

แบคทีเรียที่มีประโยชน์ชักนำการสะสมกาบา ในเมล็ดข้าวกล้องงอกอินทรีย์

Beneficial Bacteria Induced GABA Accumulation in Germinated Organic Brown Rice

นิภาพร ดวงแก้ว, วิลาวรรณ เชื้อบุญ และดุสิต อธินวัทธ์*

สาขาการจัดการเกษตรอินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Nipaporn Doungkaew, Wilawan Chuaboon, and Dusit Athinuwat*

Major of Organic Farming Management, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,
Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

กลุ่มแบคทีเรีย 182 สายพันธุ์ ถูกแยกมาจากข้าวกล้องงอกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ที่มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณการสะสม gamma-aminobutyric acid (GABA) ในการผลิตข้าวกล้องงอกขาวดอกมะลิ 105 เป็นการคัดเลือกแบคทีเรียทั้งหมดถูกแบ่งออกเป็น 7 กลุ่ม ตามลักษณะสัณฐานวิทยา แบ่งออกเป็น กลุ่ม 1 โคโลนีสีเหลือง-ขาวครีม โปร่งแสง มีเมือกเยิ้ม กลุ่ม 2 โคโลนีมีสีเหลือง รูปร่างกลม กลุ่ม 3 และ 4 โคโลนีสีส้ม โดยกลุ่ม 3 โคโลนีกลมเงา แต่กลุ่ม 4 โคโลนีมีลักษณะโค้งนูน กลุ่ม 5 โคโลนีมีสีขาว แท่งแบน รูปร่างไม่แน่นอน กลุ่ม 6 และ 7 โคโลนีสีขาว กลม เป็นเงา โดยกลุ่ม 6 โคโลนีโปร่งแสง แต่กลุ่ม 7 ไม่โปร่งแสง ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ TU-009 จากกลุ่ม 5 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการชักนำให้ข้าวกล้องงอกขาวดอกมะลิ 105 ผลิตกาบาเท่ากับ 13.58 มิลลิกรัม/100 กรัม ข้าวกล้องงอกเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ และกรรมวิธีควบคุมที่ใช้สารสังเคราะห์ calcium-calmodulin ($p = 0.05$) จึงจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรีย TU-009 ด้วยวิธีการมาตรฐานและการใช้ 16S rDNA ผลการทดลองพบว่า TU-009 มีความเหมือน 100 % กับ *Bacillus subtilis* ดังนั้น *B. subtilis* สายพันธุ์ TU-009 จึงมีศักยภาพในการกระตุ้นให้เกิดการสะสมกาบาเพื่อใช้เป็นกระบวนการผลิตทางเลือกหรือเป็นแนวทางในการลดการใช้สารเคมีสังเคราะห์ในระบบการผลิตข้าวกล้องงอก

คำสำคัญ : กาบา; การจำแนกชนิดแบคทีเรีย; เกษตรอินทรีย์; ลดการใช้สารเคมี

Abstract

The bacterial collection consisting of 182 strains was isolated from germinated organic brown rice cv. Khao Dawk Mali 105 to identify beneficial bacteria enhancing gamma-aminobutyric acid

(GABA) accumulation in commercial Khao Dawk Mali 105 germinated organic brown rice production. They were separated into 7 groups based on morphological characteristics. Group 1 was yellow-white cream transparent colony and filmy. Group 2 was yellow colony and circular. Groups 3 and 4 were orange colony, Group 3 was circular and shiny while Group 4 was convex shape. Group 5 was white colony, dry, flat, and irregular form. Groups 6 and 7 were white colony, circular, and shiny, Group 6 was transparent colony but Group 7 was not. A new benefit bacterium strain TU-009 from Group 5 induced highest GABA production in germinated organic brown rice cv. Khao Dawk Mali 105 with 13.58 mg/100 g germinated organic brown rice compared to among the strains and positive control, calcium-calmodulin ($p = 0.05$). The identification of bacterium strain TU-009 using classical method and 16S rDNA was investigated. The result revealed that strain TU-009 was 100 % equivalent to *Bacillus subtilis*. Therefore *B. subtilis* strain TU-009 has the GABA accumulation potential in germinated organic brown rice production system as alternative processing or reducing chemical inducer use.

