# การคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่สามารถผลิตเอนไซม์เพคติเนสเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

กัญญา สอนสนิท[1*] และยุพารัตน์ สายหมี[1]

[1]สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม
*jkanya@webmail.npru.ac.th

**บทคัดย่อ**

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแอคติโนมัยสีทที่สามารถผลิตเอนไซม์เพคติเนสจากดินในสวนส้มโอ 3 แหล่ง ในอำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม และศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยสลายเพคตินบนอาหารแข็ง Pectin agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน จากผลการวิจัย พบว่าสามารถคัดแยกแอคติโนมัยสีทได้ จำนวน 200 ไอโซเลท เมื่อนำไอโซเลทที่แยกได้ไปศึกษาความสามารถในการย่อยสลายเพคตินโดยตรวจสอบการเกิดบริเวณใสบนอาหารแข็ง พบว่า สามารถคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเพคติน จำนวน 81 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 40.5 ของจำนวนแอคติโนมัยสีททั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบ ไอโซเลทส่วนมากมีอัตราส่วนของบริเวณใสอยู่ในช่วง 1.00 – 2.99 จำนวน 50 ไอโซเลท (คิดเป็นร้อยละ 25 ) รองลงมาคือ อัตราส่วนอยู่ในช่วง 2.00 – 2.99 จำนวน 21 ไอโซเลท (คิดเป็นร้อยละ 10.5 ) อัตราส่วนช่วง 3.00 – 3.99 จำนวน 9 ไอโซเลท (คิดเป็นร้อยละ 4.5 ) อัตราส่วนช่วง 0.1 – 0.99 จำนวน 1 ไอโซเลท (คิดเป็นร้อยละ 0.5 ) และไม่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เพคติเนส 119 ไอโซเลท (คิดเป็นร้อยละ 59.5) ไอโซเลทที่มีอัตราส่วนบริเวณใสต่อขนาดของโคโลนีมากที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท SM4 รองลงมาคือไอโซเลท SM4.2 โดยมีอัตรส่วนบริเวณใสเท่ากับ 3.68 และ 3.65 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อนำไอโซเลททั้ง 81 ไอโซเลทไปตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนสพบว่า ไอโซเลท SM4.2 และ SM4 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเป็น 0.7932 และ 0.7872 U/ml ตามลำดับ ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง

**คำสำคัญ:** แอคติโนมัยสีท เอนไซม์ เพคติเนส อาหาร

# Screening of pectinase producing Actinomycetes for food-industrial application

Kanya Sornsanit[1*] and Yuparat Saimee[1]

[1]Microbiology Program Faculty of Science and Technology Nakhon Pathom Rajabaht University
*jkanya@webmail.npru.ac.th

## Abstract

This research aimed to isolate actinomycetes capable of producing pectinase enzyme from three orchard soils in Sampran district, Nakhon Pathom province, Thailand. The effectiveness of pectin degradation on solid pectin agar plates incubated at room temperature for 5 days was also investigated. Results revealed the successful isolation of 200 actinomycete isolates from the three orchard soils. Upon screening for pectin degradation ability, 81 isolates exhibited clear zones on the solid agar plates, representing 40.5% of the total isolates tested. The majority of these pectinolytic isolates (50 isolates, representing 25%) exhibited clear zone ratio between 1.00 and 2.99 cm. The remaining isolates showed clear zone ratio of 2.00-2.99 cm (21 isolates, 10.5%), 3.00-3.99 cm (9 isolates, 4.5%), and 0.1-0.99 cm (1 isolate, 0.5%). Notably, 119 isolates (59.5%) failed to produce pectinase. The isolate with the highest ratio of clear area to colony size was isolate SM4, followed by isolate SM4.2, with a clear area ratio of 3.68 and 3.65 cm, respectively. All 81 isolates were tested for pectinase activity. It was found that isolates SM4.2 and SM4 had the highest enzyme activity values of 0.7932 and 0.7872 U/ml, respectively, on the 5th day of cultivation.

