดับโมเลกุล พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด สามารถจำแนกเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียสเตรปโตมัยซีท ซึ่งได้แก่ เชื้อ *Streptomyces misionensis Streptomyces scabiei* และ *Streptomyces* sp. ที่ 99 98 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อนำเชื้อสายพันธุ์ MCRU4 มาศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนส พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์มีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนมีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 เป็น 118.4±3.25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และค่าปริมาณโปรตีนของเซลล์นั้นเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนมีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 เป็น 0.25±0.12 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

คำสำคัญ: ไซลาเนส, แอคติโนมัยซีท, สเตรปโตมัยซีท, ชานอ้อย

1. บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายของจุลินทรีย์สูง มีการประเมินว่ามีถึง 10% ของจุลินทรีย์ที่มีในโลก [1] สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ได้ส่งเสริมให้วิจัยและพัฒนาทั้งทางด้านการสร้างเทคโนโลยีฐานสำหรับการค้นหาและผลิตเอนไซม์ จากแหล่งจุลินทรีย์ในประเทศเพื่อเสริมสร้างความเข้มแข็งและสามารถตอบโจทย์อุตสาหกรรมกลุ่มเป้าหมาย เพื่อการพัฒนาและสร้างความแข็งแกร่งให้กับอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวรูปของประเทศในอนาคต การผลิตเชื้อเพลิงและสารเคมีชีวรูปจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร รวมถึงการใช้ในอุตสาหกรรมที่มีมูลค่าสูง เช่น ผลิตภัณฑ์เพื่อสุขรูปและเครื่องสำอาง ปัจจุบันมีการรวบรวมเอนไซม์ไว้มากกว่า 30 ชนิดจากแหล่งจุลินทรีย์ในประเทศ โดยเฉพาะเอนไซม์ในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการย่อยองค์ประกอบของพืช เช่น เซลลูเลส ไซลาเนส แพคติเนส [2]

ไซลาเนส (xylanase) เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวของในการยอยสลายเฮมิเซลลูโลส ถูกเรียกรวม ๆ กันวา เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase) เอนไซม์ไซลาเนสเป็นเอนไซม์ที่จุลินทรีย์หลั่งออกมานอกเซลล์ (extracellular enzyme) เพื่อย่อยไซแลนที่เป็นสารโมเลกุลใหญ่ซึ่งจุลินทรีย์ไม่สามารถนำเข้าสู่เซลล์ได้ ดังนั้นจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน เช่น *Aspergillus, Trichoderma, Streptomyces* และ *Bacillus* จะต้องผลิตและปลดปล่อยเอนไซม์ไซลาเนสออกมานอกเซลล์เพื่อใช้ย่อยไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน [3] ในปัจจุบันมีการนำเอนไซม์ไซลาเนสไปประยุกต์ใช้ในหลายด้าน เช่น การผลิตพลังงาน กำจัดของเสีย ผลิตสารเคมี เพิ่มคุณรูปของน้ำผลไม้ อุตสาหกรรมกระดาษ และปรับปรุงคุณรูปของโด (dough) นอกจากนี้เอนไซม์ไซลาเนสยังมีคุณสมบัติในการผลิตไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีคุณสมบัติพรีไบโอติกส์ เอทานอล และสารประกอบที่มีประโยชน์อื่น ๆ อีกด้วย [4]

สเตรปโตมัยซีท (*Streptomyces* sp.) เป็นแบคทีเรียในกลุ่มแอคติโนมัยซีท (*Actinomycetes*) ที่ผลิตเอนไซม์ไซลาเนส ออกมาเป็นเอนไซม์หลักและมีปริมาณมากกว่าไซลาเนสชนิดอื่น [5] เชื้อ *S. olivaceoviridis* E-86 ที่แยกจากดิน สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ 1,653 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และทนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 และเมื่อนำ

เอนไซม์มาตรึงบนพอลิเมอร์ Eudragit S-100 พบว่าเอนไซม์ไซลาเนส สามารถทนอุณหภูมิได้ถึง 65 องศาเซลเซียส [6] จากการศึกษาเชื้อ *S. thermovulgaris* TISTR1948 พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสทนร้อนได้ 274.49 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50.03 องศาเซลเซียส ในเวลา 4 วัน เมื่อใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน [7]

ปัจจุบันมีการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรกลุ่มที่เป็นองค์ประกอบของเฮมิเซลลูโลสมากลับมาใช้ประโยชน์ในการเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูกในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ จากรายงานของ Rahmani และคณะ [8] ได้รายงานการทดสอบการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อแอคติโนมัยซีทจำนวน 797 ไอโซเลท โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ใช้ชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนและวัดกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสในน้ำเลี้ยงเชื้อ Bhosale และคณะ [9] ได้ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อแอคติโนมัยซีท จำนวน 25 ไอโซเลท โดยใช้เลี้ยงในอาหารที่ใช้ชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน (20 กรัมต่อลิตร) ที่อุณหภูมิ 30-50 องศาสเซลเซียส พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อให้กิจกรรมของเอนไซม์ใน 185 ยูนิตต่อมิลลิตร หลังจากเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน

ชานอ้อย (bagasse) เป็นวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการหีบอ้อยเพื่อผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อย พบว่า โดยทั่วไปแล้วอ้อย 1 ตัน โรงงานจะทำน้ำตาลได้ประมาณ 100 -120 กิโลกรัม จะได้ชานอ้อยที่มีความชื้นร้อยละ 50 ออกมาประมาณ 250-300 กิโลกรัม กากน้ำตาลประมาณ 50-60 กิโลกรัม และได้กากตะกอนประมาณ 30-40 กิโลกรัม [10] ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกอ้อย 9.48 ล้านไร่ ผลผลิตอ้อยเข้าโรงงานกว่า 1 แสนล้านตันต่อปี สำหรับจังหวัดราชบุรีมีพื้นที่ปลูกอ้อย 1.63 แสนไร่ และมีโรงงานผลิตน้ำตาลจากอ้อยจำนวน 2 โรงงาน [11] ซึ่งชานอ้อยส่วนใหญ่ได้ถูกนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิง ตามโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ แต่ปัจจุบันได้มีผู้คิดค้นหาวิธีนำชานอ้อยไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ เช่น ชานอ้อยเป็นแหล่งเซลลูโลสสำหรับการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิสเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล [12]

จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์โดยเฉพาะกลุ่มแอคติโนมัยซีท และการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมในพื้นที่ชุมชน ผู้วิจัยจึงเห็นว่าจะคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทที่สามารถสร้างเอนไซม์ไซลาเนสที่สามารถใช้ชานอ้อยเป็นอาหารราคาถูกเพื่อการเจริญเติบโต

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย

2.1 การศึกษาการแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีท

เก็บตัวอย่างดินรอบบ่อน้ำทิ้งโรงงานผลิตน้ำตาลทรายและไร่อ้อยในจังหวัดราชบุรี โดยเก็บดินรอบ ๆ บ่อน้ำทิ้งบ่อละ 10 จุด และดินในไร่อ้อยที่มีการทับถมของเศษใบอ้อย ไร่ละ 10 จุด จุดละ 10 กรัม โดยเก็บตัวอย่างที่อยู่ลึกลงไปจากผิวดิน 5 เซนติเมตร จากนั้น นำตัวอย่างดินไปอบแห้งในตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำตัวอย่างดินหลังจากอบตัวอย่างละ 5 กรัม ผสมลงในน้ำเกลือปลอดเชื้อเขมขนรอยละ 0.85 จากนั้น นำมาเจือจาง แล้วเกลี่ยเชื้อลงในอาหารที่เติมไซแลนทางการค้า (Sigma, St. Louis, MO) เป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง คัดเลือกเชื้อที่เจริญและมีวงใสรอบโคโลนี วัดความกวางของเส้นผานศูนยกลางของวงใสที่แบคทีเรียสร้างขึ้น

2.2 การหากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อที่คัดเลือกได้

ทำการถ่ายเชื้อเริ่มต้นที่ได้จำนวน 10% โดยปริมาตรลงไปในอาหารที่ใช้ผลิตเอนไซม์ไซลาเนส จากเชื้อที่คัดแยกได้ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยเพาะเลี้ยงในอาหารชนิดเดียวกับที่ใช้เตรียมเชื้อตั้งต้น นำไปบ่มในเครื่องเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 96 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเอนไซม์โดยนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนใสกับตะกอนเซลล์ที่ได้ออกจากกัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที นำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสโดย

ใช้ beech wood xylan (Sigma, USA) เป็นสับเสตรต แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีการ dinitrosalicylic acid (DNS) แล้วเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส โดยกำหนดให้เอนไซม์ 1 Unit หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนสับสเตรท 1 µM ไปเป็นผลิตภัณฑ์ภายในเวลา 1 นาที [13]

2.3 ศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกได้โดยใช้ชานอ้อยเป็นแหล่งอาหารราคาถูก

การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อแอคติโนมัยซีททนร้อนที่คัดเลือกได้ เลี้ยงในอาหารเหลวพื้นฐาน ซึ่งประกอบด้วย ยีสต์สกัด 5 กรัม K_2HPO_4 1.0 กรัม KH_2PO_4 0.5 กรัม $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 กรัม NaCl 0.2 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.1 กรัม $CaCl_2.2H_2O$ 0.1 กรัม Tween 80 0.1 กรัม และชานอ้อยบดละเอียด 20 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายใสที่ได้มาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส และวิเคราะห์ค่าปริมาณโปรตีนโดยวิธีการของ Lowry และคณะ [14] โดยใช้ โปรตีนอัลบูมินเป็นเป็นสารมาตรฐาน

2.4 การจำแนกแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

สกัดดีเอ็นเอจากเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ไซลาเนสที่คัดเลือกได้ ด้วยชุดสกัดและทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำปฏิกิริยา PCR เพื่อเพิ่มจำนวนยีน 16S rDNA ในตำแหน่ง 27-1492 ของตำแหน่งยีน 16S rDNA ด้วย universal 16S ไพรเมอร์ 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') และ 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACGA-CTT-3') [15] หลังเสร็จสิ้นกระบวนการเพิ่มจำนวนยีน ตรวจสอบขนาดด้วยเครื่องเจลอิเล็คโทรโฟรีซิส และทำความบริสุทธ์ของชิ้นดีเอ็นเอด้วยชุดทำบริสุทธิ์ (QIAquick, Qiagen, Hilden, Germany) และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ (Pacific Science Co., Ltd) และเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลในโปรแกรม NCBI (National Center for Biotechnology Information) ในรูปแบบของ FASTA (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

3. ผลการศึกษา

3.1 ผลการศึกษาการแยกและคัดเลือกเชื้อแอคติโนมัยซีท

3.1.1 ผลการคัดแยกแบคทีเรียจากดินบนอาหารแข็ง

จากการเก็บตัวอย่างดินบริเวณรอบ ๆ บอน้ำทิ้งโรงงานผลิตน้ำตาลทราย บ่อละ 10 จุด และดินในไร่อ้อยที่มีการทับถมของเศษใบอ้อย ไร่ละ 10 จุด จุดละ 10 กรัม ได้แก่ โรงงานน้ำตาลราชบุรี โรงงานน้ำตาลบ้านโป่ง จำกัด และดินบริเวณไร่อ้อยในอำเภอจอมบึงจำนวน 3 แห่ง เพื่อนำมาคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแอคติโนมัยซีท โดยพิจารณาจากลักษณะปรากฏของโคโลนีและกิจกรรมการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสบนอาหารแข็ง พบว่า จากแหล่งเก็บตัวอย่างดินทั้งหมด 5 พื้นที่ดังที่กล่าวมา พบเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนทบนอาหารแข็ง โดยปรากฏวงใสขนาด 1.0-5 เซนติเมตร จำนวนทั้งสิ้น 30 โคโลนี (ตารางที่ 1)

จากตารางที่ 1 โรงงานน้ำตาลราชบุรีมีจำนวนแบคทีเรียที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส ซึ่งปรากฏวงใสขนาด 1.0-5.0 เซนติเมตร จำนวน 7 โคโลนี ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.8-4.9 เซนติเมตร โรงงานน้ำตาลบ้านโป่ง จำนวน 6 โคโลนี ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.4-3.6 เซนติเมตร โรงงานน้ำตาลไทยกาญจนบุรี จำนวน 6 โคโลนี ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.6-3.7 เซนติเมตร ดินไร่อ้อย 1 จำนวน 5 โคโลนี ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.5-4.2 เซนติเมตร และดินไร่อ้อย 2 จำนวน 7 โคโลนี ซึ่งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.1-4.1 เซนติเมตร ดังนั้น จึงเลือกโคโลนีซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดซึ่งปรากฏวงใสขนาด 3.0-5.0 เซนติเมตร เพื่อศึกษาต่อในขั้นต่อไป

