การทดสอบกิจกรรมเชิงคุณภาพเบื้องต้นของเอนไซม์เซลลูเลสและไคติเนสที่ผลิตจากเชื้อรา *Rhizopus* spp.

Preliminary Qualitative Test on Cellulase and Chitinase–Producing *Rhizopus* spp.

ชุลีภรณ์ จันทร์น้อย[1] อรอุมา เพียซ้าย[1*] และ นัฐวุฒิ บุญยืน[2]
Chuleeporn Jannoi[1] Onuma Piasai[1*] and Nattawut Boonyuen[2]

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900
[2] ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ไบโอเทค) 113 อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย ถนนพหลโยธิน คลองหนึ่ง คลองหลวง ปทุมธานี 12120
[1] Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900
[2] National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) 113 Thailand Science Park Phahonyothin Road, KhlongNueng, Khlong Luang Pathum Thani 12120
รับเรื่อง: มีนาคม 2560 Received: March 2017
รับตีพิมพ์: สิงหาคม 2560 Accepted: August 2017
[*] Corresponding author: agromj@ku.ac.th

ABSTRACT: The genus *Rhizopus* represents a group of cosmopolitan fungi with a wide geographic distribution, being commonly associated with plant hosts, specialized as parasites on animals, and mostly regarded to be saprophyte growing on various substrates. The goal of the present study was to isolate *Rhizopus* species using direct isolation and soil plate methods and identify all *Rhizopus* species obtained using morphological characters. Additionally, cellulolytic and chitinolytic enzymes from selected fungal isolates were preliminarily tested by measurement of clear zone around each colony. Based on extensive collections from soil and plant samples in various locations in Thailand between in September 2014 to August 2015, the results revealed that 24 representative isolates of the *Rhizopus* spp., including *R. oligosporus*, *R. oryzae* and *R. stolonifer* were morphologically identified. Of these, *R. oligosporus* (KUFC10227, 10228, 10234, 10236 and 10244), *R. oryza* (KUFC10232 and 10235) and *R. stolonifer* (KUFC10230) were selected and screened for qualitatively enzymatic evaluation on the agar plates. The most commonly found species was *R. stolonifer*. Based on their clear zone formations around the colonies, two candidates of *R. stolonifer* (KUFC10227 and KUFC10244) are reported to be the promising isolates as cellulase producers, while *R. stolonifer* KUFC10234 is regarded as a chitinase-producing potent strain.

Keywords: *Rhizopus*, fungi, enzyme, cellulase, chitinase

Agricultural Sci. J. (2017) Vol. 48(3): 376–388 ว. วิทย. กษ. (2560) 48(3): 376–388

บทคัดย่อ

เชื้อราในสกุล *Rhizopus* จัดเป็นกลุ่มราที่พบกระจายได้ทั่วไป โดยอยู่ร่วมกับพืชอาศัย บางชนิดเป็นปรสิตในสัตว์ และส่วนใหญ่พบเป็นผู้ย่อยสลายโดยเจริญอยู่บนวัสดุชนิดต่างๆ การศึกษานี้มีเป้าหมายเพื่อแยกเชื้อรา *Rhizopus* โดยวิธีการแยกจากพืชโดยตรงและวิธี soil plate รวมทั้งจัดจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทดสอบกิจกรรมเบื้องต้นในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไคติเนสโดยการวัดขนาดบริเวณใสของอาหารวุ้นรอบโคโลนี จากการเก็บตัวอย่างดินและพืชจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทยระหว่างเดือนกันยายน 2557 ถึง สิงหาคม 2558 สามารถแยกเชื้อรา *Rhizopus* spp. ได้จำนวน 24 ไอโซเลท จัดจำแนกเป็น *R. oligosporus, R. oryza* และ *R. stolonifer* จากนั้นคัดเลือกเชื้อรา *R. oligosporus* (KUFC10227, 10228, 10234 10236 และ 10244) *R. oryzae* (KUFC 10232 และ 10235) และ *R. stolonifer* (KUFC10230) เพื่อนำไปทดสอบกิจกรรมเชิงคุณภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไคติเนสบนอาหารวุ้น โดยเชื้อราชนิดที่พบบ่อยมากที่สุด คือ *R. stolonifer* ผลการวัดบริเวณใสของอาหารวุ้นรอบโคโลนีแสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *R. stolonifer* จำนวน 2 ไอโซเลท ได้แก่ KUFC10227 และ KUFC10244 มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเชื้อรา *R. stolonifer* KUFC10234 มีประสิทธิภาพในการผลิตเอมไซม์ไคติเนส

คำสำคัญ: *Rhizopus*, เชื้อรา, เอนไซม์, เซลลูเลส, ไคติเนส

บทนำ

เชื้อรา *Rhizopus* เดิมจัดอยู่ในอาณาจักร Eumycota ไฟลัม Zygomycota (Webster and Weber, 2007; Kirk *et al*., 2008) ในปัจจุบัน Spatafora *et al*. (2016) ได้รายงานการจัดหมวดหมู่เชื้อรา *Rhizopus* ใหม่โดยใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมและจีโนม และได้จัดเชื้อรา *Rhizopus* ไว้ในซับดิวิชั่น Mucoromycotina ลักษณะสำคัญของเชื้อราสกุลนี้มีการเจริญอย่างรวดเร็วโดยเฉพาะเมื่อเจริญอยู่บนอาหารที่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ สามารถสร้างเส้นใยแบบไม่มีผนังกั้น (coenocytic hypha) การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์ เรียกว่า สปอร์แรงจิโอสปอร์ (sporangiospore) เกิดรวมกันอยู่ในถุงสปอร์แรงเจียม (sporangium) รูปร่างค่อนข้างกลม อยู่ที่ปลายด้านบนของก้านชูสปอร์ เรียกว่า สปอร์แรงจิโอฟอร์ (sporangiophore) โครงสร้างที่ทำหน้าที่ยึดเกาะกับเนื้อเยื่อพืชหรือแหล่งอาหารเรียกว่า ไรซอยด์ (rhizoid) ในระยะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อรา *Rhizopus* พบการสร้างสปอร์สีน้ำตาลเข้ม ผนังหนา และพบการสร้างหนามยื่นออกมาโดยรอบ เรียกว่า ไซโกสปอร์ (zygospore) ซึ่งเกิดจากการผสมกันระหว่างโครงสร้างสืบพันธุ์แกมีทาเจียม (gametagium) ที่มี mating type ต่างกัน (Webster and Weber, 2007; Zheng *et al*., 2007)

