

แบบฟอร์มแจ้งความประสงค์การใช้งบประมาณสำหรับการพัฒนาบุคลากรคณะวิทยาศาสตร์

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2559

ข้าพเจ้า นางสาวกัญญา คีตบเร็ด ตำแหน่ง ค.ท.บ.สังกัด ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ได้ขออนุญาตเข้าร่วม การแข่งขันประกวดผลงานทางวิชาการ

ตามหนังสือขออนุญาต ศธ.0523.4 4.3 / 34 ลงวันที่ 6 มีภาพชน 5555 โดยข้าพเจ้ามีความประสงค์จะขอ

ใช้งบประมาณพัฒนาบุคลากรของคณะวิทยาศาสตร์ ใน

- ☐ กรณีที่ 1 ไม่มีเอกสารใด ๆ เสนอคณะ (คนละไม่เกิน 6,000 บาท)
- ☐ กรณีที่ 2 มีเอกสารรายงานสรุปเนื้อหา (คนละไม่เกิน 8,000 บาท) โดยจัดส่งเอกสาร
รายงานสรุปเนื้อหาและการนำไปใช้ประโยชน์ อย่างน้อย 1 หน้ากระดาษ A4
- ☒ กรณีที่ 3 เข้าร่วมนำเสนอผลงานวิชาการฯ
- คนละไม่เกิน 15,000 บาท (สำหรับสายวิชาการ)
- คนละไม่เกิน 10,000 บาท (สำหรับสายสนับสนุนวิชาการ)

โดยจะจัดส่งหนังสือตอบรับการเข้าร่วมนำเสนอผลงานฯ และเอกสารดังต่อไปนี้

1. บทคัดย่อ หรือสำเนาโปสเตอร์(ย่อขนาด A4) หรือบทความฯ ฉบับเต็ม
2. รายงานสรุปเนื้อหาและการนำไปใช้ประโยชน์ อย่างน้อย 1 หน้ากระดาษ A4
3. เอกสารอื่น ๆ (โปรดระบุ).....

- ☐ กรณีที่ 4 เข้าร่วมแข่งปฏิบัติการฯ
- คนละไม่เกิน 15,000 บาท (สำหรับสายวิชาการ)
- คนละไม่เกิน 10,000 บาท (สำหรับสายสนับสนุนวิชาการ)

โดยจะจัดส่งหนังสือตอบรับการเข้าร่วมอบรมเชิงปฏิบัติการฯ และเอกสารดังต่อไปนี้

1. สำเนาใบรับรอง หรือหนังสือรับรอง หรือใบประกาศนียบัตร หรือวุฒิบัตร จากการเข้าอบรมฯ
2. รายงานสรุปเนื้อหาและการนำไปใช้ประโยชน์ อย่างน้อย 1 หน้ากระดาษ A4
3. เอกสารอื่น ๆ (โปรดระบุ).....

ในปีงบประมาณ พ.ศ.2559 (1 ต.ค.58 -30 ก.ย.59) ข้าพเจ้าได้ใช้งบพัฒนาบุคลากรฯ ไปแล้ว จำนวนทั้งสิ้น..... ครั้ง ดังต่อไปนี้

-ครั้งที่ 1.....	เลือกใช้กรณี..... 2.....	ใช้งบประมาณไปแล้วเป็นจำนวนเงินทั้งสิ้น.....	2,700 บาท
-ครั้งที่ 2.....	เลือกใช้กรณี..... 4.....	ใช้งบประมาณไปแล้วเป็นจำนวนเงินทั้งสิ้น.....	1,600 บาท
-ครั้งที่	เลือกใช้กรณี.....	ใช้งบประมาณไปแล้วเป็นจำนวนเงินทั้งสิ้น.....	บาท

(หากมีจำนวนครั้งเกินกว่านี้ ให้ทำรายละเอียดแนบท้ายเพิ่มเติม)

นางสาวกัญญา คีตบเร็ด ผู้ขออนุญาต
(นางสาวกัญญา คีตบเร็ด)

...../...../.....