**Keywords:** Actinomycetes, Enzyme, Pectinase, Food

## 1. บทนำ

เพคตินเป็นสารจำพวกพอลิแซคคาไรด์ที่มีโครงสร้างหลักประกอบด้วย galacturonic acid และ rhamnose ในสายโซ่หลัก arabinose galactose และ xylose บนสายโซ่กิ่งด้วยพันธะ $\alpha$-1,4 glycoside [1] ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์และเมทริกซ์ในเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส มีบทบาทสำคัญในการยึดเกาะเซลล์ให้อยู่ติดกัน ช่วยเพิ่มความแข็งแรงและรักษาโครงสร้างของเซลล์ และทำหน้าที่เป็นโมเลกุลรับส่งสัญญาณในการสร้างภูมิต้านทานและป้องกันเชื้อโรค [1] แต่เพคตินเป็นเป็นปัญหาในอุตสากรรมการผลิตน้ำผลไม้และไวน์ อุตสาหกรรมกระดาษและเยื่อกระดาษ ระบบน้ำเสียของอุตสาหกรรมที่เกี่ยวกับผักและผลไม้ และอุตสาหกรรมสิ่งทอ [2,3] ซึ่งการใช้เอนไซม์เพคติเนสสามารถช่วยแก้ปัญหาข้างต้นได้ ในอุตสาหกรรมน้ำผลไม้และไวน์จะช่วยในการสกัด ลดความหนืด ทำใสน้ำผลไม้และไวน์ อุตสาหกรรมการผลิตกระดาษและเยื่อกระดาษมีการฟอกสีกระดาษด้วยเพอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม จะมีการใช้เพคติเนสย่อยสลายโพลิเมอร์บนเยื่อกระดาษแทน การบำบัดน้ำเสียจากอุตสาหกรรมแปรรูปอาหาร จะใช้เพคติเนสจากจุลินทรีย์ ช่วยปรับสภาพตะกอนให้เหมาะสมก่อนการบำบัดแบบ activated sludge การใช้เพคติเนสในอุตสาหกรรมสิ่งทอช่วยกำจัดสิ่งสกปรกในเส้นใยฝ้ายได้โดยไม่ต้องใช้สารเคมีและไม่ทำลายเซลลูโลส ช่วยเพิ่มการดูดซับสีย้อมและเพิ่มความนุ่มให้เส้นใยฝ้าย ในการผลิตอาหารสัตว์เพคติเนสถูกใช้ในการผลิต pectic oligosaccharide ที่ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ที่มีคุณสมบัติเป็น prebiotic อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นตัวเสริมในการควบคุมเชื้อก่อโรคพืชในการเกษตรได้ [4]

เอนไซม์เพคติเนสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสารประกอบเพคตินให้มีขนาดโมเลกุลสั้นลง เช่น oligo galacturonic, protopectin, galacturonic acid และ alcohol [5] อีกทั้งมีความจำเพาะต่อสับสเตรท โดยโมเลกุลที่ตัดได้

จะขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์เพคติเนสที่ประกอบไปด้วย polygalacturonases (PG), pectin esterases (PE), pectin lyases (PNL) และ pectate lyases (PAL) มีรายงานเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้แอคติโนมัยสีทซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีประสิทธิภาพหลากหลายและผลิตเอนไซม์เพคติเนสสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการสกัดและทำน้ำผลไม้ให้ใส โดยเอนไซม์เพคติเนสจากแอคติโนมัยสีทมีกิจกรรมในช่วง pH กว้าง จึงทำให้จุลินทรีย์กลุ่มแอคติโนมัยสีทมีความน่าสนใจในการผลิตเอนไซม์เพคติเนส [6] เพราะนอกจากจะมีความหลากหลายในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ วิตามิน และสารสีแล้ว ยังสามารถผลิตเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพได้อีกด้วย

**2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย**

**2.1 เพื่อคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เพคติเนสจากตัวอย่างดินสวนส้มโอ**

**3. วิธีดำเนินการวิจัย**

**3.1 แหล่งตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง**

เก็บตัวอย่างดินจากสวนส้มโอจากอำเภอสามพราน จำนวน 30 แหล่ง รวมทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างดินที่ได้มาผึ่งให้แห้งในที่ร่มที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 1-2 สัปดาห์ นำดินมาบดให้ละเอียดและร่อนด้วยตะแกรง เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อใช้ศึกษาขั้นต่อไป

**3.2 การคัดแยกแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดิน**

การคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดิน โดยนำตัวอย่างดินที่เตรียมไว้มาทำการเจือจางครั้งละ 10 เท่า (ten fold serial dilution) ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (normal saline) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นคัดแยกแอคติโนมัยสีทด้วยวิธีการ spread plate technique เพาะเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยสีทบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ International Streptomyces Project 2 agar (ISP2) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 5-7 วัน จากนั้นนำไปแยกเชื้อบริสุทธิ์ด้วยวิธีการขีดเชื้อ (streak plate) ต่อไป