ในปัจจุบันเชื้อรา *Rhizopus* หลายชนิดมีการนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรมที่หลากหลาย ยกตัวอย่างเช่น เชื้อรา *R. oryzae* และ *R. microsporus* ใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตแอลกอฮอล์ และหมักลูกแป้ง (Webster and Weber, 2007) เชื้อรา *R. oryzae* ใช้ในการหมักเศษเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมให้เป็นอาหารสัตว์ (Jin *et al*., 2016) เชื้อรา *R. stolonifer* นำมาใช้ในกระบวนการผลิตกรดฟูมาริก (fumaric acid) ในขณะที่เชื้อรา *R. nodosus, R. oryzae, R. sinensis* และ *R. stolonifer* ถูกนำมาใช้เป็นส่วนหนึ่งในกระบวนการผลิตกรดแลกติก (lactic acid) (Mudaliyar and Kulkarni, 2012; Saito *et al*., 2012) นอกจากนี้ มีรายงานพบว่าเชื้อรา *R. oryzae* สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) ไซเลนเนส (xylanase) อะไมเลส (amylase) ไลเปส (lipase) สารตัวเร่งปฏิกิริยาใน

กระบวนการผลิตไบโอดีเซลและ*อุตสาหกรรม*พลังงานรวมทั้งเคมีชีวภาพ (bio–refineries) ได้เช่นกัน (Yu *et al*., 2013; Kupski *et al.,* 2015; Choi *et al*., 2016; Karmee *et al.,* 2016; Mukhtar *et al.,* 2016; Pandey *et al.,* 2016) ส่วนเชื้อรา *R. oligosporus* *R. oryzae* และ *R. microsporus* นั้นมีรายงานพบการสร้างเอนไซม์ไคติเนส (Yanai *et al*., 1992; Calcagno *et al*., 1997; Takaya *et al*., 1998; Nguyen *et al*., 2008; Chen *et al*., 2013) และเชื้อรา *R. nigricans* แสดงประสิทธิภาพในการสร้างสารออกฤทธิ์ต้านเนื้องอก (Cao *et al.,* 2016) แต่อย่างไรก็ตาม เชื้อรา *Rhizopus* บางชนิด เช่น *R. arrhizus, R. microsporus* และ *R. rhizopodiformis* สามารถก่อให้เกิดโรคในมนุษย์และสัตว์ได้ โดยสามารถเข้าไปทำอันตรายต่ออวัยวะภายในบริเวณสมอง ปอด ลำไส้ และผิวหนังก่อให้เกิดโรคมิวคอร์ไมโคซิส (mucormycosis) โดยอาการอาจแสดงออกเพียงเล็กน้อยที่ผิวหนังไปจนถึงเสียชีวิตได้ (de Hoog *et al*., 2000; Webster and Weber, 2007; Riley *et al*., 2016)

จากความสำคัญข้างต้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกและจัดจำแนกชนิดเชื้อรา *Rhizopus* spp. รวบรวมและเก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อรา *Rhizopus* spp. บริสุทธิ์ ตลอดจนทำการทดสอบกิจกรรมเชิงคุณภาพเบื้องต้นในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไคติเนส เพื่อคัดกรองสายพันธุ์เชื้อรา *Rhizopus* spp. ที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์ที่เป็นประโยชน์ นับเป็นการอนุรักษ์และใช้ประโยชน์จากเชื้อราซึ่งจัดเป็นทรัพยากรจุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่งที่มีคุณค่าของประเทศให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อรา *Rhizopus* spp. จากตัวอย่าง อาหาร ดินและพืชที่เป็นโรค

สำรวจและสุ่มเก็บตัวอย่างดินที่ระดับความลึก 2 เซนติเมตรจากผิวดิน ในพื้นที่ทำการเกษตรจังหวัดลพบุรี กำแพงเพชร นครสวรรค์ และเพชรบุรี จังหวัดละ 5 ตัวอย่าง ๆ ละ 3 กรัม บรรจุลงในถุงพลาสติก และสุ่มเก็บตัวอย่างพืชที่เป็นโรค ได้แก่ มันสำปะหลัง มะยม ลูกหว้า และตัวอย่างแป้งข้าวหมาก ชนิดละ 1 ตัวอย่างจากกรุงเทพมหานคร ในระหว่างเดือนกันยายน 2557 ถึงสิงหาคม 2558 (Table 1) จากนั้นนำมาแยกเชื้อรา *Rhizopus* spp. ในห้องปฏิบัติการเชื้อรา ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การแยกเชื้อราจากตัวอย่างพืช ทำโดยวางชิ้นส่วนพืชบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปส่องดูโครงสร้างของเชื้อราใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope (ยี่ห้อ Olympus รุ่น SZ–PT ประเทศญี่ปุ่น) เมื่อเส้นใยเจริญฟูขึ้นมาจากเนื้อเยื่อพืช ใช้เข็มเขี่ยลนไฟฆ่าเชื้อ เขี่ยเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา ย้ายไปเลี้ยงบนอาหาร potato dextrose agar (PDA; บริษัท Santa Maria, California ประเทศสหรัฐอเมริกา) เพื่อเก็บรักษาเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ (Manoch *et al*., 1996) และใช้ในการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาต่อไป

