

การศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-เบสต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส และกิจกรรมการย่อยวัสดุการเกษตรจากน้ำเลี้ยงเชื้อราที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดิน

ชนิด *M. posthuma*

The Study of pH to Cellulase Enzyme Activity and Degradation Activity of Agricultural Materials from Fungi Culture Broth isolated from *M. posthuma* Earthworm Gut

รุ่งโรจน์ ไกรสิทธิพานิชย์^{1*}, อานัฐ ตันโช^{2,3,4}, รณิดา ต่วนอุดม¹, อติยา มีชัย⁵,
สุปราณี วัฒนปฐมทรัพย์¹, พัชรีย์ ปานรักษา¹, อาทิตยา ญาติสมบุญ¹, ภูริวัฒน์ เขียวคำรพ¹,
วรารักษ์ นนทอิ², สรिताพา บุญศรีกุล¹, วณวิสาข์ เชิดชน¹
Rungroj Kraisittipanit^{1*}, Arnat Tancho^{2,3,4}, Ranida Tuanudom¹, Titiya Meechai⁵,
Supraanee Watpathomsub¹, Patcharee Panraksa¹, Artitaya Yatsomboon¹, Phuriwat Khiewkamrop¹,
Waraphas Nontati², Saridapha Boonsrikun¹, Wanwisa Choedchon¹

¹คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยกรุงเทพธนบุรี

¹Faculty of Medicine, Bangkokthonburi University

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาเกษตรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

²Natural Agriculture Research and Development Center, Maejo University

³ภาคีสมาชิก สำนักวิทยาศาสตร์ ราชบัณฑิตสภา

³Fellow Member of the Academy of Science, The Royal Society of Thailand

⁴คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

⁴Faculty of Agricultural Production, Maejo University

⁵คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยกรุงเทพธนบุรี

⁵Faculty of Dentistry, Bangkokthonburi University

บทคัดย่อ

ไส้เดือนดิน *M. posthuma* มีความสำคัญต่อคุณภาพ และคุณสมบัติของดินในภาคการเกษตร เนื่องจากภายใน ลำไส้มีจุลินทรีย์ช่วยผลิตสารที่มีประโยชน์ อาทิ ฮอร์โมนพืช และเอนไซม์ งานวิจัยนี้ได้คัดแยกเชื้อราที่มีลักษณะ โคโลนีที่แตกต่างจากลำไส้ของไส้เดือนดินชนิด *M. posthuma* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar พบว่าเชื้อราทุกไอโซเลตสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้บนอาหารวุ้นชนิด CMC โดยเชื้อราไอโซเลต MEW41 มีค่าดัชนีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด เมื่อตรวจสอบสัณฐานวิทยาเบื้องต้นเป็นเชื้อราในสกุล *Penicillium* เมื่อศึกษาสภาวะการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราในช่วงความเป็นกรดเบสที่ต่างกัน พบว่าเชื้อรา

* Corresponding author : Rungroj.kra@bkkthon.ac.th

ไอโซเลต MEW41 มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์สูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-เบส 5.0 เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อรา ไอโซเลตดังกล่าวมาย่อยวัสดุการเกษตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมการย่อยกากอ้อยแห้ง วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้ปริมาณ 1.98 mg/ml ชูมะพร้าวแห้งวัดได้ 0.83 mg/ml และฟางข้าวแห้งวัดได้ 0.73 mg/ml ผลการวิจัยนี้ทำให้ทราบคุณสมบัติเบื้องต้นของเอนไซม์เซลลูเลสที่เชื้อราที่ตัดแยกได้จากลำไส้ของ ไส้เดือนดิน ซึ่งอาจพัฒนาเพื่อเป็นเอนไซม์สำหรับใช้หมักวัสดุทางการเกษตรในระดับใหญ่ต่อไป

คำสำคัญ: ไส้เดือนดิน *Metaphire posthuma* เซลลูเลส เชื้อรา ลำไส้ไส้เดือนดิน

Abstract

The earthworm *Metaphire posthuma* plays a significant role in determining soil quality and properties in agricultural systems due to the presence of beneficial microorganisms in its gut. These microorganisms help produce useful compounds, such as plant hormones and enzymes. In this study, fungal strains exhibiting distinct colony morphologies were isolated from the gut of *M. posthuma* on Potato Dextrose Agar (PDA). All fungal isolates were found to produce cellulase enzyme on CMC agar. Among them, isolate MEW41 exhibited the highest cellulase production index. Preliminary morphological identification indicated that MEW41 belongs to the genus *Penicillium*. The cellulase enzyme from MEW41 was further examined under different pH conditions, and its highest enzymatic activity was recorded at pH 5.0. When the fungal culture filtrate from MEW41 was used to degrade agricultural substrates for 24 hours, the enzymatic hydrolysis yielded reducing sugar concentrations of 1.98 mg/ml from dried sugarcane bagasse, 0.83 mg/ml from dried coconut husk, and 0.73 mg/ml from dried rice straw. These findings reveal preliminary characteristics of the cellulase enzyme produced by a fungus isolated from the gut of *M. posthuma*, suggesting its potential application in large-scale enzymatic degradation of agricultural biomass.

