ว91

ISSN 0857-1600

คณะวิทยาศาสตร์

วารสารวิทยาศาสตร์ มศว

SRINAKHARINWIROT UNIVERSITY SCIENCE JOURNAL

ปีที่ 15 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม 2542

Volume 15 No. 2 July 1999

การใช้แบคทีเรียควบคุมโรคในมะเขือเทศ

การเจริญและกิจกรรมเอนไซม์ของ *Neocallimastix frontalis* McH3 โดยใช้เปลือกสับปะรดเป็นสับสเตรท

Growth and Enzyme Activities of *Neocallimastix frontalis* McH3 Using Pineapple Peel as Substrate

พรพรรณ เลิศทวีสินธุ์[1]

Pornpan Lerstaveesin

ABSTRACT

Neocallimastrix frontalis McH3 grew anaerobically in various carbon sources such as cellulose, CMC, xylan and pineapple peel. The fungus produced 14.99, 33.26, 33.78, 19.68 mM of hydrogen, acetate, formate and lactate respectively when grown on 4 g/l of pineapple peel containing media. The fermentation products of *N. frontalis* McH3 from solid biomass contains large amounts of acidogen which are very useful substrate for methane fermentation. The cellulase and xylanase activities detected in the culture filtrate, were 1.77 and 1.83 IU/ml respectively. The pineapple peel consumption was 56.54% at 8 days of incubation. Thus the experiments concerning bioconversion of pineapple peel to methane with co-culture of *N. frontalis* McH3 and methanogenic bacteria should be further studied.

บทคัดย่อ

Neocallimastrix frontalis McH3 สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ กัน เช่น เซลลูโลส CMC ไซแลน และเปลือกสับปะรด ในสภาพไร้ออกซิเจน ผลผลิตที่ได้จากการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปลือกสับปะรด 4 กรัม/ลิตร คือ ก๊าซไฮโดรเจน อะซิเตท ฟอร์เมท และแลคเตท ปริมาณ 14.99, 33.26, 33.78, 19.68 mM ตามลำดับ กรดอินทรีย์ที่เป็นผลผลิตจากการหมักเป็นสับสเตรทที่มีประโยชน์สำหรับการผลิตก๊าซมีเธน เชื้อราผลิตเอนไซม์ในน้ำหมักเปลือกสับปะรดได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนส 1.77 และ 1.83 IU/ml ตามลำดับ นอกจากนี้ เชื้อราใช้เปลือกสับปะรดได้ร้อยละ 56.54 ในเวลา 8 วัน ดังนั้น การทดลองนี้จึงเป็นแนวทางที่จะนำเชื้อรา *N. frontalis McH3* มาใช้ร่วมกับ methanogenic bacteria ในการผลิตก๊าซมีเธนจากเปลือกสับปะรดต่อไป

*ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สุขุมวิท 23 กรุงเทพฯ 10110

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมซึ่งมีผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิด จากการขยายตัวของอุตสาหกรรมการเกษตร โดยเฉพาะสับปะรดและน้ำสับปะรดกระป๋อง เป็นสินค้าส่งออกที่มีปริมาณสูงถึง 80% ของผักและผลไม้กระป๋อง[11] ในการผลิตสับปะรดกระป๋องจะมีเปลือกและแกนเป็นของเหลือทิ้งจำนวนมาก ซึ่งจะถูกนำไปกองทิ้งไว้ให้ย่อยสลายไปเองตามธรรมชาติ เปลือกผลไม้มักจะมีเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินเป็นองค์ประกอบ การย่อยสลายเป็นไปได้ช้าๆ หากปล่อยทิ้งไว้อาจก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมต่อไป[6] ปัจจุบันจึงมีการศึกษาเพื่อกำจัดของเสียเหล่านี้โดยการย่อยสลายของเสียทางการเกษตรด้วยกระบวนการหมักแบบไร้ออกซิเจนและได้ก๊าซชีวภาพเกิดขึ้น จะได้ประโยชน์ทั้งการบำบัดของเสียและผลิตพลังงาน ขั้นตอนการย่อยสลายประกอบไปด้วยขั้นตอนไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ซึ่งในขั้นตอนนี้สารอินทรีย์เชิงซ้อน (complex organic compound) ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ที่ไม่สามารถละลายน้ำได้ เช่น คาร์โบไฮเดรท โปรตีน และไขมัน จะถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์พวก hydrolytic bacteria และ fermentative bacteria โดยคาร์โบไฮเดรทจะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (simple sugar) โปรตีนถูกเปลี่ยนเป็นเปปไทด์หรือกรดอะมิโน ไขมันจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล นอกจากนั้น ยังมีผลผลิตที่เกิดจากปฏิกิริยาของกลุ่ม fermentative bacteria ซึ่งเป็นสารประกอบแอลกอฮอล์ ไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์รวมอยู่ด้วย ผลผลิตที่ได้จากขั้นตอนไฮโดรไลซิสจะถูกย่อยสลายต่อไปในขั้นตอนการผลิตกรดอินทรีย์ (acid fermentation) โดยแบคทีเรียพวก non-methanogenic bacteria ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดอินทรีย์ระเหยง่าย เช่น กรดอะซิติก กรดโพรพิออนิก กรดบิวทีริก กรดแวรีลิก เป็นต้น นอกจากนั้น แบคทีเรียบางชนิดยังสามารถผลิตก๊าซไฮโดรเจนและสารประกอบแอลกอฮอล์ เช่น เมธานอล ซึ่งจะถูกใช้โดยแบคทีเรียกลุ่ม methanogenic bacteria เกิดเป็นก๊าซมีเธนและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในขั้นตอนการผลิตก๊าซมีเธน (methane fermentation)[1]

Neocallimastix frontalis เป็นเชื้อราเจริญในสภาพไร้ออกซิเจน แยกได้จากกระเพาะรูเมน (rumen) ของแกะ สามารถย่อยสลายผนังเซลล์พืชได้ ใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด เช่น เซลลูโลส แป้ง และเฮมิเซลลูโลส ผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายสารอินทรีย์ คือ อะซิเตท ฟอร์เมท แลคเตท เอธานอล ไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์[10] เป็นต้น กิจกรรมเอนไซม์ Endo-β-1, 4-glucanase (carboxymethylcellulase, CMCase) และ Exo-β-1, 4-glucanase (avicelase หรือ cellohydolase) จะพบในระยะที่เป็น vegetative และ zoospore ในวงจรชีวิตของเชื้อรา *N. frontalis* *N. patriciarum* และ *Piromonas communis* และจะปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ[3,4,5,8,16,17,18] สำหรับ *N. frontalis* จะปล่อยเอนไซม์ CMCase ออกมาเป็นส่วนใหญ่[9] กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสของ *N.patriciarum* และ *Piromonas communis* จะพบในเซลล์ และจะปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อน้อยมาก[16] ซึ่งตรงกันข้ามกับ *N. frontalis* จะปล่อยไซลาเนสออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อและมีเอนไซม์ที่ยึดติดกับเซลล์น้อย[9] นอกจากนี้ *N. frontalis* ยังสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ในขณะที่มี methanogenic bacteria[2] จึงน่าสนใจที่จะศึกษาการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของ *N. frontalis* McH3 โดยใช้เปลือกสับปะรดเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อนำมาปรับปรุงกระบวนการหมักก๊าซชีวภาพแบบไร้ออกซิเจนต่อไป

วิธีการ

1. ศึกษาการเจริญของเชื้อรา *N. frontalis* McH3 โดยใช้เซลลูโลส carboxymethylcellulose (CMC) ไซแลน และเปลือกสับปะรด (pine-apple peel) อบแห้ง เป็นแหล่งคาร์บอน

1.1 เตรียม preculture ของเชื้อรา *N. frontalis* McH3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ M2 ที่มีเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ตามวิธีการของ Teunissen และคณะ[13] บ่มเชื้อราที่ 39°C นาน 72 ชั่วโมง ในสภาพไร้ออกซิเจน