การแยกเชื้อราจากตัวอย่างอาหารและดิน ใช้วิธี soil plate ทำโดยชั่งตัวอย่างอาหารและดินน้ำหนักประมาณ 0.0005–0.015 กรัม ใส่ในจานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อ เกลี่ยดินให้กระจายทั่วจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นจึงเทอาหาร Gochenaur's glucose–ammonium nitrate agar (GAN; บริษัท HiMedia ประเทศอินเดีย) ที่มีส่วนผสมของ Rose Bengal ปริมาณ 0.03 กรัม และ streptomycin ที่ความเข้มข้น 30 ppm ที่อุณหภูมิ 40–45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ หมุนเบา ๆ เพื่อให้ดินกระจายผสมกับอาหารทั่วจาน บ่มเชื้อราในที่มืดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2–3 วัน เมื่อพบโคโลนีของเชื้อราที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างดินเจริญบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว จึงใช้เข็มเขี่ยลนไฟฆ่าเชื้อ

ตัดปลายเส้นใยของเชื้อราย้ายไปเลี้ยงบนอาหาร PDA เพื่อเก็บรักษาเป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์ (Warcup, 1950) และใช้ในการจำแนกทางสัณฐานวิทยาต่อไป

2. การจำแนกชนิด และเก็บรักษาสายพันธุ์บริสุทธิ์

นำเชื้อรา *Rhizopus* spp. ที่แยกได้มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7–14 วัน บันทึกลักษณะโคโลนี ได้แก่ สี และอัตราการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ่ายภาพโคโลนีเมื่ออายุ 7 วัน ศึกษาลักษณะของโครงสร้างในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และไม่อาศัยเพศ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ stereo microscope (ยี่ห้อ Olympus รุ่น SZ–PT ประเทศญี่ปุ่น) และกล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope (ยี่ห้อ Carl Zeiss รุ่น Scope. A1–AXIO ประเทศเยอรมัน) ถ่ายภาพโครงสร้างของเชื้อราโดยใช้โปรแกรม EOS Utility และวัดขนาดสปอร์โดยใช้โปรแกรม Axio Vision รวบรวมข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อนำมาประกอบการจัดจำแนกโดยเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีผู้ศึกษาก่อนหน้านี้ (Domsch *et al*., 1993; Samson *et al.,* 2002; Watanabe, 2002; Heitman *et al*., 2007; Webster and Weber, 2007; Jennessen *et al*., 2008; Watanabe, 2010; Petersen, 2012)

เก็บรักษาเชื้อรา *Rhizopus* spp. สายพันธุ์บริสุทธิ์ (pure culture) ได้แก่ เก็บบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ภายใต้พาราฟินเหลว (Manoch *et al*., 1996) เก็บในดิน (Smith and Onions, 1994) และเก็บบนกระดาษกรอง (Fong *et al*., 2000) กำหนดรหัสหมายเลขไอโซเลท ตามหลังอักษร KUFC ซึ่งย่อมาจาก Kasetsart University Fungal Collection จากนั้นนำเชื้อรา *Rhizopus* spp. ที่เก็บด้วยวิธีการต่าง ๆ มาเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และไคติเนสของเชื้อรา *Rhizopus* spp. โดยวิธี Agar plate screening

คัดเลือกเชื้อราที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยวิธี dual culture สูงสุด (ข้อมูลไม่แสดง) รวมจำนวนทั้งสิ้น 8 ไอโซเลท ได้แก่ KUFC10227, 10228, 10234, 10236, 10244, 10232, 10235 และ 10230 นำมาทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไคติเนส โดยการเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus* spp. ดังกล่าวจำนวน 8 ไอโซเลท บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นใช้แท่งอลูมิเนียม (cork borer) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเจาะชิ้นวุ้นบริเวณปลายเส้นใยของเชื้อรา *Rhizopus* spp. จำนวน 4 ชิ้น ย้ายใส่ในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ที่บรรจุอาหารเหลว minimal medium (MM; Fernandes *et al.,* 2012) ซึ่งมีส่วนผสมของ carboxyl methylcellulose (CMC) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อใช้สำหรับทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และย้ายชิ้นวุ้นจำนวน 4 ชิ้น ใส่ใน Erlenmeyer flask ที่มีอาหารเหลว MM ที่มีส่วนผสมของ colloidal chitin (บริษัท HiMedia ประเทศอินเดีย) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อใช้สำหรับทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส จากนั้นนำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าสาร (rotary shaker) ที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 5 วัน นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ที่นึ่งฆ่าเชื้อ แยกส่วนใสที่กรองได้ (supernatant) เพื่อนำมาทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร CMC (Pointing, 1999) และทดสอบการผลิตเอนไซม์ไคติเนสบนอาหาร chitin agar (CA) (Agrawal and Kotasthane, 2012) ตามลำดับ

การทดสอบประสิทธิภาพเบื้องต้นในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไคติเนสของเชื้อรา *Rhizopus* spp. โดยวิธี agar plate screening ทำโดยใช้แท่งอลูมิเนียมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะลงกลางอาหาร CMC จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนใสที่กรองได้ของเชื้อรา *Rhizopus* spp. แต่ละไอโซเลท ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงในช่องว่างที่เจาะไว้

บ่มเชื้อราที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 และ 3 วัน ตรวจสอบประสิทธิภาพของเชื้อราในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมผิวหน้าอาหาร CMC เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นล้างออกด้วยน้ำนึ่งฆ่าเชื้อ สังเกต บันทึก และถ่ายภาพผลการเกิดบริเวณใส (clear zone) โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสหน่วยเป็นมิลลิเมตร ส่วนการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส ทำโดยสังเกต ถ่ายภาพ และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่อาหารเปลี่ยนเป็นสีม่วง โดยมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร เปรียบเทียบผลกับชุดควบคุม (negative control) ซึ่งเตรียมโดยใช้แท่งอลูมิเนียมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะลงกลางอาหารวุ้น โดยไม่หยดส่วนใสใด ๆ ลงไป นำข้อมูลค่าที่วัดได้มีหน่วยเป็นมิลลิเมตรมาคำนวณและวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One–Way Anova) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (Surawut *et al*., 2010)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกและการจัดจำแนกชนิดเชื้อรา *Rhizopus* spp.