Keywords: Earthworm, *Metaphire posthuma*, Cellulase, Fungi, Earthworm gut

1. บทนำ

ไส้เดือนดินเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศของดิน บางชนิดมีส่วนช่วยพลิกกลับเนื้อดิน เติมเต็มความสมบูรณ์ให้กับดินได้ โดยทั่วไปไส้เดือนดินจะกินซากพืชและซากสัตว์ที่ตายแล้ว ผ่านเข้าสู่ทางเดินอาหาร และส่วนของลำไส้ ซึ่งเป็นบริเวณที่มีจุลินทรีย์อาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก จุลินทรีย์เหล่านั้นจะเปลี่ยนสารอาหารที่ไส้เดือนดินกินเข้าไปให้กลายเป็นแร่ธาตุ วิตามิน รวมถึงฮอร์โมนพืชหลายชนิด เมื่อไส้เดือนดินขับมูลออกมาจะรวมกับเนื้อดินทำให้เกิดความอุดมสมบูรณ์ จากการศึกษาของ Kraisittanit et.al. (2021) พบว่า ภายในลำไส้

ของไส้เดือนดินมีจุลินทรีย์กลุ่มเชื้อราจำนวนมาก และศึกษาพบว่าเชื้อราบางชนิด โดยเฉพาะเชื้อราสกุล *Aspergillus* สามารถผลิตฮอร์โมนออกซิน และฮอร์โมนจิบเบอเรลลินในปริมาณสูง เมื่อพืชได้รับฮอร์โมนเหล่านี้ในปริมาณที่พอเหมาะ จะช่วยส่งเสริมให้เกิดการเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดี

ไส้เดือนดิน *Metaphire posthuma* เป็นไส้เดือนดินขนาดกลางและมีลำตัวสีเทาปนดำ มีพฤติกรรมกินอาหารที่เน่าสลายบริเวณดินส่วนบนถึงชั้นชั้นกลาง และบางครั้งจะชอบขุดรูซอนโซทำให้นดินเกิดโพรงอากาศส่งเสริมให้รากพืชเจริญเติบโตได้ดียิ่งขึ้น อย่างไรก็ตามลักษณะพฤติกรรมสำคัญของไส้เดือนดินชนิดนี้อีกอย่างก็คือ เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของแหล่งที่อยู่อาศัยหรือได้รับสัญญาณอันตราย ไส้เดือนดินจะขุดตัวทันที ทำให้บางครั้งเรียกไส้เดือนดินชนิดนี้อีกอย่างว่าซีคู้ (รุ่งโรจน์ และคณะ, 2559)

เซลลูโลส (Cellulose) เป็นโพลีแซ็กคาไรด์ชนิดเส้นตรงที่พบมากในผนังเซลล์ของพืช และเป็นองค์ประกอบหลักของวัสดุชีวมวลจากการเกษตร เช่น ฟางข้าว กากอ้อย และขุยมะพร้าว โดยจัดเป็นแหล่งคาร์บอนธรรมชาติที่มีศักยภาพในการนำไปแปรรูปเป็นพลังงานชีวภาพหรือผลิตภัณฑ์ชีวภาพต่าง ๆ อย่างไรก็ตาม เนื่องจากโครงสร้างของเซลลูโลสมีความซับซ้อนและต้านทานการย่อยสลาย จึงต้องอาศัยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) ในการย่อยให้ได้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในกระบวนการชีวภาพต่าง ๆ ได้ง่ายขึ้น โดยทั่วไปเอนไซม์ในดินเป็นผลผลิตของจุลินทรีย์พื้นถิ่นที่อาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายอินทรีย์วัตถุ เช่น อะไมเลสที่ช่วยย่อยแบ่งให้เป็นน้ำตาล เซลลูเลสที่ย่อยเซลลูโลสให้เป็นกลูโคส และไลเปสที่ย่อยไขมันให้กลายเป็นสารประกอบของคาร์บอน (กุสุมาวดี, 2561) แต่เอนไซม์เหล่านี้มีปริมาณการผลิตไม่มากเพียงพอกับความต้องการจะนำมาสลายวัสดุทางการเกษตรปริมาณมากได้อย่างรวดเร็ว

ดังนั้นในเบื้องต้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราที่อยู่ในลำไส้ของไส้เดือนดิน ซึ่งเป็นเอนไซม์สำหรับการย่อยสลายเซลลูโลส เพื่อนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการย่อยสลายวัสดุทางการเกษตรปริมาณมากได้อย่างรวดเร็ว งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์คือ การทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราที่คัดแยกได้จากภายในลำไส้ของไส้เดือนดิน *M. posthuma* รวมถึงศึกษาสถานะความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส เพื่อนำมาทดสอบการย่อยสลายวัสดุทางการเกษตร

2. วัตถุประสงค์การวิจัย

2.1 ทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราที่คัดแยกได้จากภายในลำไส้ของไส้เดือนดิน *M. posthuma*

2.2 ศึกษาความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา

2.3 ศึกษาประสิทธิภาพการย่อยวัสดุทางการเกษตร (ขุยมะพร้าว, กากอ้อย, ฟางข้าว) จากเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1. การเก็บรวบรวมไส้เดือนดินและจำแนกชนิดไส้เดือนดิน