1.2 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ กัน โดยใช้เซลลูโลส CMC ไซแลน และเปลือกสับปะรดแห้ง ความเข้มข้น 4 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งของคาร์บอนเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ M2 ประมาณ 38 มิลลิลิตร บรรจุใน serum vial ขนาด 125 มิลลิลิตร

1.3 เติม preculture (ที่เตรียมไว้ในข้อ 1.1) ปริมาณร้อยละ 10 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนต่างๆ กันในข้อ 1.2 และบ่มที่ 39°C ในสภาพไร้ออกซิเจน ตรวจวัดปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้นโดยการแทนที่สารละลายอิ่มตัว NaCl และศึกษาการเจริญของเชื้อโดยวัดการผลิตก๊าซ H_2 ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟแบบก๊าซ ที่ช่วงเวลา 0 ถึง 8 วัน อาหารเลี้ยงเชื้อจากการหมักใช้สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

2. ศึกษากิจกรรมเอนไซม์ (enzyme activity) ของ *N. frontalis* McH3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลลูโลส CMC ไซแลน และเปลือกสับปะรด เป็นแหล่งของคาร์บอนที่ช่วงเวลา 0 ถึง 8 วัน

2.1 การวิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสตามวิธีการของ Teunissen และคณะ[12] โดยใช้ CMC เป็นสับสเตรท นำ crude enzyme ปริมาณ 0.025 มิลลิลิตร เติมสับสเตรท 0.975 มิลลิลิตร (1% CMC ใน 0.1 M citrate-phosphate buffer pH 6.0) เขย่าให้เข้ากัน และนำไปบ่มที่ 50°C เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย Dinitro-salicylic acid (DNS reagent) 2 มิลลิลิตร คำนวณกิจกรรมเอนไซม์โดยกำหนดให้หน่วยเป็น IU/ml 1 IU หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นน้ำตาลกลูโคส 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที

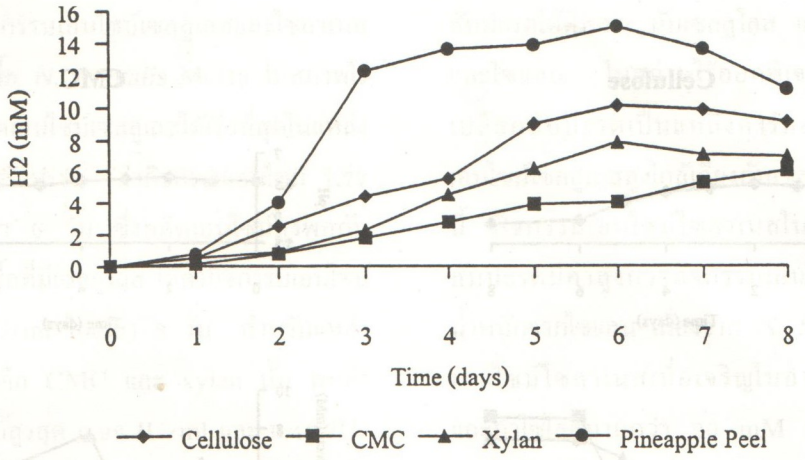
2.2 วิเคราะห์หากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนส ตามวิธีการของ Teunissen และคณะ[12] โดยใช้ไซแลนเป็นสับสเตรท นำ crude enzyme ปริมาณ 0.025 มิลลิลิตร เติมสับสเตรท 0.975 มิลลิลิตร (1% xylan ใน 0.1 M citrate-phosphate buffer pH 6.0) เขย่าให้เข้ากัน และนำไปบ่มที่ 50°C เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย dinitrosalicylic acid (DNS reagent) 2 มิลลิลิตร คำนวณกิจกรรมเอนไซม์โดยกำหนดให้หน่วยเป็น IU/ml 1 IU หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกริยาการย่อยสลายสับสเตรทให้เป็นน้ำตาลไซโลส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

3. วิเคราะห์ปริมาณและชนิดของผลผลิตที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมักด้วยเครื่อง HPLC