(อาจารย์ ดร.บุญสิงห์ พลจันทร์)

ประธานอาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม

ประธานหลักสูตร/เลขานุการคณะ/หัวหน้างาน

หมายเหตุ : 1. งบประมาณที่ใช้สำหรับการพัฒนาบุคลากร หมายถึงค่าใช้จ่ายทุกประเภทที่ใช้ในการเข้าร่วมการอบรม/สัมมนา/ประชุม เช่น ค่าลงทะเบียน ค่าใช้จ่ายในการเดินทาง และอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง

2. การใช้งบประมาณพัฒนาบุคลากรในที่คณะวิทยาศาสตร์จัดสรร ให้ถือปฏิบัติตามเงื่อนไขที่กำหนดไว้ในแต่ละกรณี
(ฉบับปรับปรุงใหม่ตามมติที่ประชุมคณะกรรมการประจำคณะ ครั้งที่ 5/2556 เมื่อวันที่ 10 พฤษภาคม 2556)

รายงานสรุปเนื้อหาและการนำไปใช้ประโยชน์จากการเข้าอบรม สัมมนา หรือประชุมวิชาการ

ข้าพเจ้า นางสาวศรียาญจนา คล้ายเรือง ตำแหน่ง อาจารย์ สังกัด คณะวิทยาศาสตร์ ขอ
นำเสนอรายงานสรุปเนื้อหาและการนำไปใช้ประโยชน์จากการเข้าประชุม และนำเสนอผลงานวิจัย ใน
งานประชุมวิชาการวิชาการระดับชาติ “มศว วิจัย” ครั้งที่ ๙ เมื่อวันที่ ๒๘-๒๙ กรกฎาคม พ.ศ. ๒๕๕๙
ณ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ กรุงเทพมหานคร ตามหนังสือขออนุญาตเดินทางไปราชการ เลขที่
ศธ.๐๕๒๓.๔.๔.๓/๓/๓ ลงวันที่ ๖ มิถุนายน ๒๕๕๙ จึงขอนำเสนอสรุปเนื้อหาและการนำไปใช้
ประโยชน์ของ การอบรมดังต่อไปนี้

สรุปเนื้อหา

จากการเข้าร่วมประชุม และนำเสนอผลงานวิจัย ในงานประชุมวิชาการวิชาการระดับชาติ
“มศว วิจัย” ครั้งที่ ๙ ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนองค์ความรู้ในศาสตร์สาขาต่างๆ ระหว่างผู้เข้าร่วม
นำเสนอผลงานวิจัย กับผู้ทรงคุณวุฒิ ในกลุ่มสหวิทยาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ทั้งภาค
บรรยายและภาคโปสเตอร์นั้น สามารถสรุปได้ดังนี้

๑. การพัฒนาผลิตภัณฑ์ไอศกรีมเพื่อสุขภาพจากข้าวไรซ์เบอร์รี่ ผู้วิจัยได้รายงานว่าสูตรไอศกรีมที่
ผลิตจากข้าวไรซ์เบอร์รี่หุงสุก ไฟเบอร์ซอล และน้ำตาลมอลติทอล ได้รับการยอมรับจากผู้บริโภค และมี
ฤทธิ์ทางชีวภาพที่ถือว่ามียุทธประโยชน์ต่อสุขภาพ ซึ่งจะเป็นการเพิ่มมูลค่าข้าวไรซ์เบอร์รี่ และสามารถนำ
ผลงานวิจัยนี้สู่การผลิตภาคอุตสาหกรรมในอนาคต

๒. การใช้ธนาคารเงินดัดแปลงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากราเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากสาหร่ายทะเล
และฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแกรมลบบางชนิด ซึ่งในงานนี้ผู้วิจัยได้แยกและจำแนกราเอนโดไฟท์จาก
สาหร่ายทะเล *Gracillaria* spp. และ *Chaetomophia antemina* ได้เชื้อราในจีนัส *Aspergillus* และ
Penicillium ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแกรมลบได้ โดยเมื่อนำมาพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ
โดยใช้ธนาคารเงิน พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้

๓. การใช้ความหลากหลายของไลเคนเพื่อบ่งชี้คุณภาพอากาศในมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
องครักษ์ จังหวัดนครนายก เป็นงานวิจัยที่ใช้ไลเคนเป็นเครื่องมือ พบไลเคนทั้งหมด ๘ ชนิด โดยจีนัสที่
พบมากที่สุด คือ *Graphis* sp. ซึ่งบ่งบอกถึงคุณภาพไม่บริสุทธิ์ของอากาศ และชนิดที่พบน้อยที่สุดคือ
Chrysotrix sp.