จากการแยกเชื้อรา *Rhizopus* spp. จากตัวอย่างอาหาร ดิน และพืช สามารถแยกเชื้อราดังกล่าวได้จำนวน 24 ไอโซเลท (Table 1) จัดจำแนกชนิดโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลักษณะรูปร่างและขนาดของโครงสร้างของเชื้อรา *Rhizopus* ในระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สามารถจำแนกชนิดเชื้อรา *Rhizopus* ได้เป็น 3 ชนิด (species) คือ *R. stolonifer*, *R. oryzae* และ *R. oligosporus* โดยแยกเชื้อรา *R. stolonifer* ได้ 11 ไอโซเลท (45.83%) เชื้อราชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยพบการสร้างสปอร์แรงจิโอฟอร์ตั้งตรง ผิวเรียบ สีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม สปอร์แรงเจียมรูปร่างค่อนข้างกลม สีดำอมน้ำตาล ขนาด 75.5 – 76 x 72.5 – 73 ไมโครเมตร สปอร์แรงจิโอสปอร์รูปร่างเกือบกลม หัวท้ายรี (ellipsoid) ขนาด 5.3 – 5.5 x 3.7 – 4 ไมโครเมตร ผิวสปอร์พบรอยขีดตามยาว ไซโกสปอร์สีน้ำตาลเข้ม ผนังมีหนาม ขนาด 51.06 – 60.17 ไมโครเมตร ส่วนเชื้อรา *R. oryzae* สามารถแยกได้ 8 ไอโซเลท (33.33%) ซึ่งเชื้อราชนิดนี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายกับเชื้อรา *R. stolonifer* แต่มีขนาดของสปอร์แรงเจียม สปอร์แรงจิโอสปอร์ และไซโกสปอร์ใหญ่กว่า *R. stolonifer* เล็กน้อย โดยสปอร์แรงเจียม ขนาด 84 – 85 x 82 – 83 ไมโครเมตร สปอร์แรงจิโอสปอร์ ขนาด 5.5 – 6.5 x 3.8 – 4 ไมโครเมตร และไซโกสปอร์สีน้ำตาลเข้ม ผนังมีหนาม ขนาด 63.2 7– 70 ไมโครเมตร นอกจากนี้ยังสามารถแยกเชื้อรา *R. oligosporus* ได้จำนวน 5 ไอโซเลท (20.84%) โดยเชื้อรา *R. oligosporus* จะสร้างสปอร์แรงเจียมที่มีขนาดเล็กกว่าเชื้อรา *R. stolonifer* และ *R. oryzae* และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสปอร์แรงเจียมมีสีดำเข้ม ผนังเรียบ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 51 – 52 x 49 – 50 ไมโครเมตร ในขณะที่ สปอร์แรงจิโอสปอร์ รูปไข่ หรือรูปรี สีน้ำตาล ขนาด 6.5 – 7 x 4.7 – 5.5 ไมโครเมตร และไม่พบการสร้างไซโกสปอร์ (Figure 1)

เมื่อพิจารณาจากแหล่งที่พบ สามารถแยกเชื้อรา *Rhizopus* spp. ได้จากตัวอย่างดินมากกว่าตัวอย่างพืชและอาหาร เชื้อราที่พบในดินมากที่สุด ได้แก่ *R. stolonifer* โดยพบจำนวน 10 ไอโซเลท และ *R. oryzae* พบจำนวน 5 ไอโซเลท ในขณะที่เชื้อรา *R. oligosporus* แยกได้จากดินจำนวน 3 ไอโซเลท ส่วนเชื้อราที่พบในพืชมากที่สุดคือ เชื้อรา *R. oryzae* พบจำนวน 3 ไอโซเลท รองลงมาคือ เชื้อรา *R. stolonifer* พบจำนวน 1 ไอโซเลท และในตัวอย่างอาหารพบเชื้อรา *R. oligosporus* จำนวน 2 ไอโซเลท (Table 1)

อย่างไรก็ตามเชื้อรา *Rhizopus* spp. สามารถพบแพร่กระจายได้ทั่วไปในดิน น้ำ พืช มูลสัตว์

รวมถึงปนเปื้อนในอากาศและข้าวของเครื่องใช้ต่าง ๆ (Domsch *et al*., 1993; Samson *et al.,* 2002) ในประเทศไทยมีรายงานพบเชื้อรา *R. stolonifer* จากตัวอย่างดินและพืชหลายชนิด เช่น ข้าว ข้าวโพด และหญ้าชนิดต่าง ๆ (Manoch *et al*., 2001) ส่วน Jeamjitt *el at*. (2007) ได้รายงานพบเชื้อรา *R. oryzae* และ *R. stolonifer* ในมูลสัตว์เคี้ยวเอื้องและสัตว์ฟันแทะ ได้แก่ เก้ง กระบือ อูฐ วัว ละมั่ง ช้าง แพะ แกะ กระต่ายและหนู นอกจากนี้ยังมีรายงานพบเชื้อรา *R. rhizipodiformis* ซึ่งเป็นราทนร้อนจากดินและเศษซากพืชที่เหลือจากวัสดุการเกษตร (Dethoup and Manoch, 2010)