Keywords: gamma-aminobutyric acid; bacterial identification system; organic farming; reduced chemical

1. คำนำ

ข้าวกล้องมีองค์ประกอบทางโภชนาการสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับข้าวขาวที่ผ่านการขัดสี เช่น เส้นใยอาหาร กรดไฟติก วิตามินอี วิตามินบี และ gamma-aminobutyric acid (GABA) ซึ่งองค์ประกอบทางโภชนาการเหล่านี้ส่วนใหญ่จะอยู่ที่จมูกข้าวและรำข้าวซึ่งจะถูกขัดออกระหว่างการสี (Standard tables of food composition in Japan, 2000; Champagne *et al.*, 2004) โดยกาบาเป็นกรดอะมิโนที่ถูกผลิตมาจากกระบวนการ decarboxylation ของ glutamic acid เพื่อทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ในระบบประสาทส่วนกลาง และเป็นสารยับยั้ง (inhibitor) ช่วยให้สมองเกิดการผ่อนคลายและนอนหลับสบาย รวมทั้งช่วยกระตุ้นต่อมไร้ท่อ (anterior pituitary) ให้ผลิตฮอร์โมนที่ทำหน้าที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น (Li and Xu, 2008) Karladee และ Suriyong (2012) สามารถตรวจพบกาบาในเมล็ด

ธัญพืช รวมทั้งเมล็ดข้าว ตั้งแต่เมล็ดเริ่มงอกจนกระทั่งอายุ 30 วัน (Bouché and Fromm, 2004) แต่การสะสมของกาบาที่เกิดขึ้นในธรรมชาติมีปริมาณน้อยและไม่คงที่ส่งผลให้ไม่เพียงพอต่อความต้องการที่จะทำให้เกิดผลตามที่คาดหวังได้ นอกจากนี้มีรายงานว่ากาบาจะมีการสะสมในพืชเพิ่มมากขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมหรือพืชอยู่ในสภาวะเครียดทางกายภาพ (abiotic stress) เช่น สภาพร้อน แสง สารเคมี และธาตุอาหารบางชนิด เช่น calcium-calmodulin (Baum *et al.*, 1996) และการกระตุ้นด้วยสภาวะเครียดจากสิ่งมีชีวิต (biotic stress) ได้แก่ จุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* sp. หรือ *Pseudomonas fluorescens* เป็นต้น ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการกระตุ้นให้พืชสะสมกาบา (Shelp *et al.*, 1999) นอกจากนี้การสะสมกาบาในพืชยังมีผลต่อการลดการระบาดของแมลงศัตรูพืช รวมทั้งสามารถลด

ปริมาณสัญญาณ quorum sensing และความรุนแรงในการก่อโรคของ *Agrobacterium tumefaciens* สาเหตุโรค crown gall (Chevrot et al., 2006) จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่ากาบาอาจเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับการสื่อสารระหว่างพืชกับสิ่งมีชีวิตอื่น เช่น แบคทีเรีย รา และแมลง (Shelp et al., 2006) จึงเป็นแนวทางในการวิจัยในครั้งนี้ที่ใช้แบคทีเรียที่มีประโยชน์เป็น elicitors ในการกระตุ้นการสะสม กาบาในเมล็ดข้าวกล้องงอกเพื่อพัฒนาและเพิ่มมูลค่าสำหรับสินค้าเกษตรอินทรีย์ คณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะนำแบคทีเรียที่มีประโยชน์มาใช้ในการกระตุ้นให้เมล็ดข้าวขาวดอกมะลิ 105 ให้มีการสะสมกาบาเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจัดเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับผลผลิตทางการเกษตรเพื่อเป็นต้นแบบของวิสาหกิจชุมชนหรือภาคอุตสาหกรรมต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การแยก รวบรวม และจัดกลุ่มแบคทีเรียที่มีประโยชน์

2.1.1 การแยกแบคทีเรียที่มีประโยชน์จากผิวเมล็ดข้าว

นำเมล็ดข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ที่ผ่านการแช่น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 48 ชั่วโมง เพาะในจานเพาะเชื้อยัดยออ่อนยาว 1 มิลลิเมตร มาแยกแบคทีเรียที่ผิวเมล็ดข้าว โดยการนำเมล็ดข้าวงอกจำนวน 1 กรัม ใส่ลงในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer นาน 20 นาที และเก็บเฉพาะส่วนของน้ำมาเจือจางด้วยวิธีการ ten-fold serial dilution ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-1} - 10^{-6} จากนั้นกระจายให้ทั่วผิวหน้าอาหาร nutrient glucose agar (NGA) บ่มไว้ 24-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (25 ± 3 องศาเซลเซียส) เลือกโคโลนีเดี่ยวทุกลักษณะนำไป streak บน NGA จานใหม่ จนกระทั่งได้เชื้อบริสุทธิ์เพื่อจำแนกเป็น

กลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยสีและลักษณะโคโลนี และเก็บรักษาไว้ในสภาพ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็น stock ในการศึกษาขั้นถัดไป

2.1.2 การแยกแบคทีเรียภายในเมล็ดข้าว

นำเมล็ดข้าวที่ฆ่าเชื้อที่ผิว 1 กรัม ไปบดในน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร เก็บเฉพาะส่วนของน้ำมาเจือจาง ด้วยวิธีการ ten-fold serial dilution กระจายให้ทั่วผิวหน้าอาหาร NGA ตามรายละเอียดวิธีการข้อ 2.1.1

2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการชักนำให้เมล็ดข้าวสะสมกาบา

2.2.1 การเตรียมข้าวกล้องงอก

วางแผนการทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียที่แยกได้ในข้อ 2.1 ในการชักนำการสะสมกาบาในเมล็ดข้าวแบบ CRD (completely randomized design) กรรมวิธีละ 10 ซ้ำ โดยเตรียม suspension เชื้อบริสุทธิ์ที่รวบรวมได้จากข้อ 2.1 ที่ความเข้มข้นเซลล์ 10^6 cfu/ml สายพันธุ์ละ 100 มิลลิลิตร จากนั้นสุ่มตัวอย่างเมล็ดข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 จำนวน 10 กรัม ฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยการแช่เมล็ดใน clorox 10 % นาน 2 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง นำเมล็ดข้าวแชลงใน suspension ของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์นาน 30 นาที เปรียบเทียบกับการแช่ใน calcium-calmodulin (positive control) และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ (negative control) จากนั้นนำเมล็ดข้าวดังกล่าวไปแช่น้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อให้น้ำท่วมข้าวสูงประมาณ 2 นิ้ว นาน 48 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง นำข้าวที่ได้มาใส่ภาชนะเพาะงอก ห่อด้วยผ้าขาวบาง 3 ชั้น เพื่อรักษาความชื้น นำไปเพาะบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พรหมน้ำและวัดความยาวของยอดอ่อน ทุก ๆ 6 ชั่วโมง จนกระทั่งมีความยาวยอดอ่อนถึง 1 มิลลิเมตร จึงนำมาทำการ pregelatinization โดยการนึ่งด้วยไอน้ำนาน 5 นาที

เพื่อหยุดกระบวนการงอก และยับยั้งเอนไซม์ต่าง ๆ ในเมล็ดข้าวงอก แล้วนำตัวอย่างข้าวที่ได้ไปทำแห้ง ต่อโดยการอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนเหลือความชื้น 14 % นำไปวิเคราะห์ปริมาณ GABA ต่อไป

2.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณกาบา

นำตัวอย่างข้าวจากข้อ 2.2.1 มาวิเคราะห์ปริมาณกาบาโดยชั่งตัวอย่างข้าว 3 กรัม ที่บดละเอียดในไนโตรเจนเหลว ละลายใน ethanol 80 % เขย่าให้เข้ากัน กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ตั้งทิ้งไว้จน ethanol ระเหย เติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร borate buffer 0.2 มิลลิลิตร และ phenol 6 % 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติม NaOCl 10 % 0.4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้ม 10 นาที ทำให้เย็นทันที จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 630 นาโนเมตร (Kitaoka and Nakano, 1969) บันทึกผลการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปพร้อมคัดเลือแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ชักนำให้ข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 สะสมกาบาได้ดีที่สุดนำไปจำแนกชนิดเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาเชิงลึกและใช้ประโยชน์จริงต่อไป

2.3 การจำแนกชนิดแบคทีเรียที่มีประโยชน์

2.3.1 การศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานและสรีรวิทยา

นำแบคทีเรียสายพันธุ์ TU-009 ที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการสะสมกาบา มาเลี้ยงบนอาหาร NGA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียโดยเปรียบเทียบกับลักษณะต่าง ๆ ประกอบด้วย สี และลักษณะรูปร่างของโคโลนี รวมทั้งทดสอบคุณสมบัติในการติดสีแกรม (Schaad *et al.*, 1988)