ตารางที่ 1 กลุ่มแอคติโนมัยซีทที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนทบนอาหารแข็ง

แหล่งที่เก็บตัวอย่างดิน	ชื่อ	เส้นผ่าน ศก. บนอาหารแข็ง (ซ.ม.)*	แหล่งที่เก็บตัวอย่างดิน	ชื่อ	เส้นผ่าน ศก. บนอาหารแข็ง (ซ.ม.)*
โรงงานน้ำตาลราชบุรี	MCRU1	4.0±0.23	ดินไร่อ้อย 1	MCRU16	3.7±0.28
	MCRU2	1.8±0.15		MCRU17	3.2±0.22
	MCRU3	2.6±0.22		MCRU18	1.6±0.23
	MCRU4	4.9±0.35		MCRU19	4.2±0.19
	MCRU5	3.1±0.20		MCRU20	2.9±0.24
	MCRU6	1.9±0.26		MCRU21	2.5±0.18
	MCRU7	2.2±0.19		MCRU22	3.6±0.15
โรงงานน้ำตาลบ้านโป่ง	MCRU8	2.5±0.15		MCRU23	2.7±0.21
	MCRU9	1.4±0.11	ดินไร่อ้อย 2	MCRU24	4.1±0.24
	MCRU10	3.6±0.24		MCRU25	1.1±0.06
	MCRU11	3.3±0.18		MCRU26	2.3±0.14
	MCRU12	2.0±0.15		MCRU27	2.3±0.16
โรงงานน้ำตาลไทยกาญจนบุรี	MCRU13	1.8±0.23		MCRU28	2.7±0.23
	MCRU14	2.1±0.25		MCRU29	1.9±0.21
	MCRU15	2.2±0.16		MCRU30	1.7±0.17

*ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.1.2 ผลศึกษาการหากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ผลิตจากเชื้อที่คัดเลือกได้

จากการเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดเลือกทั้งหมด 8 สายพันธุ์ มาเลี้ยงเพื่อตรวจวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่ปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อนำมาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยทำการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในอาหารพื้นฐานที่มีการเติมชานอ้อยบดละเอียด 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มบนเครื่องเขย่าที่มีความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ MCRU4 มีค่ากิจกรรมการของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดที่ 118.4±3.25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 2) ซึ่งเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ MCRU4 เพื่อการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่เวลาต่าง ๆ ต่อไป

ในการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกได้โดยใช้ชานอ้อยเป็นแหล่งอาหารราคาถูกจากเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกทั้ง 8 สายพันธุ์ พบว่า เชื้อทั้งหมดสามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสที่มีกิจกรรมระหว่าง 73.7-118.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ชานอ้อยบดละเอียดเป็นแหล่งคาร์บอนแหล่งเดียว (ตารางที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Rahmani และคณะ [8] และ Bhosale และคณะ [9] พบว่า ชานอ้อยสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทเพื่อผลิตเอนไซม์ไซลาเนส โดยตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ใช้ชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน

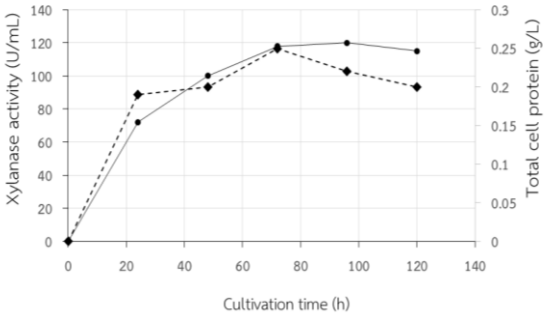
3.2 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อแอคติโนมัยซีทที่คัดเลือกได้โดยใช้ชานอ้อยเป็นแหล่งอาหารราคาถูก

จากการศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ MCRU4 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด โดยทำการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในอาหารพื้นฐานที่มีการเติมชานอ้อยบดละเอียด 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสของแบคทีเรียสายพันธุ์ MCRU4 มีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนมีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 (118.4±3.25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) จากนั้นมีค่าลดลงตามลำดับ การสร้างเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อสเตรปโตมัยสีทส่วนใหญ่แล้วจะมีการสร้างเอนไซม์ตั้งแต่วันแรกและเมื่อสร้างเอนไซม์ได้สูงสุดแล้วค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสก็จะมีค่าลดลง ส่วนค่าปริมาณโปรตีนของเซลล์นั้นเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จากชั่วโมง ที่ 0 จนมีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 (0.25±0.12 กรัมต่อลิตร) ในรูปที่ 2 ซึ่งหลังจากนั้น ปริมาณโปรตีนของเซลล์จะมีค่าลดลงตามลำดับ (รูปที่ 1) ซึ่งพบว่า กราฟค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสที่วัดได้สอดคล้องกับการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสของเชื้อ *S. thermovulgaris* TISTR1948 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์เอนโดไซลาเนสทนร้อนที่มีกิจกรรมเอนไซม์ มีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนมีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 (274.49 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 50.03 องศาเซลเซียส โดยใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน [7]

ตารางที่ 2 กิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนสของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

สายพันธุ์	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/L)*	กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส (U/mL)*
MCRU1	2.97±0.14	88.6±3.82
MCRU4	3.44±0.22	118.4±3.25
MCRU10	2.86±0.31	80.8±4.61
MCRU11	2.82±0.25	80.5±4.53
MCRU16	1.86±0.22	74.9±2.97
MCRU17	1.81±0.31	73.7±3.65
MCRU19	3.08±0.42	97.8±2.24
MCRU22	1.99±0.18	78.5±2.09

*ทำการทดลอง 3 ซ้ำ



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส (xylanase activity) (●) และปริมาณโปรตีนของเซลล์ (total cell protein) กับเวลา (◆) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ MCRU

3.3 ผลการจำแนกแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

จากการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ไซลาเนสที่คัดเลือกได้ พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด คือ MCRU1 และ MCRU4 และ MCRU19 สามารถจำแนกเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียแอคติโนมัยซีท อยู่ใน

จีนัสสเตรปโตมัยซีท ซึ่งมีความใกล้เคียงกับ *Streptomyces misionensis* (accession No. KX129893) *Streptomyces scabiei* (accession No. EU559731) และ Streptomyces sp. (accession No. MN058274) ถึง 99 98 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ แสดงดังรูปที่ 2

MCRU1
cagaagcgaaagtgacggtacctgcagaagaagcgccggctaactacgccagcagccgcggtaatacgta
gggcgcatagcgttgtccggaattattgggcgtaaagagctcgaggcggcttgtcacgtcggttgtgaaa
gcccgggcttaaccccgggtctgcagtcgatacgggcaggctagaagttcggtaggggagatcggaatt
cctggtgtagcggtgaaatgcgcagatatcaggaggaacaccggtggcgaaggcggatctctgggccgta
tactgacgctgaggagcgagcgtggggagcgaacaggattagataccctggtagtccacgccgtaaaggt
gggcactaggtgtgggcacattccacgttgtccgtgccgcagctaacgcattaagtgccccgcctgggga
gtacggccgcaaggctaaaactcaaaggaattgacgggggcccgcacaagcggcggagcatagtggctta
attcgacgcaacgcgaagaaccttaccaaggcttgacatacaccggaaagcattagagatagtgccccc
ttgtggtcggtgtacaggtgg

MCRU4
tgagggatgacggccttcgggttgtaaacctctttcagcagggaagaagcgaaagtgacggtacctgcag
aagaagcgccggctaactacgtgccagcagccgcggtaatacgagggcgcgagcgtattccgggaattatt
gggcgtaaagagctcgtaggcggtctgtcgcgtcggatgtgaaagcccgggggcttaaccccgggtctgca
ttcgatacgggcagactagagtgtggtagggtagatcggaattcctggtgtagcggtgaaatgcgcagt
atcaggaggaacaccggtggcgaaggcggatctctgggccattactgacgctgaggagcgaaagcgtggg
gagcgaacaggattagataccctggtagtccacgccgtaaacggtgggaactaggtgttggcgacattcc
acgtcgtcggtgccgcagctaacgcattaagttccccgcctggggacgtacggccgcaaggctaaaactc
aaaggaattgacgggggcccgcacaagcagcggagcatgtggcttaattcgacgcaacgcgaagaacctt
accaaggctgacatacac