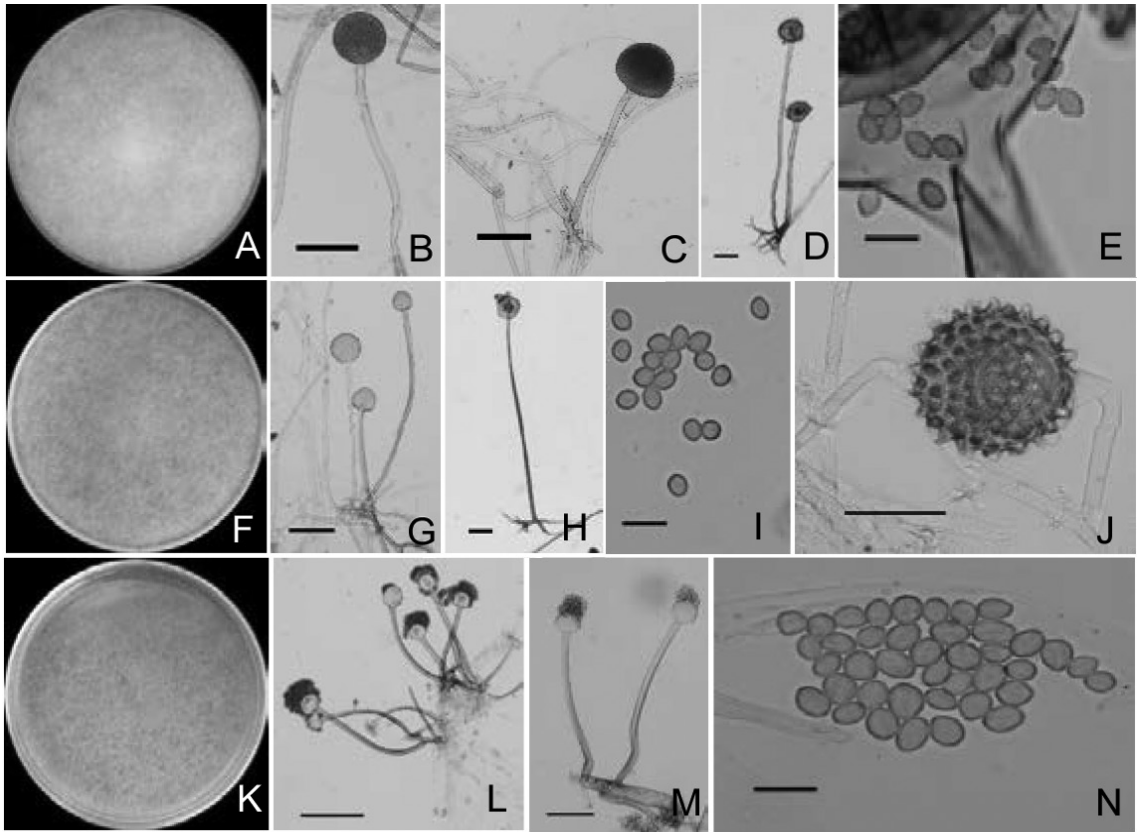


Figure 1 Morphological characteristic of *Rhizopus* spp.: *R. stolonifer* KUFC10233 (A–E), *R. oryzae* KUFC10241 (F–J) and *R. oligosporus* KUFC10245 (K–N) (Bars: L = 200 µm; B, C, D, G, H = 100 µm; J, M =50 µm; E, I, N = 10 µm)

Table 1 Strains of *Rhizopus*, isolated from soil, plants and food from various sources

Source	Fungal species	KUFC	Location
Soil	*R. stolonifer*	10227, 10228, 10229, 10231	Lop Buri
	R. stolonifer	10233, 10234, 10239	Nakhon Sawan
	R. stolonifer	10236, 10237	Kamphaeng Phet
	R. stolonifer	10244	Phetchaburi
	R. oligosporus	10230, 10249	Lop Buri
	R. oligosporus	10235	Nakhon Sawan
	R. oryzae	10232, 10247, 10248, 10250	Lop Buri
	R. oryzae	10238	Nakhon Sawan
Plant	*R. stolonifer*	10242	Bangkok
	R. oryzae	10240, 10241, 10243	Bangkok
Food	*R. oligosporus*	10245, 10246	Bangkok

2. การทดสอบประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไคติเนส

ผลการทดลองพบว่าเชื้อรา *Rhizopus* spp. จำนวน 8 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส หลังจากบ่มเชื้อราที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลาที่ 1 วัน และพบว่ามีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้นเมื่อบ่มเชื้อราที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ต่อเนื่องเป็นเวลา 3 วัน โดยเชื้อรา *R. oryzae* KUFC10332 มีการสร้างบริเวณใสของอาหารวุ้นรอบโคโลนี เท่ากับ 39.33 มิลลิเมตร เมื่ออายุ 1 วัน และเมื่อเชื้อรามีอายุ 3 วัน เชื้อราที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ดีที่สุด คือ *R. stolonifer* (KUFC10227 และ KUFC10244) รองลงมา คือ เชื้อรา *R. oligosporus* (KUFC10230 และ KUFC10235) และ *R. stolonifer* (KUFC10228), *R. oryzae* (KUFC10232) โดยมีการสร้างบริเวณใสได้อยู่ในช่วงระหว่าง 43 – 66 มิลลิเมตร (Table 2 และ Figure 2) จากผลการทดลองมีความสอดคล้องกับรายงานของ Domsch *et al*. (1993) ซึ่งรายงานว่า *R. stolonifer* มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เฮมิเซลลูเลส โพลีกาแลคทูโรเนส และเพคติเมธิลเอสเตอเลส ในขณะที่เชื้อรา *R. oryzae* มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์โปรติเนส โพลีกาแลคทูโรเนส และไลเปส จากรายงานของ Polrak and Suwazono (2011) พบว่าเชื้อรา *Rhizopus* หลายชนิดมีความสามารถในการผลิตกรดอินทรีย์ได้หลายชนิด นอกจากนี้ Srisupapakdee and Kongkiattikajorn (2014) พบว่าเชื้อรา *R. microsporus* สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอทานอลได้ดี

ส่วนผลการทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ไคติเนส พบว่ารา *Rhizopus* spp. ทั้ง 8 ไอโซเลท พบการผลิตเอนไซม์ไคติเนส หลังจากบ่มเชื้อราที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน โดยเชื้อรา *R. stolonifer* KUFC10234 พบบริเวณที่มีการผลิตเอนไซม์ไคติเนส จะเปลี่ยนสีอาหารเป็นสีม่วงเท่ากับ 76.22 มิลลิเมตร (Table 2 และ Figure 2) ในขณะที่เชื้อรา *R. stolonifer* ไอโซเลทอื่น เช่น KUFC10236 และ KUFC10244 ไม่พบการผลิตเอนไซม์ไคติเนส ส่วนของเชื้อรา *R. stolonifer* (KUFC10227 และ KUFC10228) *R. oryzae* (KUFC10232) และ *R. oligosporus* (KUFC10230 และ KUFC10235) พบการผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้เช่นเดียวกัน (Table 2 และ Figure 2) โดยผลการศึกษานี้มีความสอดคล้องกับรายงานของ Chen *et al*. (2013) ซึ่งพบว่ามีการผลิตเอนไซม์ไคติเนสจากราเชื้อ *R. oryzae* ATCC200756

Table 2 Screen of cellulase and chitinase of *Rhizopus* spp.