2.3.2 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมี

เลี้ยงแบคทีเรีย TU-009 บนอาหาร

NGA ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24-48 ชั่วโมง นำมาทดสอบลักษณะทางชีวเคมีบางประการ โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลจากตำรา Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9th Ed.) เช่น oxidase test, cytochrome oxidase, catalase production, oxygen relationship, indole production, citrate utilization, urease test และ starch hydrolysis (Holt *et al.*, 1994)

2.3.3 การศึกษาคุณสมบัติทางโมเลกุล

ศึกษาสายพันธุ์ TU-009 ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการกระตุ้นการสะสมกาบาเปรียบเทียบกับ *B. subtilis* TU-Orga 1 (Satitthampana *et al.*, 2012) ตรวจสอบโดยออกแบบไพรเมอร์จำเพาะบริเวณ 16S *rDNA* ของแบคทีเรีย และเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยา PCR และตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอหลังการเพิ่มปริมาณด้วยวิธี agarose gel electrophoresis ย้อมเจลด้วย ethidium bromide จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอโดยดูการเรืองแสงภายใต้แสง ultraviolet แล้ววิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยการทำ sequencing

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

3.1 การแยก รวบรวม และจัดกลุ่มแบคทีเรียที่มีประโยชน์

การแยกและรวบรวมแบคทีเรียที่มีประโยชน์จากผิวและภายในเมล็ดของข้าวกล้องงอกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 182 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถแบ่งตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ทั้งหมด 7 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 โคโลนีสีขาวครีม โปร่งใส กลางโคโลนียกตัวขึ้นสีเหลือง และโคโลนีลักษณะเยิ้ม กลุ่มที่ 2 โคโลนีสีเหลือง กลม และขอบเรียบ กลุ่มที่ 3 โคโลนีสีส้ม กลม และมันเงา กลุ่มที่ 4 โคโลนีสีส้มอมเหลือง กลม และรูปทรงหนูน กลุ่มที่ 5 เป็น

แบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีสีขาว ค่อนข้างกลม ขอบไม่เรียบ และมีลักษณะแห้ง กลุ่มที่ 6 โคโลนีสีขาว โปร่งใส กลม และมันเงา และกลุ่มที่ 7 โคโลนีสีขาว กลม และมันเงา จำนวน 15, 19, 12, 5, 78, 32 และ 21 สายพันธุ์ ตามลำดับ (Figure 1) แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่แยกจากผิวและภายในเมล็ดข้าวกล้องงอกมีความหลากหลายสูง ซึ่งความหลากหลายของจุลินทรีย์มีบทบาทที่สำคัญต่อระบบนิเวศทั้งในด้านประโยชน์และโทษ จากรายงานการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์พบว่าประชากรของแบคทีเรียเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีปริมาณมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ (วิทยา, 2526; สมศักดิ์, 2528) โดยจุลินทรีย์จะมีกิจกรรมและขยายพันธุ์ได้เมื่อมีชนิด ปริมาณ การ

กระจาย และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ในสภาพแวดล้อมนั้น ๆ (กรรณิการ์, 2543) ซึ่งความหลากหลายของจุลินทรีย์มีประโยชน์โดยตรงต่อพืชซึ่งจุลินทรีย์สามารถทำงานได้หลากหลาย (multi-function) เช่น กระตุ้นให้พืชสะสมสารที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและต้านทานต่อการเข้าทำลายของเชื้อสาเหตุโรค Prathuang-wong และคณะ (2005) รายงานว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescens* สายพันธุ์ SP007s มีประสิทธิภาพสูงในการกระตุ้นให้พืชสะสมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการปกป้องตนเองของพืชเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น ข้าว ถั่วเหลือง รวมทั้งพืชผัก ตลอดจนกระตุ้นการสะสมกาบาในเมล็ดข้าวออก