เก็บตัวอย่างไส้เดือนดินชนิด *Metaphire posthuma* จากพื้นที่สวนกล้วยของเกษตรกรในจังหวัดนครปฐมจำนวน 3 จุด จุดละ 4-5 ตัวอย่าง โดยหามูลของไส้เดือนดินที่บริเวณพื้นที่เก็บตัวอย่างเมื่อเจอแล้ววางขนาดของพื้นที่จุดเก็บตัวอย่างกว้าง x ยาวประมาณ 0.5 เมตร x 0.5 เมตร ขุดดินขึ้นมาลึกไม่เกิน 30 เซนติเมตร จากนั้นคัดแยกไส้เดือนดินเบื้องต้นโดยสังเกตพฤติกรรมของไส้เดือนดิน *M. posthuma* คือจะขดลำตัวเมื่อได้รับแรงสั่นสะเทือนหรือป้องกันตัว (ภาพที่ 1) จากนั้นคัดแยกไส้เดือนดินด้วยมือ (hand sorting) เมื่อได้ไส้เดือนดินแล้วทำการสลับตัวอย่างในห้องปฏิบัติการด้วยเอทานอลความเข้มข้น 30% V/V ก่อนนำมายืนยันลักษณะของไส้เดือนดิน *M. posthuma* จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยวิธีของ Gate (1939) และ Sims and Easton (1972) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 พฤติกรรมการขดตัวและลักษณะภายนอกของไส้เดือนดิน *M. posthuma*

A คือ การขดตัวของไส้เดือนดิน *M. posthuma*

B คือ ไส้เดือนดิน *M. posthuma* ในเอทานอลความเข้มข้น 30% V/V

3.2. การเตรียมอาหารและการคัดแยกเชื้อราจากลำไส้ไส้เดือน

3.2.1 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อรา

เตรียมอาหาร Potato dextrose agar (PDA) โดยผสม Potato dextrose broth (Himedia) (PDB) ปริมาณ 30 กรัม และผงวุ้น 15 กรัม เทรวมกันลงในขวด จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน โดยเติมแท่งแม่เหล็กกวนสารลงไปด้วยเพื่อใช้สำหรับผสมยาปฏิชีวนะ เมื่อผสมอาหารและวุ้นแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) ที่ 121.5 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการเติมยาปฏิชีวนะสำหรับฆ่าเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด (10% W/V Chloramphenicol, 2% Streptomycin) ชนิดละ 1 มิลลิลิตร เทลงไปในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปผสมเขย่าให้ยาปฏิชีวนะและ

อาหารเข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้จนกว่าอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส หรือมือจับได้ ก่อนนำมาเทลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อในตู้เยื่อเชื้อ (Laminar flow)

3.2.2 การคัดแยกเชื้อราจากลำไส้ไส้เดือนดิน

ใช้กรรไกรผ่าตัดที่นิ่งฆ่าเชื้อตัดแยกลำไส้ไส้เดือนดินแต่ละชนิดออกมา โดยจุดส่วนของลำไส้ชนิดละ 0.1 กรัม แยกใส่ลงไปในหลอดเก็บตัวอย่าง 1.5 มิลลิลิตร ที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้วลงไป 900 ไมโครลิตร และนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าสาร 1 นาที จากนั้นเจือจางสารละลายจากลำไส้ไส้เดือนดินให้ได้ความเข้มข้น 10^{-3} ถึง 10^{-5} คูดสารละลายลำไส้ 100 ไมโครลิตร มาเกลี่ย (spread plate) ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นนำจานอาหารไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบเวลาใช้มีดผ่าตัดร่อนไฟฟ้าเชื้อเก็บแยกโคโลนีที่มีความแตกต่างกันมาวางลงบนจานอาหาร PDA ใหม่ แล้วบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องอีก 3 วัน หรือจนเชื้อราโตมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีกว้างประมาณ 1.5 นิ้ว จากนั้นใช้มีดร่อนฆ่าไฟฆ่าเชื้อตัดชิ้นวันเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดกว้าง x ยาว ประมาณ 2×2 เซนติเมตร เก็บรักษาไว้ในหลอดเก็บเชื้อที่เติมกลีเซอรอลความเข้มข้น 15% V/V ที่นิ่งฆ่าเชื้อ ก่อนนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้งานต่อไป

3.3. การศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

3.3.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Sodium Carboxymethyl Cellulose (CMC) agar

เตรียมอาหารแข็ง Minimal agar (น้ำตาลกลูโคส 1 กรัม โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต 9 กรัม โซเดียมซิเตรต 0.5 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัม ผงวุ้น 20 กรัม) ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เมื่อส่วนผสมละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว เติมน้ำ CMC 5 กรัม ลงไป แล้วละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาณของเหลวให้ได้ 1,000 ml จึงนำอาหารที่ได้นิ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนิ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121.5 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำมาเทลงจานอาหารเพื่อใช้สำหรับทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสต่อไป