การนำไปใช้ประโยชน์

๑. สามารถนำไปสอนในวิชาอื่นๆที่เกี่ยวข้อง เช่น ชว ๔๓๐ สรีรวิทยาของแบคทีเรีย

๒. สามารถนำไปใช้ในวิชา วท ๔๙๔ การเรียนรู้อิสระ ในการทำวิจัยของนักศึกษาสาขา
เทคโนโลยีชีวภาพ

.....ศรียาญจนา.....

(นางสาวศรียาญจนา คล้ายเรือง)

.....๒๐/.....ค.ค./.....๕๗.....

ความคิดเห็นของผู้บังคับบัญชาชั้นต้น (ประธานหลักสูตร/เลขานุการคณะ/หัวหน้างาน)

ร.ท.ท.บ

(อาจารย์ ดร. มุขลิบลินทร์ ผลจันทร์)

ประธานอาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม

ความคิดเห็นของคณบดีคณะวิทยาศาสตร์หรือผู้แทน

(.....)

...../...../.....

**SWURES9-082: การผลิตเอนไซม์แอล-แอสพาราจิเนสของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากข้าว
ที่เพาะเลี้ยงในระบบไบโอรีแอคเตอร์จุ่มชั่วคราว**

**PRODUCTION OF L-ASPARAGINASE BY ENDOPHYTIC BACTERIA ISOLATED FROM
RICE SEEDLING IN TEMPORARY IMMERSION BIOREACTOR**

ศรียาญญา คล้ายเรือง^{1*} นพมณี โทปบุญยานนท์¹ ปิยะนุช เนียมทรัพย์¹ ฉัตรชฎา กันทะเรียน¹
พูนพัฒน์ พูนน้อย²

Srikanjana Klayraung^{1}, Nopmanee Topoonyanon¹, Piyanuch Niamsup¹, Chadchada Kantarian¹,
Poonpat Poonnoy²*

¹สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

¹Division of Biotechnology, Faculty of Science, Maejo University.

²หลักสูตรวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้

²Food Engineering Program, Faculty of Engineering and Agro-Industry, Maejo University.

***Corresponding author, E-mail: srikanja@mju.ac.th, srikanja@yahoo.com**

บทคัดย่อ

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากข้าวที่เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในระบบไบโอรีแอคเตอร์จุ่มชั่วคราว (temporary immersion bioreactor, TIB) ได้เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์รวมทั้งสิ้น 26 ไอโซเลต เมื่อนำมาจำแนกโดยเทคนิคการหาลำดับเบสของ 16S rRNA พบว่า แบคทีเรียเอนโดไฟท์ถูกจำแนกอยู่ใน 9 จินัส ได้แก่ *Microbacterium*, *Achromobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Curtobacterium*, *Acidovax*, *Enterobacter*, *Bacillus* และ *Burkholderia* แบคทีเรียเอนโดไฟท์เหล่านี้ได้ถูกนำไปศึกษาการผลิตเอนไซม์ต้านมะเร็งคือ L-asparaginase พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ 10 ไอโซเลตที่ผลิตได้บนอาหารแข็ง Modified M9 agar ที่เติม asparaginase โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ L-asparaginase ในน้ำเลี้ยงอยู่ในช่วง 10.35-13.97 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่มีกิจกรรมสูงสุดคือ *Enterobacter oryzae* ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าเอนโดไฟท์ที่ได้จากพืชที่ขยายพันธุ์ด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์จุ่มชั่วคราวเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีศักยภาพในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมยารักษาโรคต่อไปได้

คำสำคัญ: แบคทีเรียเอนโดไฟท์ แอล-แอสพาราจิเนส ระบบไบโอรีแอคเตอร์จุ่มชั่วคราว

Abstract

A total of 26 bacterial endophytic bacterial isolates were obtained from rice seedling in temporary immersion bioreactor (TIB) system. They were identified by 16S rRNA base sequencing technique. The endophytes from sugarcane were categorized into 9 genera comprising of *Microbacterium*, *Achromobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Curtobacterium*, *Acidovax*, *Enterobacter*, *Bacillus* and *Burkholderia*. These bacteria were investigated for anticancer enzyme, L-asparaginase particularly. Total of 10 isolates produced this enzyme which ranged from 10.35 to 13.97 U/ml of supernatant. Among these, *Enterobacter oryzae* showed the highest L-asparaginase production. These results indicated that the bacterial endophytes from TIB

systems might be the effective candidate for applications in therapeutic industries.