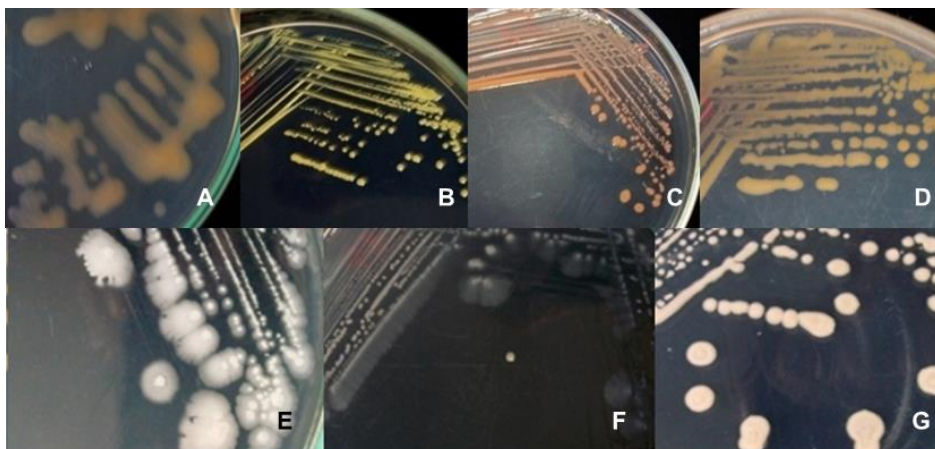


Figure 1 Morphology of bacterial colony isolated from germinated organic brown rice cv. Khao Dawk Mali 105: Group 1 yellow-white cream transparent colony, middle colony raised yellow, and filmy (A), Group 2 yellow colony, middle colony raised yellow, and circular (B), Group 3 orange colony, circular and shiny (C), Group 4 orange-yellow colony, circular, and convex shape (D), Group 5 white colony, dry, flat, and irregular (E), Group 6 white transparent colony, circular, and shiny (F), and Group 7 white colony, circular, and shiny (G).

3.2 คัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการชักนำให้เมล็ดข้าวสะสมกาบา

ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรีย 41 สาย

พันธุ์ จาก 182 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพสูงในการส่งเสริมให้ข้าวกล้องพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีการสะสมกาบาเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ

calcium-calmodulin และน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ ซึ่งแบคทีเรียทั้งหมดนี้จัดอยู่ในกลุ่ม 5 โดยเฉพาะแบคทีเรียสายพันธุ์ TU-002, TU-045 และ TU-009 มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการสะสมกาบาสูงสุดเท่ากับ 11.94, 12.32 และ 13.58 มิลลิกรัม/100 กรัม ข้าวกล้อง ซึ่งดีกว่าการใช้ calcium-calmodulin ในการกระตุ้นการสะสมกาบา (8.51 มิลลิกรัม/100 กรัม ข้าวกล้อง) ($p = 0.05$) (Figure 2)

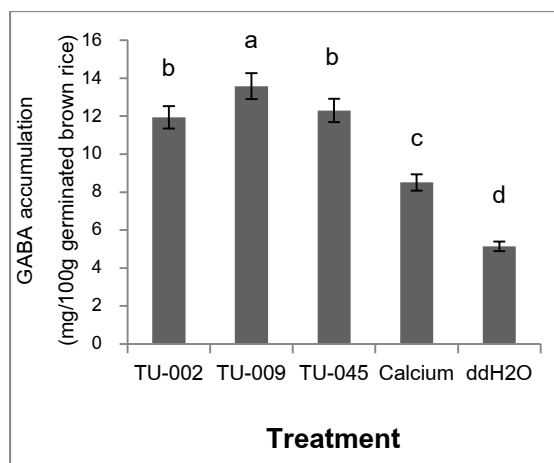


Figure 2 Efficacy of beneficial bacteria induced GABA accumulation in germinated brown rice. TU-002, TU-009, and TU-045 are new beneficial bacteria isolated from this study and calcium is calcium-calmodulin.

โดยทั่วไปแล้วเมล็ดธัญพืชประกอบด้วย phytochemicals ได้แก่ สารโปรตีน (คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน) และสารทุติยภูมิ (วิตามิน phenolics รวมทั้งสารต้านอนุมูลอิสระต่าง ๆ เช่น gamma-butyric acid (GABA) และ gamma oryzanol (Vongsudin *et al.*, 2012) ซึ่งทั่วไปปริมาณ phytochemicals ในธัญพืชมีน้อย แต่มีรายงานว่ากระบวนการงอกและกระบวนการหมัก