3.3.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา

นำเชื้อราจากตู้ -20 องศาเซลเซียส มาละลายโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำชิ้นวันของเชื้อราที่ได้มาวางบนอาหาร CMC agar ก่อนนำไปบ่มในที่มืดเป็นเวลา 3 วัน เมื่อครบกำหนดนำเชื้อราแต่ละตัวอย่างมาวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (Growth zone, G) 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย จากนั้นเทสารละลายไอโอดีนความเข้มข้น 1% ลงไปในเพลตให้ท่วมแล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จะสังเกตเห็นสีของเพลตเปลี่ยนจากสีขาวขุ่นเป็นสีดำม่วง ส่วนที่มีการสร้างเซลลูเลสจะเกิดเป็นโซนใส (Clear zone; C) สีเหลือง ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส 3 ซ้ำแล้วหาค่าเฉลี่ย นำค่าเฉลี่ยมาคำนวณสัดส่วนโซนใสเฉลี่ยต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (C/G ratio) และคำนวณค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.3.3 การศึกษาความเป็นกรด-เบส (pH) ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

เตรียมอาหารเหลว Minimal medium ในลงขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร ขวดละ 30 มิลลิลิตร นำไปนิ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนิ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121.5 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อเย็นลงแล้วใส่ชิ้นวันเชื้อราแต่ละไอโซเลตลงไปในขวดละ 3 ชิ้น นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 120 rpm

เป็นเวลา 3 วัน กรองแยกเชื้อรา เก็บเฉพาะสารละลาย crude enzyme ลงหลอดเก็บตัวอย่างแล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

จากนั้นเตรียมสารละลาย 1% CMC โดยชั่งผง CMC 0.1 กรัมผสมกับน้ำกลั่นหนึ่งมาเชื้อที่ปรับ pH แล้ว 7 ช่วง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ได้แก่ pH 3 ถึง pH 9 โดยใช้สารละลาย 0.1N NaOH และ 0.1N HCl จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลาย CMC 0.5 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 มิลลิลิตร ดูด crude enzyme ของเชื้อราปริมาณ 0.5 มิลลิลิตรลงไปผสมกับสารละลาย CMC ทำซ้ำ 3 หลอด นำไป vortex 10 วินาที ก่อนนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

เมื่อครบเวลานำไปแต่ละหลอดไปต้มให้ความร้อนเพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นทิ้งให้เย็นเติมสารละลาย DNS reagent ลงในหลอดทดลองในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที วางตั้งไว้จนเย็น ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสงแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย ก่อนนำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน จากนั้นคำนวณหาค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสโดยสมการ

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (Unit/ml)} = \frac{\text{น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น}}{\text{ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ทดสอบ} \times \text{เวลา (นาที)}} \quad (1)$$

3.4. การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยสลายวัสดุการเกษตรจากเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อรา MEW41 ที่ 24 ชั่วโมง

ชั่งขุยมะพร้าวแห้ง กากอ้อยแห้ง ฟางข้าวแห้ง และสาร CMC 1 กรัม มาใส่ในขวดรูปชมพู่ จำนวนวัสดุละ 4 ขวด จากนั้นนำทุกขวดมานึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121.5 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออุณหภูมิเย็นลงแล้วเติมน้ำกลั่นปริมาณ 50 มิลลิลิตร ลงไปทั้ง 4 ขวด และเติมน้ำเลี้ยงเชื้อรา EMW41 อีกขวดละ 50 มิลลิลิตร 3 ขวด ส่วนอีกขวดเป็นขวดควบคุมเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาณ 50 มิลลิลิตร นำทุกขวดมาเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ หาค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ และหาค่าความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.01$

4. ผลการวิจัย

ตอนที่ 1 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส

จากการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูโลสบนอาหาร CMC agar พบว่าเชื้อราทั้งหมดสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ แต่มีเชื้อราจำนวน 5 ไอโซเลตที่ให้ค่าอัตราส่วนของค่าการสร้างโซนใสต่อขนาดโคโลนี (C/G) มากกว่า 1.4 มิลลิเมตร ได้แก่ เชื้อราไอโซเลต MEW25 วัดค่า C/G ได้ 1.45 มิลลิเมตร เชื้อราไอโซเลต MEW28 วัดค่า C/G ได้ 1.43 มิลลิเมตร เชื้อราไอโซเลต MEW40 วัดค่า C/G ได้ 1.42 มิลลิเมตร

เชื้อราไอโซเลต MEW41 วัดค่า C/G ได้ 1.86 มิลลิเมตร และเชื้อราไอโซเลต MEW44 วัดค่า C/G ได้ 1.42 มิลลิเมตร (ตารางที่ 1)

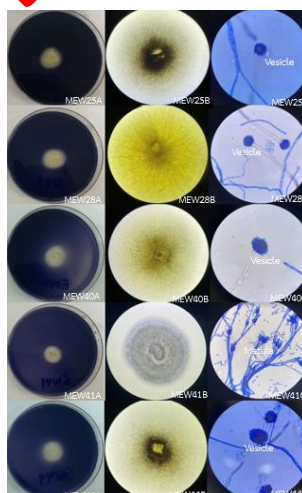
ตารางที่ 1 แสดงค่าอัตราการสร้างโคนิไส (C) ต่อการเจริญเติบโต (G)