Keywords: Endophytic bacteria, L-asparaginase, temporary immersion bioreactor

บทนำ

ระบบไบโอรีแอคเตอร์จุ่มชั่วคราว (Temporary Immersion Bioreactor; TIB) เป็นระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่กำลังได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน โดยมีระบบการทำงานคล้ายระบบถังหมัก (Fermentor) ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ มีการพัฒนามาจนเป็นถึงเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแบบขวดแผ่น ที่มีการแบ่งอุปกรณ์ออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นอาหารเหลว และส่วนที่ใส่ชิ้นส่วนพืช เชื่อมต่อกันด้วยท่อเพื่อปล่อยลมไปต้นอาหารเหลวไปเลี้ยงชิ้นส่วนพืชตามระยะเวลา ระบบนี้สามารถเพิ่มมวลของเนื้อเยื่อเจริญต่างๆ อีกทั้งยังสามารถเพิ่มปริมาณต้นพืชได้เป็นจำนวนมาก สามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้ [1] แม้ว่าระบบนี้จะมีประสิทธิภาพสูงในการทำงาน แต่เป็นระบบที่ต้องการให้อยู่ในสภาพที่ปลอดเชื้อตลอดการเพาะเลี้ยง ดังนั้นจึงไม่ต้องการให้เกิดการปนเปื้อนระหว่างการเพาะเลี้ยง โดยจากการวิจัย และรายงานที่มีมาก่อนพบว่าสาเหตุของการปนเปื้อนในงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช มาจากทั้งส่วนสิ่งแวดล้อม และจุลินทรีย์ที่เป็นเอนโดไฟท์ (endophytes) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ (Endophytic bacteria) เป็นเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในสถานะปกติอาศัยอยู่ภายในชิ้นส่วนพืช ซึ่งอาจอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ของลำต้น ใบ หรือราก โดยไม่ส่งผลกระทบต่อพืช การอยู่ร่วมกันนี้อาจเป็นการอยู่ในภาวะพึ่งพากัน หรือภาวะอิงอาศัยบางครั้งอาจพบความสัมพันธ์เฉพาะชนิด [2] ในขณะเดียวกันการอยู่ร่วมกันของเอนโดไฟท์ และพืชอาจทำให้พืชมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นได้ หรือมีความต้านทานต่อโรคเพิ่มขึ้น เนื่องจากอาจมีการสร้างผลิตภัณฑ์บางอย่างเกิดขึ้นที่ส่งผลดีกับการเจริญของพืช ซึ่งสารดังกล่าวอาจเป็น สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive Compounds) เช่น สารต้านจุลินทรีย์ สารต้านอนุมูลอิสระ เอนไซม์ หรือฮอร์โมนพืช เป็นต้น [3] รวมทั้งเอนไซม์แอล-แอสพาราจิเนส ที่มีรายงานการผลิตจากแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *Serratia marcescens* และ *Bacillus methylophilus* ที่แยกได้จากพืชสมุนไพร [4] ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้ใช้ในการรักษามะเร็งต่อมน้ำเหลืองชนิดเฉียบพลัน (Acute Lymphocytic Leukemia) ซึ่งในปัจจุบันผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *Erwinia carotovora* [5] ดังนั้นจุลินทรีย์เอนโดไฟท์ก็มีความน่าสนใจของเป็นทรัพยากรชีวภาพ จึงไม่ควรละทิ้งจุลินทรีย์เหล่านี้ให้เปล่าประโยชน์ หรือกักเก็บออกไปโดยสิ้นเชิงจากงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช อีกทั้งยังเป็นการรวบรวมเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากแหล่งใหม่เพิ่มเติมมาศึกษาความสามารถในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรม การเกษตร และการแพทย์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากต้นข้าวที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์จุ่มชั่วคราว และทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้ในการผลิตเอนไซม์แอล-แอสพาราจิเนส