สามารถปรับปรุงเพิ่มพูนปริมาณ phytochemicals และเพิ่มประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารเหล่านั้นในธัญพืชได้ เช่น ข้าวที่ผ่านกระบวนการงอกพบปริมาณ phenolics และ GABA ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น (Ngyuen *et al.*, 2008; Vongsudin *et al.*, 2012) เช่นเดียวกับถั่วเหลืองที่มีปริมาณ phenolics เพิ่มขึ้นเมื่อผ่านกระบวนการงอก (Pauca-Menacho *et al.*, 2010) หรือการกระตุ้นด้วยการหมักข้าวด้วยรา *Aspergillus oryzae* สามารถเพิ่มปริมาณ phenolics สูงกว่าเชื้อราชนิดอื่น (Yen *et al.*, 2003) ตลอดจนในกระบวนการหมัก (fermentation) ด้วย *Lactobacillus hillgadill* K3 แล้วทำแห้ง ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารฟังก์ชันนอล (functional food) และเครื่องดื่ม ตลอดจนพบว่ามะเขือเทศที่ติดเชื้อจาก *Cladosporium fulvum* พบว่ามีระดับกาบาสะสมที่บริเวณ apoplast สูงถึง 2.5 มิลลิกรัม/พืช 100 กรัม (Mead *et al.*, 2013; Solomon and Oliver, 2002) และเช่นกันปริมาณกาบามีการสะสมเพิ่มขึ้นเมื่อข้าวเป็นโรคใบไหม้ (Wu *et al.*, 2006) จากข้อมูลชี้ให้เห็นว่าจุลินทรีย์ทั้งที่เป็นประโยชน์และโทษต่อพืชสามารถเพิ่มปริมาณการสะสมกาบาให้กับพืชได้ทั้งสิ้น (Duck *et al.*, 2010) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองพบว่าการใช้แบคทีเรีย TU-900 แคมลิตข้าวมีประสิทธิภาพสูงสุดในการกระตุ้นข้าวกล้องงอกให้มีการสะสมกาบาสูงกว่าการใช้ calcium-calmodulin ถึง 36.9 เปอร์เซ็นต์ (Figure 2) การใช้จุลินทรีย์นอกจากจะช่วยให้ข้าวกล้องมีการสะสมกาบาเพิ่มมากขึ้นแล้วยังพบว่าทำให้เมล็ดข้าวที่ได้หลังกระบวนการหมักมีความหอมรับประทานมากยิ่งขึ้น ซึ่งมีการรายงานวิธีที่ช่วยลดการเกิดกลิ่นเหม็นที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการแช่ซึ่งไม่ส่งผลต่อปริมาณกาบาในข้าวกล้องงอก โดยการ

เติม lactic acid ที่ความเข้มข้น 0.5 % (v/v) จะมีผลในการควบคุมการเกิดเชื้อจุลินทรีย์โดยไม่มีผลต่อปริมาณกาบาในข้าวกล้องงอกที่ได้ (Radhika *et al.*, 2012)

3.3 การจำแนกชนิดแบคทีเรียที่มีประโยชน์

การศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในการส่งเสริมข้าวกล้องงอกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ให้มีการสะสมกาบา พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ TU-009 มีประสิทธิภาพสูงสุด (Figure 1) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีโคโลนีค่อนข้างกลม ขอบไม่เรียบ สีขาวด้าน และเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และเมื่อตรวจสอบคุณลักษณะทางชีวเคมีบางประการพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ TU-009 มีปฏิกิริยาเป็นบวกในการทดสอบ catalase production, urease test, starch hydrolysis และ reduced nitrate to

nitrite (Table 1) ซึ่งจากผลการทดลองสอดคล้องกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus subtilis* จากนั้นนำแบคทีเรียสายพันธุ์ TU-009 ไปจำแนกในระดับโมเลกุลด้วยไพรเมอร์จำเพาะบริเวณ 16S *rDNA* พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณ DNA ที่ขนาด 550 bp (Figure 3) ตรงตามขนาดที่ได้ออกแบบไพรเมอร์ไว้ และเมื่อแยกสกัดแถบดีเอ็นเอดังกล่าวไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยวิธี sequencing analysis (หน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ) นิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้เมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโดยโปรแกรม BLAST พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ TU-009 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์กับ *B. subtilis* AN2 (Table 2)

Table 1 Characteristics of the beneficial bacterium strain TU-009 to induce GABA accumulation^{1/}

Characteristics	Bacterium strain	Comparative strain	
	TU-009	<i>Bacillus subtilis</i> TU-Orga1	<i>B. subtilis</i> ^{2/}
Gram's stain	+	+	+
Oxygen relationship	+	+	+
Catalase production	+	+	+
Endospore forming	+	+	+
Citrate utilization	+	+	+
Hydrolysis			
Starch	+	+	+
Gelatin	+	+	+
Casein	+	+	+
5% Salt tolerance	+	+	+
7% Salt tolerance	+	+	+
Oxidase test	+	+	+
Potato soft rot	-	-	-

^{1/}+ = 90 % or more of strains are positive reaction, - = less than 90 % or more of strains are negative reaction.