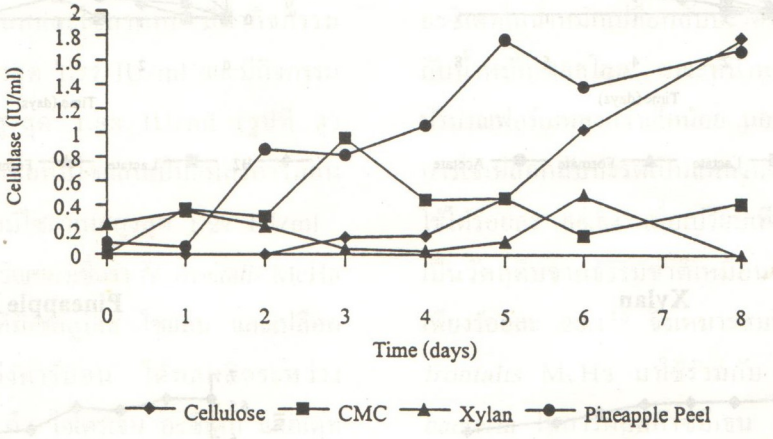
4. ศึกษาการใช้คาร์โบไฮเดรทที่เป็นแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ของเชื้อรา *N. frontalis* McH3 โดยตรวจวัดปริมาณ total sugar ที่ช่วงสุดท้ายของการทดลองการเจริญของเชื้อรา

ผลการทดลอง

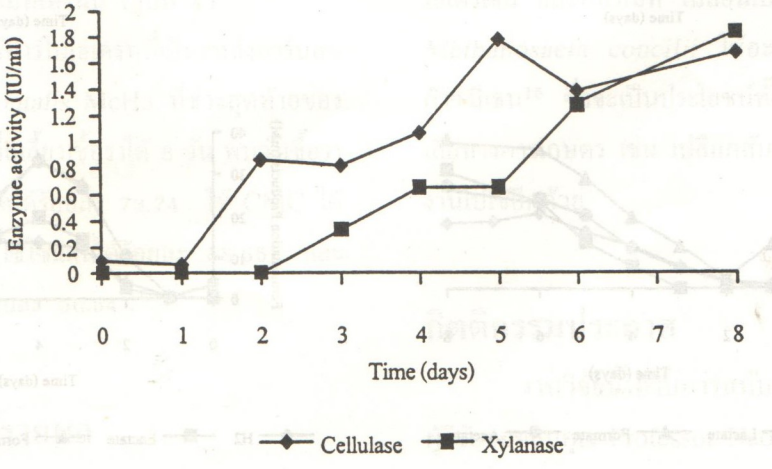
1. การเจริญของเชื้อรา *N. frontalis* McH3 ในสภาพไร้ออกซิเจน สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากเปลือกสับปะรดในการเจริญได้ดีที่สุด ปริมาณก๊าซ H_2 14.997 mM ในเวลา 6 วัน ใช้เซลลูโลสรองลงมาจากเปลือกสับปะรด คือ ปริมาณก๊าซ H_2 10.096 mM ในเวลา 6 วัน และใช้ xylan ในการเจริญได้ดีกว่า CMC คือ ปริมาณก๊าซ H_2 สูงสุด 7.855 และ 6.109 mM ตามลำดับ (รูปที่ 1)