วิธีดำเนินการวิจัย

ทำการเพาะเลี้ยงเมล็ดข้าวพันธุ์หอมแดงสุโขทัย 1 (*Oryza sativa* ST1) ในระบบไบโอรีแอคเตอร์จุ่มชั่วคราว โดยใช้อาหาร ½ MS [6] ที่ไม่เติมซูโครส นาน 14 วัน นำตัวอย่างต้นข้าว และอาหารเพาะเลี้ยงที่เก็บเกี่ยวต้นข้าวไปแล้ว มาแยกเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ โดยต้นข้าวแยกเชื้อโดยวิธีการของ Kumrapich et al. [7] สำหรับอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใช้วิธีการ spread plate บนอาหาร nutrient agar (NA) ที่ผสม nystatin และทำให้บริสุทธิ์โดยการ cross streak บนอาหารแข็ง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้มาจำแนกชนิดด้วยการหาลำดับเบสของ 16S rRNA โดยสังกัดเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียด้วยชุดสกัดสำเร็จรูป (Geneaid, Taiwan) จากนั้นเพิ่มชิ้นส่วน

ดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase chain reaction) ด้วยไพรเมอร์ 27F และ 1522R และนำส่งหาลำดับเบส ณ บริษัท FirstBase ประเทศมาเลเซีย และวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยโปรแกรม BLAST เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) เพื่อระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้มาทดสอบการผลิตเอนไซม์แอล-แอสพาราจิเนส เบื้องต้นโดยการปลูกเชื้อลงบนผิวหน้าอาหาร modified M9 agar [8] บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง สังเกตผลบวกโดยหากเชื้อแบคทีเรียมีการสร้างเอนไซม์แอล-แอสพาราจิเนส อาหารจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู จากนั้นนำมาตรวจกิจกรรมของเอนไซม์แอล-แอสพาราจิเนส โดยนำเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ให้ผลบวกในการทดสอบเบื้องต้นมาเพาะเลี้ยงในอาหาร modified-M9 broth นาน 72 ชั่วโมง นำมาเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที่ นาน 5 นาที นำส่วนใสมาวิเคราะห์กิจกรรมแอลพาราจิเนส โดยนำไปคำนวณปริมาณแอมโมเนียตามวิธีของ Imada et al. [9] และหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่ง 1 ยูนิต ของแอล-แอสพาราจิเนส เท่ากับ การปลดปล่อยแอมโมเนีย 1 ไมโครโมล/ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่กำหนด วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้โดยวิธี Duncan's multiple range test (n=3)

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

จากการคัดเลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากต้นข้าว และอาหารเพาะเลี้ยงในระบบไบโอรีแอคเตอร์จุ่มข้าวคั่ว ได้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ 26 ไอโซเลตเมื่อนำไปพิสูจน์ทราบชนิดของเชื้อ โดยการหาลำดับเบสของ 16S rRNA สามารถจำแนกได้อยู่ใน 9 จินัส โดยเป็นแบคทีเรียแกรมบวกอยู่ในจินัส *Bacillus*, *Curtobacterium* และ *Microbacterium* และในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบที่พบอยู่ในจินัส *Achromobacter*, *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* และ *Pantoea* ดังแสดงรายละเอียดของเชื้อที่นำไปจำแนกสายพันธุ์ในตารางที่ 1