รหัสเชื้อราจากลำไ้ไ้เดือน	ค่า C/G $\pm$ SD	รหัสเชื้อราจากลำไ้ไ้เดือน	ค่า C/G $\pm$ SD
MEW41	1.86 $\pm$ 0.22a	MEW2	1.06 $\pm$ 0.42b
MEW25	1.45 $\pm$ 0.31ab	MEW37	1.00 $\pm$ 0.42bc
MEW28	1.43 $\pm$ 0.37ab	MEW38	1.01 $\pm$ 0.44b
MEW40	1.42 $\pm$ 0.27ab	MEW47	0.95 $\pm$ 0.20bc
MEW44	1.42 $\pm$ 0.33ab	MEW30	0.94 $\pm$ 0.34bc
MEW45	1.21 $\pm$ 0.25b	MEW18	0.89 $\pm$ 0.34c
MEW43	1.15 $\pm$ 0.45b	MEW42	0.89 $\pm$ 0.45c
MEW39	1.12 $\pm$ 0.13b	MEW46	0.85 $\pm$ 0.26c
MEW23	1.10 $\pm$ 0.25b	MEW31	0.85 $\pm$ 0.56c
MEW26	1.10 $\pm$ 0.40b	MEW15	0.25 $\pm$ 1.37d

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ $P < 0.01$; C คือ บริเวณโคนิไสที่เชื้อราสร้างขึ้น หน่วยเป็น มิลลิเมตร; G คือ ขนาดของการเจริญเติบโตของโคนิไสเชื้อรา หน่วยเป็น มิลลิเมตร

เมื่อตรวจลักษณะของเชื้อรา MEW25, MEW28, MEW40 และ MEW44 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า มีลักษณะโคนิไสนุ่มฟู เส้นใยเป็นสีขาวถึงเทาเขียว สร้างสปอร์สีเขียวถึงดำ สร้าง Conidiospore บน vesicle เป็นลักษณะของราในสกุล *Aspergillus* (ภาพที่ 2 B-C)

สำหรับเชื้อราไอโซเลต MEW41 มีลักษณะโคนิไสเหมือนพรมนุ่ม มีขอบโคนิไสสีขาว สร้างสปอร์สีเขียว เทา สร้าง Conidiospore บน Metula เป็นลักษณะของราในสกุล *Penicillium* (ภาพที่ 2 B-C)



ภาพที่ 2 แสดงโซนไฮโดรไลติกและลักษณะสปอร์ของเชื้อรา EW25 EW28 EW40 EW41 และ EW44

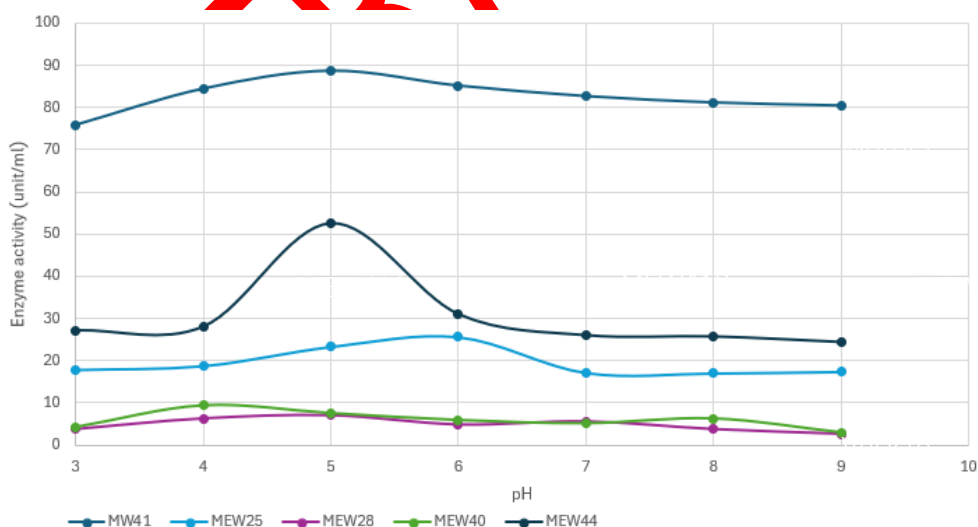
ตอนที่ 2 ศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อราบางชนิด

การศึกษาความสามารถในการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสที่ pH ต่างกัน คือ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 และ 9.0 พบว่า เชื้อราทั้ง 7 ไอโซเลต มีการทำงานสูงสุดอยู่ในช่วง 4.0-6.0 โดยเชื้อราไอโซเลต MEW41 มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสสูงที่สุด มีค่า 88.59 unit/ml ที่ pH เท่ากับ 5.0 (ตารางที่ 2 และ ภาพที่ 3)

ตารางที่ 2 แสดงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราที่ระดับ pH ต่างกัน

ไอโซเลต เชื้อรา	กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่ pH ต่างๆ (Unit/ml)						
	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
MEW25	17.81 ^b	18.73 ^c	23.27 ^c	25.59 ^b	17.09 ^{bc}	16.99 ^{bc}	17.33 ^{bc}
MEW28	3.73 ^c	6.27 ^d	7.03 ^d	4.18 ^c	5.55 ^{bc}	3.71 ^c	2.59 ^c
MEW40	4.17 ^c	9.35 ^d	7.47 ^d	5.83 ^c	5.07 ^c	6.21 ^c	2.87 ^c
MEW41	75.89 ^{a*}	84.39 ^{a*}	88.59 ^{a*}	85.61 ^{a*}	82.61 ^{a*}	81.11 ^{a*}	80.41 ^{a*}
MEW44	27.09 ^b	28.01 ^b	52.53 ^b	30.93 ^b	25.93 ^b	25.63 ^b	24.31 ^b