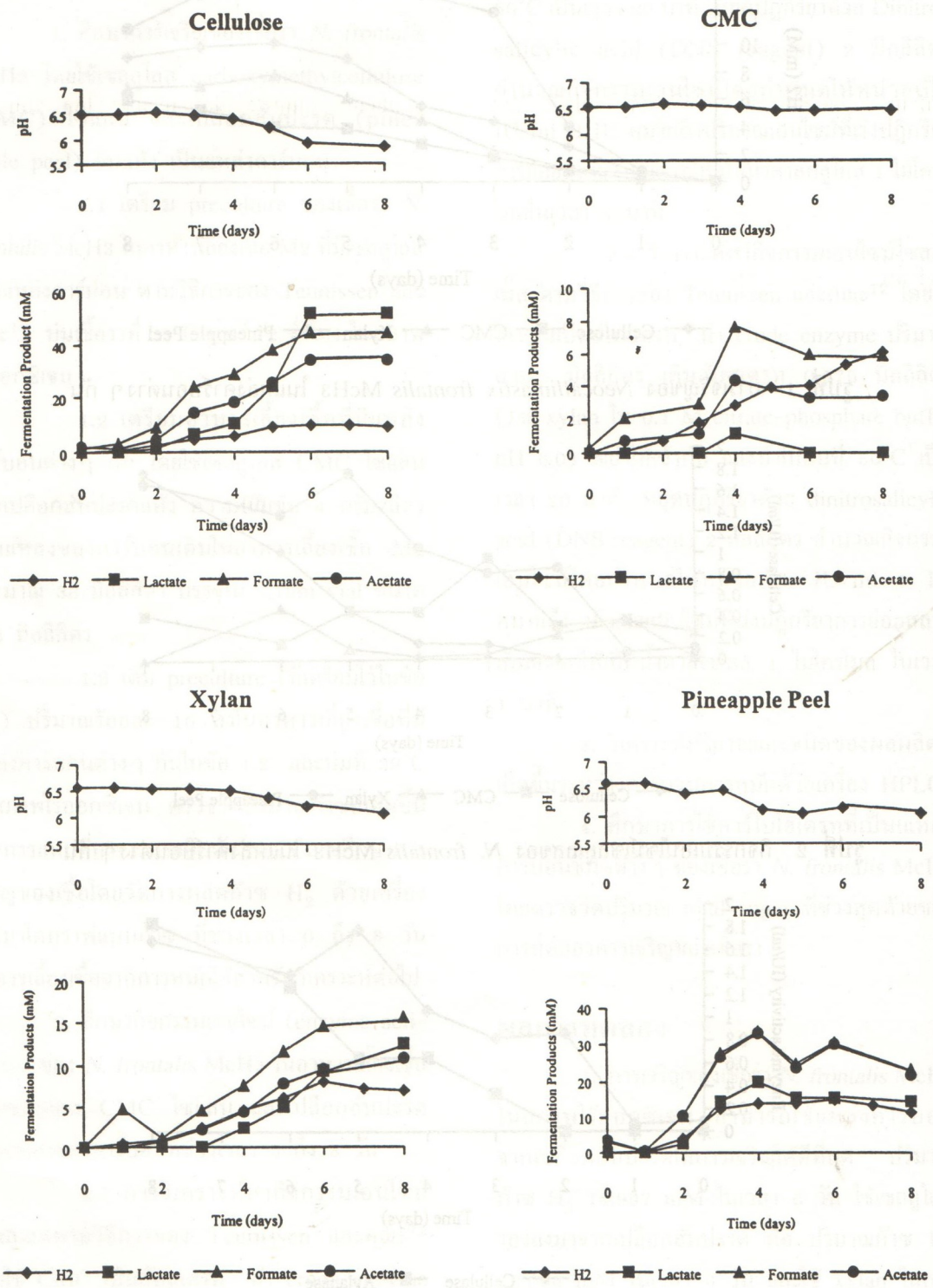
รูปที่ 1 การเจริญของ *Neocallimastix frontalis* McH3 ในแหล่งคาร์บอนต่างๆ กัน



รูปที่ 2 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสของ *N. frontalis* McH3 ในแหล่งคาร์บอนต่างๆ กัน



รูปที่ 3 กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสของ *N. frontalis* McH3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปลือกสับปะรดเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่ 4 ผลผลิตจากการหมักของ *Neocallimastix frontalis* McH3 ในแหล่งคาร์บอนต่างๆ กัน

2. กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสในอาหารเลี้ยงเชื้อ *N. frontalis* McH3 ในสภาพไร้ออกซิเจน ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้เร็วที่สุดในแหล่งคาร์บอนเปลือกสับปะรด ค่ากิจกรรมเอนไซม์ 1.77 IU/ml ในเวลา 5 วัน ซึ่งผลิตเอนไซม์สูงพอกับในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลลูโลส ได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 1.78 IU/ml ในเวลา 8 วัน สำหรับแหล่งคาร์บอนอื่นๆ คือ CMC และ xylan นั้น พบค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 0.96 IU/ml และ 0.49 IU/ml ตามลำดับ (รูปที่ 2) และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปลือกสับปะรดเป็นแหล่งคาร์บอนพบการผลิตเอนไซม์ทั้งเซลลูเลสและไซลาเนส มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด 1.77 IU/ml และมีกิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด 1.83 IU/ml (รูปที่ 3) ขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสสูงสุด 1.27 IU/ml

3. การเจริญของเชื้อรา *N. frontalis* McH3 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลลูโลส ไซแลน และเปลือกสับปะรดเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ผลผลิตระหว่างกระบวนการหมัก คือ ไฮโดรเจน อะซิเตท แลคเตท และฟอร์เมท อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี CMC พบไฮโดรเจน อะซิเตท และฟอร์เมทเท่านั้น (รูปที่ 4)

4. การใช้คาร์โบไฮเดรทที่เป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อรา *N. frontalis* McH3 ที่ช่วงสุดท้ายของการทดลอง คือ เมื่อเลี้ยงเชื้อราได้ 8 วัน พบว่าเชื้อราสามารถใช้เซลลูโลสได้ร้อยละ 73.74 ใช้ CMC ได้ร้อยละ 50.19 ใช้ไซแลนได้ร้อยละ 58.55 และเปลือกสับปะรดร้อยละ 56.54

สรุปและอภิปรายผล

เชื้อรา *Neocallimastix frontalis* McH3 เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญและย่อยสลายเปลือกสับปะรดได้ดีพอๆ กับเซลลูโลส และดีกว่า CMC และไซแลน ในสภาพไร้ออกซิเจน พบว่าการใช้เปลือกสับปะรดเป็นแหล่งคาร์บอนมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสสูงใกล้เคียงกับเซลลูโลส นอกจากนี้ กิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสในน้ำหมักเปลือกสับปะรดมีค่าสูงกว่ากิจกรรมเอนไซม์ไซลาเนสในน้ำหมักจากไซแลน เนื่องจาก *N. frontalis* จะผลิตเอนไซม์ไซลาเนสเมื่อเจริญในอาหารที่มีไซแลนและถ้าไซโลสมากกว่า 20 mM จะยับยั้งการผลิตเอนไซม์ [7,9] ผลผลิตที่ได้จากการหมัก คือ ไฮโดรเจน อะซิเตท แลคเตท และฟอร์เมท ปริมาณของอะซิเตทในน้ำหมักเปลือกสับปะรดมีปริมาณใกล้เคียงกับน้ำหมักเซลลูโลส ขณะที่น้ำหมักเซลลูโลสจะมีปริมาณฟอร์เมทสูงกว่าเล็กน้อย นอกจากนี้ เมื่อศึกษาการใช้เปลือกสับปะรดเป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อราใช้ได้ร้อยละ 56.54 เมื่อเปรียบเทียบกับฟางข้าวซึ่งเป็นวัตถุดิบจากธรรมชาติเหมือนกัน เชื้อราใช้ได้เพียงร้อยละ 23.1[10] จึงเหมาะสมที่จะนำเชื้อรา *N. frontalis* McH3 มาใช้ร่วมกับ *methanogenic bacteria* ในการผลิตก๊าซมีเธน เช่น *Methanobacterium formicicum*[14] ใช้คาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจน และฟอร์เมท เปลี่ยนเป็นก๊าซมีเธน และ *Methanosaeta concilii* ใช้อะซิเตทเปลี่ยนเป็นก๊าซมีเธน[15] ซึ่งจะเป็นประโยชน์ทั้งในการบำบัดของเสียทางการเกษตร เช่น เปลือกสับปะรด และได้พลังงานไปใช้อีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจาก JSPS ผู้วิจัยขอขอบคุณ Professor Naomichi Nishio ที่ให้คำปรึกษาและอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยที่ Hiroshima University