Rhizopus species	KUFC	The diameter of the clear zone (mm)			
		cellulase		chitinase	
		1 day	3 days	1 day	3 days
R. stolonifer	10227	20.77 ± 9.21[cd]	78.77 ± 2.11[a]	0 ± 0	40.88 ± 39.42[ab]
	10228	14.44 ± 7.69[cd]	43.77 ± 27.91[b]	0 ± 0	51.33 ± 44.45[ab]
	10234	15.66 ± 0.33[cd]	20.00 ± 0[c]	0 ± 0	76.22 ± 1.34[a]
	10236	12.22 ± 0.69[d]	18.00 ± 1.73[c]	0 ± 0	0 ± 0[b]
	10244	35.11 ± 3.09[ab]	77.11 ± 1.95[a]	0 ± 0	0 ± 0[b]
R. oryzae	10232	39.33 ± 0.66[a]	66.00 ± 3.21[a]	0 ± 0	40.77 ± 3.98[ab]
R. oligosporus	10235	25.55 ± 10.12[bc]	74.44 ± 3.68[a]	0 ± 0	53.11 ± 45.99[ab]
	10230	23.55 ± 4.47[c]	77.11 ± 2.58[a]	0 ± 0	41.66 ± 39.40[ab]

* No difference was statistically significant when compared with isolates vertically ($P < 0.05$); The value shown is the average ± standard deviation

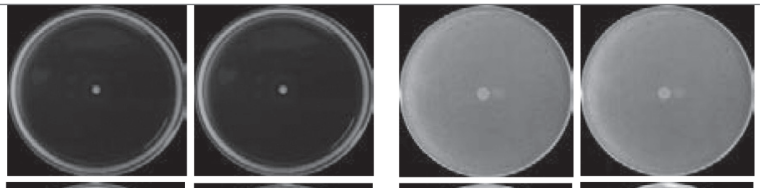
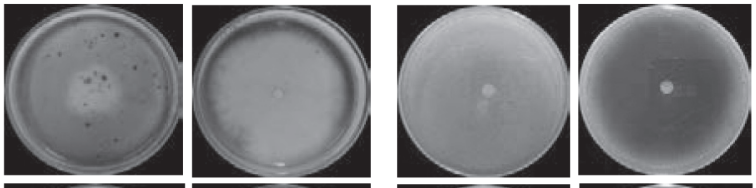
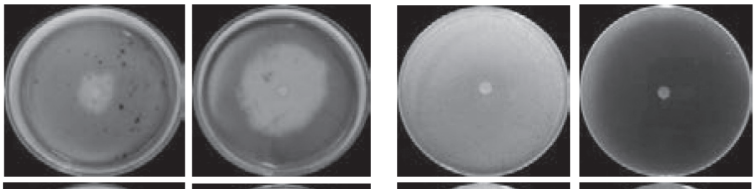
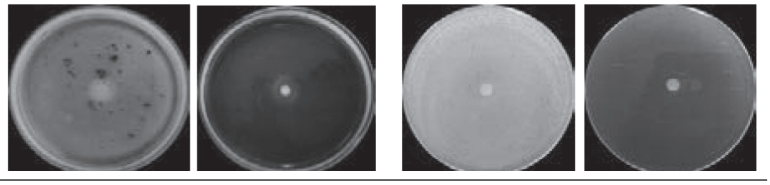
Rhizopus species	KUFC	Clear zone			
		cellulolytic		chitinolytic	
		1 day	3 days	1 day	3 days
control					
R. stolonifer	10227				
R. stolonifer	10228				
R. stolonifer	10234				

Figure 2 Clear zone formed by *Rhizopus* spp. in CMC and CA

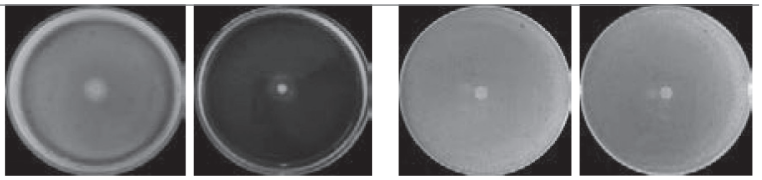
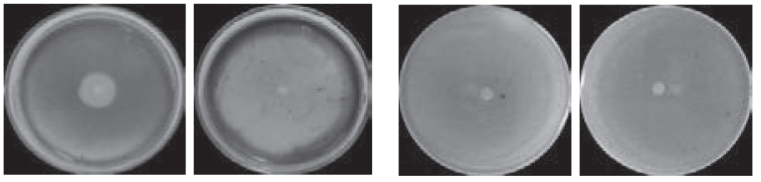
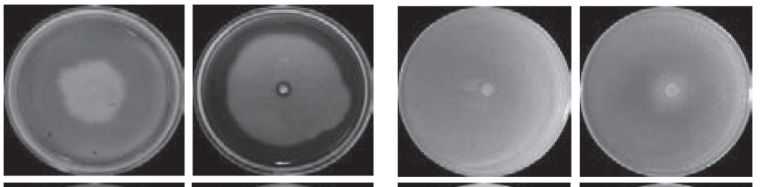
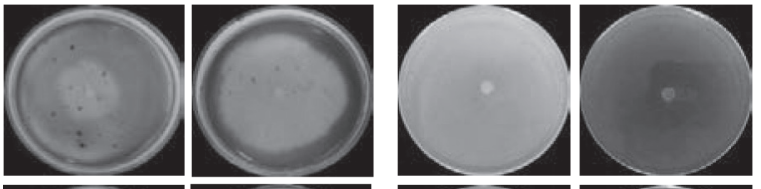
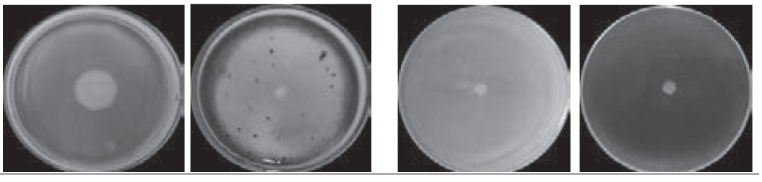
Rhizopus species	KUFC	Clear zone			
		cellulolytic		chitinolytic	
		1 day	3 days	1 day	3 days
R. stolonifer	10236				
R. stolonifer	10244				
R. oligosporus	10232				
R. oligosporus	10235				
R. oligosporus	10230				