MCRU19
gcacaagcggcggagcatgtggcttaattcgacgcaacgcgaagaaccttaccaaggcttgacatacacc
ggaaagcattagagatagtgccccctgggtcggtgtacaggtggtgcatggctgtcgtcagctcgtgtc
gtgagatgttgggttaagtcccgcaacgagcgcaaccctgtcccgtgttgccagcaactcttcggaggt
tggggactcacgggagaccgccggggtcaactcggaggaaggtggggcgacgtcaagtcatcatgccccct
tatgtcttgggctgcacacgtgctacaatggcgggtacaatgagctgcgatacccgtgaggtggagcgaat
ctcaaaaagccggtctcagttcggattggggtctgcaactcgaccccatgaagtcggagtcgctagtaat
cgcagatcagcattgctgcggtgaatacgttcccgggccttgtacacaccgcccgtcacgtcacgaaagt
cggtaacacccgaagccgtggcccaacccgcaagggagggagcggtcgaaggtgggactggcgattggg
acgaagtcgtaacaaggtagccgtaccggaaggtgcggctggatcacctcctt

รูปที่ 2 ลำดับเบสของเชื้อจุลินทรีย์ MCRU1 MCRU4 และ MCRU19 โดยสกัดดีเอ็นเอและนำมาทำปฏิกิริยาเพิ่มจำนวนด้วยวิธี PCR ในตำแหน่ง 27-1492 ของตำแหน่งยีน 16S rDNA

4. สรุปและอภิปรายผล

การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทจากตัวอย่างดินบริเวณรอบ ๆ บอน้ำทิ้งโรงงานผลิตน้ำตาลทราย และดินในไร่อ้อยที่มีการทับถมของเศษใบอ้อย พบเชื้อกลุ่มแอคติโนมัยซีทที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนทบนอาหารแข็ง โดยปรากฏวงใสขนาด 1.0-5 เซนติเมตร จำนวนทั้งสิ้น 30 โคโลนี และเลือกโคโลนีซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดซึ่งปรากฏวงใสขนาด 3.0-5.0 เซนติเมตร เมื่อนำโคโลนีที่มีขนาดวงใสกว้างที่สุดจำนวน 8 โคโลนี มาเลี้ยงเพื่อตรวจวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส โดยทำการเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในอาหารพื้นฐานที่มีการเติมชานอ้อยบดละเอียด 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ MCRU4 มีค่ากิจกรรมการของเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุดที่ 118.4±0.25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และจำแนกแบคทีเรียโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA สามารถระบุได้ว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียนในกลุ่มแอคติโนมัยซีท จีนัสสเตรปโตมัยซีท อย่างไรก็ตาม ค่ากิจกรรมและความสามารถในการทนความร้อนของเอนไซม์ไซลาเนสจากเชื้อจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน จากรายงานการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มย่อยสเตรปโตมัยซีท พบว่า เชื้อ *S. olivaceoviridis* E-86 ที่แยกจากดิน สามารถผลิตเอนไซม์ไซลาเนสได้ถึง 1,653 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และทนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส [6] และจากการคัดแยกและศึกษาเชื้อ *S. thermovulgaris* TISTR1948 พบว่า สามารถผลิตเอนไซม์เอนโดไซลาเนสทนร้อนที่มีกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสที่ 274.49 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50.03 องศาเซลเซียส โดยใช้ฟางข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน [7]

5. องค์ความรู้ใหม่

ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแบคทีเรียแอคติโนมัยซีท กลุ่มย่อยสเตรปโตมัยซีทที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ไซลาเนสออกมานอกเซลล์ โดยเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้นี้สามารถเจริญเติบโตและสร้างเอนไซม์ไซลาเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้