เอกสารอ้างอิง

1. Banres, D. and Fitzgerald. 1987. Anaerobic wastewater treatment process. In : Environmental Biotechnology. Foster, C.F. and John Wase, D.A. (eds.), Ellis Horwood limited publisher, Chicherter.
2. Bauchop, T. and Mountfort, D.O. 1981. Cellulose fermentation by a rumen anaerobic fungus in both the absence and the presence of rumen methanogens. Appl. Environ. Microbiol 42: 1103-1110
3. Barichievich, E.M. and Calza, R.E. 1990. Media carbon induction of extracellular cellulase activities in *Neocallimastix frontalis* isolate EB 188. Curr. Microbiol. 20:265-271.
4. Barichievich, E.M. and Calza, R.E. 1990. Supernatant protein and cellulase activities of the anaerobic ruminal fungus *Neocallimastix frontalis* isolate EB 188. Appl. Environ. Microbiol. 56:43-48.
5. Calza, R.E.1990. Regulation of protein and cellulase excretion in the ruminal fungus *Neocallimastix frontalis* isolate EB 188. Curr. Microbiol. 21:109-115.
6. Khan, A.W. 1977. Anaerobic degradation of cellulose by mixed culture. Can. J Microbiol. 23:1700-1705.
7. Lowe, S.E. Theodorou, M.K. and Trinci A.P.J. 1987. Cellulases and xylanases of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose and xylan. Appl. Environ. Microbiol. 53:1216-1223.
8. Mountfort, D.O. and Asher, R.A. 1985. Production and regulation of cellulose by two strains of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis.* Appl. Environ. Microbiol 49 : 1314-1322.
9. Mountfort, D.O. and Asher, R.A. 1989. Production of xylanase by the ruminal anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis.* Appl. Environ. Microbiol. 55:1016-1022.
10. Mountfort, D.O. and Orpin, C.G. 1994. Anaerobic Fungi : Biology, Ecology and Function, Marcel Dekker, Inc.
11. Tanticharoen, M. Tateiam, N. Bhumiratana, S. and Tientanacom, S. 1987. Biogas production from pineapple cannery wastes in anaerobic filter reactor, Annual Report of ASEAN Working Group on the Management and Utilization of Food Wastes Materials. ASEAN Committee on Science and Technology. 400-412.
12. Teunissen, M.J. de Kort, G.V.M. Op den Camp, H.J.M. and Huis in't Veld, J.H.J. 1991. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes during growth of the anaerobic fungus *Piromyces* sp. on different substrate. J. of Gen. Microbiol. 139:1657-1664.
13. Teunissen, M.J. Op den Camp, H.J.M. Orpin, C.G. Huis in't Veld, J.H.J. and Vogels, G.D. 1991. Comparison of

growth characteristics of anaerobic fungi from ruminant and non-ruminant herbivore during cultivation in a defined medium. J. of Gen. Microbiol. 137:1401-1406.

14. Teunissen, M.J. Kets, E.P.W. Op den Camp, H.J.M. Huis in't Veld, J.H.J. and Vogels, G.D. 1992. Effect of coculture of anaerobic fungi isolated from ruminants and non-ruminants with methanogenic bacteria on cellulolytic and xylanolytic enzyme activities. Arch Microbiol. 157:176-182.
15. Williums, A.G. and Orpin, C.G. 1987. Polysaccharide-degrading enzymes formed by three species of anaerobic rumen fungi grown on a range of carbohydrates. Can. J Microbiol. 33 : 418-426.
16. Wilson, C.A. and Wood, T.M. Studies on the cellulase of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*, with special reference to the capacity of the enzyme to degrade crystalline cellulose. Enz. Microb. Technol. 1992:14:258-264.
17. Wood, T.M. Wilson, C.A. McCrae, S.I. and Joblin, K.N. 1986. A highly active extracellular cellulase from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis*. FEMS Microbiol. Lett. 34:37-40.
18. Wheatley, A.D. 1984. Anaerobic Digestion : A Waste Technology. SCI. London.