**3.3 การคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่ผลิตเอนไซม์เพคติเนส**

เพาะเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์ของแอคติโนมัยสีทที่แยกได้จากข้อ 3.2 บนจานอาหารแข็ง ISP2 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะแอคติโนมัยสีทที่เพาะเลี้ยงไว้ จากนั้นใช้เข็มเขี่ยชิ้นวุ้นที่มีเชื้อ แอคติโนมัยสีทที่ต้องการทดสอบมาวางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ pectin agar ที่มี citrus pectin ความเข้มข้นร้อยละ 1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน นำจานเพาะเชื้อมาราดทับด้วย cetyl trimethyl ammonium bromide ความเข้มข้นร้อยละ 1 ที่ละลายในแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 15 วางจานอาหารเลี้ยงเชื้อต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที สังเกตลักษณะวงใสรอบโคโลนี วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณโซนใสกับเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของแอคติโนมัยสีทที่เกิดขึ้นบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อหาอัตราส่วนบริเวณใสต่อขนาดของโคโลนี

**3.4 การเตรียมเอนไซม์หยาบ (crude enzyme)**

นำแอคติโนมัยสีทที่สามารถสร้างเอนไซม์เพคติเนสบนอาหารแข็งได้มาเพาะเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ISP2 บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 วัน ใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะแอคติโนมัยสีทที่เลี้ยงไว้ จากนั้นใช้เข็มเขี่ยชิ้นวุ้นที่ต้องการทดสอบมา 1 ชิ้น ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ pectin broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มโดยการเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกเก็บส่วนใสเพื่อใช้เป็น crude enzyme ในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์

**3.5 การวิเคราะห์กิจกรรม pectinase โดยหาปริมาณ galacturonic acid**

เตรียมสารละลายเพคตินเข้มข้นร้อยละ 1 ใน phosphate buffer pH 7.2 จากนั้นใส่สารละลายเพคตินที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง และใส่ crude enzyme ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้วนำไปวิเคราะห์โดยวิธี Dinitrosalicylic acid method (DNS method) โดยใช้ galacturonic acid เป็นสารละลายมาตรฐาน โดยการคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ดังสมการ (1)

**การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนส**

$$\text{Enzyme activity (U/ml)} = \frac{\text{galacturonic acid (mg) x 1000 x dilution factor}}{\text{มวลโมเลกุลของ □□□□□□□□□□□□ □□□□ (□/□□□) □ เวลาที่ใช้ทำปฏิกิริยา□ ปริมาตรเอนไซม์}} \quad (1)$$

**4. ผลการวิจัยและอภิปรายผล**

**4.1 การคัดแยกแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดิน**

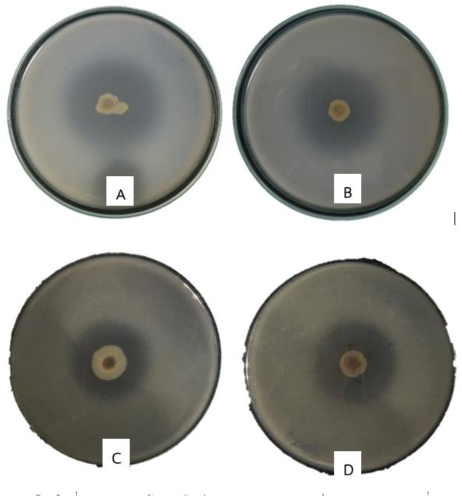
จากการคัดแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดินสวนส้มโอ พื้นที่อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม จำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแยกเชื้อแอคติโนมัยสีทได้ทั้งหมด 200 ไอโซเลท โดยเชื้อที่คัดแยกได้จะมีลักษณะคล้ายผงหรือฝุ่นแป้ง หยาบกระด้าง แข็ง คล้ายขนสัตว์หรือผ้ากำมะหยี่ บางไอโซเลทสามารถสร้างรงค์วัตถุสีต่าง ๆ เช่น สีขาว สีครีม สีเทา