^{2/} Reference strain from Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition (Holt *et al.*, 1994).

Table 2 Nucleotide analysis of beneficial bacterium strain TU-009 compared to GenBank database by BLAST program

Accession number of comparative strain (GenBank)	Sequence alignment		Nearest phylogenetic neighbor (genus, species, and strain)
	Similarity nucleotide	% identity	
JX860847.1	550/550	100	<i>Bacillus subtilis</i> AN2
KJ628093.1	549/550	99	<i>Bacillus thuringiensis</i> LMA
KJ634852.1	549/550	99	<i>Bacillus thuringiensis</i> CRR1 102
KJ564122.1	549/550	99	<i>Bacillus cereus</i> LLD146
KJ535332.1	549/550	99	<i>Bacillus anthracis</i> HA 523
KJ589505.1	549/550	99	<i>Bacillus mycoides</i> BZB2

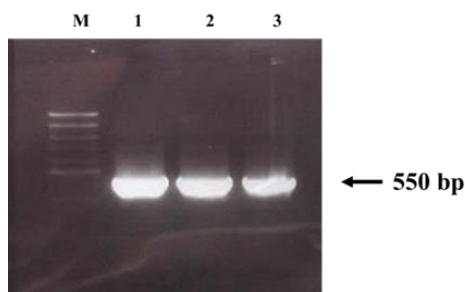


Figure 3 PCR amplification of 16S *rDNA* region using specific primer designed to detect 550 bp products have been separated by 0.8 % agarose gel electrophoresis. Lane M = 1 kb ladder, lanes 1 and 2 = *Bacillus subtilis* TU-009 and lane 3 = *B. subtilis* TU-Orga1 (comparative strain).

4. สรุป

การศึกษาวิจัยสามารถแยกและรวบรวมแบคทีเรียที่มีประโยชน์จากผิวและภายในเมล็ดของข้าวกล้องงอกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 ได้ทั้งหมด 182 ไอโซเลท แบ่งตามลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน

ได้ 7 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มที่ 1 โคโลนีสีเหลือง-ขาวครีม โปร่งใส กลางโคโลนียกตัวขึ้นสีเหลือง และโคโลนีลักษณะเยิ้ม กลุ่มที่ 2 โคโลนีสีเหลืองบริเวณกลางยกตัวขึ้น กลม และขอบเรียบ กลุ่มที่ 3 โคโลนีสีส้ม กลม และมีมันเงา กลุ่มที่ 4 โคโลนีสีส้มอมเหลือง กลม และรูปทรงหนูน กลุ่มที่ 5 เป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีสีขาว ค่อนข้างกลม ขอบไม่เรียบ และมีลักษณะแห้ง กลุ่มที่ 6 โคโลนีสีขาว โปร่งใส กลม และมีมันเงา และกลุ่มที่ 7 โคโลนีสีขาว กลม และมีมันเงา โดยแบคทีเรียสายพันธุ์ TU-009 เป็นสมาชิกของแบคทีเรียในกลุ่มที่ 5 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการส่งเสริมให้ข้าวกล้องงอกพันธุ์ขาวดอกมะลิ 105 มีการสะสมกาบาเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม และเมื่อทดสอบแกรมและตรวจสอบลักษณะทางชีวเคมี และระดับโมเลกุลพบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีปฏิกิริยาเป็นบวกในการทดสอบ catalase production, urease test, starch hydrolysis และ reduced nitrate to nitrite รวมทั้งมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ AN2 100 เปอร์เซ็นต์ ผลงานวิจัยนี้ *B. subtilis* TU-009 สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อการผลิตข้าวกล้องงอกที่มีการสะสมของกาบา

ในปริมาณสูงในระดับท้องถิ่นและอุตสาหกรรม

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนในการสนับสนุนการวิจัย และบริษัทไบรง ฟรุ๊ต อินดัสทรี จำกัด และขอบคุณศูนย์เครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

6. เอกสารอ้างอิง

กรรณิการ์ ชูเกียรติวัฒนา, 2543, จุลชีววิทยา สิ่งแวดล้อม, โคราซอออฟเซ็ทการพิมพ์, นครราชสีมา, 94 น.

สมศักดิ์ วั่งใน, 2528, จุลินทรีย์และกิจกรรมในดิน, โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช, กรุงเทพฯ, 193 น.

วิทยา มะเสนา, 2526, จุลชีววิทยาทางดิน, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 228 น.