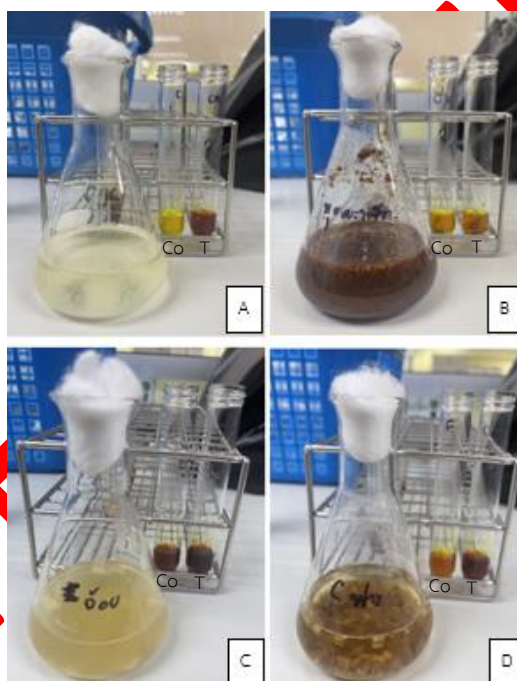
* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ $P < 0.01$



ภาพที่ 3 แสดงแนวโน้มกิจกรรมของเซลล์ที่ pH ต่างกัน

ตอนที่ 3 การศึกษาประสิทธิภาพการย่อยวัสดุการเกษตร (ขุยมะพร้าว, กากอ้อย, ฟางข้าว) จากเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อราไอโซเลต MEW41 ที่ 24 ชั่วโมง

น้ำเลี้ยงเชื้อรา MEW41 เมื่อนำมาย่อยสลายวัสดุการเกษตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์เซลลูเลสสามารถย่อยสลายขุยมะพร้าวแห้งและวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้เฉลี่ย 0.83 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กาบอ้อยแห้งวัดปริมาณน้ำตาลได้ 1.98 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในฟางข้าวแห้งวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 0.73 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4 และ ตารางที่ 6)



ภาพที่ 4 ประสิทธิภาพการย่อยวัสดุการเกษตร (ขุยมะพร้าว, กากอ้อย, ฟางข้าว) จากเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อราไอโซเลต MEW41 ที่ 24 ชั่วโมง Co = หลอดควบคุม T = หลอดทดสอบ
A = เซลลูเลสสังเคราะห์ B = ขุยมะพร้าวแห้ง C = กาบอ้อยแห้ง D = ฟางข้าวแห้ง

ตารางที่ 6 แสดงกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราที่ระดับ pH แตกต่างกัน

วัสดุการเกษตร	A540 nm	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดได้ (mg/ml)
เซลลูโลสสังเคราะห์ (CMC) (control)	1.37	$1.39 \pm 0.21b$
ขุยมะพร้าวแห้ง (dry coconut coir)	0.81	$0.83 \pm 0.11c$
กากอ้อยแห้ง (dry sugarcane sheath)	1.95	$1.98 \pm 0.18a^*$

ฟางข้าวแห้ง (dry rice straw)

0.71

0.73 ± 0.09c

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ $P < 0.01$ อภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้คัดแยกเชื้อราจากภายในลำไส้ของไส้เดือนดินชนิด *Metaphire posthuma* ได้จำนวน 20 ไอโซเลต เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง CMC พบว่าเชื้อราทั้ง 20 ไอโซเลต สามารถสร้างโซนใสเมื่อย้อมด้วยสารละลายไอโอดีน และพบว่ามีเชื้อราจำนวน 5 ไอโซเลต ที่มีอัตราส่วนการสร้างโซนใสต่อการเจริญเติบโตสูงสุด ได้แก่ เชื้อราไอโซเลต MEW25 วัดค่าอัตราส่วนการสร้างโซนใสต่อการเจริญเติบโตได้ 1.45 เชื้อราไอโซเลต MEW28 วัดค่าอัตราส่วนการสร้างโซนใสต่อการเจริญเติบโตได้ 1.43 เชื้อราไอโซเลต MEW40 วัดค่าอัตราส่วนการสร้างโซนใสต่อการเจริญเติบโตได้ 1.42 เชื้อราไอโซเลต MEW41 วัดค่าอัตราส่วนการสร้างโซนใสต่อการเจริญเติบโตได้ 1.86 และเชื้อราไอโซเลต MEW44 วัดค่าอัตราส่วนการสร้างโซนใสต่อการเจริญเติบโตได้ 1.42 แสดงให้เห็นว่าไส้เดือนดินสามารถสร้างความอุดมสมบูรณ์และกระจายจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ลงสู่เนื้อดินได้ โดยกินซากพืชเข้าไปผ่านลำตัวแล้วเกิดกระบวนการย่อยสลายก่อนเคลื่อนที่และขับมูลออกมา สอดคล้องกับงานวิจัยของ ปริญาและลินดา (2559) ที่ศึกษาพบว่าเชื้อราจากดิน 15 ไอโซเลต สามารถผลิตเซลลูเลสได้ โดยมีค่าอัตราส่วนการสร้างโซนใสต่อการเจริญเติบโตสูงถึง 2.11 แสดงให้เห็นว่าเชื้อราสามารถเอนไซม์เซลลูเลสได้เป็นอย่างดี