6. กิตติกรรมประกาศ

ผู้จัดทำขอขอบพระคุณสำนักวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยราชภัฏหมู่บ้านจอมบึง สำหรับการทุนสนับสนุนการวิจัยจากทุนงบประมาณเงินรายได้มหาวิทยาลัยราชภัฏหมู่บ้านจอมบึง ประจำปีงบประมาณ 2561 ขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏหมู่บ้านจอมบึง สำหรับการอำนวยความสะดวกในเรื่องสถานที่และอุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับการวิจัยในครั้งนี้

7. เอกสารอ้างอิง

[1] National Science and Technology Development Agency (NSTDA). “Microorganism

Bank". (in Thai). 2017. [Online]: 24 October 2017.https://mgronline.com/science/detail/9600000107780.

[2] Champreeda., W. 2018. Microoragamisms bank "Enzyme Industry Value in World Market" (in Thai). [Online] 24 October 2018. https://mgronline.com/science/detail.pdf.

[3] Javier, P.I., Óscar, G., Sanz-Aparicio, J. and Díaz, P. 2007. Xylanases: Molecular Properties and Applications. In: Industrial Enzymes. Polaina J, MacCabe A (eds). Springer Netherlands. 65-82.

[4] Fang, T.J., Liao, B.C. and Lee, S.C. 2010. Enhanced production of xylanase by *Aspergillus carneus* M34 in solid-state fermentation with agricultural waste using statistical approach. New on Biotechnology. 27:25–32.

[5] Li, N., Shi, P., Yang, P., Wang, Y., Luo, H., Bai, Y., Zhou, Z., and Yao, B. 2009. Cloning, expression, and characterization of a new *Streptomyces* sp. S27 xylanase for which xylobiose is the main hydrolysis product. Applied Biochemistry and Biotechnology. 159:521-531.

[6] Ai, Z., Jiang, Z., Li, L., Deng, W., Kusakabe, I. and Li, H. 2005. Immobilization of *Streptomyces olivaceoviridis* E-86 xylanase on Eudragit S-100 for xylooligosaccharide production. Process Biochemistry. 40:2707–2714.

[7] Chaiyaso, T., Kantiya, A., Techapan, C., Leksawasdi, N., Seesuriychan, P. and Hanmoungjai, P. 2011. Optimization of cellulase-free xylanase production by thermophilic *Streptomyces thermovulgaris* TISTR1948 through Placket-Burman and Response surface methodological approaches. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 75:531-537.

[8] Rahmani, N., Kahar, P., Lisdiyanti, P., Hermiati, E., Lee, J., Prasetya, B., Ogino, C. and Kondo, A. 2018. Xylanase and feruloyl esterase from *actinomycetes* cultures could enhance sugarcane bagasse hydrolysis in the production of fermentable sugars. Bioscience Biotechnology and Biochemistry. 82:904–915.

[9] Bhosale, H.J., Sukalkar, S.R., Uzma, S.M.Z. and Kadam, T.A. 2015. Production of xylanase by *Streptomyces rameus* grown on agricultural wastes. Biotechnology Biorefinery and Bioengineering. 1:505-512.

[10] Rocha, G.J.M., Martin, C., Soares, I.B., Maior, A.N.S., Baudel, H.M. and Abreu, C.A.M. 2011. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. Biomass and Bioenergy. 35:663-670.

[11] Sugarcane and Sugar Officer. Sugarcane Areas Report on 2017/2018 (in Thai). 2018. [Online] 10 September 2019. http:/www.ocsb.go.th/upload/journal/923-9999.pdf.

[12] Guo, Y., Xu, J., Zhang, Y., Yu, Q., Yaun, Z. and Liu, Y. 2013. Effects of different pretreatment methods on chemical composition of

sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis. Bioresource Technology. 144:396-400.

[13] Techapun, C., Charoenrat, T., Watanabe, M., Sasaki, K. and Poosaran, N. 2002. Optimization of thermostable and alkaline-tolerant cellulase-free xylanase production from agricultural waste by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab106, using the central composite experimental design. Biochemistry and Engineering Journal. 12:99-105.

[14] Lowry. O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biology and Chemistry. 193:265-275.

[15] Senthilraj, R., Prasad, G.S., Janakiraman, K. 2016. Sequence-based identification of microbial contaminants in non-parenteral products. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 5:329-336