**4.2 การคัดเลือกแอคติโนมัยสีทที่ผลิตเอนไซม์เพคติเนส**

จากกการศึกษาพบว่าจากแอคติมัยสีททั้งหมด 200 ไอโซเลท สามารถการสร้างเอนไซม์เพคติเนสมาย่อยสารประกอบเพคตินบนอาหารได้จำนวน 81 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 40.5 ของจำนวนแอคติโนมัยสีททั้งหมดที่ทำการทดสอบ ไอโซเลทที่สามารถสร้างเอนไซม์เพคติเนส ได้แก่ FI2-1, FI2-2, FI17, FI23, FI26, FI29, FI34, FI38, FI47, FI49-1, FI49-2, FI52-1, FI52-2, FI54, FI61, FI64, BI3, BI9, BI13, BI14, BI17, BI18, BI19, BI25, BI26, BI29, BI34, BI35, BI36, BI43, BI44, GAP1, GAP3, GAP8, GAP11-1, GAP14, GAP15, GAP16-1, GAP16-2, GAP17, CHI4, CHI8, CHI9-1, CHI16-2, CHI16-3, CHI16-4, CHI16-5, CI1-1, CI1-2, CI9-3, CI13, CI14, CI16, CI17, CI27, RI2, RI11, RI24, RI35, RI4.2, RI48, TI3, SM1, SM4, SM4.2, SM5, SM6.2, SM12, SM22, SM27.1, SM27.2, SM28, SK2, SK17.2, SK20, SK21, SK24, SK25, AC2, AC4, AC6 และ AC12 โดยไอโซเลทส่วนมากมีอัตราส่วนของบริเวณใสอยู่ในช่วง 1.00 – 2.99 จำนวน 50 ไอโซเลท (คิดเป็นร้อยละ 25 ) รองลงมาคือ อัตราส่วนอยู่ในช่วง 2.00 – 2.99 จำนวน 21 ไอโซเลท (คิดเป็นร้อยละ 10.5 ) อัตราส่วนช่วง 3.00 – 3.99 จำนวน 9 ไอโซเลท (คิดเป็นร้อยละ 4.5 ) อัตราส่วนช่วง 0.1 – 0.99 จำนวน 1 ไอโซเลท (คิดเป็นร้อยละ 0.5 ) และไม่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เพคติเนส 119 ไอโซเลท (คิดเป็นร้อยละ 59.5) (ตารางที่ 1) โดยไอโซเลท SM4 สามารถสร้างเอนไซม์เพคติเนสบนอาหารแข็งได้อัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณโซนใสกับเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีสูงที่สุด เท่ากับ 3.68 รองลงมาคือ ไอโซเลท SM4.2 อัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณโซนใสกับเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี เท่ากับ 3.65 ไอโซเลทที่มีบริเวณโซนใสกว้างที่สุดคือ ไอโซเลท SM4 เท่ากับ 4.05 เซนติเมตร รองลงมาคือ ไอโซเลท SM4.2 มีบริเวณโซนใส 4.02 เซนติเมตร ไอโซเลท CH14 มีบริเวณโซนใส 3.7 เซนติเมตร และไอโซเลท CH18 มีบริเวณโซนใส 3.6 เซนติเมตร (ภาพที่ 1) ซึ่งอัตราส่วนระหว่างความกว้าง โซนใสต่อความกว้างโคโลนีสูงจะสัมพันธ์กับประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ที่สูงขึ้น [7] แต่อย่างไรก็ตามต้องทำการทดสอบเพื่อหาประสิทธิภาพของเอนไซม์ในอาหารเหลวด้วย

**ตารางที่ 1** ความสามารถในการสร้างเอนไซม์เพคติเนสของแอคติโนมัยสีทบนอาหารแข็ง pectin agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

| อัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณโซนใสกับเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี | จำนวนไอโซเลท |
|---|---|
| 0.10 - 0.99 | 1 |
| 1.00 - 1.99 | 38 |
| 2.00 - 2.99 | 20 |
| 3.00 - 3.99 | 9 |
| รวม | 81 |




**ภาพที่ 1** บริเวณโซนใสที่เกิดจากการสร้างเอนไซม์เพคติเนส บนอาหารแข็ง pectin agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน (A) ไอโซเลท SM4.2 (B) ไอโซเลท CHI4 (C) ไอโซเลท SM4 (D) ไอโซเลท CHI8