เมื่อนำเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต มาศึกษาพื้นฐานวิทยาเบื้องต้นพบว่าเชื้อราไอโซเลต MEW25, MEW28, MEW40 และ MEW44 มีลักษณะพื้นฐานวิทยาเป็นราในสกุล *Aspergillus* และเชื้อราไอโซเลต MEW41 มีลักษณะพื้นฐานวิทยาเป็นเชื้อราในสกุล *Penicillium* สอดคล้องกับงานวิจัยของ ปริญาและลินดา (2559) ที่พบว่าเชื้อราสกุล *Aspergillus* ชนิด *A. allahaba* เป็นเชื้อราที่ผลิตเซลลูเลสและมีประสิทธิภาพในการนำมาหมักเพื่อผลิตปุ๋ยหมักได้เป็นอย่างดี และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของสันธยา และคณะ (2566) ที่ศึกษาและรายงาน ว่า เชื้อราสกุล *Aspergillus* sp. หลายชนิดที่คัดแยกได้จากวัสดุการเกษตรสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ มีค่าอัตราส่วนการสร้างโซนใสต่อการเจริญเติบโตสูงสุดวัดได้ 1.57 ml นอกจากนี้พิทักษ์พงศ์ (2552) ได้รายงาน ว่า เชื้อราสกุล *Penicillium* ที่คัดแยกได้จากดินในไร่อ้อยหลายชนิดสามารถผลิตเซลลูเลสได้ แสดงให้เห็นว่าเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต ซึ่งเป็นราในสกุล *Aspergillus* และสกุล *Penicillium* จึงเป็นเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จริง

เมื่อพิจารณาปัจจัยการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราที่คัดแยกได้จากลำไส้ไส้เดือนดินชนิด *M. posthuma* ทั้ง 5 ไอโซเลตพบว่า ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลต มีช่วงการทำงานสูงสุดระหว่างค่าความเป็น pH 4 - 6 โดยเชื้อราไอโซเลต MEW41 มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจากเชื้อราสูงสุดที่ pH เท่ากับ 5 วัดได้ 88.59 Unit/ml สอดคล้องกับการศึกษาของ ศุภางคนค์ และคณะ (2556) ที่ศึกษาพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่คัดแยกได้จาก *Thermobifida fusca* PA1-1 ทำงานได้ดีที่ pH 4-6 เช่นกัน แสดงให้เห็นว่าเมื่อปรับสภาวะให้ pH เหมาะสมเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อราในการศึกษารังนี้ จะสามารถนำมาย่อยสลายวัสดุการเกษตรได้สูงสุด

ผู้วิจัยจึงได้ทดสอบประสิทธิภาพการย่อยวัสดุการเกษตร 3 ชนิดในสภาวะปิด 3 ตัวอย่าง ได้แก่ ขุยมะพร้าวแห้ง กากอ้อยแห้ง และฟางข้าวแห้ง โดยใช้เชื้อรา MEW41 ที่ pH เท่ากับ 5 ผลการศึกษาพบว่า กากอ้อยแห้งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เกิดขึ้นสูงสุด วัดได้ 1.98 mg/ml ตามด้วยขุยมะพร้าวแห้ง และฟางข้าวแห้ง วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 0.81 mg/ml และ 0.71 mg/ml ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา MEW41 ซึ่งคัดแยกได้จากลำไส้ของไส้เดือนดิน *M. posthuma* มีประสิทธิภาพจริงในการย่อยสลายวัสดุการเกษตรตามธรรมชาติ ทั้งนี้งานวิจัยยังมีข้อมูลสนับสนุนจากการศึกษาของ สันธยาและคณะ (2566) ที่ทดลองพบว่าเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus* สามารถย่อยสลายอาหารวันชานอ้อย อาหารวันแกรบ และอาหารวันรำข้าวได้

นอกจากนี้ ผลการศึกษาที่แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อราซึ่งคัดแยกได้จากไส้เดือนดิน *M. posthuma* ยังสามารถย่อยสลายเซลลูโลสสังเคราะห์ (synthetic cellulose) ได้อีกด้วย เนื่องจากเซลลูโลสสังเคราะห์เป็นวัสดุชีวภาพที่นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมชีวภาพ อุตสาหกรรมกระดาษ และอุตสาหกรรมสิ่งทอ สะท้อนให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ร่วมกับวัสดุที่มีโครงสร้างคล้ายเซลลูโลส เช่น พิล์มชีวภาพ (biofilms) แผ่นเซลลูโลสนาโน หรือเส้นใยเซลลูโลสที่ใช้ในอุตสาหกรรมบรรจุภัณฑ์ทางเลือก งานวิจัยนี้ผู้วิจัยเสนอแนะว่า หากทดสอบปัจจัยด้านอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลสจะทำให้ทราบคุณสมบัติของเอนไซม์ดียิ่งขึ้น และในอนาคตจะได้นำเชื้อราดังกล่าวมาศึกษาในระดับถึงหมักหรือกองปุ๋ยหมักต่อไป