Figure 2 (Continue)

สรุป

การแยกเชื้อรา *Rhizopus* spp. จากตัวอย่างดิน พืช และอาหาร สามารถแยกเชื้อรา *Rhizopus* spp. ได้จำนวน 24 ไอโซเลท จัดจำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ 3 ชนิด ได้แก่ *R. oligosporus*, *R. oryzae* และ *R. stolonifer* เชื้อราที่พบมากที่สุด คือ *R. stolonifer* รองลงมาคือ *R. oryzae* และ *R. oligosporus* ตามลำดับ โดยเชื้อรา *R. stolonifer* นั้นสามารถแยกจากตัวอย่างดินได้มากกว่าตัวอย่างพืช เมื่อศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไคติเนส จากเชื้อรา *Rhizopus* ทั้ง 8 ไอโซเลท (KUFC10227, 10228, 10234, 10236, 10244, 10232, 10235 และ 10230) พบว่าเชื้อราแต่ละไอโซเลทมีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงในระดับใกล้เคียงกัน ยกตัวอย่างเช่น เชื้อรา

R. stolonifer (KUFC10227 และ KUFC10244) และ *R. oligosporus* (KUFC10230 และ KUFC10235) ส่วนเชื้อรา *R. stolonifer* (KUFC10234) สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้มากที่สุดเมื่อบ่มเชื้อราไว้ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ในขณะที่เชื้อรา *R. stolonifer* (KUFC10236 และ KUFC10244) สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสแต่ไม่พบการผลิตเอนไซม์ไคติเนส

เอกสารอ้างอิง

Agrawal, T. and A.S. Kotasthane. 2012. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. Springerplus 1(73): 1–10.

Calcagno, A., J. Larrondo, M. Agut and M.A. Calvo. 1997. Chitinase activity of filamentous fungi. J. Microbiol. 92(370): 59–61.

Cao, J., D. Hou, J. Lu, L. Zhu, P. Zhang, N. Zhou and K. Chen. 2016. Anti-tumor activity of exopolysaccharide from *Rhizopus nigricans* Ehrenb on S180 tumor-bearing mice. Bioorg. Med. Chem. Lett. 26(8): 2098–2104.

Choi, Y.H., D.H. Choi, E.H. Park and M.D. Kim. 2016. Isolation of potent amylolytic fungus *Rhizopus oryzae* from Nuruk. Microbiol. Biotechnol. Lett. 44(3): 376–382.

Chen, W.M., C.S. Chen and S.T. Jiang. 2013. Purification and characterization an extracellular chitinase from *Rhizopus oryzae*. J. Mar. Sci. Technol. 21(3): 361–366.

De Hoog, G.S., J. Guarro, J. Gené and M.J. Figueras. 2000. Atlas of Clinical Fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht. The Netherlands. 1,160 pp.

Dethoup, T. and L. Manoch. 2010. Study of thermophilic and thermotolerant fungi from soils and agricultural wastes. p. 523–529. *In* Proceeding of the 48th Kasetsart University, Annual Conference (Plants), Bangkok. (in Thai)

Domsch, K.H., W. Gams and T.H. Anderson. 1993. Compendium of Soil Fungi. Volume I. IHW–Verlag. Germany. 860 p.

Fernandes, E.G., H.M. Valerio, T. Feltrin and S.T.V.D. Sand. 2012. Variability in the production of extracellular enzymes by entomopathogenic fungi grown on different substrates. Braz. J. Microbiol. 19: 827–833.

Fong, Y.K., S. Anuar, H.P. Lim, F.Y. Than and F.R. Sanderson. 2000. A modified filter paper technique for long–term preservation of some fungal cultures. Mycologist. 14(3): 127–130.

Heitman, J., J.W. Kronstad, J.W. Taylor and L.A. Casselton. 2007. Sex in Fungi: Molecular Determination and Evolutionary Implications. American Society for Microbiology. 542 p.

Jeamjitt, O., L. Manoch, N. Visarathanonth, C. Chamswarng and S. Pikulklin. 2007. Coprophilous fungi and antagonistic effect of *Sordaria fimicola* against plant pathogenic fungi *in vitro*. p. 686 – 692. *In* Proceedings of the 45th Kasetsart University Annual Conference, Bangkok. (in Thai)

Jennessen, J., J. Schnürer, J. Olsson, R.A. Samson and J. Dijksterhuis. 2008. Morphological characteristics of sporangiospores of the tempe fungus *Rhizopus oligosporus* differentiate it from other taxa of the *R. microspores* group. Mycol. Res. 112(5): 547–563.

Jin, B., F. Zepf, Z. Bai, B. Gao and N. Zhu. 2016. A biotech–systematic approach to select fungi for bioconversion of winery biomass wastes to nutrient-rich feed. Process Saf. Environ. Prot. 103: 60–68.

Karmee, S.K. 2016. Preparation of biodiesel from nonedible oils using a mixture of used lipases. Energy Sourc. A, Recovery Util Environ. Effects. 38(18): 2727–2733.