**4.3 การวิเคราะห์กิจกรรม pectinase โดยหาปริมาณ galacturonic acid**

เมื่อนำเชื้อแอคติโนมัยสีท จำนวน 81 ไอโซเลทไปตรวจหากิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนสในวันที่ 3. 5 และ 7 ของการเพาะเลี้ยงพบว่า ซึ่งจำนวนไอโซเลทที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสอยู่ในช่วง 0.01-0.1999 U/ml จำนวน 22 ไอโซ-เลท จำนวนไอโซเลทที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสอยู่ในช่วง 0.2-0.3999 U/ml จำนวน 17 ไอโซเลท จำนวนไอโซ-เลทที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสอยู่ในช่วง 0.4-0.4999 U/ml จำนวน 30 ไอโซเลท จำนวนไอโซเลทที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสอยู่ในช่วง 0.5000-0.6999 U/ml ขึ้นไป จำนวน 10 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท GAP15, RI48, SM1, SK2, BI13, BI14, BI17, BI19, BI26, BI29 และ BI35 จำนวนไอโซเลทที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสอยู่ในช่วง 0.7000 -0.8000 U/ml จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท SM4.2 และ SM4 โดยวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ได้ 0.7932 และ 0.7872 U/ml ตามลำดับ ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง ดังตารางที่ 2 ซึ่งค่ากิจกรรมเอนไซม์ (U/ml) ที่วัดได้ของไอโซเลททั้ง 81 ไอโซเลท แสดงในตารางที่ 3 ซึ่ง Salehghamari et al. [8] กล่าวถึงเชื้อแอคติโนมัยสีทสายพันธุ์ GIAL86 เป็นสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนสสูงสุดเท่ากับ 0.03 U/ml เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน ในอาหารเหลวที่มีเพคตินเป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับไอโซเลท CHI4 และ CHI8 ซึ่งแสดงค่าอัตราส่วนบริเวณใสต่อขนาดของโคโลนีบนอาหารแข็ง ได้ค่าอัตราส่วนค่อนข้างสูงนั้น เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 3, 5 และ 7 วันพบว่า ค่ากิจกรรมของเพคติเนสในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงมีค่าต่ำกว่าไอโซเลท SM4.2 และ SM4 โดยตรวจค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนสที่วันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงเป็น 0.5437, 0.4587 และ 0.4196 ตามลำดับ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปจนถึงวันที่ 7 ของการเพาะเลี้ยงพบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของทุกไอโซเลทไม่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเกี่ยวข้องกับการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยสีมไอโซเลทที่ทดสอบในการศึกษาครั้งนี้มีช่วงระยะการเจริญที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เพคติเนสในช่วงวันที่ 3-5 วันของการเพาะเลี้ยง โดยเอนไซม์เป็นเมทาบอไลท์ปฐมภูมิ ซึ่งจะมีการสังเคราะห์ควบคู่ไปกับการเจริญของเชื้อ เมื่อเชื้อมีการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่แล้วจึงอาจเป็นสาเหตุทำให้ตรวจไม่พบกิจกรรมของเอนไซมีที่เพิ่มขึ้นได้ ในการวัดขนาดของบริเวณใสของไอโซเลท CHI4 และ CHI8 ซึ่งพบว่ามีบริเวณใสบนอาหารแข็งค่อนข้างกว้าวแต่เมื่อเทียบเป็นอัตราส่วนของบริเวณใสต่อขนาดของโคโนโลแล้วพบว่าค่าที่ได้น้อยกว่า

**ตารางที่ 2** จำนวนไอโซเลทที่มีกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสช่วงต่างๆ ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง (U/ml)

| **กิจกรรมเอนไซม์เพคติเนส (U/ml)** | **จำนวนไอโซเลท** |
|---|---|
| 0.01-0.1999 | 22 |
| 0.20-0.3999 | 17 |
| 0.40-0.4999 | 30 |
| 0.50-0.6999 | 10 |
| 0.70-0.8000 | 2 |
| รวม | 81 |

**ตารางที่ 3** กิจกรรมเอนไซม์เพคติเนส (U/ml) ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยง

| **รหัสเชื้อ** | **กิจกรรมเอนไซม์** | **รหัสเชื้อ** | **กิจกรรมเอนไซม์** |
|---|---|---|---|
| GAP8 | 0.2730 | CHI8 | 0.4196 |
| GAP11-1 | 0.3790 | CH16-4 | 0.4357 |
| GAP14 | 0.4312 | CH16-5 | 0.4316 |
| GAP15 | 0.5076 | **SM4** | **0.7872** |
| GAP16-1 | 0.4137 | RI24 | 0.2572 |
| GAP16-2 | 0.4250 | RI35 | 0.3652 |
| GAP17 | 0.3268 | RI48 | 0.4355 |
| CI1-1 | 0.4825 | TI3 | 0.3777 |
| CI1-2 | 0.4614 | SM4 | 0.5437 |
| CI14 | 0.4333 | SM22 | 0.4119 |
| CI16 | 0.4484 | SM27.1 | 0.3660 |
| CHI4 | 0.4587 | **SM4.2** | **0.7932** |
| CH19-1 | 0.3567 | SM28 | 0.4420 |
| CH16-2 | 0.4250 | SK2 | 0.5547 |
| SK17.2 | 0.3727 | FI49-2 | 0.3972 |
| SK20 | 0.4480 | FI52-1 | 0.3842 |
| SK21 | 0.4493 | FI54 | 0.2736 |
| SK24 | 0.4239 | FI61 | 0.4235 |
| SK25 | 0.4149 | BI3 | 0.4705 |
| AC2 | 0.4830 | BI9 | 0.4966 |
| AC6 | 0.4541 | BI13 | 0.5756 |
| AC12 | 0.4529 | BI14 | 0.5159 |
| F12-1 | 0.3830 | BI17 | 0.5283 |