5. สรุปผลการทดลอง

ลำไส้ของไส้เดือนดิน *Metaphire posthuma* พบเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากเชื้อราที่คัดแยกมีประสิทธิภาพการทำงานอยู่ในช่วงความเป็น pH เท่ากับ 4-6 โดยเชื้อราสกุล *Penicillium* MEW41 มีประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุดในการย่อยสารเซลลูโลสสังเคราะห์ วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้ 88.59 unit/ml และเอนไซม์จากเชื้อราไอโซเลต MEW41 สามารถย่อยวัสดุการเกษตรทั้งฟางข้าวแห้ง กากอ้อยแห้ง และขุยมะพร้าวแห้งและเปลี่ยนเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมง โดยกากอ้อยแห้งเป็นวัสดุการเกษตรที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการย่อยสลายด้วยเซลลูเลสสูงสุด วัดได้ 1.98 mg/ml ผลการศึกษานี้สามารถนำเอนไซม์จากเชื้อราไอโซเลต MEW41 มาศึกษาต่อในระดับอุตสาหกรรมได้ในอนาคต

6. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยกรุงเทพธนบุรีและมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยาและภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยกรุงเทพธนบุรีที่เอื้อเฟื้อสถานที่สำหรับการทดลองเพื่อศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ห้องแลปจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยกรุงเทพธนบุรี ที่ช่วยดูแลและอำนวยความสะดวกระหว่างศึกษาวิจัย

7. เอกสารอ้างอิง

- กุสุมาวดี ฐานเจริญ. (2561). การคัดเลือกยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากน้ำทิ้งโรงอาหาร: การประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียและผลิตไบโอดีเซล, *วารสารเกษตรพระวิรุณ*, 15(1), 204-215. <https://li01.tci-thaijo.org/index.php/pajrmu/article/view/249113>
- ปริญญ์ ไกรวณินันท์ และ ลินดา ใจปิง. (2559). การคัดแยกเชื้อราที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อใช้ในกระบวนการหมักปุ๋ยชีวภาพ, *วารสารวิทยาศาสตร์ มช*, 44(4), 759-769. <https://ph01.tci-thaijo.org/index.php/KKUSciJ/article/download/249638/169250/897051>
- พิทักษ์พงศ์ ป้อมปรามณี. (2552). การศึกษาจุลินทรีย์ในดินไร้ออกซิเจนที่มีบทบาทในการย่อยสลายใบอ้อย, *วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง*, 18(1), 42-51. https://li01.tci-thaijo.org/index.php/science_kmitl/article/view/99943
- รุ่งโรจน์ ไกรสิทธิพาณิชย์, อานัฐ ตันโซ, พัฒนา สมนิยาม และ สิริพร โรจน์อารยานนท์. (2559). การใช้เครื่องหมายสัณฐานวิทยาศึกษาความหลากหลายของไส้เดือนดินในพื้นที่การเกษตรของจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน. คณะกรรมการจัดการประชุม (บ.ก.), *การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ ครั้งที่ 3 ก้าวสู่ทศวรรษที่ 2 บูรณาการงานวิจัย ใช้องค์ความรู้สู่ความยั่งยืน* (น. 46-57), วิทยาลัยนครราชสีมา.
- ศุภางคนาค จอมสืบ, มังกร โรจน์ประภากร และ วิรสิทธิ์ สรรพมงคลไชย. (2556). การศึกษาลักษณะของเอนไซม์คาร์บอกซิเมทิลเซลลูเลสและการผลิตในระดับถังหมักจาก *Thermobifida fusca* PA1-1. *การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 51 ประจำปี พ.ศ.2556* (หน้า 162-169). กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สันธยา บุญรุ่ง, ปวีณา สุ่มะหิงพันธ์ และ ศิริลักษณ์ สุตศรี. (2566). การแยกและคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อใช้ย่อยสลายวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร, *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 28(3), 1818-1832. <https://scijournal.buu.ac.th/index.php/sci/article/view/4682/4690>
- Gates, G.E. (1939). Thailand earthworms, *Journal Thailand Research Society*, 12, 65-114.
- Kraisittipant, R.W., Charerntantanakul, W., Aumtong, S., Niumsup P., & Tancho, A., (2021). The potential of fungi Ccollected from earthworm gut and vermicompost producing auxin under tryptophan and non-tryptophan culture, *International Journal of Agricultural Technology*, 17(3), 921-928. <https://www.thaiscience.info/Journals/Article/IJAT/10994587.pdf>
- Sims, R.W., & Easton, E.G. (1972). A numerical reversion of the earthworm genus *Pheretima* (Megascleidae: Oligochaeta) with the recognition of new genera and an appendix on the

earthworms collected by the Royal Society North Borneo Expedition, *Biological Journal of the Linnean Society*, 4(3), 169-268. <http://doi:10.1111/j.1095-8312.1972.tb00694.x>

RETRACTED