ในการสืบค้นข้อมูลเพื่อเปรียบเทียบแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่พบในข้าวที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบ TIB นี้กับรายงานการวิจัยที่มีมาก่อนหน้านี้ พบว่าเชื้อแบคทีเรียเกือบทุกสปีชีส์ที่จำแนกได้ มีรายงานการเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในข้าวมาเกือบทั้งหมด โดย *Achromobacter xylosoxidans* ถูกรายงานการเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในงานวิจัยของ Jha and Kumar (2009) [10] ในขณะที่ Mano et al. (2006) [11] ได้รายงานการเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟต์ในข้าวของเชื้อแบคทีเรียในจินัส *Acidovorax* *Curtobacterium* และ *Pantoea* สำหรับ *Burkholderia* *Curtobacterium* *Enterobacter* และ *Klebsiella* ได้มีรายงานการวิจัยในการเป็นแบคทีเรียเอนโดไฟต์มาก่อนหน้าแล้วเช่นกัน [10, 12-15] ส่วนในกรณีของ *Bacillus amyloliquefaciens* อาจสรุปได้ว่าแหล่งที่มาของเชื้อแบคทีเรียนี้มีการปนเปื้อนเข้าสู่ต้นข้าวมาจากสิ่งแวดล้อมระหว่างการนำเมล็ดข้าวเข้าสู่การเพาะเลี้ยงด้วยระบบ TIB รวมทั้งจากการสืบค้นรายงานการวิจัยแม้จะมีรายงานการเป็นเอนโดไฟต์ในข้าวของเชื้อแบคทีเรียในจินัสนี้ แต่เป็นในสปีชีส์อื่นๆ เช่น *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. licheniformis* และ *B. cereus* เป็นต้น [10]

ตารางที่ 1 ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่แยกได้จากข้าวที่เพาะเลี้ยงในระบบ TIB

ไอโซเลท	ชื่อแบคทีเรีย	Accession Number	% Homology
RT1.2A	<i>Microbacterium laevaniformans</i> RT1.2A	FJ200403	100
RT1.2C	<i>Enterobacter asburiae</i> RT1.2C	CP011591	100
RT1.2C01	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> RT1.2C01	JF330167	100
RT3.1A	<i>Klebsiella pneumoniae</i> RT3.1A	JN644536	100
RT3.1B	<i>Microbacterium laevaniformans</i> RT3.1B	JQ229794	100
RT3.1C	<i>Pantoea dispersa</i> RT3.1C	JN391535	99
RT4	<i>Pantoea stewartii</i> RT4	EF602554	99
RT5	<i>Curtobacterium</i> sp. (HPABA05) RT5	HQ257215	100
RT6	<i>Acidovorax oryzae</i> RT6	HM240858	100
RT8	<i>Enterobacter</i> sp. (IICDBZ5) RT8	JN836922	100
RT9	<i>Enterobacter asburiae</i> RT9	CP012162	99
RT11	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> RT11	AB681488	100
RT12	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> RT12	AB681488	100
RT13	<i>Microbacterium testaceum</i> RT13	HgM355620	100
RT14A	<i>Klebsiella pneumoniae</i> RT14A	AB680615	99
RT14B	<i>Pantoea stewartii</i> RT14B	EF602554	99
RT16	<i>Enterobacter asburiae</i> RT16	HQ407265	100
RT17	<i>Burkholderia gladioli</i> RT17	JQ280393	100
RT18	<i>Burkholderia gladioli</i> RT18	HQ849083	100
RT20	<i>Pantoea dispersa</i> RT20	JN391535	99
RT22	<i>Pantoea stewartii</i> RT22	JN175332	99
RT23	<i>Burkholderia glumae</i> RT23	HQ849085	99
Rice TIB1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Rice TIB1	KJ946379	100
Rice TIB2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Rice TIB2	KP721470	100
Rice TIB3	<i>Enterobacter oryzae</i> Rice TIB3	JF513179.1	99
Rice TIB4	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Rice TIB4	EU661377.1	99

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ทั้งหมดที่แยกได้มาตรวจสอบการผลิตเอนไซม์แอล-แอสพาราจิเนส บนอาหาร modified M9 agar พบว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์มีเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์จำนวน 10 ไอโซเลทที่ให้ผลบวกในการทดสอบคือเปลี่ยนสีอาหารจากสีเหลืองเป็นสีชมพู จึงนำเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดมาตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอล-แอสพาราจิเนส ในอาหารเหลว modified M9 broth พบว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟต์ที่ทดสอบสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 10.35-13.97 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 2) โดยไอโซเลทที่ผลิตได้สูงที่สุดคือ *Enterobacter oryzae*

จากผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์แอล-แอสพาราจิเนส พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตได้อยู่ในจีนัส *Bacillus*,