Kirk, P.M., P.F. Cannon, D.W. Minter and J.A. Stalpers. 2008. Dictionary of the Fungi. 10th edition. Ria Christie Collections, Uxbridge, United Kingdom. 784 p.

Kupski, L., M.A.D.C. Silvello, M.R.V. Fontes, T.S. Lima, H. Treichel and E.B. Furlong. 2015. *R. oryzae* cellulases: A new approach to degrading lignocellulosic material. J. Food Biochem. 39(2): 129 – 138.

Manoch, L., C. Chana, S. Somrithipol and S. Kosol. 1996. Myxomycetes hyphomycetes and coprophilous fungi from Huay Kha Khang wildlife sanctuary. p. 444–452. *In* Proceeding of the 35th Kasetsart University, Annual Conference (Plants), Bangkok. (in Thai)

Manoch, L., K. Jaroenthai, K. Busarakam, P. Athipunyakom, A. Somrith and O. Jeamjitt. 2001. Plant pathogenic, endophytic and soil fungi in Thailand. p. 502–510. *In* Proceeding of the 39th Kasetsart University, Annual Conference (Plants), Bangkok. (in Thai)

Mukhtar, H., S. Khursheed, I.U. Haq, M.W. Mumtaz, U. Rashid and S.I.A. Resayes. 2016. Optimization of lipase biosynthesis from *Rhizopus oryzae* for biodiesel production using multiple oils. Chem. Eng. Technol. 39(9): 1707–1715.

Mudaliyar, P. and C. Kulkarni. 2012. Screening of novel substrates for lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. Int. J. Life Sci. Pharma. Res. 2(1): 122–127.

Nguyen, N.V., Y.J. Kim, K.T. Oh, W.J. Jung and R.D. Park. 2008. Antifungal activity of chitinases from *Trichoderma aureoviride* DY–59 and *Rhizopus microsporus* VS–9. Curr. Microbiol. 56(1): 28–32.

Pandey, A.K., G. Edgard and S. Negi. 2016. Optimization of concomitant production of cellulase and xylanase from *Rhizopus oryzae* SN5 through EVOP–factorial design technique and application in sorghum stover based bioethanol production. Renew. Energy 98: 51–56.

Petersen, J.H. 2012. The Kingdom of Fungi. Princeton University Press, New Jersey, USA, 272 pp.

Polrak, S. and W. Suwazono. 2011. Screening of *Rhizopus* spp. that have ability to hydrolyze cassava starch from cassava solid waste and soil. p. 1594–1600. *In* Proceeding of the 8th National Kasetsart University Kamphaeng Saen confernce, Nakhon Pathom. (in Thai)

Pointing, S.B. 1999. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. Fungal Divers. 2: 17–33.

Riley, T.T., C.A. Muzny, E. Swiatlo and D.P. Legendre. 2016. Breaking the mold: A review of mucormycosis and current pharmacological treatment options. Ann. Pharmacother. 50(9): 747–757.

Saito, K., Y. Hasa and H. Abe. 2012. Production of lactic acid from xylose and wheat straw by *Rhizopus oryzae*. J. Biosci. Bioeng. 114(2): 166–169.

Samson, R.A., E.S. Hoekstra, J.C. Frisvad and O. Filtenborg. 2002. Introduction to food-and airborne fungi. 6thedition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht. The Netherlands. 389 p.

Smith, D. and A.H.S. Onions. 1994. The Preservation and Maintenance of Living Fungi. 2nd edition. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 132 p.

Spatafora, J.W., G.L. Benny, K. Lazarus, M.E. Smith, M.L. Berbee, G. Bonito, N. Corradi, I. Grigoriev, A. Grygansky, T.Y. James, K.O. Donnell, R.W. Roberson, T.N. Taylor, J. Uehling, R. Vilgalys, M.M. White and J.E. Stajich. 2016. A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. Mycologia 108(5): 1028–1046.

Srisupapakdee, Y. and J. Kongkiattikajorn. 2014. Selection and Identification of cellulolytic fungi for ethanol production. p. 265–276. *In* Proceeding of the 10th Mahasarakham University, Research Conference, Mahasarakham. (in Thai)

Surawut, S., P. Sangpaiboon., W. Puckdee, D. Tongphueak, K. Rachsuwan and W. Srimala. 2010. Isolation of cellulase producing fungi in plant genetics conservation project under the royal initiation of her royal highness Princess Maha Chakri Sirindhorn Rambhai Barni Rajabhat University. p. 48 – 58. *In* Proceeding of the 5th Rajamangala University of Technology Isan, Research Conference. (in Thai)

Takaya, N., D. Yamazaki, H. Horiuchi, A. Ohta and M. Takagi. 1998. Intracellular chitinase gene from *Rhizopus oligosporus* molecular cloning and characterization. Microbiology 144: 2647–2654.

Warcup, J.E. 1950. The soil plate method for isolation of fungi from soil. Nature 166: 117–118.

Watanabe, T. 2002. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. 2nd edition., CRC Press LLC, New York. 504 p.

Watanabe, T. 2010. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. 3rd edition. CRC Press LLC, New York. 426 p.

Webster, J. and R.W.S. Weber. 2007. Introduction to Fungi. 3rd edition. Cambridge University Press, New York. 841 p.

Yu, X.W., C. Sha, Y.L. Guo, R. Xiao and Y. Xu. 2013. High–level expression and characterization of a chimeric lipase from *Rhizopus oryzae* for biodiesel production. Biotechnol. Biofuels. 6(29): 1–12.

Yanai, K., N. Takaya, N. Kojima, H. Horiuchi, A. Ohta and M. Takagi. 1992. Purification of two chitinases from *Rhizopus oligosporus* and isolation and sequencing of the encoding genes. J. Bacteriol. 174: 7398–7406.

Zheng, R.Y., G.Q. Chen, H. Huang and X.Y. Liu. 2007. A monograph of *Rhizopus*. Sydowia 59(2): 273–372.