**5. สรุปผลการทดลอง**

การคัดแยกแอคติโนมัยสีทจากตัวอย่างดินสวนส้มโอ อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม จำนวน 30 ตัวอย่าง แยกเชื้อ แอคติโนมัยสีทได้ทั้งหมด 200 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อทั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการย่อยสลายเพคตินบนอาหารแข็ง pectin agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน ตรวจผลโดยการสังเกตบริเวณใสรอบโคโลนีของเชื้อ พบว่าเชื้อแอคติโนมัยสีท จำนวน 81 ไอโซเลทสามารถย่อยสลายเพคตินได้ และตรวจไม่พบการย่อยสลายเพคตินบนอาหารแข็งจำนวน 119 ไอโซเลท และพบว่าไอโซเลท SM4 มีอัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณโซนใสกับเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีกว้างที่สุดเมื่อทดสอบบน

อาหารแข็งคือ มีอัตราส่วนบริเวณโซนใสต่อขนาดของโคโลนีเท่ากับ 3.68 เซนติเมตร รองลงมาคือ ไอโซเลท SM4.2 มีอัตราส่วนบริเวณโซนใส 3.65 เซนติเมตร เมื่อตรวจหาประสิทธิภาพของเชื้อโดยวัดกิจกรรมเอนไซม์เพคติเนสพบว่าไอโซเลท SM4.2 มีกิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 5 วัน คือเท่ากับ 0.7932 U/ml และรองมาได้แก่ไอโซเลท SM4 มีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 0.7872 U/ml

**6. กิตติกรรมประกาศ**

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยโครงการวิจัยบูรณาการนักศึกษาและอาจารย์เพื่อการพัฒนาท้องถิ่นและความเป็นเลิศทางวิชาการ จากมหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม ขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

**7. เอกสารอ้างอิง**

[1] Priyanka S.B. (2019). Isolation, Purification and Characterization of Pectinase Enzyme from Streptomyces Thermocarboxydus, *Journal of Biotechnology & Bioresearch*, 1(5), 1-6.

[2] Kohli, P. & Gupta R. (2015). Alkaline pectinase: A review, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, 279-285.

[3] Qian L., Coffman, A. M. & Lu-Kwang, J. (2015). Development of reproducible assays for polygalacturonase and pectinase*, Enzyme and Microbial Technology*, 72 (2015), 42–48.

[4] El-Nasser,n. H. A., El-Mahdy, E. S. M.,Wafaa G. S. & Gehad H. E. S. (2018). Isolation and Screening of Pectinolytic Streptomyces sp. from Soil Samples of Egypt*, Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 9(2), 744-751.

[5] ANGGRAINIP. U., FAHRURROZI2 , A. M., (2022). Production and immobilization pectinase from Bacillus sp. 2P11 using alginate beads, *Biodiversitas*, 23 (8) : 3960-3966 .

[6] Govindaraji,P.K. & Vuppu, S. (2020) .Characterisation of pectin and optimization of pectinase enzyme from novel Streptomyces fumigatiscleroticus VIT-SP4 for drug delivery and concrete crack-healing applications*: An eco-friendly approach. Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(2), 3529-2540.

[7] Preecha Yodying, Sirina Thongdonnoi and Sirinapa Chungopast. (2019). Isolation of cellulose-degrading bacteria and effective of corncob and water hyacinth decomposition using as substrates. *KHON KAEN AGR. J.*, 47(1), 177-186.

[8] Salehghamari, E., Nasrollahzadeh, Z., Tahmaseb, M. & Amoozegar, M. L. (2019). Enzyme from Streptomyces coelicoflavusGIAL86 isolated from Meyghan Salt Lake, Arak, Iran, *Int. J. Aquat. Biol.* 7(2), 106-111.