Enterobacter และ *Klebsiella* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน สร้างสปอร์ และแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างท่อน จากงานวิจัยของ Nongkhlaw and Joshi (2015) [4] ได้รายงานการผลิตเอนไซม์แอล-แอสพาราจิเนส ของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่แยกได้จากพืชสมุนไพรไว้ว่าเชื้อแบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* ที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้สูงคือ *B. methylophilicus* โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.84 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในอาหาร Modified Czapek Dox's medium ในขณะที่ในการวิจัยในครั้งนี้ ส่วน *B. amyloliquefaciens* RT16 ผลิตได้สูงถึง 13.61 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 2) ซึ่งสูงกว่าเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่เคยรายงานไว้มากกว่า 10 เท่า สำหรับแบคทีเรียแกรมลบที่ผลิตได้สูงที่สุดในการทดลองนี้คือ *Enterobacter oryzae* RiceTIB3 ซึ่งผลิตได้สูงถึง 13.97 ยูนิตต่อมิลลิลิตรนั้น ได้มีผู้รายงานถึงการผลิตเอนไซม์แอล-แอสพาราจิเนส ในสปีชีส์ของ *E. aerogenes* ที่ผลิตได้สูงในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีการพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology) สามารถผลิตได้สูงถึง 19.13 ยูนิตต่อมิลลิลิตร [16] ดังนั้นในการผลิตเอนไซม์นี้ของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ *Enterobacter oryzae* อาจทำให้ผลิตได้สูงกว่านี้โดยการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต และปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์นี้ต่อไป

ตารางที่ 2 กิจกรรมของเอนไซม์แอล-แอสพาราจิเนส ที่ผลิตโดยแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากข้าว

เชื้อแบคทีเรีย	กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> RT11	10.35 ± 2.02 ^d
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> RT12	11.70 ± 3.11 ^{bc}
<i>Klebsiella pneumoniae</i> RiceTIB4	11.73 ± 0.44 ^{bc}
<i>Klebsiella pneumoniae</i> RT3.1A	11.86 ± 1.59 ^{bc}
<i>Klebsiella pneumoniae</i> RiceTIB2	13.42 ± 0.66 ^{ab}
<i>Klebsiella pneumoniae</i> RiceTIB1	13.44 ± 0.78 ^{ab}
<i>Enterobacter asburiae</i> RT9	13.49 ± 0.12 ^{ab}
<i>Enterobacter asburiae</i> RT1.2C	13.58 ± 1.83 ^a
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> RT16	13.61 ± 0.26 ^a
<i>Enterobacter oryzae</i> RiceTIB3	13.97 ± 0.85 ^a

หมายเหตุ: อักษรที่ต่างกันแสดงถึงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05) เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี Duncan's multiple range test