Baum, G., Lew-Yadun, S., Fridmann, Y., Arazi, T., Katsnelson, H., Zik, M. and Fromm, H., 1996, Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants, EMBO J., 15: 2988-2996.

Bouché, N. and Fromm, H., 2004, GABA in plants: Just a metabolite?, Trends Plant Sci. 9(3):110-115.

Champagne, E.T., Wood, D.F., Juliano, B.O. and Bechtel, D.B., 2004, The rice grain and its gross composition, pp. 77-107, In Champagne, E.T. (Ed.), Rice, American Association of Cereal Chemistry, St. Paul.

Chevrot, R., Rosen, R., Haudecoeur, E., Cirou, A., Shelp, B.J., Ron, E. and Faure, D., 2006, GABA controls the level of quorum sensing signal in *Agrobacterium*

tumefaciens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103: 7460-7464.

Duck, H.P., Mirabella, R., Bronstein, P.A., Preston, G.M., Haring, M.A., Lim, C.K., Collmer, A. and Schuurink, R.C., 2010, Mutations in γ -aminobutyric acid (GABA) transaminase genes in plants or *Pseudomonas syringae* reduce bacterial virulence, Plant J. 64: 318-330.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T., 1994, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th Ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Karladee, D. and Suriyong S., 2012, γ -Aminobutyric acid (GABA) content in different varieties of brown rice during germination, Sci. Asia 38:13-17.

Kitaoka, S. and Nakano, Y., 1969, Colorimetric determination of amino acid, J. Biochem. 66: 89-94.

Li, K. and Xu, E., 2008, The role and the mechanism of gamma-aminobutyric acid during central nervous system development, Neurosci. Bull. 24: 195-200.

Mead, O., Thynne, E., Winterberg, B., Solomon, P.S., 2013, Characterising the role of GABA and its metabolism in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*, PLoS ONE 8(11): e78368.

Ngyuen, J.S. and Ooraikul, B., 2008, The physico-chemical, eating and sensorial properties of germinated brown rice, Int. J. Food Agri. Environ. 6: 119-124.

Paucer-Menacho, L.M., Berhow M.A., Mandari-

- no, J.M.G., Mejia, E.G. and Chang, Y.K., 2010, Optimisation of germination time and temperature on the concentration of bioactive compounds in Brazilian soybean cultivar BRS 133 using response surface methodology, Food Chem. 119: 636-642.
- Prathuangwong, S., Preecha, C., Vudhivanich, S., Kasem, S., Buensanteai, N. and Chuaboon, W., 2005, Occurrence and biological control of cauliflower at Suphanburi, In The ISSAAS International Congress 2005, Dec 12-14, 2005, Hanoi.
- Radhika, D., Bajpai, V.K. and Baek, K.H., 2012, Production of gaba (γ -aminobutyric acid) by microorganisms: A review, Braz. J. Microbiol. 43: 1230-1241.
- Satitthampana, P., Chuaboon, W. and Athinuwat, D., 2012, Efficiency of new antagonistic bacterium TU-Orga1 enhanced growth and controlled bacterial leaf blight in rice, Thai J. Sci. Technol. 1: 180-188.
- Schaad, N.W., 1988, Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Bacteriology Committee of American Phytopathological Society, St. Paul MN.
- Shelp, B.J., Bown, A.W. and Faure, D., 2006, Extracellular gamma-aminobutyrate mediates communication between plants and other organisms, Plant Physiol. 142: 1350-1352.
- Shelp, B.J., Bown, A.W. and McLean, M.D., 1999, Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid, Trends Plant Sci. 4: 446-452.
- Solomon, P.S. and Oliver, R.P., 2002, Evidence that γ -aminobutyric acid is a major nitrogen source during *Cladosporium fulvum* infection of tomato, Planta 214: 414-420.
- Standard tables of food composition in Japan (5th Ed.), 2000, Resources Council, Science and Technology Agency, Japan, pp. 40-45.
- Vongsudin, W., Laohakunjit, N. and Kerdchoechuen, O., 2012, The biological activities of fermented germinated cereals extracts, Agri. Sci. J. 43: 461-464.
- Wu, D.C., Re, D.B., Nagai, M., Ischiropoulos, H., Przedborski, S., 2006, The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates moter neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis in mice, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 103: 12132-12137.
- Yen, G.C., Chang, Y.C., and Su, S.W., 2003, Antioxidant activity and active compounds of rice koji fermented with *Aspergillus candidus*, Food Chem. 83: 49-54.