สรุป

โดยสรุปในการวิจัยมีสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์แอล-แอสพาราจิเนส ได้ 10 สายพันธุ์ เชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์ที่ผลิตได้สูงสุดคือ *Enterobacter oryzae* จากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากพืชที่เพาะเลี้ยงด้วยระบบนี้ ว่ามีโอกาสที่จะเป็นแหล่งผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีประโยชน์ทางการแพทย์ อุตสาหกรรม และการเกษตรต่อไป โดยในงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ ที่สนับสนุนทุนวิจัย (มจ.1-57-004) และ ผศ.ดร.สุรยา พิมพ์พิไล ที่อนุเคราะห์เมล็ดพันธุ์ข้าวในการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- [1] Etienne H., Berthouly, M. (2002, June). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 69: 215-31.
- [2] Bacon C.W., White, J.F. (2000). *Microbial Endophytes*. New York: Marcel Dekker.
- [3] Strobel, G.A. (2003, May). Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*. 5(6): 535-44.
- [4] Nongkhilaw, F.M.W., Joshi, S.R. (2015, January). L-asparaginase and antioxidant activity of endophytic bacteria associated with ethnomedicinal plants. *Indian Journal of Biotechnology*. 14: 59-64.
- [5] Pasut, G., Sergi, M., Veronese, F.M. (2008, January). Anti-cancer PEG-enzyme: 30 years old, but still a current approach. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60(1): 69-78.
- [6] Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*. 5: 473-479.
- [7] Kumrapich, B., Klayraung, S., Wongkattiya, N., Topoonyanont, N., Niamsup, P. (2011). Diversity of bacteria isolated from leaves and stems of sugarcane (*Saccharum* sp. var. LK92-11). pp. 1-6. Proceeding of the 37th Congress on Science and Technology of Thailand (STT37); 2011 Oct 10-12; Bangkok, Thailand. SCISOC; 2011.
- [8] Gulati, R., Saxena, R.K., Gupta, R.A. (1997, January). A rapid plate assay for screening L-asparaginase producing microorganism. *Letters in Applied Microbiology*. 24(1): 23-26.
- [9] Imada, A., Igarasi, S., Nakahama, K., Isono, M. (1973, May). Asparaginase and glutaminase activities of microorganisms. *Journal of General Microbiology*. 76(1): 85-9.
- [10] Jha, P., Kuma, A. (2009, July). Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from wheat plant. *Microbial Ecology*. 58(1): 179-88.
- [11] Mano, H., Tanaka, F., Watanabe, A., Kaga, H., Okunishi, S., Morisaki, H. (2006, July) Culturable surface and endophytic bacterial flora of the maturing seeds of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. *Microbes and Environments*. 21(2): 81-100.
- [12] Cottyn, B., Regalado, E., Lanoor, B., De Cleene, M., Mew, T.W., Swings, J. (2001, March). Bacterial populations associated with rice seed in the tropical environment. *Phytopathology*. 9(3): 282-92.
- [13] Elbeltagy, A., Nishioka, K., Sato, T., Suzuki, H., Ye, B., Hamada, T. (2001, November). Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(11): 5285-93.
- [14] Peng, G., Zhang, W., Luo, H., Xie, H., Lai, W., Tan, Z. (2009, July). *Enterobacter oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the wild rice species *Oryza latifolia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59(pt7): 1650-55.
- [15] Ji, S.H., Gururani, M.A., Chun, S.C. (2014, January). Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiological Research*. 169(1): 83-98.

- [16] Baskar, G., Kumar, M.D., Prabu, A.A., Renganathan, S., Yoo, C. (2009, September). Optimization of carbon and nitrogen sources for L-asparaginase production by *Enterobacter aerogenes* using response surface methodology. *Chemical & Biochemical Engineering Quarterly*. 23(3): 393-97.



บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ โทร.๓๘๗๐-๒
ที่ ศธ ๐๕๒๓.๔.๔.๓/ ๗๗) วันที่ ๖ มิถุนายน ๒๕๕๔

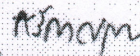
เรื่อง ขออนุญาตเข้าร่วมประชุมวิชาการระดับชาติ “มศว วิจัย” ครั้งที่ ๙ และเสนอผลงานวิจัย

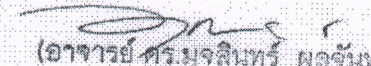
เรียน คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

ตามหนังสือที่ ศธ ๐๕๑๔.๓๘/๒๒๑ ลงวันที่ ๑๔ มกราคม ๒๕๕๔ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
กำหนดจัดงานประชุมวิชาการระดับชาติ “มศว วิจัย” ครั้งที่ ๙ ในระหว่างวันที่ ๒๘ - ๒๙ กรกฎาคม ๒๕๕๔
ณ อาคารนวัตกรรม ศาสตราจารย์ ดร.สาโรช บัวศรี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร กรุงเทพมหานคร

ในการนี้ ข้าพเจ้าจึงขออนุญาตเข้าร่วมประชุมวิชาการระดับชาติ “มศว วิจัย” ครั้งที่ ๙ และเสนอ
ผลงานวิจัยในรูปแบบโปสเตอร์ หัวข้อเรื่อง “การผลิตเอนไซม์แอล-แอสพาราจিনเนสของเชื้อแบคทีเรียเอนโดไฟท์จากข้าวที่
เพาะเลี้ยงในระบบไบโอรีแอคเตอร์จมชั่วคราว” ตามวัน เวลา และสถานที่ดังกล่าว

จึงเรียนมาเพื่อโปรดพิจารณาอนุญาต


(นางสาวศรีกาญจนา คล้ายเรือง)
ตำแหน่ง อาจารย์


(อาจารย์ ดร.มุขสินทร์ พงษ์ทอง)
ประธานอาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม